На правах рукописи

ЩЕЛГАЧЕВ Владимир Викторович

ТЕХНОЛОГИЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ПРЕПАРАТА БИОГЕЛЬ Б, ПРЕДНАЗНАЧЕННОГО ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ КОЖНЫХ ПОРАЖЕНИЙ ЖИВОТНЫХ

03.00.23 – Биотехнология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2006

Работа выполнена в ФГОУ ВПО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И. Скрябина» (ФГОУ ВПО МГАВМиБ) и Центре военно-технических проблем биологической защиты научно-исследовательского института микробиологии Министерства обороны Российской Федерации (ЦВТП БЗ НИИМ МО РФ)

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Тихонов Игорь Владимирович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Девришов Давудай Абдулсемедович;
доктор биологических наук, профессор
Рубан Евгений Александрович

Ведущая организация: Государственное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной вирусологии и микробиологии» (ГНУ ВНИИВВиМ)

Защита состоится ___ мая 2006 г. в 12.00 часов на заседании диссертационного совета Д.220.042.01 в ФГОУ ВПО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина» по адресу: 109472, Москва, ул. Академика Скрябина, 23;тел. (495) 377-93-83.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГОУ ВПО МГАВМиБ.

Автореферат разослан ___ апреля 2006 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета Т.Н. Грязнева

2006А
7292

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В настоящее время значительное место в патологии животных занимают гнойно-воспалительные заболевания кожных покровов. Среди них особое значение имеют травматические поражения кожи и связанные с ними гнойные инфекции, которые обуславливают снижение продуктивности и племенных качеств животных, осложнения родов, падеж молодняка и др. [Караваев Ю.Д. и соавт., 1999; Лопатин С.В., Самоловов А.А., 2006 и др].

В ветеринарной практике для лечения животных с ожоговыми ранами и раневой инфекцией кожи используют, как правило, антибиотики и мази, которые, при имеющихся достоинствах, обладают рядом недостатков: необходимость точного расчета доз, длительный курс лечения, высокий процент осложнений, развитие резистентности у микроорганизмов к лекарственным препаратам, что снижает эффективность их использования [Ковалев В.Ф. 1989; Тимофеев С.В., 2005].

Повышение эффективности лечения раневых инфекций может быть достигнуто применением препаратов на основе живых бактерий, обладающих широким спектром антагонистической активности в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов.

Для аэробных спорообразующих бацилл, входящих в состав таких препаратов как биоспорин, Биод-5, споробактерин, бактисубтил и др. наряду с выраженной антагонистической активностью характерны иммуномодулирующие, антиаллергические, антирадиационные и антитоксические свойства [Поберий И.А.,1996; Бакулина Л.Ф.,2001; Грязнева Т.Н., 2005]. Среди них наибольший интерес представляют B.subtilis и B.licheniformis, входящие в состав пробиотиков биоспорин и Биод-5.

Учитывая отмеченное, разработка новых лекарственных препаратов для наружного применения на основе споровых форм B.subtilis и B. licheniformis является актуальной задачей.

Цель и задачи исследований. Цель исследований - разработка технологии приготовления препарата Биогель Б для лечения кожных поражений животных.

Для достижения поставленной цели предстояло решить следующие задачи.

1. Обосновать возможность создания на основе B.subtilis и B.licheniformis препарата для лечения животных с различными поражениями кожи.

2. Разработать компонентный состав препарата Биогель Б и технологию его приготовления.

РОС. НАЦИОНАЛЬНАЯ БИБЛИОТЕКА
С.Петербург
09 №

3. Оценить свойства разработанного образца препарата Биогель Б по физико-химическим и биологическим показателям.

4. Провести экспериментальные испытания препарата Биогель Б при травматических и гнойно-некротических поражениях кожи у экспериментальных животных.

5. Оценить стабильность биологических и физико-химических показателей препарата Биогель Б в процессе хранения.

Научная новизна. Впервые на основе спорообразующих бактерий B.subtilis ВКПМ В-2335(3) и B.licheniformis ВКПМ В-2336(31) сконструирован новый препарат Биогель Б для наружного применения при травматических и гнойно-некротических поражениях кожи у животных.

Создана промышленная технология производства препарата Биогель Б в мягкой (гелевой) лекарственной форме, с использованием отечественного технологического оборудования и материалов.

Разработанная лекарственная форма препарата Биогель Б сохраняет биологическую активность не менее 24 месяцев.

Показано, что препарат Биогель Б обладает биологическими свойствами, отличающими его от других пробиотиков, что позволяет использовать его в качестве терапевтического средства при лечении травматических поражений кожных покровов (раны, ожоги) и связанных с ними гнойных осложнений, вызванных антибиотикоустойчивыми стафилококками, стрептококками, синегнойной палочкой, грибами рода Candida, энтеропатогенными штаммами эшерихий, а также ассоциациями бактерий.

Методы контроля качества Биогеля Б позволяют дать объективную оценку биологической активности бактерий-компонентов препарата и охарактеризовать качество мягкой (гелевой) лекарственной формы.

Показана высокая терапевтическая эффективность Биогеля Б при травматических поражениях кожных покровов и связанных с ними гнойных осложнениях у экспериментальных животных.

Практическая значимость работы. На базе ЦВТП БЗ НИИМ МО РФ создана аппаратурно-технологическая линия промышленного производства препарата Биогель Б для лечения кожных поражений животных.

Разработан и утвержден 29.12.2005 г. регламент производства препарата Биогель Б.

Разработаны проект технических условий «Мягкая лекарственная форма препарата Биогель Б» и проект инструкции по применению препарата Биогель Б в ветеринарии.

Разработан и утвержден 29.12.2005 г. сборник методик по контролю качества препарата Биогель Б.

Получены 3 серии препарата Биогель Б, которые прошли предрегистрационные испытания на разных видах экспериментальных животных и подтвердили соответствие показателей качества препарата требованиям ТУ.

Результаты исследований по созданию технологии производства препарата Биогель Б используются в учебном процессе в МГАВМиБ имени К.И. Скрябина при подготовке студентов по дисциплине «Биотехнология».

Апробация работы. Материалы диссертации доложены и обсуждены на научно-практической конференции «Перспективы использования эубиотика биоспорин в практике здравоохранения и военно-медицинской службы» (Екатеринбург, 1997); на III съезде итало-российского общества по инфекционным болезням «Инфекционные болезни: новое в диагностике и терапии» (Санкт-Петербург, 1998); на юбилейной научной конференции «Диагностика, лечение и профилактика опасных инфекционных заболеваний. Биотехнология. Ветеринария" (Киров, 1998); юбилейной научной конференции «Диагностика, лечение и профилактика инфекционных заболеваний. Биотехнология. Ветеринария» (Екатеринбург, 1999); научно-практической конференции «Актуальные вопросы современной медицины» (Самара, 2001); на IX Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2002); на научной конференции "Иммунология Урала" (Екатеринбург, 2003); на научной конференции Центра ВТП БЗ НИИ микробиологии МО РФ (Екатеринбург, 2003); на международной конференции «Пробиотики, пребиотики, симбиотики и функциональные продукты питания. Современное состояние и перспективы» (Москва, 2004); на юбилейной научно-практической конференции «Диагностика, лечение и профилактика опасных инфекционных заболеваний. Эпидемиология и эпизоотология. Микробиология. Биотехнология. Экология» (Екатеринбург, 2004).

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Теоретическое и экспериментальное обоснование состава и формы выпуска препарата Биогель Б для наружного применения на основе штаммов B.subtilis 3 и B.licheniformis 31.

2. Технология приготовления препарата Биогель Б в мягкой гидрофильной (гелевой) форме.

3. Результаты изучения терапевтической эффективности препарата Биогель Б при травматических и гнойно-некротических поражениях кожи животных.

Публикации. По результатам диссертации опубликовано 13 статей в сборниках научных конференций.

Объем и структура диссертации. Материалы диссертации изложены на 139 страницах и включают введение, обзор литературы, собственные исследования, обсуждение полученных результатов, выводы, данные о практиче-

ском использовании научных результатов, рекомендации по использованию научных выводов, список использованной литературы (194 источника, из них 171 работа отечественных и 23 иностранных авторов). Работа содержит 34 таблицы, 2 рисунка, 6 страниц приложений.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы и методы исследований

Работа выполнена на кафедре биотехнологии МГАВМиБ и в Центре военно-технических проблем биологической защиты НИИМ МО РФ.

В качестве объекта исследования использовали споровые и вегетативные клетки B.subtilis ВКПМ В-2335(3) и B.licheniformis ВКПМ В-2336(31), депонированные во ВНИИ "Генетика", которые с 1992 года находятся в коллекции ЦВТП БЗ НИИМ МО РФ и систематически репродуцируются.

В качестве тест-штаммов использовали C.albicans IMV 690, S.aureus 209P, S.epidermidis ATCC 14990, E.coli 157, S.typhimurium 55, P.vulgaris 177, P. mirabilis 237, P. aeruginosa 9024, S. pyogenes 19615, полученные из ГИСК им. Л.А. Тарасевича.

Для выращивания B.subtilis и B.licheniformis и определения их антагонистической активности использовали среду Гаузе № 2 и МПА.

Наличие посторонней микрофлоры в препаратах и полупродуктах определяли с использованием мясо-пептонного бульона и селективных сред: Эндо - на отсутствие патогенных и условно-патогенных энтеробактерий; Сабуро - на отсутствие грибов; среды с мочевиной - на отсутствие бактерий рода Proteus; агара Чистовича - на отсутствие стафилококков.

В работе использовали описанные в ФС 42-3476-98 методы определения биологических, физико-химических и других характеристик микроорганизмов и приготовленных на их основе биопрепаратов.

Исследования на экспериментальных животных проводили с использованием беспородных белых мышей весом 16-22 г (860 штук); морских свинок весом 200-250 г (80 штук); белых крыс линии Вистар весом 180-220 г (170 штук); кроликов весом 1500-2000 г (45 штук), полученных из вивария ЦВТП БЗ НИИМ МО РФ. Работу с экспериментальными животными проводили в соответствии с "Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных".

Статистическую обработку полученных экспериментальных данных проводили согласно общепринятым методам с расчетом среднего арифметического значения (M) и доверительного интервала (m). Оценку достоверности различий определяли по критерию Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Обоснование компонентного состава мягкой лекарственной формы пробиотика Биогель Б

В настоящее время в ветеринарной и медицинской практике применяется значительное количество различных вспомогательных веществ (основ) для мягких лекарственных форм (МЛФ). Разработку компонентного состава МЛФ нового пробиотика с рабочим названием «Биогель Б» проводили в соответствии с общепринятыми требованиями для этих лекарственных форм [Соколовский Е.В., 1999; Мизина П.Г., 2004].

На основании анализа данных литературы и с учетом рекомендаций национальных и международных органов контроля медицинских иммунобиологических препаратов, были обоснованы следующие требования к разрабатываемому биопрепарату Биогель Б.

1. МЛФ пробиотика Биогель Б не должна: снижать терапевтическую эффективность основного действующего начала лекарственного средства; нарушать физиологические функции кожи и слизистых; изменять свои физико-химические свойства под воздействием таких факторов внешней среды как кислород, влажность и др.; вызывать аллергических реакций; оказывать токсического, раздражающего, сенсибилизирующего и других побочных действий, как локально, так и на макроорганизм в целом.

2. МЛФ пробиотика Биогеля Б должна обладать: адгезивной способностью, т.е. иметь оптимальные консистентные свойства, обеспечивающие образование на коже или слизистых оболочках тонкой, сплошной, не сползающей пленки; свойствами, препятствующими быстрому высыханию всей композиции МЛФ после нанесения ее на место повреждения; устойчивостью к возможному деструктивному действию входящих в ее состав микроорганизмов; способностью сохранения микробных клеток в композиции и возможностью продуцирования ими биологически активных веществ, а также препятствовать контаминации их посторонней микрофлорой.

Кроме того, производство МЛФ должно быть доступным и сравнительно недорогим.

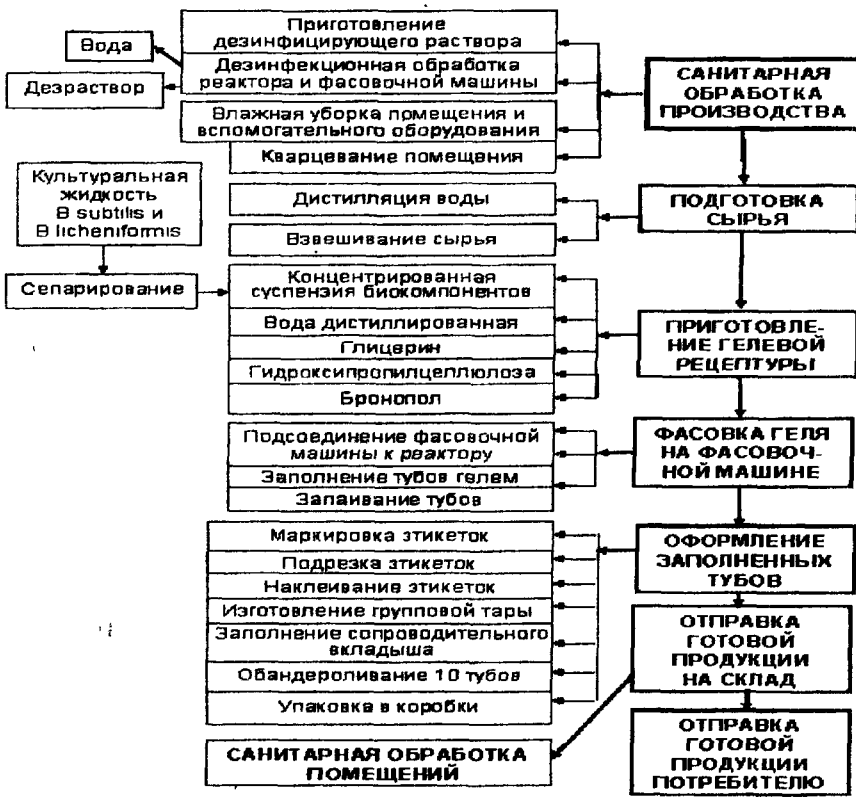
На первом этапе работы был обоснован выбор компонентного состава гелевой лекарственной формы, содержащей ассоциацию 2-х штаммов живых бацилл – B.subtilis ВКПМ № В-2335(3) и B.licheniformis ВКПМ № В-2336(31), который подбирался с учетом сохранения биологической активности бацилл в составе гидрогеля, в т.ч. и при длительном хранении препарата. В связи с этим проводились исследования различных гелеобразователей и консервантов и, в первую очередь, тех из них, которые в течение длительного времени успешно используются в фармакологии.

Биокомпоненты для препарата отбирали на этапе концентрирования биомассы бацилл при производстве пробиотика биоспорина, при этом исключалась стадия лиофильной сушки, что в конечном итоге значительно снижало себестоимость Биогеля Б.

В результате теоретических и экспериментальных поисковых исследований нами был обоснован и рекомендован следующий компонентный состав Биогеля Б: концентрированная микробная масса B. subtilis (50-150)·10^9 КОЕ/$см^3$ – 2,0 $см^3$; концентрированная микробная масса B. licheniformis (10-40)·10^9 КОЕ/$см^3$ – 1,0 $см^3$; гидроксипропилцеллюлоза – 1,3 г; глицерин – 20,0 г; бронопол – 0,05 г; вода – до 100,0 $см^3$.

Технология приготовления Биогеля Б

Технологическая схема получения препарата Биогель Б включает в себя технологические операции, представленные на рис. 1.



1. Технологическая схема производства Биогеля Б

В условиях производства были отработаны следующие стадии приготовления Биогеля Б: подготовка оборудования и помещений для смешивания компонентов, входящих в состав МЛФ препарата; приготовление вспомогательных компонентов препарата (гидроксипропилцеллюлоза, глицерин, бронопол, дистиллированная вода); приготовление биокомпонентов B.subtilis B.licheniformis методом сепарирования в боксированном сепараторе АСГ-3МБ; смешивание биокомпонентов и вспомогательных веществ; фасовка, маркировка; определение показателей качества (входящий контроль, контроль на этапе приготовления и контроль готовой продукции).

