



ФАРМАКОЛОГИЯ, КЛИНИЧЕСКАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ

УДК 616-092.4

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ БИОСПОРИНА, ИММОБИЛИЗОВАННОГО НА МИКРОКАПСУЛАХ

А.В. КОРОЧИНСКИЙ¹
И.М. ПРИВАЛОВ², Э.Ф. СТЕПАНОВА¹
А.В. СЕРГИЕНКО¹, И.А. САВЕНКО¹
Ю.А. ОГУРЦОВ¹

¹ *Пятигорская государственная
фармацевтическая академия*

² *Пятигорский государственный
гуманитарно-технологический
университет*

e-mail: a.v.korochinskii@mail.ru

Рассматриваются фармакологические исследования разработанного препарата: микрокапсул биоспорина с альгинатом натрия и активированным углем, модифицированных хитозаном. Исследуется раздражающая активность, острая токсичность и специфическая активность препарата.

Ключевые слова: микрокапсулы, пробиотики, биоспорин, фармакологические исследования.

Введение.

Вопросам микроэкологии кишечника в последние годы уделяется большое внимание врачей всех специальностей, так как 90% россиян страдают заболеваниями органов системы пищеварения, которые характеризуются хронизацией и рецидивирующим течением. Природные, техногенные, экстремальные факторы негативно воздействуют на организм, его микрофлору и приводят к синдрому нарушений микроэкологии пищеварительного тракта – дисбактериозам.

Одним из наиболее перспективных средств для лечения и профилактики дисбиотических состояний являются пробиотики [2, 3]. Они ингибируют рост патогенных микроорганизмов, обладают лакто- и бифидогенными свойствами, иммуномодулирующей активностью, стимулируют ангиогенез, увеличивают регенераторную способность тканей, нормализуют липидный и углеводный обмены в организме человека.

Широкий спектр препаратов-пробиотиков, охватывающий основные формы микроэкологических нарушений, не позволяет решить проблему массовой коррекции дисбактериозов. Основными причинами этого являются: ограниченная антагонистическая активность используемых в производстве пробиотиков штаммов, узкий спектр дисбиотической коррекции препаратов, низкая приживляемость в кишечнике и т. д. [3].

В этой связи перспективными представляются исследования по подбору оптимальных форм выпуска пробиотиков и поиску соответствующих технологий. Все больший интерес проявляется к получению инкапсулированных форм микроорганизмов, что способствует повышению стрессоустойчивости клеток в неблагоприятных условиях.

Целью работы явились фармакологические исследования разработанной лекарственной формы биоспорина, основанной на принципах иммобилизации микро-



капсулы биоспорина с альгинатом натрия и активированным углем, модифицированной хитозаном.

Материалы и методы.

Фармакологические исследования микрокапсул биоспорина с альгинатом натрия и активированным углем, модифицированных хитозаном, включали изучение раздражающей активности, острой токсичности и специфической активности препарата.

Оценку раздражающего действия препарата *in situ* проводили тестом на хорион-аллантаической оболочке куриного эмбриона, НЕТ – САМ test [1, 4]. Вещество тестировали в 48 повторностях.

Раздражающая активность *in vivo* исследовалась на переднем сегменте глаза 15 морских свинок.

Острую токсичность рассматривали в экспериментах на мышах по методу Кербера [1, 4].

Специфическая активность препарата изучалась на экспериментальной модели дисбиоза кишечника у крыс, индуцированного комбинацией антимикробных препаратов: ампициллин и метронидазол. Эксперименты проводили на 48 половозрелых белых лабораторных крысах самцах линии Вистар (масса тела 200-250 г). Содержание, питание, уход за животными и выведение их из эксперимента осуществляли в соответствии с требованиями «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу МЗ СССР от 12.08.1977 № 755). Все животные содержались в одинаковых условиях в отношении температуры, влажности и освещения, а также рациона питания (комбикорм ПК-120-1. Россия).

Результаты и обсуждение.

При нанесении на хорион-аллантаическую оболочку куриного эмбриона исследуемого препарата в чистом виде не отмечалось какого либо воздействия. Наблюдалась ненарушенная прозрачная тонкая оболочка с нормально функционирующей сетью кровеносных сосудов и капилляров. Результаты, полученные в ходе эксперимента, позволяют отнести препарат к 1 классу веществ по степени раздражения *in situ*.

