

Определение безвредности гликопептидов молочнокислых бактерий на лабораторных животных

Софронова О.В., Полякова Л.Л., Овчарова А.Н.

ВНИИФБиП животных – филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства –
ВИЖ им. Академика Л.К. Эрнста», Боровск, Калужской обл.

Резюме. Изучение острой токсичности и аллергенности гликопептидов молочнокислых бактерий на мышах и кроликах. При современном уровне физического, химического и биологического загрязнения окружающей среды домашние и сельскохозяйственные животные не в меньшей, если не в большей, степени чем люди, страдают от вторично индуцированного иммунодефицита – разбалансировки нормального функционирования иммунной системы. Это приводит к существенному снижению общей сопротивляемости организма животного к различным заболеваниям вирусной и бактериальной природы. Восстановить нормальное функционирование иммунной системы животного можно с помощью иммуномодуляторов, действующим началом которых является синтезированный из природных компонентов гликопептид – универсальный структурный фрагмент оболочки клеток молочнокислых бактерий, взаимодействующий с иммунной системой животного организма.

Ключевые слова: гликопептиды; молочнокислые бактерии; среднесмертельная доза; токсичность и аллергенность

Для цитирования:

Софронова О.В., Полякова Л.Л., Овчарова А.Н. Определение безвредности гликопептидов молочнокислых бактерий на лабораторных животных // *Фармакокинетика и фармакодинамика*. – 2019. – № 2. – С. 59–63. DOI: 10.24411/2587-7836-2019-10049.

Determination of the safety of glycopeptides lactic acid bacteria in laboratory animals

Sofronova OV, Polyakova LL, Ovcharova AN

All-Russian Research Institute of Physiology, Biochemistry and Nutrition of animals – branch of Federal state budgetary scientific institution "Federal Research Center Livestock – AUIAB Academician LK Ernst", Borovsk, Kaluga region, Russian Federation

Resume. The study of acute toxicity and allergenicity glycopeptides lactic acid bacteria in mice and rabbits. At the present level of physical, chemical and biological pollution of the environment, domestic and farm animals in no less, if not more than people, suffer from secondary induced immunodeficiency – an imbalance in the normal functioning of the immune system. This leads to a significant reduction in the overall resistance of the animal to various diseases of a viral and bacterial nature. The normal functioning of the animal's immune system can be restored with the help of immunomodulators, the active principle of which is the glycopeptide synthesized from natural components – a universal structural fragment of the lactic acid bacteria cell membrane that interacts with the immune system of the animal organism.

Keywords: glycopeptides; lactic acid bacteria; the medium lethal dose; toxicity and allergenicity

For citations:

Sofronova OV, Polyakova LL, Ovcharova AN. Determination of the safety of glycopeptides lactic acid bacteria in laboratory animals. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2019;2:59–63. (In Russ). DOI: 10.24411/2588-0519-2019-10049.

Введение

Гликопептиды повышают общую сопротивляемость организма животного к патогенному фактору, прежде всего за счёт активации клеток фагоцитарной системы иммунитета (нейтрофилов и макрофагов). Последние путём фагоцитоза уничтожают патогенные микроорганизмы и, в то же время, секретируют медиаторы естественного иммунитета – цитокины, которые, воздействуя на широкий спектр клеток-мишеней, вызывают дальнейшее развитие защитной реакции организма [1–2].

Препарат, создаваемый на основе гликопептидов молочнокислых бактерий, планируется применять для профилактики и лечения инфекционных заболеваний; для снятия поствакцинальных осложнений и стрессового состояния [3].

Исследование токсических свойств синтетических и природных гликопептидов, проведённое в 70–80-е годы прошлого столетия, привело к созданию ряда синтетических фармацевтических препаратов нового класса – иммуномодуляторов. Учитывая высокую токсичность синтетических гликопептидов, нами были проведены дополнительные исследования безвредности природных гликопептидов, выделенных из различных видов молочнокислых бактерий [4–5].

Проведённые исследования показали значительно более низкую токсичность и аллергенность природных гликопептидов по сравнению с синтетическими фармакопейного качества.

Гликопептиды – это один из компонентов клеточной стенки бактерий, в частности, лактобацилл. Природные состоят из гликозидной (N-ацетил глюкозаминил - N'-ацетилмурамил) и пептидной части.