Для приготовления Биогеля Б в лабораторных условиях использовали стеклянный реактор, объемом 30,0 дм^3, оборудованный лопастной мешалкой с нижним спуском и загрузочным люком на съёмной крышке. Дистиллированную воду в объеме 22,08 дм^3 вливали в реактор, затем загружали глицерин в количестве 6000 г и включали мешалку. После 10 мин перемешивания в реактор загружали гидроксипропилцеллюлозу (390 г) и бронопол (15 г). Смесь перемешивали до получения однородной массы. В полученный гель добавляли биомассу бацилл и перемешивали в течение 5-10 мин.

Гель смешивали с концентрированной микробной массой, в состав которой входят B.subtilis и B.licheniformis, с таким расчетом, чтобы получить в конечном итоге лекарственную форму, содержащую в своем составе соответствующие концентрации бацилл.

Культурально-морфологические свойства бацилл в составе Биогеля Б

Изучение комплекса биологических свойств (морфологических, тинкториальных, культуральных, биохимических) бактериальных культур B. subtilis и B. licheniformis в составе гелевой композиции проводили с целью установления соответствия полученных результатов данным паспортов на эти штаммы.

Культурально - морфологические свойства штаммов изучали по характеру роста на различных питательных средах, спорообразованию на питательном агаре, уровню терморезистентности спор.

В результате проведения комплекса микробиологических исследований было показано, что биологические свойства штаммов B. subtilis и B. licheniformis в составе Биогеля Б идентичны паспортным свойствам этих культур.

Антагонистическая активность бацилл в составе Биогеля Б

Одним из показателей, характеризующих современный, высокоэффективный пробиотик, является его активность в отношении патогенных и условно-патогенных бактерий.

Антагонистическую активность бацилл-компонентов препарата Биогель Б изучали в отношении наиболее часто встречающихся возбудителей, поражающих кожу и слизистые, таких как - S.aureus, S.epidermidis, S.pyogenes, P.aeruginosa, P.vulgaris. P.mirabilis, C.albicans, E.coli, S.typhimurium.

Приведенные в табл. 1 данные свидетельствуют о высокой антагонистической активности бацилл как в составе Биогеля Б, так и в составе биоспорина в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов.

1. Влияние Биогеля Б и биоспорина на рост тест-культур

Препарат	Суммарная концентрация бацилл, 10^9 КОЕ/см^3	Зона подавления роста тест-культуры, мм								
		S. aureus 209P	S.epidermidis ATCC 14990	S. pyogenes ATCC 19615	C.albicans IMB 690	P. aeruginosa ATCC 9024	P.vulgaris 177	P.mirabilis 237	S.typhimurium 55	E.coli 157
Биогель Б	1	29,2±2,1	22,1±2,1	25,1±1,5	>30	15,7±1,6	>30	>30	12,8±1,4	22,5±2,5
	2	28,8±1,9	24,5±1,8	24,4±2,2	>30	16,2±2,3	>30	>30	14,6±2,8	23,2±2,1
	3	>30	22,3±1,7	26,3±1,8	>30	15,7±1,6	>30	>30	14,2±1,7	23.5±1,8
	5	>30	24,8±2,2	28,6±2,7	>30	16,3±1,8	>30	>30	14,9±2,4	22.4±2,7
	10	>30	24,1±1,9	27,5±1,8	>30	17,6±2,4	>30	>30	15,3±1,8	24 3±2,3
Биоспорин (препарат сравнения)	2	29,1±2,2	23,4±1,5	25,8±2,5	>30	15,5±1,7	>30	>30	14,2±1,8	22,9±1,7
	3	>30	23,7±2,7	27,6±2,9	>30	16,3±2,5	>30	>30	15,4±1,9	24,6±2,5
	5	>30	24,6±1,8	26,4±2,2	>30	17,6±1,8	>30	>30	16.3±2,7	23,8±1,4
	10	>30	23,3±1,6	28,5±3,0	>30	16,1±2,1	>30	>30	14 8±2,3	23,2±1,9
Биокомпонент (B.subtilis, B.licheniformis)	1	27,6±2,3	23,9±2,5	24,3±1,5	>30	15,3±1,8	>30	>30	12,5±1,2	23,4±1,3
	2	28,4±1,8	23,7±2,3	24,8±2,1	>30	14,7±2.0	>30	>30	13 4±1,7	22,7±2,2
	3	>30	24,2±1,8	25,4±1,7	>30	15,6±1,7	>30	>30	13,5±2,1	24,8±2,1
	5	>30	25,5±3,1	28,5±3,1	>30	16,4±2,1	>30	>30	14,7±1,3	23,7±1,7
	10	>30	24,4±2,4	27,8±2,9	>30	16,6±1,9	>30	>30	15,3±2,4	24,6±1,8
Гелевая композиция (без биокомпонента)		0	0	0	0	0	0	0	0	0

Физико-химические свойства Биогеля Б изучали непосредственно после добавления биокомпонентов в состав гелевой композиции по следующим показателям: внешний вид, однородность, pH, динамическая вязкость, коллоидная стабильность, термостабильность. В качестве контроля использовали гелевую композицию без добавления биокомпонентов (табл. 2).