Раздражающая активность *in vivo* оценивалась по степени отека и гиперемии переднего сегмента глаза морских свинок. Время оценки составляло: 30 секунд, 2 минуты, 6 часов, 24 часа. Контролем служил второй глаз животного. Результаты раздражения конъюнктивы морских свинок регистрировали в баллах по 5-балльной шкале [1].

Отек на 30-й секунде составил $0,33 \pm 0,471$ балла, гиперемия также $0,33 \pm 0,471$ балла, итого в сумме $0,66 \pm 0,471$ балла, что свидетельствует о слабом раздражающем действии. Через 2 минуты раздражающее действие составило: отек $1,0 \pm 0,0$ балла и гиперемия $1,0 \pm 0,0$ балла, суммарный показатель равен $2 \pm 0,0$ баллам, что также соответствует слабому раздражающему действию. Через 6 часов и 24 часа у всех наблюдаемых животных отек и эритема отсутствовали.

Это позволяет согласно классификации веществ по степени раздражения отнести исследуемый препарат к 1-му классу соединений, коэффициент раздражающего воздействия – $1,0 \pm 0,0$.

Острую токсичность определяли по оценке выживаемости мышей и по рассчитанной среднесмертельной дозе. В течение первых 2 часов введения препаратов в дозировке 5000 мг/кг (8×10^{10} КОЕ) не наблюдалось изменений со стороны психической деятельности животных. Снижения двигательной активности и потребления воды и пищи не происходило. Тонус скелетных мышц, реакция на тактильные, болевые, звуковые и световые раздражители была такая же, как и у интактной группы.

К окончанию первых суток животные не отличались по внешнему виду, количеству и консистенции фекальных масс, частоте мочеиспускания и характеру поведения от животных интактной группы.

При пероральном применении препарата в объемных дозах: 0,014 мл, 0,028 мл, 0,056 мл, 0,12 мл. гибели животных во всех группах не отмечалось.

Результаты, полученные в ходе эксперимента по определению острой токсичности, позволяют отнести исследуемый препарат к малоопасным веществам (4 класс опасности) [1, 4].



При проведении фармакодинамического исследования определяли специфическую активность препарата и побочные действия.

Перед проведением экспериментов животные были разделены на 4 группы: (по 12 крыс в группе): интактная, группа негативного контроля, группа сравнения, группа, получавшая микрокапсулы биоспорина. Животным опытных групп ежедневно в одно и то же время per os в течение 3 дней вводили в количестве 15 мг ампициллин (ОАО «Органика», Россия) и 10 мг метронидазол (ОАО «Ирбитский химико-фармацевтический завод», Россия), растворенного в дистиллированной воде, соответственно. Затем крысам группы сравнения с 3-го дня в течение 6 дней вводили пробиотик – бактисубтил (Сотекс, Россия).

Оценка результатов проводится на основании следующих показателей:

- характер стула;
- аппетит (количество съеденной еды);
- масса тела животных;
- гистологическая картина срезов органов животных.

Под воздействием введенных антибиотиков у опытных животных отмечались следующие симптомы: полифекалия, понос, запор или их чередование, изменение консистенции стула, ухудшение аппетита, снижение веса.

В табл. 1 представлены данные наблюдений за стулом животных каждой экспериментальной группы.

Таблица 1

**Влияние препаратов на дисбиоз крыс, индуцированный антибиотиками
(характер стула), болюсы (на 1 животное)**

	1 день	2 день	3 день	4 день	5 день	6 день	7 день	8 день
Интактная группа	27,5	25	28	28,75	27,75	25	27,5	25
Группа негативного контроля	25	33,75	жидк.	жидк.	жидк.	жидк.	жидк.	жидк.
Бактисубтил	30	32,5	жидк.	жидк.	жидк.	25	28	26,72
Микрокапсулы биоспорина с альгинатом натрия и активированным углем	26,5	25	12	18,75	27,75	25	27,5	25

Как следует из представленных данных, лечение разработанным препаратом позволило устранить диспепсические явления уже через 45-50 часов.

Под воздействием антибиотиков у всех групп животных наблюдалось резкое снижение аппетита (рис. 1).