Аминокислотный состав пептидной части, выделенных из одного ряда лактобактерий (палочкообразных) содержит от двух (обязательных — L — аланил — D — изоглутамин) до семи аминокислот. Состав синтетических гликопептидов — строго определён как гликозидной частью, выделяемой из стенок бактерий, так и двумя «пришитыми» аминокислотами L — аланил и D — изоглутамин.

Целью настоящей работы является изучение токсичности и аллергенности природных гликопептидов молочнокислых бактерий на лабораторных животных.

Материалы и методы

Исследования выполнены во ВНИИ физиологии, биохимии и питания сельскохозяйственных животных в соответствии с «Инструкцией о гигиенических требованиях к новым препаратам химического и биологического синтеза, предполагаемым для использования в составе рациона или для консервации кормов сельскохозяйственных животных, продукция от которых идёт в пищу населения» [8] (утверждена 14 декабря 1981 г.) и «Методическими указаниями по определению токсических свойств препаратов, применяемых в ветеринарии и животноводстве» [9].

Исследования были проведены на мышах и кроликах.

При изучении патогенности, определении средней смертельной дозы, токсичности и токсигенности гликопептидов эксперименты проводили на мышах обоего пола со стандартной живой массой тела 22–25 г.

Мышей содержали в виварии института в стандартных клетках, они получали полноценный рацион (ОР), состоящий из специального комбикорма ПК-121-1 (для лабораторных мышей и крыс) по 10 г на голову в сутки.

Определение среднесмертельной дозы. Из мышей было сформировано 4 группы по 10 особей в каждой группе. Контрольная (1-ая) группа получала ОР (добавок не получала), изучаемый препарат вводили с кормом в дозах: 0,05 мг/мышь (2-я группа — рекомендуемая доза), 0,5 мг/мышь (3-я группа — десятикратная доза) и 5,0 мг/мышь (4-я группа — стократная доза) на протяжении 7 суток.

Аналогично проводились испытания инъекционного препарата. Из мышей было сформировано 4 группы по 10 особей в каждой (5 самок и 5 самцов). Подопытным мышам (6–8-я группы) внутрибрюшинно вводили препарат в рекомендуемой, десятикратной и стократных дозах в объёме 0,5 мл, а контрольным животным (5-я группа) вместо препарата вводили стерильный изотонический раствор натрия хлорида в дозе 0,5 мл.

За животными велись наблюдения в течение 30 сут. после введения препарата и учитывалась их сохранность, общее состояние и внешний вид.

Определение острой токсичности (LD_{50}) препарата при введении его в желудок, было проведено на серых мышах. Десяти мышам (5 самок и 5 самцов) вместе с гранулами давали по 1,0 мл раствора препарата на

мышь с концентрацией 0,5 мг/мышь. Препарат скармливали в течение 10 дней, а наблюдение за животными велось в течение 2 недель.

Второй этап исследований токсичности гликопептида выполнен в виварии института на молодняке кроликов 2-месячного возраста.

Для изучения токсичности кролики породы калифорнийская по принципу парных аналогов были разделены на четыре группы по шесть животных в каждой. Первая группа получала ОР, состоящий из 150 г разнотравного сена и 200 г полнорационных гранул. Животные 2-, 3- и 4-й групп дополнительно к ОР в течение 7 дней получали по 1 мл раствора препарата: 2-я группа в количестве 0,8 мг на животное (рекомендуемая доза); 3-я группа — 8 мг (десятикратная доза), 4-я группа — 80 мг/животное (стократная доза).

Опыт продолжался 1,5 месяца. На протяжении всего опыта ежедневно осуществлялся контроль за общим состоянием животных, учитывали потребление ими кормов и проводили взвешивание кроликов и отбор крови до и после скармливания препарата [2].

Местное токсическое действие гликопептидов определяли путём нанесения раствора на кожу [1]. При постановке кожной пробы шерсть на боку выстригали на площади 6×9 см и двукратно с интервалом в 24 ч втирали в кожу раствор препарата, а контрольным животным втирали в кожу воду. Учёт реакции проводили ежедневно в течение 4 суток. До и после нанесения препарата измеряли толщину кожной складки.

Для изучения аллергенных свойств препарата в опыт были взяты те же животные, на которых испытывалось местное токсическое действие на кожу (по 4 кролика из контрольной и опытной групп). Кроликам на один и тот же выстриженный участок кожи наносили путём втирания на протяжении 8 сут. раствор препарата в концентрации 0,8 мг/мл. Через 14 сут. после последней аппликации гликопептида на кожу свежесстриженного участка спины этим же животным вновь втирали препарат в той же концентрации. Учёт реакции проводили через 24 ч.