2. Физико-химические показатели экспериментального образца препарата Биогель Б и гелевой композиции

Показатель		Гелевая композиция (без биокомпонентов)	Биогель Б
Внешний вид		Бесцветная прозрачная гелеобразная масса	Непрозрачная гелеобразная масса серого цвета
Однородность		Однородная	Однородный
Водородный показатель, pH		5,9±0,1	6,5±0,1
Динамическая вязкость, спз		1260±30	1170±28
Коллоидная стабильность	при центрифугировании	Стабилен	Стабилен
	при замораживании-оттаивании	Стабилен	Стабилен
	при нагревании	Стабилен	Стабилен

Было установлено, что основные физико-химические свойства Биогеля Б незначительно отличаются от таковых для геля без добавления биокомпонентов. После добавления в гелевую композицию бацилл происходит незначительное повышение величины pH, а также некоторое снижение динамической вязкости. Кроме того, Биогель Б не расслаивается и устойчив к неоднократным циклам замораживания-оттаивания и высокой температуре. Эти свойства Биогеля Б значительно расширяют возможности его использования в условиях хранения при различных температурных режимах.

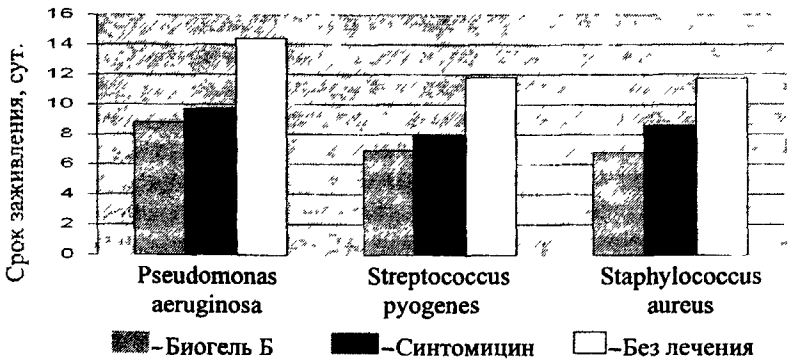
При использовании Биогеля Б в качестве лекарственного препарата важно, чтобы он в течение длительного времени сохранял свои лечебные свойства, которые обеспечиваются способностью входящих в его состав пробиотических микроорганизмов, сохранению их жизнеспособности и последующего размножения. В связи с этим, нами были изучены свойства Биогеля Б в динамике, в процессе его хранения, начиная с этапа приготовления и через 1, 3, 6, 12 и 24 месяца при температуре хранения (4±2) °С.

Было установлено, что культурально-морфологические, физико-химические свойства и антагонистическая активность Биогеля Б существенно не изменились при отмеченных сроках хранения.

В экспериментальных исследованиях по оценке токсичности и безопасности Биогеля Б на белых мышах, белых крысах, морских свинках и кроликах было установлено, что препарат, вводимый внутрибрюшинно, внутрижелудочно и при нанесении на кожные покровы (в т.ч. и в дозах, 10-кратно превышающих терапевтическую), не вызывает у животных патологических изменений во внутренних органах и тканях, а также биохимических и гематологических показателей периферической крови.

Терапевтическая эффективность Биогеля Б на модели инфекционного процесса пограничных покровов тела лабораторных животных

Для изучения терапевтической эффективности препарата в отношении гнойной инфекции, вызываемой такими возбудителями как S.aureus, S.pyogenes и P.aeruginosa, использовали экспериментальных животных, у которых локализованную гнойную инфекцию вызывали внутрикожным введением культуры одного из вышеперечисленных микроорганизмов. Результаты изучения влияния Биогеля Б на сроки заживления гнойно-некротических (ГН) поражений, вызванных внутрикожным введением белым мышам этих культур, представлены на рис. 2.



2. Влияние Биогеля Б на сроки заживления гнойно-некротических очагов у белых мышей

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о положительном влиянии Биогеля Б на регрессию ГН-процессов у белых мышей. Среди экспериментальных животных гибели не отмечено, генерализации инфекции не наблюдалось. Срок заживления в группе животных, леченных Биогелем Б, был короче, чем в группе леченых препаратом сравнения - синтомицином (8,8±0,5 и 9,7±0,7; 6,9±0,4 и 7,9±0,6; 6,8±0,4 и 8,6±0,5 сут. соответственно), что свидетельствует об эффективности применения Биогеля Б при поражениях кожи, вызванных возбудителями стафилококковой, стрептококковой и синегнойной инфекцией. При этом важно подчеркнуть, что в случаях гнойных инфекций, вызванных антибиотикоустойчивыми штаммами возбудителей, применение синтомицина было не эффективным. Кроме того, штаммы, входящие в состав Биогеля Б, обладают ранозаживляющими и противоожоговыми свойствами, что было подтверждено в опытах на лабораторных животных с использованием моделей резаных кожных ран и термических ожогов кожи. В этих случаях применение Биогеля Б обеспечи-

вало сравнительно более раннее отторжение некротизированных тканей, ускоряло развитие процессов регенерации, предупреждало развитие вторичной раневой инфекции при ожогах. При этом заживление происходило, в среднем, в 1,5 раза быстрее, чем при использовании синтомицина.

Эффективность применения Биогеля Б для лечения модельных резаных ран кожи у экспериментальных животных представлена в табл. 3.

