

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека  
Федеральное бюджетное учреждение науки  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ПРИКЛАДНОЙ МИКРОБИОЛОГИИ И  
БИОТЕХНОЛОГИИ (ФБУН ГНЦ ПМБ)

УТВЕРЖДАЮ



2019 г.

ОТЧЕТ

ОБ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИХ ИСПЫТАНИЯХ

«Исследование антибактериальной активности и цитотоксического действия  
препарата ОСТЕОМЕД - Форте *in vitro*»  
(по договору № 710-н/2018 от 12.11. 2018 г.)

Оболенск 2019

## СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Заместитель директора,  
доктор биол. наук

И.Г. Шемякин

Научный сотрудник,  
канд. биол. наук

Е.В. Детушева

Младший научный сотрудник

М.А. Марьин

Старший научный сотрудник,  
канд. мед. наук

О. Ю. Манзенюк

## **Реферат**

Отчет: 27 с., 7 табл., 5 рис.

**МИНИМАЛЬНАЯ ИНГИБИРУЮЩАЯ (ПОДАВЛЯЮЩАЯ) КОНЦЕНТРАЦИЯ (МИК=МПК), МИНИМАЛЬНАЯ БАКТЕРИЦИДНАЯ КОНЦЕНТРАЦИЯ (МБК), ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ, КЛЕТОЧНЫЕ КУЛЬТУРЫ, ТРУТНЕВЫЙ ГОМОГЕНАТ ОСТЕОМЕД ФОРТЕ.**

В отчете представлены результаты исследований, проведенных по договору № 710-н/2018 от 12 ноября 2018 г. между ООО «ПАРАФАРМ» и ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» (ГНЦ ПМБ).

**Объектом исследования является: препарат «ОСТЕОМЕД ФОРТЕ»**

**Цель исследования:**

**1. Исследование антибактериальной активности и цитотоксического действия препарата ОСТЕОМЕД ФОРТЕ *in vitro*:**

- оценить возможное антибактериальное действие препарата «ОСТЕОМЕД ФОРТЕ» *in vitro* в отношении бактерий группы кишечной палочки (БГКП) (4 штамма), включая патогенные *E. coli* 157 П.1 серотипа O157:H7; бактерий *Staphylococcus* sp. (4 штамма), включая патогенные *S. aureus* ATCC1707 MRSA и бактерии *Streptococcus* sp. (4 штамма) из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск»;

2. Определить бактерицидный/бактериостатический эффект 4-х компонентов препарата «ОСТЕОМЕД ФОРТЕ» - трутневый гомогенат, цитрат кальция, пиридоксина гидрохлорид (витамин В6), витамин D3 в отношении бактерий группы кишечной палочки (БГКП) (4 штамма), включая патогенные *E. coli* 157 П.1 серотипа O157:H7; бактерий *Staphylococcus* sp. (4 штамма), включая патогенные *S. aureus* ATCC1707 MRSA и бактерии *Streptococcus* sp. (4 штамма) из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск»;

3. Изучить возможное цитотоксическое действие препарата «ОСТЕОМЕД ФОРТЕ» на перевиваемую человеческую линию эпителиальных клеток HeLa S3 (ATCC® CCL-2.2™) в экспериментах *in vitro*.

**Область применения – медицина**

ОБОЗНАЧЕНИЯ, СОКРАЩЕНИЯ.....	5
Регулирующие стандарты.....	6
Задачи.....	7
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ	
1.    Материалы и методы.....	8
1.1    Предмет исследований.....	9
1.2    Бактериальные культуры.....	9
1.3    Антибактериальные препараты.....	10
1.4    Видовая идентификация микроорганизмов.....	10
1.5    Определение минимальной ингибирующей концентрации (МПК/МИК).....	11
1.6    Определение минимальной бактерицидной концентрации (МБК).....	11
1.7    Выбор видов и количества микроорганизмов.....	12
1.8    Клеточные культуры, питательные среды, рабочие растворы, МТТ тест.....	16
2.    Результаты исследований.....	20
ВЫВОДЫ.....	21
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	21
ПРИЛОЖЕНИЯ	
Приложение 1.....	23

## ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

«ГКПМ-	Государственная коллекция патогенных микроорганизмов и
Оболенск».....	клеточных культур (ФБУН ГНЦ ПМБ)
МЕ.....	международная единица
М.К.....	микробная клетка
ФСБ.....	фосфатно-солевой буфер
МТТ.....	соль (3-(4,5-диметтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромида)
МХБ.....	бульон Мюллера-Хинтона
КОЕ.....	колониеобразующая единица
МПК/МИК.....	минимальная подавляющая/ингибирующая концентрация
МБК.....	минимальная бактерицидная концентрация

## **Регулирующие стандарты**

• Все работы проводились в соответствии со следующей нормативно- технической документацией:

- ГОСТ Р ИСО 20776-1-2010. Клинические лабораторные исследования и диагностические тест-системы *in vitro*. Исследование чувствительности инфекционных агентов и оценка функциональных характеристик изделий для исследования чувствительности к антимикробным средствам;
- Клинические рекомендации: Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам Версия-2015-02, утвержденные на Расширенном совещании Межрегиональной ассоциации по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии (Москва, 22.05.2015 г.);
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2006), Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 16th edn. Informational Supplement M100-S16, Wayne, PA;
- ISO/TC 34/SC 9 – Микробиология;
- Санитарные правила «Порядок учета, хранения, передачи и транспортировки микроорганизмов I-IV групп патогенности» СП 1.2.036-95;
- ИСО/МЭК 17025-99 «Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий»;
- СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III - IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

### **Задачи исследования**

1. Определить бактерицидный/бактериостатический эффект препарата «ОСТЕОМЕД ФОРТЕ» в отношении бактерий группы кишечной палочки (БГКП) (4 штамма), включая патогенные *E. coli* 157 П.1 серотипа O157:H7; бактерий *Staphylococcus* sp. (4 штамма), включая патогенные *S. aureus* ATCC1707 MRSA и бактерии *Streptococcus* sp. (4 штамма);
2. Определить бактерицидный/бактериостатический эффект 4 компонентов препарата «ОСТЕОМЕД ФОРТЕ» - пиридоксина гидрохлорид (витамин В6), Витамин D3 и трутневый гомогенат - в отношении бактерий группы кишечной палочки (БГКП) (4 штамма), включая патогенные *E. coli* 157 П.1 серотипа O157:H7; бактерий *Staphylococcus* sp. (4 штамма), включая патогенные *S. aureus* ATCC1707 MRSA и бактерии *Streptococcus* sp. (4 штамма);
3. Провести измерение жизнеспособности клеточной популяции HeLa S3, которую выращивали 5, 24, 72 и 120 часов в присутствии готовой (таблетированной) формы «ОСТЕОМЕД ФОРТЕ» в концентрациях от 78,125 мкг/мл до 10 мг/мл и премикса из активных компонентов «ОСТЕОМЕД ФОРТЕ» в соотношении, эквивалентном таблетке (см. таблицу 1) по методике МТТ-теста.

Табл. 1. Перечень исследуемых концентраций для таблетированной формы «ОСТЕОМЕД ФОРТЕ» и премикса из действующих веществ в эксперименте по определению жизнеспособности клеточной культуры HeLa S3.

Конечная (исследуемая) концентрация			
Таблетки		Премикса	
	в %	в мг/мл	в %
1	0,00781	0,07813	0,00781
2	0,01563	0,15625	0,01563
3	0,03125	0,3125	0,03125
4	0,0625	0,625	0,0625
5	0,125	1,25	0,125
6	0,25	2,5	0,25
7	0,5	5	0,5
8	1	10	1
	A	B	C
			D

## ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

### 1. Материалы и методы.

#### Реактивы и приборы

- Автоклав ВК-75, завод медоборудования, (Тюмень, Россия);
- Деионизатор MilliQ (Милипор, США);
- Камера морозильная LG GC-204SQW, обеспечивающая температуру минус 80 °C (Корея);
  - Холодильник бытовой, обеспечивающий температуру 4 °C («Stinol», Россия);
  - Шкаф вытяжной Ш2НЖ (Россия);
  - Ламинарный шкаф «Лабораторные системы» для работы с микроорганизмами 3-4 групп патогенности (Россия);
    - Масс-спектрометр MALDI Biotype (Bruker, Германия);
    - Термостаты ТС-80 ("Лабораторное оборудование", РФ);
    - Весы лабораторные электронные Е10640 с наибольшим пределом взвешивания 620 г и погрешностью не более 0,001 г, («Ohaus», Швейцария);
      - рН-метр лабораторный РВ11, («Sartorius», Германия);
      - Оптический стандарт мутности («Биомерье», Франция);
      - Весы аналитические Sartorius MSU225P-100-DA («Sartorius», Германия);
      - Питательный агар («Питательные среды», Оболенск, РФ);
      - Пробирки лабораторные полипропиленовые с закручивающимися пробками вместимостью 15 мл и 50 мл, стерильные («Corning Costar», США);
        - Планшеты 96-луночные (SPL Lifesciences, Япония);
        - Пробирки микрокентрифужные вместимостью 0,5 мл, 1,5 мл, 2,0 мл («Eppendorf», Германия);
          - Наконечники для регулируемых автоматических пипеток («Eppendorf» Германия);
          - Пипетки регулируемые автоматические вместимостью 0,5-10, 10-100, 100-1000 мкл («Eppendorf», Германия);
          - Пипетки стерильные пластиковые градуированные вместимостью 0,1-1,0; 2,0 мл («Corning Costar», США);
          - Пробирки микробиологические стеклянные по ГОСТ 1770-74;

- Петли инокуляционные одноразовые на 1 мкл, 2 мкл и 10 мкл («Greiner-bio-one» Швейцария);
- Чашки Петри диаметром 90 мм («Минимед», РФ);
- Спирт этиловый ректифицированный по ГОСТ Р 51652-2000;
- Перекись водорода 30 % по ГОСТ 177-88;
- Глюкоза (Химмед, РФ);

### **1.1. Предмет исследований**

Предметом исследований являются:

- «ОСТЕОМЕД ФОРТЕ» комплексный препарат для профилактики и комплексной терапии остеопороза, остеопении и сопутствующих им заболеваний (артрита, артроза, остеохондроза и других патологий опорно-двигательной системы, а также пародонтита); в реабилитационный период при переломах для профилактики остеопороза и других травм костей и суставов.

- Гомогенат трутневый является источником природных прогормонов: эстрадиола, пролактина, тестостерона, прогестерона, обладающих анаболическим действием на соединительные ткани человека, которые способствуют выработке собственных эндогенных гормонов, стимулируют синтез новых клеток и тканевых структур. Аминокислоты, входящие в состав трутневого гомогената, участвуют в формировании коллагена, который в свою очередь формирует костную матрицу.

- Цитрат кальция - является органической солью кальция, что способствует более полному и безопасному его всасыванию из ЖКТ. Кроме того, он помогает ингибированию выработки паратгормона и предотвращению гормонально обусловленной резорбции костной ткани, являясь эффективной и безопасной формой кальция, необходимой для укрепления костей и увеличения минеральной плотности костной массы.

- Витамин В<sub>6</sub> (пиридоксина гидрохлорид) помогает усвоению магния из ЖКТ и его транспортировке в клетки, усвоению кальция и его проникновению через мембранные клеток, препятствуя нарушению кальциевого обмена и помогает удержанию Са в новообразовавшихся остеоцитах.

- Витамин D<sub>3</sub> (холекальциферол). Способствует усвоению кальция, магния и фосфора и отвечает за уменьшение потери этих веществ с мочой через почки. Необходим для нормальной минерализации и роста костей. Витамин D<sub>3</sub> активно способствует росту скелета, укреплению мышц и минерализации костей и зубов.

### **1.2. