

ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ «БИОТОН»

(ООО «Биотон»)

УТВЕРЖДАЮ:

Директор ООО "Биотон"



Н. К. Евтин

ОТЧЕТ О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

по теме: «Изучение антибактериального, антипаразитарного, противовирусного и противогрибкового действия натуропатического средства «Септисол»
(заключительный)

Руководитель темы:

Заместитель директора ООО «Биотон», д. м. н., профессор

A handwritten signature in blue ink, likely belonging to A. N. Sergeev.

А. Н. Сергеев

Новосибирск 2007

РЕФЕРАТ

Отчет 13 с., 3 табл., 8 источник литературы

СРЕДСТВО «СЕПТИСОЛ», ВИРУСЫ, БАКТЕРИИ, ПРОСТЕЙШИЕ, ГРИБЫ. Объектами исследования является: средство «Септисол», вирусы, бактерии, простейшие, грибы.

Целью настоящих исследований явилась оценка противовирусного, противогрибкового, антипаразитарного и антибактериального действия натуропатического многофункционального оздоровительного средства «Септисол» для наружного применения, включая слизистые.

В работе были использованы экспериментальные методы исследования (вирусологические, бактериологические, фунгологические).

Показано, что средство «Септисол» обладает выраженным противовирусным действием в отношении вирусов гриппа, аденовируса человека и вирусов простого герпеса и противохламидийным действием. Установлено, что натуропатическое многофункциональное оздоровительное средство «Септисол» не обладает инактивирующим действием в отношении вирусов и хламидий, находящихся внутри клеток, несмотря на это, наблюдается выраженный противовирусный и противохламидийный эффект на стадии распространения патогенов к интактным клеткам, что оказывает тормозящее действие на развитие инфекции. Показана явно выраженная антибактериальная, противопаразитарная в отношении трихомонад активность натуропатического многофункционального оздоровительного средства «Септисол». Кроме того, средство обладает противогрибковым действием в отношении *Can. albicans*, *Can. Tropicalis* и *Asp. niger*.

СОДЕРЖАНИЕ

	Стр.
Обозначения и сокращения	4
Введение	5
Основная часть	6
1. Цель исследования	6
2. Материалы и методы	6
Оценка противовирусной, противогрибковой и антибактериальной активности натуропатического многофункционального оздоровительного средства «Септисол».	7
3. Заключение	12
Список использованных источников	13

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

БОЕ	— бляшкообразующие единицы
ГНЦ ВБ	— Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии
ООО	— общество с ограниченной ответственностью
ФГУН	— Федеральное государственное учреждение науки
Asp.	— Аспиригилум
Сап.	— кандида
Сог.	— коринебактерия
Е.	— эшерихия
М	— среднее значение
m	— ошибка среднего значения
Mic.	— микоплазма
N.	— нейссерия
P.	— псевдомонада
S.	— стафилококк
Sal.	— сальмонелла
Sh.	— шигелла
Str.	— стрептококк
Tr.	— трипонема
Ur.	— уреоплазма

ВВЕДЕНИЕ

Современные средства наружного применения, используемые в настоящее время для лечения и профилактики заболеваний инфекционной природы, в основном имеют направленное действие в отношении узкого спектра возбудителей. В случаях, когда необходимо предупредить или провести лечение абсолютно отличающихся друг от друга заболеваний человеку необходимо использовать множество разных средств, которые не всегда достаточно эффективны. В свою очередь создание средства способного эффективно предупреждать и лечить множество инфекционных заболеваний разного происхождения существенно бы отразилось на общем здоровье населения Сибирского региона и Российской Федерации в целом.

Выше сказанное подтолкнуло исследователей ООО НПП «ЛЕТО» к созданию нового уникального натуропатического многофункционального оздоровительного средства «Септисол» для наружного применения способного оказывать терапевтическое и профилактическое действие в отношении огромного количества инфекционных заболеваний разной этиологии.

Состав средства «Септисол»: ионные комплексы меди, прополис, мед, камедь, каменное масло, мумие, живица, экстракты лекарственных трав (ромашка, шалфей, лопух, подорожник и др.) на природной родниковой воде с повышенным содержанием ионов серебра.

Богатый набор активных веществ и экстрактов растений наделил средство «Септисол» свойствами способными оказывать антибактериальное, противовирусное, противопаразитарное и противогрибковое действие.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1. Цель исследования

Целью исследования является оценка противовирусного, противогрибкового, противопаразитарного и антибактериального действия натуропатического многофункционального оздоровительного средства «Септисол» для наружного применения, включая слизистые.