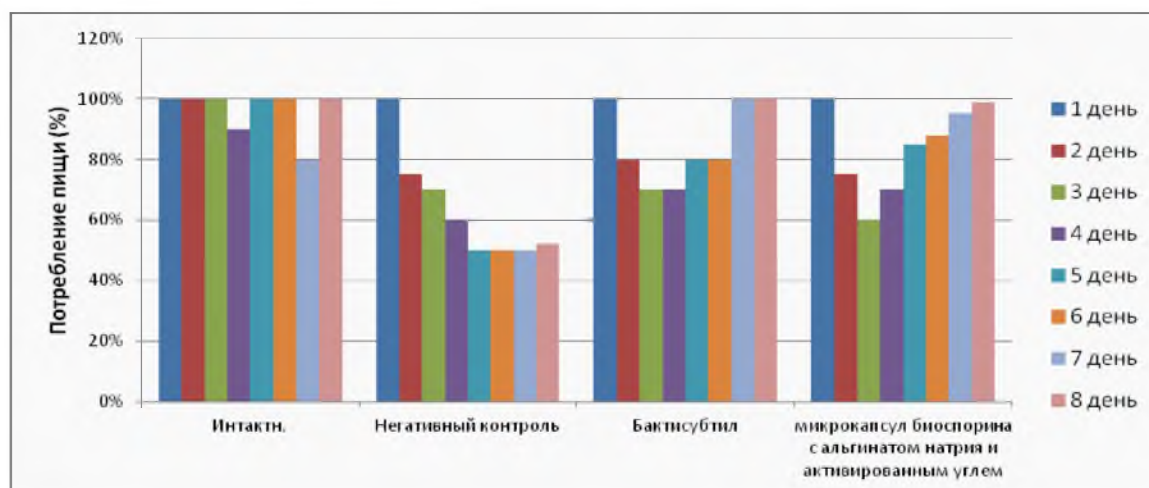


Рис. 1. Динамика потребления пищи

В дальнейшем аппетит у животных, получавших пробиотики, восстанавливался полностью. Восстановление аппетита в группе животных, получавших исследуемый препарат, происходило интенсивнее.

После введения антибактериальных препаратов на 2-3-й день исследования животные опытных групп теряли в весе до 25 г (рис. 2), в то же время животные интактной группы продолжали набирать массу тела.

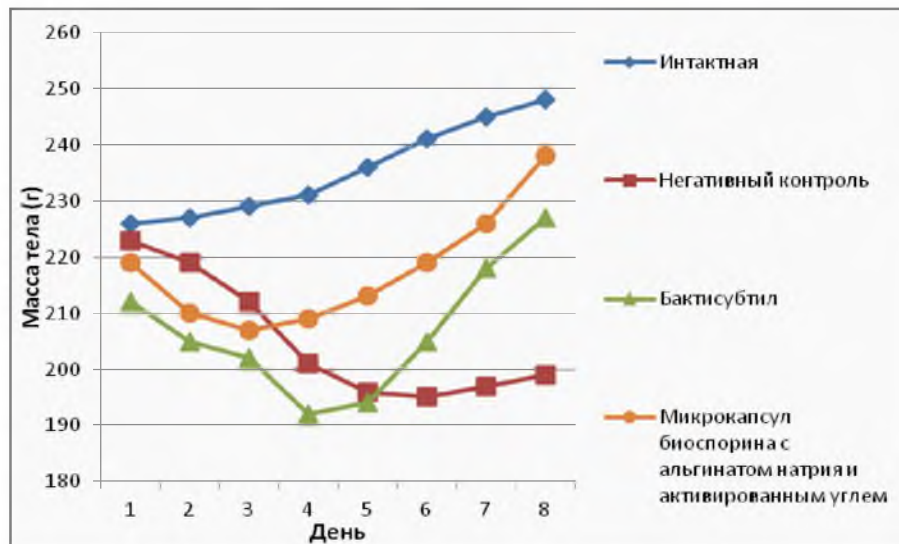


Рис. 2. Динамика изменения массы тела животных

После введения пробиотических бактерий животные стали набирать вес. В группе, получавшей иммобилизованный биоспорин, снижение массы наблюдалось на $5,5 \pm 0,12\%$, затем масса монотонно возросла на $8,7 \pm 0,31\%$ ($p=0,05$).

