



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **102047** (13) **C2**
(51) МПК**A61K 35/74** (2006.01)**C12N 1/20** (2006.01)**C12N 9/14** (2006.01)**C12R 1/125** (2006.01)**A61P 1/16** (2006.01)ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД**

(21) Номер заявки: **а 2012 09749**

(22) Дата подання заявки: **13.08.2012**

(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **27.05.2013**

(41) Публікація відомостей про заявку: **10.01.2013, Бюл.№ 1**

(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **27.05.2013, Бюл.№ 10**

(72) Винахідник(и):
**Соколовський Іван Іванович (UA),
Брушков Анатолій Вікторович (RU),
Гріва Геннадій Іванович (RU),
Грива Олег Іванович (UA),
Деримедвідь Людмила Віталіївна (UA),
Карпенко Наталія Володимирівна (UA),
Соколов Олег Олегович (UA),
Соколовський Сергій Іванович (UA)**

(73) Власник(и):
Соколовський Іван Іванович,
пр. Гагаріна, 104, кв. 269, м.
Дніпропетровськ, 49107 (UA),
Брушков Анатолій Вікторович,
ул. Почтовая, 23, кв. 1, г. Нахабино,
Московская обл., 143430 (RU),
Гріва Геннадій Іванович,
бул. Дм. Донського, 11, корп. 1, кв. 14, г.
Москва, 117216 (RU),
Грива Олег Іванович,
вул. О. Гончара, 15/17, кв. 53, м.
Дніпропетровськ, 49005 (UA),
Деримедвідь Людмила Віталіївна,
Московский проспект, 96, кв. 70, м. Харків,
61187 (UA),
Карпенко Наталія Володимирівна,
с. Дубники, 17, Новоград-Волинський р-н,
Житомирська обл., 11713 (UA),
Соколов Олег Олегович,
бул. Слави, 4-а, кв. 1, м. Дніпропетровськ,
49100 (UA),
Соколовський Сергій Іванович,
вул. Мандриківська, 222, кв. 21, м.
Дніпропетровськ, 49000 (UA)

(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
SU 1735359 A, 23.05.1992
SU 1210452 A1, 27.04.1996
UA 56348 C2, 15.05.2003
UA 80995, 26.11.2007
RU 2208633 C1, 20.07.2003
JP 2008-005702 A, 17.01.2008
RU 2298032 C2, 27.04.2007
UA 96709 C2, 25.11.2011
Брушков А.В., Грива Г.И., Мельников В.П.,
Суховай Ю.Г., Репин В.Е., Каленова Л.Ф.,
Бреннер Е.В., Субботин А.М., Трофимова
Ю.М., Танака М., Катаяма Т., Утсуми М.
"Реликтовые микроорганизмы
криолитозоны как возможные объекты
геронтологии" [on-line] [збережено в
Інтернет 14.09.2010] Знайдено в Інтернет:
<URL: http://www.tmnsc.ru/science-ideas/copy6_of_test >

UA 102047 C2

**(54) ГЕПАТОЗАХИСНА ТА АНТИОКСИДАНТНА АКТИВНІСТЬ ШТАМУ РЕЛІКТОВИХ БАКТЕРІЙ
BACILLUS sp. F**

(57) Реферат:

Винахід стосується використання штаму реліктових бактерій *Bacillus* sp. F як гепатозахисного та антиоксидантного засобу.

Винахід належить до біотехнологій, зокрема до промислових штамів мікроорганізмів, і отримання гепатопротекторних препаратів.

Останніми роками спостерігається інтерес до вживання в медицині лікарських речовин рослинного походження. Цілющі властивості рослин були відкриті в результаті незліченних експериментів, що виконувалися мільйонами людей протягом тисячоліть. Встановлено, що природні речовини краще, ніж хімічно синтезовані, вписуються в обмін речовин організму і володіють мінімальною побічною дією. При цьому рекордною біологічною активністю володіють види рослин, що відносяться до реліктових форм життя (принцип Г.У. Ліхошерстних - "чим стародавніше - тим активніше"). Стародавні види виробили особливі захисні механізми, що дозволяють їм, врешті-решт, ставати абсолютно стійкими в еволюційному відношенні. Логічно тому вважати, що мікроорганізми, які збереглися до наших днів, саме бактерії, можуть стати активним продуцентом біологічно активної речовини і надалі - лікувальним засобом.

Відомий штам бактерії *Bacillus megaterium*, призначений для деструкції фосфатоорганічних пестицидів (авт. свід. СРСР № 1735359, 1992 р.). Штам може виконувати важливу функцію очищення природних середовищ, але вузька направленість не дозволяє використовувати його як базу для виробництва лікарських засобів для людей і тварин.