2. Материалы и методы

Работы проводились сотрудниками ООО «Биотон» на арендованных помещениях и оборудовании ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор».

Вирусы. В работе использовали вирус гриппа штамм A/Aichi/2/68 (H3N2), вирус гриппа птиц штамм A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005 (H5N1), аденовируса человека 5-го серотипа штамм Adel75, вирус простого герпеса 1-о типа штамм HF и вирус простого герпеса 2-о типа штамм MS.

Бактерии, простейшие, грибы

В качестве представителей бактерий были взяты в работу стафилококки: *S. aureus*, *S. saprophyticus*, *S. hominis*, *S. haemolyticus*, *S. epidermidis*; стрептококки: *Str. pyogenes*, *Str. pneumoniae*, *Str. agalactiae*, *Str. viridans*; грамотрицательные кокки — нейссерии: *N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae*; псевдомонады: *P. aeruginosa* (синегнойная палочка) *P. putida*; кишечные палочки — *E. coli* энтеротоксигенная, энтероинвазивная, энтеропатогенная, энтерогеморагическая; дифтерийная палочка — *Cor. diphtheriae*, сальмонеллы: *Sal.*

enteritidis, *Sal. typhimurium*; шигелла дизентерии: *Sh. flexneri*, *Sh. sonnei*, *Sh. dysenteriae*; хламидии — *Chl. trachomatis*; трихомонады: *Tr. elongata*, *Tr. hominis*, *Tr. vaginalis*; микоплазма и уреаплазма: *Mic. hominis*, *Ur. urealyticum*; грибы рода кандида — *Cand. albicans*, *Cand. tropicalis* и грибы *Asp. niger*.

Культуры клеток

Для проведения вирусологических и бактериологических работ использовали перевиваемые культуры клеток, а именно: для исследований с использованием вирусов гриппа применяли культуру клеток MDCK; для аденовируса человека 5-го серотипа и для хламидии применяли культуру клеток HeLa; в качестве клеточной системы для исследования ВПГ-1, ВПГ-2 использовали культуру клеток Vero [Культура животных клеток, 1989].

Оценка противовирусного действия средства «Септисол»

Профилактический эффект средства «Септисол» для лечения вирусных инфекций оценивали с помощью ранее описанной реакции нейтрализации вирусов с использованием культур клеток [Field's Virology, 2001; Лурия и Дарнел, 1970; Вирусология, 1988]. Серийные последовательные разведения с двукратным шагом средства «Септисол» смешивали с рабочим разведением вируса, содержащим от 50 до 80 БОЕ. Полученную суспензию вносили на монослой культур клеток. Адсорбцию вируса проводили в течение одного часа при 37 °С. После чего не адсорбированный вирус удаляли из планшеты, после чего в нее добавляли питательную среду. Инфицированные клетки культивировали в течение 2-3 суток при температуре 37 °С. Учет результатов осуществляли, исходя из определения максимального разведения средства «Септисол», которое вызывает уменьшение числа бляшек на монослое культур клеток по сравнению с контрольным количеством бляшек на 50 или более процентов.

Лечебное действие средства «Септисол» оценивали с помощью добавления его серийных последовательных разведений с двукратным шагом в питательную среду с инфицированным монослоем культур клеток. Доза заражения монослоя составляла 50-80 БОЕ на лунку. Культивировали в течение 2-3 суток при температуре 37 °С. Оценку лечебной активности средства «Септисол» проводили, определяя максимальное разведение средства «Септисол» способное вызывать уменьшение числа бляшек на монослое культур клеток по сравнению с контрольным количеством бляшек на 50 или более процентов.

Оценка противохламидийного действия средства «Септисол» Для изучения противохламидийного действия «Септисола» использовали метод нейтрализации хламидий в культуре клеток HeLa. Бактериоскопию хламидий в клетках выполняли с помощью метода фазово-контрастной микроскопии [Коротяев и Бабичев, 2002; Никифоров и Шкарин, 2000].

Оценка антибактериального, противогрибкового и противопаразитарного действия средства «Септисол»

Определение литической активности средства «Септисол» в отношении бактерий, простейших и грибов оценивали общепринятым методом серийных разведений для определения наименьшей литической концентрации средства [Зыков, 1977; Никифоров и Шкарин, 2000].

Статистическая **обработка результатов.** Статистическую обработку полученных результатов проводили общепринятыми методами [Ашмарин и Воробьев, 1962].

3. Оценка противовирусной, противогрибковой и антибактериальной активности натуропатического многофункционального оздоровительного средства «Септисол»

На первом этапе исследования оценивали профилактическое действие средства «Септисол» на примере его специфического деструктивного воздействия на вирусы гриппа, аденовирус человека 5-о серотипа, ВПГ-1 и ВПГ-2 на стадии предшествующей инфицированию клеток. По результатам исследования средство «Септисол» инактивирует вирус гриппа штамм A/Aichi/2/68 (H3N2) и вирус гриппа птиц штамм A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005 (H5N1) в виде уменьшения количества бляшек на 50 и более процентов в монослое культур клеток MDCK по сравнению с контролем в разведении средства 1:128. Уменьшение более чем на 50% числа бляшек образованных аденовирусом человека 5-о серотипа штамм Adel 75 в монослое культуры клеток HeLa по сравнению с контролем наблюдалось при разведении «Септисола» 1:256. В то же время, противовирусная активность в отношении штаммов HF и MS вирусов простого герпеса наблюдалась только при разведении средства 1:64 за счет уменьшения количества БОЕ в монослое клеток Vero в сравнении с контролем.

Таблица 1. Определение профилактического противовирусного действия средства «Септисол»

Штамм вируса	Количество БОЕ в разведениях средства «Септисол»										К	Т
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024		
Aichi	0	0	0	0	0	5	26	75	78	80	75	1:128
Suzdalka	0	0	0	0	0	5	20	57	65	70	67	1:128
Adel 75	0	0	0	0	0	2	15	25	59	63	65	1:256
HF	0	0	0	0	2	21	58	62	63	62	60	1:64
MS	0	0	0	0	3	18	54	61	60	65	62	1:64

Примечание: Aichi — штамм вируса гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2); Suzdalka — штамм вируса гриппа птиц A/Chicken/Suzdalka/Nov-1/2005 (H5N1); Adel 75 — штамм аденовируса человека 5-о серотипа Adel 75; HF — штамм вируса простого герпеса 1-о типа HF; MS — штамм вируса простого герпеса 2-о типа MS; К — количество БОЕ в контроле (без добавления средства «Септисол»); Т — титр средства «Септисол», оказывающий противовирусное действие.

Полученные данные свидетельствуют о выраженном профилактическом эффекте, направленном против вирусов гриппа, аденовируса человека и вирусов простого герпеса натуропатического многофункционального оздоровительного средства «Септисол» для наружного применения, включая слизистые, в исследованиях *in vitro*.

На втором этапе оценивали лечебную активность средства «Септисол» при добавлении его к инфицированным вирусами гриппа, аденовирусом человека 5-о серотипа, вирусами простого герпеса 1-о и 2-о типов монослоям культур клеток. В результате установили, что достоверного изменения в инфицированных вирусами монослоях клеток по количеству бляшек в сравнении с контролем при культивировании в течение 3 суток не наблюдается. Результаты не приводятся. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что средство «Септисол» не оказывает лечебного действия на ранее инфицированные клетки.

Однако, при культивировании инфицированных монослоев культур клеток с добавленным средством «Септисол» в культуральную жидкость, наблюдали значимое снижение вирусного урожая в сравнении с контролем (без добавления средства). Для вируса гриппа штамм A/Aichi/2/68 (H3N2) при культивировании на монослой клеток MDCK с использованием культуральной среды без добавления средства «Септисол» урожай составлял $6,3 \pm 0,2$ lg (БОЕ)/мл в тоже время при добавлении средства концентрация вируса снизилась до $3,0 \pm 0,1$ lg (БОЕ)/мл. Вирус гриппа птиц штамм A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005 (H5N1) нарабатывался до концентрации $6,8 \pm 0,2$ lg (БОЕ)/мл без добавления средства на той же культуре клеток, а при добавлении средства концентрация вируса составила $3,0 \pm 0,3$ lg (БОЕ)/мл. Культивирование аденовируса человека 5-о серотипа штамм Adel 75 на культуре клеток HeLa с добавлением средства «Септисол» принесло более низкую урожайность вируса $2,8 \pm 0,2$ lg (БОЕ)/мл по сравнению с урожайностью вируса без применения средства $7,3 \pm 0,1$ lg (БОЕ)/мл. В случае с ВПГ-1 урожай вируса на культуре клеток Vero при добавлении средства составил $4,0 \pm 0,1$ lg (БОЕ)/мл и $3,8 \pm 0,4$ lg (БОЕ)/мл для вируса ВПГ-2 в то же время при культивировании вирусов в отсутствие средства «Септисол» для штамма HF вируса простого герпеса 1-о типа получили $6,0 \pm 0,1$ lg (БОЕ)/мл и $6,2 \pm 0,2$ lg (БОЕ)/мл для штамма MS вируса простого герпеса 2-о типа.

Таблица 2 Изменение урожайности вирусов при культивировании в монослой культур клеток под воздействием средства «Септисол»

Средство «Септисол»	Концентрация штаммов вирусов в культуральной жидкости в lg (БОЕ)/мл ($M \pm m$)				
	Aichi	Suzdalka	Adel 75	HF	MS
добавлено	$3,0 \pm 0,1$	$3,0 \pm 0,3$	$2,8 \pm 0,2$	$4,0 \pm 0,1$	$3,8 \pm 0,4$
нет	$6,3 \pm 0,2$	$6,8 \pm 0,2$	$7,3 \pm 0,1$	$6,0 \pm 0,1$	$6,2 \pm 0,2$

Примечание: Aichi — штамм вируса гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2); Suzdalka — штамм вируса гриппа птиц A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005 (H5N1); Adel 75 — штамм аденовируса человека 5-о серотипа Adel 75; HF — штамм вируса простого герпеса 1-о типа HF; MS — штамм вируса простого герпеса 2-о типа MS.

Эти данные дают основание предполагать, что хотя средство «Септисол» не способно оказывать ингибирующего воздействия на вирус, находящийся внутри клеток и тем самым лечить уже инфицированные клетки, оно все-таки обладает вирулицидным действием в отношении вирусов, которые выходят из клеток или находятся вне клеток и благодаря этому предотвращает их распространение на окружающие, не зараженные клетки. В связи с этим средство «Септисол» обладает лечебным эффектом, который осуществляется за счет подавления распространения вирусов к окружающим незараженным клеткам.

На следующем этапе исследовали противовирусное действие «Септисола». Было установлено, что подавление инфекционности хламидий на стадии предшествующей проникновению в клетку наблюдается даже при разведении средства «Септисол» 1:512. В тоже время при воздействии средства «Септисол» на зараженный монослой культуры клеток HeLa в течение первых 2 суток значимого уменьшения в числе инфицированных клеток при подсчете в фазово-контрастном микроскопе по сравнению с контролем не наблюдали. Однако, начиная с 3-х и по 6-е сутки культивирования, разница между контролем и опытом становилась очевидной.

Количество инфицированных клеток в контроле к 6-м суткам стало больше в 3 раза по сравнению с опытом. Полученные данные свидетельствуют об отсутствии литического или любого другого действия средства «Септисол» на хламидии внутри клеток. Однако при этом наблюдается выраженный противохламидийный эффект на стадии распространения инфекции к окружающим интактным клеткам сходный с таковым для вирусов. Таким образом, лечебный эффект натуропатического многофункционального оздоровительного средства «Септисол» для наружного применения, включая слизистые, предположительно связан с блокированием распространения хламидии к окружающим здоровым клеткам.

В следующей серии экспериментов оценивали антибактериальное, противогрибковое и противопаразитарное действие средства «Септисол». Данные представлены в таблице 3. По результатам проведенных исследований было установлено, что средство «Септисол» обладает бактерицидным действием в наибольшем разведении: для стафилококков — 1:256; для стрептококков от 1:128 до 1:256; для грамотрицательных кокков — нейссерии 1:128; для псевдомонад 1:64; для кишечных палочек и дифтерийной палочки 1:256, для сальмонелл и шигелл 1:256; для микоплазмы и уреоплазмы 1:128. В то же время для трихомонад средство «Септисол» обладает противопаразитарным действием в разведении 1:64. Противогрибковым действием в отношении *Can. albicans*, *Can. Tropicalis* и *Asp. niger* средство «Септисол» обладает в максимальном разведении 1:32.

Таблица 3. Определение чувствительности бактерий к средству «Септисол»

Бактерии	Наличие — (+) или отсутствие — (-) колоний микроорганизмов на питательной среде при добавлении разведений средства «Септисол»										Т
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	1:256
<i>S. saprophyticus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	1:256
<i>S. hominis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-		+	1:256
<i>S. haemolyticus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	1:256
<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	1:256
<i>Str. pyogenes</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	1:128
<i>Str. pneumoniae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	1:256
<i>Str. agalactiae</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	1:128
<i>Str. viridans</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	1:128
<i>N. meningitidis</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	1:128
<i>N. gonorrhoeae</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	1:128
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	1:64
<i>P. putida</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	1:64
<i>E. coli</i> энтеротоксигенная	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	1:256
<i>E. coli</i> энтероинвазивная	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	1:256
<i>E. coli</i> энтеропатогенная	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	1:256
<i>E. coli</i> энтерогеморрагическая	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	1:256
<i>Cor. diphtheriae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	1:256
<i>Sal. enteritidis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	1:256

Sal. typhinurium	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	1:256
Sh. flexneri	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	1:256
Sh. sonnei	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	1:256
Sh. dysenteriae	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	1:256
Mic. hominis	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	1:128
Ur. urealiticum	-	-	-	-	-	-	-		+	+	1:128
Простейшие											
Tr. elongata	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	1:64
Tr. hominis	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	1:64
Tr. vaginalis	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	1:64
Грибы										+	
Can. albicans	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	1:32
Can. tropicalis.	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	1:32
Asp. niger	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	1:32

Примечание: Т — титр средства «Септисол», оказывающий антибактериальное, противопаразитарное, противогрибковое действие.

Полученные данные указывают на явно выраженную антибактериальную, противопаразитарную в отношении трихомонад активность натуропатического многофункционального оздоровительного средства «Септисол» для наружного применения, включая слизистые. Кроме того, средство обладает выраженным противогрибковым действием в отношении Can. albicans, Can. Tropicalis, Asp. niger.

Заключение

Существующие на сегодняшний день средства наружного применения, которые используются населением для лечения и профилактики заболеваний инфекционной природы главным образом обладают направленным действием в отношении определенных инфекционных агентов. Зачастую возникает необходимость предупредить или провести лечение абсолютно отличающихся друг от друга заболеваний в результате человеку необходимо использовать множество различных по своему составу и принципам действия средств, которые к тому же не всегда достаточно эффективны.

Исследователями ООО НПП «ЛЕТО» было разработано уникальное натуропатическое многофункциональное оздоровительное средство «Септисол» для наружного применения, включая слизистые, способное оказывать терапевтическое и профилактическое действие в отношении огромного количества инфекционных заболеваний разной этиологии.

Целью исследования являлась оценка противовирусного, противопаразитарного, противогрибкового и антибактериального действия натуропатического многофункционального оздоровительного средства «Септисол» для наружного применения, включая слизистые.

В работе были использованы экспериментальные методы исследования (вирусологические, бактериологические, фунгологические).

Показано что средство «Септисол» обладает выраженным противовирусным действием в отношении вирусов гриппа, аденовируса человека и вирусов простого герпеса и противохламидийным действием, что дает основание для использования этого средства в целях профилактики и лечения данных заболеваний. Однако установлено, что натуропатическое многофункциональное оздоровительное средство «Септисол» не обладает деструктивным действием в отношении вирусов и хламидий, находящихся внутри клеток. Несмотря на это наблюдается выраженный противовирусный и противохламидийный эффект на стадии распространения инфекции к окружающим интактным клеткам, что оказывает тормозящее действие на развитие инфекции. Показана явно выраженная антибактериальная, противопаразитарная в отношении трихомонад активность натуропатического многофункционального оздоровительного средства «Септисол». Кроме того, средство обладает противогрибковым действием в отношении *Can. albicans*, *Can. Tropicalis* и *Asp. niger*.

Список использованных литературных источников

1. Ашмарин И. П., Воробьев А. А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. — Л.: Гос. изд. мед. лит., 1962.
2. Вирусология. Методы: Пер. с англ./Под ред. Б. Мейхи. — М.: Мир, 1988. — 344 с.
3. Коротяев А. И., Бабичев С. А. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология: Учебник для мед. вузов. — 3-е изд. — СПб.: СпецЛит, 2002. — 591 с.
4. Культура животных клеток. Методы: Пер. с англ./Под ред. Р. Фрешни. — М.: Мир, 1989. — 333 с.
5. Лурия С., Дарнел Дж. Общая вирусология/Под ред. Ю. З. Гендона. — М.: Мир, 1970. — 423 с.
6. Никифоров В. А., Шкарин В. В. Медицинская микробиология (общие и эколого-эпидемиологические аспекты): Учеб. пособие. — Н. Новгород: Изд-во Нижегородской государственной медицинской академии, 2000. — 248 с.
7. Руководство к практическим занятиям по микробиологии, иммунологии и вирусологии. Под ред. М. П. Зыкова. М., «Медицина», 1977. — 288 с.
8. Field's Virology /editors-in-chief, D. M. Knipe, P. M. Howley. — 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. — P. 5125