После эвтаназии у экспериментальных животных оценивалось состояние желудка и кишечника.

У животных группы негативного контроля желудок и кишечник вздуты, в кишечнике обнаружены вспененные желчные кислоты (пропотевшие через стенку кишечника). Внутренняя сторона плевры окрашена в желтый цвет. Выражены эритема слизистой толстой кишки, зернистость, отечность, появление геморрагий.

В группе животных, получавших микрокапсулы биоспорина с альгинатом натрия и активированным углем, модифицированные хитозаном, наблюдалась более благоприятная картина: в желудке обнаружена пища, небольшое вздутие, в кишечнике желчь, кишечник пуст. Слизистая толстой кишки не изменена.

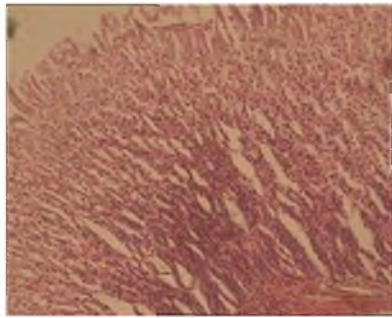
Более быстрое восстановление веса и аппетита животных группы, получавшей исследуемый препарат, можно связать с нормализацией пищеварительных функций желудочно-кишечного тракта, более интенсивными процессами разрушения и выведения антибактериальных препаратов в результате использования пробиотиков.

От каждой группы животных забирали желудок, тонкий и толстый кишечник, изучали их гистологические срезы.

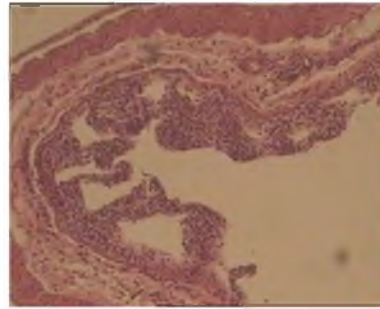
На рис. 3 представлены гистологические срезы желудка.

На гистологических срезах желудка группы негативного контроля (рис. 3б) наблюдаются значительные резкие изменения структурных и вазоцитарных взаимоотношений во всех отделах желудочно-кишечного тракта. Поверхностный однослойный эпителий полностью отсутствует. Дифференцировать отдельные железы не представляется возможным. Из секреторных клеток, выполняющих просветы желудочных желез, определяются лишь единичные с размытыми контурами и мутной цитоплазмой.

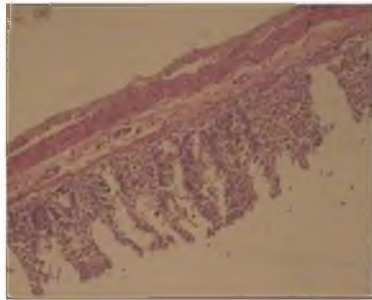
В группе животных, получавших бактисубтил, слизистая оболочка желудка заметно повреждена, однако относительно группы негативного контроля повреждения менее выражены (рис. 3в) Просматриваются расширенные просветы желудочных желез. Участков полной десквамации слизистой (что наблюдается на рис. 3б) нет. Клетки, выполняющие железы, дифференцируются, хотя часть клеток содержит признаки дистрофических и некротических изменений.



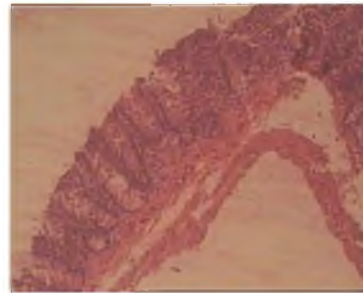
а) интактная группа



б) группа негативного контроля



в) группа, получавшая бактисубтил

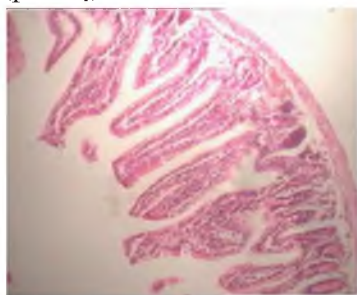


г) группа, получавшая исследуемый препарат

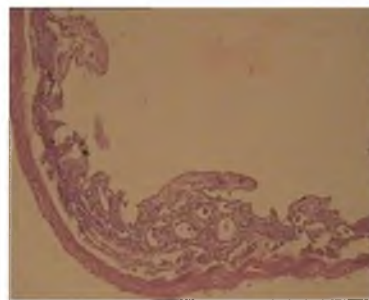
Рис.3. Гистологические срезы желудка

Структура желез слизистой оболочки желудка животных, леченных исследуемым препаратом, относительно сохранена (рис. 3г). Дифференцируются все виды железистых секреторных клеток. Отдельные желудочные железы плотно прилегают друг к другу. Различимы желудочные ямки. Однако часть железистых клеток имеет признаки мутного набухания цитоплазмы, кариорексиса и кариолизиса. При большом увеличении обнаруживаются многочисленные митозы в эпителиоцитах шеек желез, что может говорить об активных регенераторных процессах, протекающих в среде секреторных клеток

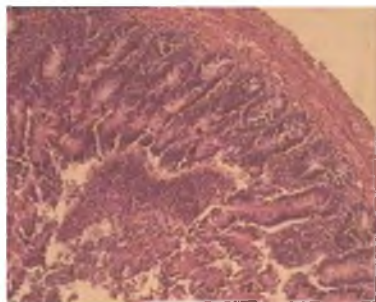
Затем был выполнен сравнительный анализ гистологических картин тонкого кишечника (рис. 4).



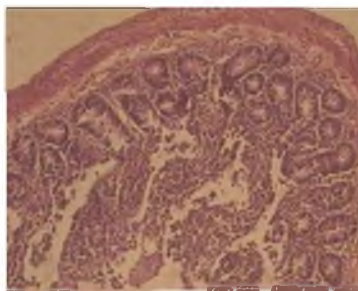
а) интактная группа



б) группа негативного контроля



в) группа, получавшая бактисубтил



г) группа, получавшая исследуемый препарат

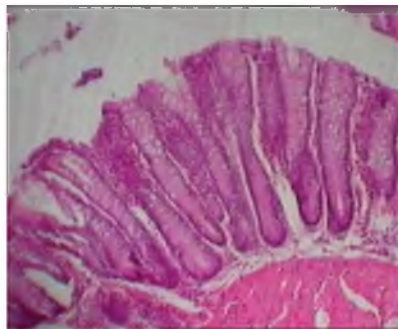
Рис. 4. Гистологические срезы тонкого кишечника

На срезах тонкого кишечника (рис. 4б) видны специфические гистологические изменения, характерные для дисбиоза. Архитектоника слизистой оболочки тонкого кишечника резко нарушена. Ворсинки слизистой полностью отсутствуют. Остатки крипт представляют бесструктурную некротизированную массу причудливых форм, которая отслаивается от мышечной пластинки по всему периметру. Клетки, выполнявшие крипты, не дифференцируются

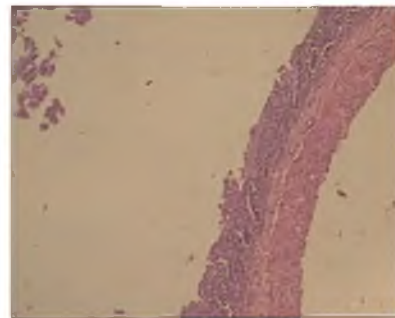
На гистологических срезах тонкой кишки животных группы, получавшей бактисубтил (рис. 4в), наблюдается умеренная степень повреждения собственной пластинки слизистой оболочки. Ворсинки укорочены и разделены искривленными дугами, придавая слизистой оболочке вид извилистой поверхности клеток. Строма инфильтрирована плазматическими клетками, эозинофилами и лимфоцитами. увеличено и число тучных клеток, часть из них разрушена до уровня крипт.

В группе животных, леченных исследуемыми микрокапсулами, отмечены незначительные изменения (рис. 4г). Ворсинки слизистой оболочки расширены или разветвлены, но не укорочены; наблюдается некоторое увеличение плотности клеток стромы.