Відомий штам бактерій *Bacillus mucilaginosus* продукт біостимулятора неспецифічного імунітету телят (авт. свід. RU 1210452, 1996 р.).

Недоліками зазначеного штаму є те, що він незадовільно росте в лабораторних умовах разом з низькою біологічною (ферментативною) активністю і складним технологічним процесом його отримання, який включає ультрафіолетове опромінення та заморожування у рідкому азоті.

Відомі штами бактерій групи *Bacillus subtilis* (патенти UA 56348, 15.05.2003 та 80995, 26.11.2007), які одержані шляхом аналітичного селекціонування та виділені із ґрунтів відповідно, і які мають імуностимулюючу та протипухлинну активність.

Відомий штам бактерії *Bacillus subtilis* P-1- переважно як продуцент протеази (патент RU 2208633, 2001 р.).

Відомий також штам бактерій *Bacillus macroides* Excel 00, виділений з міцелію лікарського гриба *Agaricus Blazei* Murill, що проявляє імунну активність і здатність перешкоджати старінню і хворобам (заявка JP 2008-005702 A, 2008 р.).

Основним недоліком вказаних штамів є тривалість процесу культивування і необхідність вирощування на дорогих живильних середовищах, що включають нестандартні і рідкісні харчові компоненти, а також нестабільність біологічних продуктів.

Відомий штам бактерій *Bacillus subtilis* 1779 (прототип), по видовій подібності найближчий до штаму, що заявляється, виділений в природних умовах, проявляючий широкий спектр активності антагоніста, низьку адгезивну здатність, імуномодулюючу активність і продукує комплекс гідролітичних ферментів (патент RU 2298032, 2007 р.).

Проте вузька сировинна база для штаму-прототипу, обмежений діапазон живильних середовищ для його культивування, відсутність даних про його гепатозахисні властивості і по фармакокінетиці в дослідженнях *in vivo* вимушують вести пошук інших штамів з більш високими споживчими характеристиками.

В Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології НАН України 03 грудня 2010 р. задепоновано новий штам реліктової бактерії *Bacillus* sp. F (реєстровий номер *Bacillus* sp. IMB B-7323), і в патенті UA96709, 2011 р. представлено технологію культивування штаму та його імуномодулюючі та геропрогекторні властивості.

Гепатозахисні властивості не виявлені.

В основу пропонованого винаходу поставлена задача застосування штаму реліктових бактерій *Bacillus* sp. F як гепатозахисного засобу.

Для вирішення поставленої задачі пропонується застосування штаму реліктових бактерій *Bacillus* sp. F, задепонованого в Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології НАН України, як гепатозахисного засобу.

Штам виділений із стародавніх багаторічномерзлих порід верхньоплейстоценового віку в геологічному оголенні Мамонтової гори (Центральна Якутія).

Штам являє собою слабо рухомі прямі палички із закругленими кінцями розмірами (1-1,2)×(3-10) мкм, по 1-2 ланцюжки і іноді до 7, ендоспори бацилярного типу, грампозитивний, психротолерантний, факультативний анаероб. На щільних живильних середовищах утворює непрозорі блискучі м'які колонії жовтуватого кольору. Зростання при температурі від +5 до +43 °C і pH 5-12.

Гепатозахисна активність штаму *Bacillus* sp. F вивчалась на моделях гострого та хронічного тетрахлорметанового гепатиту у щурів.

- Експериментальне пошкодження печінки викликали підшкірним введенням тетрахлорметану в дозі 0,2 мл/100 г протягом 60 діб. Як препарат порівняння вибрано еталонний гепатопротектор і антиоксидант силімарин під торговою маркою "Силібор" виробництва ФФ "Здоров'я" (Україна), табл. п/о по 35 мг. Штам *Bacillus* sp. F у вигляді лізату та в дозі 1 мл/кг вводили внутрішньошлунково один раз на добу протягом 2 місяців. Результати дослідів наведено у таблиці.