Изучение раздражающего действия на конъюнктиву глаза. Для внесения раствора препарата в конъюнктивальный мешок кролику оттягивали верхнее веко и закапывали из пипетки 1–2 капли раствора препарата (без твёрдых частиц), а контрольным кроликам идентично вводили стерильную воду. В каждой группе было по 6 кроликов. Учёт реакции проводили ежедневно в течение 6 сут.

Результаты исследований и обсуждение

В последнее время появился интерес к иммуномодуляторам — гликопептидам как синтетическим, так и натуральным, выделенным из различных молочнокислых бактерий. В 1974 г. F. Lederer, et al. [10] обнаружили, что такие сравнительно небольшие по молекулярной массе соединения, такие как мурамилдипептид (MDP),

обладает такими же иммуномодулирующими свойствами, как адьювант Фрейда, что привело к производству новых иммуномодуляторов на его основе.

Одновременно болгарские учёные выделили биологически активные соединения из лизоцимного гидролизата клеток *Lactobacillus bulgaricus*. Выделенный препарат, названный бластолизин, используется в медицине и обладает противоопухолевыми свойствами. В совместном исследовании болгарских и московских учёных при изучении гликопептида бластолизина установлена его структура [13]. Этот гликопептид представляет собой дисахарид пентапептид, в котором пептидная часть состоит из следующей последовательности аминокислот: L-Ala-D-Glu-L-Lys-D-Asp-D-Ala. Начальная часть молекулы гликопептида установленной структуры представляет собой GMDP. Московскими учёными ИБХ им. Шемякина впервые был синтезирован GMDP, изучены его свойства и установлено, что препарат обладает противоопухолевой активностью аналогичной MDP [11].

Дальнейшие исследования: доклинические испытания, лекарственная форма и масштабирование технологии осуществлены в Латвии Институтом органического синтеза (г. Рига) и НПО «Биолар» (г. Олайне).

В мире были получены два фармацевтических препарата: Ромуртид – аналог MDP, производимый в Японии, и Ликопид – аналог GMDP, производимый в России, а также ветеринарный препарат Гликопин (аналог GMDP) – производитель ЗАО «Пептек» (Россия).

Следует отметить, что средняя смертельная доза (LD_{50}), характеризующая токсичность препарата, равна для MDP (Ромуртид) и GMDP (Ликопид и Гликопин) 25 и 100 мг/кг, соответственно [12, 14].

По нашему мнению, необходимо дальнейшее исследование природных гликопептидов из молочнокислых бактерий, включая их выделение и характеристику свойств. Такие препараты могут быть менее токсич-

ными, более дешевыми и найти широкое применение в качестве добавки для укрепления защитных сил организма как человека, так и животных.

Проведенные исследования показали, что применение гликопептидов молочнокислых бактерий в кормлении мышей и молодняка кроликов во всех использованных дозах (рекомендуемая, десяти- и стократная) не вызывало гибели подопытных животных (табл. 1). Не наблюдалось также каких-либо отклонений в их общем состоянии, внешнем виде, поведении и потреблении корма. Основные параметры крови животных контрольной и опытных групп находились в пределах физиологической нормы, лейкоцитарная формула во всех группах соответствовала лейкограмме здоровых животных.

Изучение раздражающего действия на конъюнктиву глаза и оценка аллергенности.

При определении воздействия гликопептида на слизистые оболочки глаз кроликов каких-либо изменений со стороны конъюнктивы, роговицы и зрачка не обнаружено. Не было гиперемии слизистой, отёчности или гнойных истечений из глаза.

Отсутствовало и местное токсическое действие изучаемого препарата при его нанесении на кожу кролика. Не было утолщения кожной складки после втирания препарата; болезненность, припухлость, повышение температуры в месте нанесения отсутствовали.

Как показали дальнейшие исследования препарата, то он не проявлял аллергенных свойств: на месте нанесения препарата в соответствии с существующей методикой аллергической реакции в виде инфильтрации, изъязвления, некрозов ткани не наблюдалось.