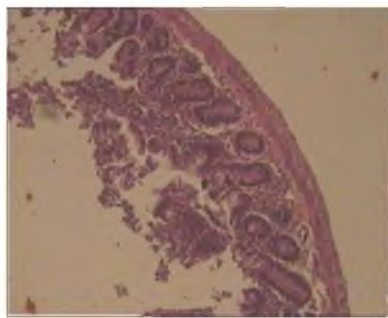
На заключительном этапе гистологических исследований рассматривались срезы толстого кишечника (рис. 5).



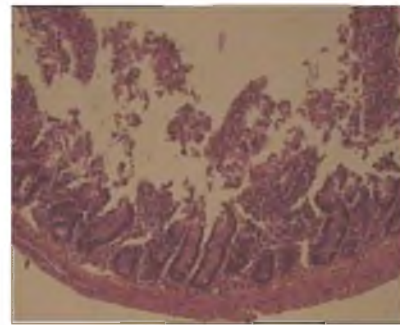
а) интактная группа



б) группа негативного контроля



в) группа, получавшая бактисубтил



г) группа, получавшая исследуемый препарат

Рис. 5. Гистологические срезы толстого кишечника

Под действием вводимых антибиотиков в слизистой оболочке толстого кишечника развился некроз по всему периметру среза толстой кишки, доходящий до мышечной пластинки. Часть некротизированных масс секвестрирована в просвет кишечника. Клетки, выполнявшие выстилку крипт, не дифференцируются (рис. 5б).

При применении бактисубтила поражение толстого кишечника значительно менее выражено, хотя признаки поверхностного некроза и истончение слизистой толстого кишечника еще заметны. Трубочатое строение желез сохранено. Здесь клетки дифференцируются по своей функции: кишечные, эпителиальные и бокаловидные (рис. 5в).

Наименьшее поражение слизистой толстого кишечника наблюдается в группе животных, получавших микрокапсулы биоспорина с альгинатом натрия и активиро-



ванным углем. Трубочатое строение желез толстого кишечника сохранено на протяжении всей толщи слизистой оболочки за исключением поверхностных зон, где наблюдаются неглубокие слои некротизированных бесструктурных масс, слущивающихся в просвет кишечника. На срезе хорошо различимы клетки желез – бокаловидные и кишечные эпителиальные. При большом увеличении в данной группе наблюдается повышенное количество митозов, что может свидетельствовать в пользу активности регенераторных процессов (рис. 5г).

Выводы.

На экспериментальных моделях в доклинических исследованиях изучены токсичность, раздражающая активность и протективные характеристики разработанного пробиотического препарата, установлена его эффективность. Микрокапсулы биоспорина с альгинатом натрия и активированным углем, модифицированные хитозаном, отвечает всем современным требованиям, предъявляемым к пробиотикам: выполняют деконтаминацию и заселение биотопа нормальными симбионтами, безопасны и имеют экспериментально подтвержденный эффект.

Литература

1. Арзамасцев, Е.В. // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Е.В.Арзамасцев, Т.А. Гуськова, И.В. Березовская [и др.]. – М., 2005. – С. 41-54
2. Костюкевич, О. П. Современные представления о микробиоценозе кишечника: дисбактериоз и его коррекция / О.П. Костюкевич // РМЖ. – 2007. 2176.www.mij.ni
3. Молохова, Е.И. Лекарственные препараты – пробиотики на российском фармацевтическом рынке / Е.И. Молохова, В.Н. Тарасевич // Фармация. – 2004. – № 3. – С. 55-58.
4. Сидоров, К.К. Методы определения острой токсичности и опасности химических веществ (Токсикология) / К.К. Сидоров. – М. : Медицина, 1990. – 171 с.

PHARMACOLOGICAL STUDIES OF THE DOSAGE FORM OF BIOSPORINA IMMOBILIZED ON MICROCAPSULES

A.V. KORochinskiy¹

E.F. STEPANOVA¹, I.M. PRIVALOV²

A.V. SERGIENKO¹, I.A. SAVENKO¹

U.A. OGURTSOV¹

¹ *Pyatigorsk State Pharmaceutical Academy*

² *Pyatigorsk State Humanities and Technology University*

e-mail: a.v.korochinskii@mail.ru

We consider the pharmacological studies of the microcapsules of biosporin with sodium alginate and activated carbon modified with chitosan. We investigate the irritating activity, acute toxicity and specific activity of the drug.

Key words: microcapsules, probiotics, biosporin, pharmacological studies.