Показники	Інтактний контроль	Контрольна патологія	Лізат	Силібор
1	2	3	4	5
Вживаність, %	100	70*	100**	90
Масовий коефіцієнт печінки, %	2,8±0,2	5,9±0,3*	3,7±0,2*#	4,0±0,3*#
Сироватка крові				
АлАТ, мМ/год.×л	0,61±0,12	1,57±0,20*	0,73±0,14#^	1,22±0,25*
Лужна фосфатаза, мккат/л	0,64±0,19	1,43±0,21*	0,78±0,13#	0,87±0,20#
Сечовина, мМ/л	4,2±0,3	8,2±0,6*	5,5±0,4#	6,7±0,5*#
Загальний білок, г/л	68,3±1,6	51,0±2,1 *	62,7±1,0*#^	57,6±1,5*#
Холестерол, мМ/л	1,62±0,21	3,26±0,30*	2,61±0,14*#^	2,19±0,11*#
Тканина печінки				
Дієнові кон'югати, мкМ/г	8,3±0,7	14,7±1,2*	9,1±0,7#^	11,9±1,0*
ТБК-АП, мкМ/г	121,24±9,4	203,7±15,3 *	141,8±10,1#^	180,9±12,2*
Відновлений глутатіон, мМ/г	0,46±0,02	0,28±0,03*	0,51±0,03#	0,47±0,03#
Каталаза, мккат/г	0,37±0,05	0,18±0,01*	0,34±0,04#	0,38±0,04#

Примітки:

1. статистично значущі відмінності ($p < 0,05$): * - з групою інтактного контролю, # - з групою контрольної патології, ^ - з групою, лікованою силібором;
2. ТБК-АП - тіобарбітурової кислоти активні продукти.

- Стан печінки визначали за наступними показниками: виживання тварин протягом дослідів, масовий коефіцієнт печінки, рівень АлАТ, лужної фосфатази, вміст загального білка, сечовини, холестеролу у сироватці крові; рівень ТБК-Р, ДК, ВГ, каталази та глікогену в гомогенаті печінки; швидкість секреції жовчі, кількість жовчних кислот та холестеролу в жовчі.

- Як видно з таблиці, ураження печінки тетрахлоретаном супроводжувалося значним порушенням її функціонального стану. У щурів в групі контрольної патології спостерігалось збільшення МКП в 2 рази у порівнянні з групою інтактного контролю. Це свідчить про тяжку інтоксикацію і наявність запального процесу в тканині печінки, а також розвиток жирової дистрофії печінки під впливом тетрахлоретану [Гистология: учебник / под. ред. Э.Г. Улумбекова, Ю.А. Чельшева.-2-е изд., перераб. и доп. - М.: ГЭОТАР-МЕД, 2002. 672 с.]. Достовірне підвищення активності АлАТ в гомогенаті печінки у 2 рази вказувало на розвиток цитолізу гепатоцитів. Поряд із цим відзначалося також підвищення активності ЛФ у сироватці крові в 2,3 рази, що обумовлено вивільненням ЛФ із ушкоджених гепатоцитів, а також з індуктивним її синтезом у жовчних каналцях.

- Дослідження в гомогенаті печінки вмісту продуктів ВРО показало збільшення рівня ДК в 1,8 разу й ТБК-Р в 1,7 рази. При цьому істотно постраждала антиоксидантна система - вміст ВГ зменшився в 1,7 разу, а каталази - в 2 рази.

- У результаті дії тетрахлорметану відбулося порушення вуглеводного обміну, а саме спостерігалось збіднення печінки тварин глікогеном в 2,4 разу в порівнянні з його вмістом у печінці інтактних тварин. Тетрахлорметанове пошкодження печінки також супроводжувалося пригніченням білково-синтетичної функції печінки. Вміст білка в сироватці крові вірогідно знизився в 1,4 рази. Тетрахлорметан викликав також пригнічення жовчоутворювальної функції печінки: показники швидкості секреції жовчі й вміст жовчних кислот значимо зменшувалися, відповідно в 2,5 й 1,5 рази. Спостерігалось також порушення обміну холестеролу - його рівень в жовчі знизився порівняно з інтактними тваринами в 1,6 рази, вміст холестеролу в сироватці крові збільшився в 2 рази.

До кінця експерименту 30 % тварин з групи контрольної патології загинуло, що сягає рівня статистично значущої відмінності з контролем ($p < 0,05$).

Як видно з отриманих результатів, застосування лізату та референс-препарату на тлі експериментального гепатиту позитивно впливало на стан печінки тварин. МКП тварин під впливом лізату та силібору зменшився в 1,7 та 1,6 рази відповідно порівняно з аналогічним показником у тварин з групи контрольної патології.

Під дією досліджуваних препаратів спостерігали зменшення запальних процесів у печінці піддослідних тварин, про що свідчить зниження маркера цитолізу АлАТ під впливом лізату в 1,4 рази, що достовірно переважає вплив силібору, у якого відзначена лише тенденція до зниження рівню АлАТ.

Вміст холестеролу в сироватці крові при введенні лізату зменшився в 1,3 разу, під дією силібору - в 1,5 рази, що достовірно перевищує дію лізату.