3. Влияние Биогеля Б на длительность лечения резаных ран кожи у экспериментальных животных

Метод лечения	Длительность лечения по фазам раневого процесса, сут.				Эффективность лечения, %
	Очищение ран от гнойно-некротических тканей	Образование грануляций	Начало эпителизации	Время излечения	
Биогель Б	2,6±0,3	3,3±0,6	4,1±0,5	5,2±0,4	48,5
Синтомицин	3,2±0,4	4,0±0,6	5,2±0,5	7,1±0,3	29,7
Без лечения	4,1±0,6	5,7±0,9	7,3±0,7	10,1±0,4	-

Полученные результаты свидетельствуют о высокой ранозаживляющей активности Биогеля Б. Так, на 2-3 сут. в группе животных, леченных Биогелем Б, уменьшалась местная воспалительная реакция, на 3-4 сут. начиналось образование грануляционной ткани, на 4-5 сут. рана полностью очищалась от некротических тканей, заполнялась грануляциями и начиналась эпителизация. Полное заживление наступало на 5-6 сут. против 10-11 сут. в контрольной группе и на 7-8 сут. в группах животных, леченых синтомицином.

Экспериментальные данные по лечению термических ожогов кожи у белых мышей представлены в табл. 4.

4. Влияние биогеля Б на продолжительность лечения термических ожогов кожи у экспериментальных животных

Метод лечения	Степень ожога	Продолжительность лечения по фазам раневого процесса, сут.				Эффективность лечения, %
		Очищение ран от гнойно-некротических тканей	Образование грануляций	Начало эпителизации	Время излечения	
Биогель Б	I	6,1±0,8	7,0±0,8	7,7±1,0	8,5±0,8	44,1
	II	7,8±1,0	8,9±0,9	9,8±0,7	10,8±0,9	39,3
Синтомицин	I	7,5±0,8	9,9±0,5	10,9±0,9	13,1±0,7	13,8
	II	9,8±0,6	11,3±0,6	12,0±0,8	14,3±0,9	19,7
Без лечения	I	8,5±0,9	11,6±0,6	13,1±0,8	15,2±0,9	-
	II	11,2±0,7	13,4±0,4	14,8±0,7	17,8±1,0	-

Лечение экспериментальных животных с термическими ожогами первой

и второй степени свидетельствует об эффективности применения Биогеля Б. Очищение ран от гнойно-некротических тканей, образование грануляций, начало эпителизации в группе животных, леченых Биогелем Б, происходило в более короткие сроки по сравнению с животными, леченными синтомицином. Время полного излечения термических ожогов кожи в группе животных, леченных Биогелем Б, составило 8,5±0,8 сут. для первой степени ожога и 10,8±0,9 сут. для второй степени ожога, что соответственно в 1,5 и в 1,3 раза меньше, чем в группе животных, которым наносился синтомицин.

Таким образом, результаты экспериментальных данных свидетельствуют о высокой терапевтической эффективности Биогеля Б при лечении резаных кожных ран и термических ожогов у животных.

Изучение факторов неспецифической резистентности методом оценки функциональной активности перитонеальных макрофагов осуществляли при воспроизведении у экспериментальных животных ожоговой травмы и моделировании локальной гнойной инфекции кожи. Определяли такие показатели, как степень распластывания перитонеальных макрофагов, фагоцитарную активность макрофагов, интенсивность кислородзависимых метаболических процессов в исследуемых клетках, а также лейкоцитарную формулу, абсолютное содержание лейкоцитов и лимфоцитов в периферической крови животных (табл. 5).

5. Влияние способов лечения на показатели функциональной активности макрофагов у белых мышей с ожогами в различные сроки наблюдения

Метод лечения. группа животных	Срок наблюдения, сутки	Исследуемый показатель						
		$ИР_{60}$, ед.	$ИР_{90}$, ед.	ФП, %	ФИ, ед	НСТ сп. %	НСТ ст. %	К, ед
Биогель Б	3	0,56±0,13	0,71±0,17	67,2±1,9	3,32±0,45	17,5±1,7	18,2±1,5	1 04
	8	0,40±0,11	0,59±0,13	45,7±1,7	2,53±0,17	21,2±1,8	22,9±1,4	1.08
	14	0,78±0,16	0,94±0,19	41,3±1,9	2,62±0,23	19,3±1,8	19,5±1,6	1.01
Синтомицин	3	0,51±0,12	0,65±0,16	53,5±2,1	1,96±0,18	16,5±1,5	17,5±1,8	1,06
	8	0,34±0,08	0,58±0,13	42,3±1,8	2,12±0,25	22,5±1,8	18,5±1,6	0,82
	14	0,60±0,15	0,75±0,16	26,3±1,6	2,14±0,31	20,3±1,6	17,6±1,9	0,87
Без лечения	3	0,38±0,13	0,32±0.18	37,2±1,7	2,06±0,21	13,8±1,8	12,3±1,7	0,89
	8	0,21±0,10	0,26±0,14	32,5±1,6	2,16±0,34	12,4±1,5	10,4±1,6	0,84
	14	0,36±0,14	0,30±0,19	30,3±1,7	2,26±0,27	13,7±1,7	10,7±1,6	0,78
Интактная	-	0,48±0,11	0,49±0,18	39,0±1,8	3,08±0,35	13,5±1,4	17,8±1,7	1,32