Заключение

В настоящей работе была изучена безвредность гликопептидов молочнокислых бактерий. Исходя из

Таблица 1

Определение безвредности гликопептида для лабораторных животных (n*/n**)

Вид животных	Путь введения микроорганизмов	Контроль	Испытуемые дозы препарата, мг/гол		
			рекомендуемая доза	десятикратная доза	стократная доза
Определение среднесмертельной дозы					
Мыши	Внутрибрюшинно	*10/0**	10/0	10/0	10/0
	С кормом	10/0	10/0	10/0	10/0
Определение токсичности					
Мыши	С кормом	10/0	–	10/0	–
Кролики	С кормом	6/0	6/0	6/0	6/0
Местное токсическое и аллергенное воздействие					
Кролики	В конъюнктивный мешок	6/0	–	6/0	–
	Втирание в кожу	6/0	–	6/0	–
	Аллергенность	6/0	–	6/0	–

Примечания: * – число животных в группе; ** – число погибших животных или давших реакцию на введение препарата.

полученных данных, изучаемый нами препарат не оказывает токсичного, токсигенного и аллергенного действия на организм лабораторных животных, не раздражает неповрежденные слизистые оболочки.

Значения средней смертельной дозы (LD_{50}) для исследуемых природных гликопептидов из различных видов лактобактерий (*Lactobacillus bulgaricus*, *L. Acidophilus*, *L. Plantarum*) в эксперименте определить

не удалось, в связи с отсутствием гибели животных. Для синтетических гликопептидов MDP и GMDP LD_{50} составляет 25 мг/кг и 100 мг/кг, соответственно.

По совокупности полученных данных следует, что ни один из гликопептидов молочнокислых бактерий не токсичен для лабораторных животных, и изучаемый препарат может быть отнесён к четвёртому классу опасности, т. е. является безопасным для животных и человека.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Софронова Ольга Владимировна

Автор, ответственный за переписку

e-mail: sova60@rambler.ru

SPIN код: 8603-7034

н. с., кандидат технических наук
Иммунобиотехнологии и микробиологии,
ВНИИФБиП ФГБНУ ФНЦ ВИЖ
им Л.К. Эрнста, Боровск, Калужской обл.

Sofronova Olga

Corresponding author

e-mail: sova60@rambler.ru

SPIN code: 8603-7034

Research Officer, candidate of technical Sciences
of Immunobiotechnology and Microbiology, VNI-
IFBiP of the L.K. Ernst Federal Science Center for
Animal Husbandry, Borovsk, Kaluga region

Полякова Людмила Леонидовна

SPIN код: 5853-4527

м. н. с., Иммунобиотехнологии и
микробиологии, ВНИИФБиП ФГБНУ ФНЦ
ВИЖ им Л.К. Эрнста, Боровск, Калужской обл.

Polyakova Lyudmila

SPIN code: 5853-4527

Junior researcher of Immunobiotechnology and
Microbiology, VNIIFBiP of the L.K. Ernst Federal
Science Center for Animal Husbandry», Borovsk,
Kaluga region

Овчарова Анастасия Никитовна

SPIN код: 2377-8689

с. н. с., к. б. н., Иммунобиотехнологии и
микробиологии, ВНИИФБиП ФГБНУ ФНЦ
ВИЖ им Л.К. Эрнста, Боровск, Калужской обл.

Ovcharova Anastasia

SPIN code: 2377-8689

Senior Research Officer, candidate of Biological
Sciences of Immunobiotechnology and Microbiol-
ogy, VNIIFBiP of the L.K. Ernst Federal Science
Center for Animal Husbandry», Borovsk, Kaluga
region