Досліджувані препарати вірогідно нормалізували білково-синтетичну й глікогенутворювальну функції печінки, про що свідчить достовірне підвищення рівню загального білка в сироватці крові й глікогену в тканині органа. Так, при застосуванні лізату рівень глікогену порівняно з нелікованими тваринами збільшився в 2 рази, а при застосуванні силібору в 2,2 рази. Рівень загального білку при застосуванні лізату збільшився в 1,3 рази, а при застосуванні силібору - в 1,2 рази. Причому, якщо за впливом на рівень глікогену між досліджуваними препаратами достовірних відмінностей не визначено, то за впливом на білоксинтетичну функцію печінки лізат достовірно переважає дію референс-препарату.

На фоні застосування лізату і силібору спостерігалось зниження інтенсивності процесів ВРО, про що свідчить зменшення рівня ДК під впливом лізату - в 1,6 рази, а силібору - в 1,2 рази. Рівень ТБК-Р понизився під впливом лізату в 1,4 рази, а силібору - в 1,1 рази, що достовірно нижче, ніж в групі тварин, яких лікували лізатом. Паралельно з цим спостерігали поліпшення стану антиоксидантної системи гепатоцитів, про що свідчить підвищення вмісту ВГ та каталази під впливом досліджуваних препаратів. Так, при застосуванні лізату рівень ВГ у гепатоцитах порівняно з нелікованим контролем збільшився в 1,9 разу, а силібор збільшив його рівень у 1,8 рази. Також при застосуванні лізату спостерігали збільшення активності каталази порівняно з нелікованими тваринами в 1,9 рази. При застосуванні силібору збільшення було таким самим, достовірної різниці між ефектом обох препаратів не визначено.

При введенні досліджуваних засобів відзначали позитивну тенденцію з боку функції жовчоутворення, а саме, відновлення процесів холато- і холестерологенезу, швидкості секреції жовчі, а також зниження активності ЛФ. На тлі лізату активність ЛФ порівняно з групою контрольної патології, зменшилася в 1,8 рази, що достовірно переважає дію силібору (рівень ЛФ зменшився в 1,6 рази). На підставі аналізу впливу лізату на жовчосекреторну функцію печінки встановлено, що при застосуванні лізату швидкість секреції жовчі збільшилась в 1,9 рази. При застосуванні силібору швидкість секреції жовчі порівняно з групою контрольної патології зросла в 2,5 рази, що достовірно переважає аналогічний показник групи тварин, які отримували лізат. Під впливом лізату рівень жовчних кислот збільшився в 1,2 разу порівняно з показниками нелікованих тварин, а при застосуванні силібору в 1,3 рази.

У групах тварин, яких лікували обома досліджуваними препаратами, спостерігалась нормалізація вмісту холестеролу в жовчі майже до рівня інтактних тварин (зменшення в 1,2-1,3 рази), але дія силібору достовірно переважала дію лізат.

Всі щури в групі, що отримували лізат, вижили. При введенні силібору вижило 90 % щурів.

Таким чином, згідно з отриманими результатами експерименту, лізат переважав силібор за впливом на наступні показники: МКП, виживаність тварин, рівень АлАТ, сечовини, загального білку в сироватці крові, ДК та ТБК-АП в гомогенаті печінки щурів, але поступався референс-препарату за дією на вміст холестеролу в сироватці крові та жовчі, швидкості секреції жовчі. Це дозволяє зробити висновок, що лізат за гепатозахисною дією не поступається препарату порівняння, а навіть переважає його за протизапальною та антиоксидантною активністю.

Отримані результати підтверджені також і гістологічними дослідженнями, які свідчать про відновлення структури тканини печінки тварин, що отримували бактеріальний лізат, після її довготривалого ураження тетрахлоретаном.

Мікроскопічні дослідження мікропрепаратів печінки, пофарбованих гематоксилін-еозином, показали, що у тварин з групи інтактного контролю рисунок тканини печінки звичайний, міждолькові сполучнотканинні прошарки не виражені, тому межі дільок змазані, радіальна напрямковість печінкових балочок збережена. Зони порталних трактів не розширені, жовчні протоки визначаються слабо. Гепатоцити рівномірно забарвлені, містять чітко визначені 1-2 ядра, частина ядер з невеликою гіперхромією, ядерець переважно 1-2 на ядро. Вираженість анізонуклеоза незначна, двоядерних клітин небагато, локалізовані вони переважно

перипортально. Мікроциркуляторних порушень не виявлено. Рисунок печінкової паренхіми не змінний.