Примечание: $ИР_{60}$, $ИР_{90}$ – индекс распластывания соответственно через 60 и 90 мин инкубации; ФП – фагоцитарный показатель (процент фагоцитирующих клеток); ФИ – фагоцитарный индекс (среднее число поглощенных частиц латекса одним фагоцитом); $НСТ_{сп}$, $НСТ_{ст}$ – тест с нитросиним тетразолием (процент формазан положительных фагоцитов соответственно в спонтанном и стимулированном тесте); К – коэффициент стимуляции, соотношение показателей стимулированного и спонтанного НСТ-теста

Полученные экспериментальные данные по оценке функциональной активности макрофагов у животных опытных групп свидетельствуют об изменении у них исследуемых показателей по сравнению с контрольной группой и группой интактных животных. Фагоцитарный показатель у животных с ожогом на 3 сутки был меньше аналогичного показателя в интактной группе (37,2±1,7 и 39,0±1,8 %, соответственно), а на фоне лечения препаратом Биогелем Б оказался более высоким (67,2±1,9%) как в сравнении с вышеуказанными группами, так и в сравнении с животными, которым в качестве лечебного средства наносился препарат сравнения – синтомицин.

Эта закономерность прослеживается и в другие сроки наблюдения (8 и 14-е сут.). Аналогичные результаты исследования функциональной активности макрофагов свидетельствуют об изменении этих показателей у животных с экспериментальной инфекцией. Показан более выраженный лечебный эффект применения препарата Биогель Б в сравнении с антибактериальной мазью, что отражается в стимуляции реакций фагоцитоза и неспецифических факторов защиты. Кроме того, выявлено увеличение общего количества лейкоцитов, содержания нейтрофилов, эозинофилов и моноцитов в периферической крови во всех группах экспериментальных животных, леченных Биогелем Б. К концу срока наблюдения эти показатели были сопоставимы с аналогичными у интактных животных.

Таким образом, на основе штаммов пробиотика биоспорина создан экспериментальный образец нового препарата Биогель Б для наружного применения при гнойно-некротических поражениях кожи у животных, ранах и ожогах различной степени, который рекомендован для проведения комиссионных испытаний на сельскохозяйственных и мелких домашних животных.

ВЫВОДЫ

1. На основе штаммов B.subtilis ВКПМ B-2335(3) и B.licheniformis ВКПМ B-2336(31) создана мягкая гидрофильная форма препарата Биогель Б для лечения животных с различными поражениями кожи. В состав препарата входят: концентрированная микробная масса B.subtilis (50-150)·10^9 КОЕ/$см^3$ – 2,0 $см^3$; концентрированная микробная масса B. licheniformis (10-40)·10^9 КОЕ/$см^3$ – 1,0 $см^3$; гидроксипропилцеллюлоза – 1,3 г; глицерин – 20,0 г; бронопол – 0,05 г; вода – до 100,0 $см^3$.

2. Биогель Б обладает выраженной терапевтической эффективностью при кожных ранах, инфицированных стафилококком, стрептококком и синегнойной палочкой. Сроки заживления раневых и ожоговых поверхностей при применении Биогеля Б сокращаются на 2-4 суток, в сравнении с принятыми схемами лечения.

3. При лечении Биогелем Б наблюдается активация моноцитарно-макрофагального звена кроветворения и стимуляция функциональной активности макрофагов, что сопровождается усилением местных реакций в области травмы и способствует лечебному эффекту. На экспериментальных животных показано, что Биогель Б не обладает острой и хронической токсичностью.

4. Препарат Биогель Б сохраняет свои биологические и физико-химические свойства при температуре хранения (4±2) °С в течение 24 месяцев (срок наблюдения).

5. Результаты проведенных теоретических и экспериментальных исследований реализованы разработкой регламента производства препарата Биогель Б, проектов технических условий и инструкции по применению, сборника методик по контролю качества препарата Биогель Б.

ПРАКТИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ НАУЧНЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

1. Разработан и утвержден «Регламент производства препарата Биогель Б» (Архив ЦВТП БЗ НИИМ МО РФ.– Инв. № 314/1-05, утвержден 29.12.2005 г.).

2. Разработан проект технических условий "Мягкая лекарственная форма препарата Биогель Б" (Архив ЦВТП БЗ НИИМ МО РФ. – Инв. № 314/2-05, утвержден 29.12.2005 г.).

3. Разработан проект инструкции по применению препарата Биогель Б в ветеринарии (Архив ЦВТП БЗ НИИМ МО РФ.– Инв. № 314/3-05, утвержден 29.12.2005 г.).

4. Составлен сборник методик по контролю качества препарата Биогель Б (Архив ЦВТП БЗ НИИМ МО РФ.– Инв. № 314/4, утвержден 29.12.2005 г.).

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ НАУЧНЫХ ВЫВОДОВ

1. Рекомендовать Биогель Б зооветспециалистам и владельцам животных в качестве терапевтического средства при лечении травматических поражений кожных покровов (раны, ожоги) и связанных с ними гнойных осложнений, вызванных антибиотикоустойчивыми стафилококками, стрептококками, синегнойной палочкой, грибами рода Candida, энтеропатогенными штаммами эшерихий, а также ассоциациями бактерий.

2. Отработанные технологические параметры и режимы производства Биогеля Б с использованием отечественного сырья и оборудования рекомендуются для приготовления биопрепаратов на основе других микроорганизмов.

3. Результаты исследований по разработке технологии производства Биогеля Б и оценке его лечебной эффективности при поражениях кожных покровов (раны, ожоги) у животных рекомендуется использовать в учебном процессе в высших учебных заведениях по дисциплине "Биотехнология".

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Ларионов Л.П. Разработка гелевой формы препарата биоспорин /Ларионов Л.П., Щелгачев В.В., Литусов Н.В. //Перспективы использования эубиотика биоспорин в практике здравоохранения и военно-медицинской службы: Сб.науч.ст.– Екатеринбург: ЦВТП БЗ НИИМ МО РФ, 1997.- С. 49-55.

2. Литусов Н.В. Изучение возможности создания гелевой формы эубиотика биоспорина /Литусов Н.В., Щелгачев В.В., Ларионов Л.П. //Инфекционные болезни: новое в диагностике и терапии: Сб.науч.ст. – СПб : ВМедА, 1998. – С. 49 – 50.

3. Щелгачев В.В. Сравнительная характеристика пробиотиков на основе аэробных спорообразующих микроорганизмов /Щелгачев В.В., Васильев А.П., Михайлова О.Е. и др. //Диагностика, лечение и профилактика опасных инфекционных заболеваний. Биотехнология. Ветеринария: Сб.науч.ст. – Киров: НИИМ МО РФ, 1998.- С. 347.

4. Щелгачев В.В. Изучение возможностей разработки стоматологической пасты, содержащей биоспорин /Щелгачев В.В., Ларионов Л.П., Григорьев С.С. и др. //Диагностика, лечение и профилактика инфекционных заболеваний. Биотехнология. Ветеринария: Сб.науч.ст. – Екатеринбург: ЦВТП БЗ НИИМ МО РФ, 1999.- С. 299.

5. Щелгачев В.В. Экспериментальная оценка диссеминации бактерий, входящих в состав препарата биоспорин, при пероральном введении /Щелгачев В.В., Грачев А.Ю., Васильев А.Н. //Диагностика, лечение и профилактика инфекционных заболеваний. Биотехнология. Ветеринария: Сб.науч.ст.– Екатеринбург: ЦВТП БЗ НИИМ МО РФ, 1999.- С. 300.

6. Садыков Н.С. Эффективность биоспорина в составе гелевой формы препарата /Садыков Н.С., Литусов Н.В., Щелгачев В.В. и др. //Актуальные вопросы современной медицины: Сб.науч.ст.– Самара: СВМИ МО РФ, 2001.– С. 255.

7. Садыков Н.С. Оценка свойств комбинированного препарата на основе Bacillus subtilis и эраконда при различных сроках хранения /Садыков Н.С., Литусов Н.В., Щелгачев В.В. и др. //Актуальные вопросы современной медицины: Сб.науч.ст. – Самара: СВМИ МО РФ, 2001.– С. 256.

8. Ларионов Л.П. Доклинические испытания Биогеля Б при наружном

применении /Ларионов Л.П., Литусов Н.В., Щелгачев В.В. и др. //Человек и лекарство: Сб.науч.ст.– М.: РЦ «Фармединфо», 2002.– С. 649.

9. Щелгачев В.В. Оценка показателей неспецифической резистентности организма при лечении Биогелем Б экспериментальных ожоговых поражений кожи /Щелгачев В.В., Литусов Н.В., Степанов А.В. и др. //Иммунология Урала: Сб.науч.ст. – Екатеринбург: ЦВТП БЗ НИИМ МО РФ, 2003, Т.2, №1. – С. 116.

10. Щелгачев В.В. Терапевтическая эффективность Биогеля Б на модели экспериментального инфекционного процесса пограничных покровов тела /Щелгачев В.В., Литусов Н.В., Васильев П.Г. и др. //Пробиотики, пребиотики, симбиотики и функциональные продукты питания. Современное состояние и перспективы: Сб.науч.ст. – М.: ГУ «МНИИЭиМ», 2004.– С. 54.

11. Васильев А.П. История и перспективы применения пробиотиков в медицине и ветеринарии /Васильев А.П., Забокрицкий А.Н., Васильев П.Г. и др.//Диагностика, лечение и профилактика опасных инфекционных заболеваний. Эпидемиология и эпизоотология. Микробиология. Биотехнология. Экология: Сб.науч.ст. –Екатеринбург: ЦВТП БЗ НИИМ МО РФ, 2004. -- С. 69-77.

12. Ребров А.Я. Состав и антимикробная активность препаратов спор B.subtilis и B.licheniformis, выращиваемых поверхностно и глубинно в разных условиях /Ребров А.Я., Щелгачев В.В., Устинова Н.Б. //Диагностика, лечение и профилактика опасных инфекционных заболеваний. Эпидемиология и эпизоотология. Микробиология. Биотехнология. Экология: Сб.науч ст. –Екатеринбург: ЦВТП БЗ НИИМ МО РФ, 2004. – С. 83-85.

13. Щелгачев В.В. Итоги работ по разработке готовых лекарственных форм биоспорина /Щелгачев В.В., Забокрицкий А.Н., Васильев П.Г. и др. //Диагностика, лечение и профилактика опасных инфекционных заболеваний. Эпидемиология и эпизоотология. Микробиология. Биотехнология. Экология: Сб.науч.ст. –Екатеринбург: ЦВТП БЗ НИИМ МО РФ, 2004. – С. 85-91.

Сдано в производство 15.04.2006 г. Ризограф Тираж 100 Заказ 90

Издательско-полиграфический отдел
ФГОУ ВПО МГАВМиБ им. К.И. Скрябина.

109472, Москва, ул. Академика Скрябина, 23

2006A
7292

M-7292