Литература / References

- Li X, Sun Q, Wang Y, et al. The regulatory effects of *L. plantarum* peptidoglycan microspheres on innate and humoral immunity in mouse. *J Microencapsul.* 2017;34(7):635–643. DOI: 10.1080/02652048.2017.1375037.
- Agarwal R, Bartsch SM, Kelly BJ, et al. Newer glycopeptide antibiotics for treatment of complicated skin and soft tissue infections: systematic review, network meta-analysis and cost analysis. *Clin Microbiol Infect.* 2018;24(4):361–368. DOI: 10.1016/j.cmi.2017.08.028
- Остренко К.С., Галочкин В.А., Колоскова Е.М., Галочкина В.П. Влияние нового микронутриента – аскорбата лития на стрессоустойчивость и продуктивность свиноматок // *Проблемы биологии продуктивных животных.* – 2017. – № 2. – С. 74–86. [Ostrenko KS, Galochkin VA, Koloskova EM, Galochkina VP. Vliyanie novogo mikronutrienta – askorbata litiya na stressoustojchivost' i produktivnost' svinomatok. *Problemy biologii produktivnyh zhivotnyh.* 2017;2:74–86. (In Russ).]
- Овчинников Ю.А., Иванов В.Т., и др. *Гликопептиды, обладающие противоопухолевой активностью и способ их получения* // Авторское свидетельство СССР № 727647, 1980. [Ovchinnikov YuA, Ivanov VT, et al. *Glikopeptidy, obladayushchie protivopuholevoj aktivnost'yu i sposob ih polucheniya.* Avtorskoe svidetel'stvo SSSR №727647, 1980. (In Russ).]
- Ермолаев Е.Д., Земтурис М.М., Софронова О.В. и др. *Способ выделения O-(2-ацетамидо-2-деокси- D- глюкопиранозил) – (1-4) – 2 - ацетамидо – 3 – O - 1 – карбоксиэтил) - 2-деокси- D-глюкозы из биомассы Micrococcus lysodeikticus* // Авторское свидетельство СССР №1496229, 1985. [Ermolaev ED, Zemturis MM, Sofronova OV, et al. *Sposob vydeleniya O-(2-acetamido-2-deoksi- D- glyukopiranozil) – (1-4) – 2 - acetamido – 3 – O - 1 – karboksietil) - 2-deoksi- D-glyukozy iz biomassy Micrococcus lysodeikticus.* Avtorskoe svidetel'stvo SSSR №1496229, 1985. (In Russ).]
- Подгорнова Н.Н., Ермолаев Е.Д., Лудрика Р., и др. *Способ получения гликопептидов* // Авторское свидетельство СССР № 1705303, 1991. [Podgornova NN, Ermolaev ED, Ludrika R, et al. *Sposob polucheniya glikopeptidov.* Avtorskoe svidetel'stvo SSSR №1705303, 1991. (In Russ).]
- Lefrancier P, Derren M, Ghoay I. Apyrogenic, adjuvant active N-acetylmuramyl – dipeptides. *J. Med. Chem.* 1982;25:87–90.
- Подгорнова Н.Н. *Лабораторная методика производства GMDP* // НПО «Биолар», Олайне, Латвия: 1988. [Podgornova NN. *Laboratornaya metodika proizvodstva GMDP.* NPO «Biolar», Olajne, Latviya: 1988. (In Russ).]
- Инструкция о гигиенических требованиях к новым препаратам химического и биологического синтеза, предлагаемым для использования в составе рационов или для консервирования кормов с.-х. животных, продукция от которых идет в пищу населения. // Кн.: *Ветеринарные препараты.* Справочник. – М.: Агропромиздат. 1988. [(Instrukciya o higienicheskikh trebovaniyah k novym preparatam himicheskogo i biologicheskogo sinteza, predlagayemym dlya ispol'zovaniya v sostave racionov ili dlya konservirovaniya kormov s.-h. zhivotnyh, produkciya ot kotoryh idet v pishchu naseleniya. Kn.: *Veterinarnye preparaty.* Spravochnik. Moscow: Agropromizdat. 1988. (In Russ).]
- Методические указания по определению токсических свойств препаратов, применяемых в ветеринарии и животноводстве // Кн.: *Ветеринарные препараты.* Справочник. – М.: Агропромиздат. 1988: 239–289. [Metodicheskie ukazaniya po opredeleniyu toksicheskikh svojstv preparatov, primenyaemyh v veterinarii i zhivotnovodstve. Kn.: *Veterinarnye preparaty.* Spravochnik. Moscow: Agropromizdat. 1988. (In Russ).]
- F. Ellouz, A. Adams, R. Ciorbarn, F. Lederer. Muram peptides and lipopeptides: Studies towards immunostimulants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1974;59: 1317–1320.
- Безруков М.В. Структура активного компонента бластолизина. Синтез и свойства родственных соединений // Автореферат дисс. М.: 1987. [Bezrukov MV. *Struktura aktivnogo komponenta blastolizina. Sintez i svojstva rodstvennyh soedinenij.* Avtoreferat diss. Moscow: 1987. (In Russ).]
- Bogdanov LG, Dalev PG, et al. Antitumor glycopeptides from *Lactobacillus Bulgaricus* cell wall. *FEBS Letters.* 1975;57(3):79–86.
- Галочкин В.А., Галочкина В.П., Остренко К.С. Разработка теоретических основ и создание антистрессовых препаратов нового поколения // *Сельскохозяйственная биология.* – 2009. – № 2. – С. 43–55. [Galochkin VA, Galochkina VP, Ostrenko KS. *Razrabotka teoreticheskikh osnov i sozdanie antistressovyh preparatov novogo pokoleniya.* *Sel'skhozjajstvennaya biologiya.* 2009;2:43–55. (In Russ).]