Після застосування тетрахлорметану протягом 2 місяців у щурів в паренхімі спостерігається морфологічна картина, характерна для реактивного гепатиту: дрібні вогнищеві та сливні інфільтрати, які складаються переважно з колоклітинних елементів, внутрішньодолькові некрози невеликих груп гепатоцитів із накопиченням лімфоцитів і макрофагів. Спостерігалась вогнищева інфільтрація паренхіми лімфоцитами, сливний характер інфільтратів, дрібні некрози, жирова інфільтрація гепатоцитів.

У цитоплазмі визначаються оптичні порожнечі, характерні для жирової дистрофії. Дистрофія носить переважно дрібнокрапельний характер, хоча іноді видна лише одна крупна вакуоль, яка відштовхує ядро на периферію клітини.

Як показала оглядова мікроскопія, печінка щурів, яким вводили лізат, практично мала типову для даного виду тварин морфологічну будову. Іноді клітинні інфільтрати струменями розливаються від центру до периферії дольки, не торкаючись гепатоцитів. В сусідніх з ураженими відносно збережених ділянках виявляються морфологічні маркери регенерації: гепатоцити, що мітотично діляться (це зовсім не характерно для печінки в нормі), і виражений анізонуклеоз. Мітоз гепатоциту (стрілка), виражений анізонуклеоз, радіальний напрямок печінкових балочок, гепатоцити та синусоїдальні гемокапіляри не змінені.

Сполучнотканинні прошарки між печінковими часточками не виразні. Межа їх визначена триадами. Зони триад вузькі. Часточки створені системою печінкових балочок, кожна із яких складалася з одного ряду гепатоцитів. Самі балочки розташовані достатньо регулярними радіальними тяжами. Найбільш виражено радіальний напрям балочок центрлобулярно. Гепатоцити мали характерну полігональну форму, межа їх достатньо чітка. Ядра правильної круглястої форми, розташовані у центрі клітин, звичайного розміру. Коливання розміру ядер (анізонуклеоз) виражено помірно. Переважна більшість ядер містила одне достатньо велике ядро. Доволі часто зустрічалися двоядерні гепатоцити. Цитоплазма рівномірно пофарбована, у перинуклеарній зоні видні невеликі скупчення дрібнозернистого базофільного матеріалу. Синусоїдальні гемокапіляри помірно коливалися за поширенням просвіту, як правило, не містили крові.

Таким чином, на моделі хронічного тетрахлорметанового гепатиту лізат штаму *Bacillus* sp. F виявляв суттєві гепатопротекторні та антиоксидантні властивості, за якими переважав дію референс-препарату силібору.

У роботі були використані статевозрілі білі рандомбредні щури масою 180-280 г.

Дослідження проводилися відповідно до Національних "Загальних етичних принципів експериментів на тваринах" (Україна, 2001), що відповідають положенням "Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей" (Страсбург, 1985). Процедури, що супроводжуються болем (хірургічні втручання, евтаназія, вилучення органів), проводили під наркозом (внутрішньоочередово тіопентал натрію в дозі 80 мг/кг маси тіла або етамінал натрію в дозі 40 мг/кг).

Кількісні дані обробляли за допомогою програми статистичної обробки StatPlus 2009: за критерієм t Стюдента у випадках нормального розподілу, за критерієм W. Уайта за його відсутності; внутрішньогрупові відмінності аналізували за парним критерієм Т. Вілкоксона, альтернативні (виживаність, наявність/відсутність певної ознаки) - за кутовим перетворенням Фішера (в необхідних випадках - із поправкою Ейтса); для аналізу закономірностей зв'язку між окремими показниками використовували коефіцієнт кореляції Спірмена.

Сировинна база початкового мікроорганізму на планеті практично невичерпна, тільки в Російській Федерації кріолітозона займає близько 70 % території країни, яка може бути "постачальником" і інших унікальних і поки що не відкритих реліктових мікроорганізмів. Зазначимо також, що останнім часом реліктові бактерії цього типу були виділені із більш молодих повторно-жильних льодів льодяного комплексу Якутії, із стінок підземелля Інституту мерзлотоведення ім. П.І. Мельникова в Якутську, а також із-під земляних льодів в тунелі Фокс і на золотому руднику поблизу Фербекса на Алясці.

Вважаємо, що після більш детального дослідження механізмів виживання виявленої реліктової бактерії протягом багатьох тисячоліть і дії її культури на макроорганізми в аптечних мережах Росії, України і інших країн з'являться нові препарати, які дозволять серйозно (і, можливо, кардинально) змінити стратегію лікування гепатиту.

ФОРМУЛА ВІНАХОДУ

Використання штаму реліктових бактерій *Bacillus* sp. F як гепатозахисного та антиоксидантного засобу.

5

Комп'ютерна верстка Л. Бурлак

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601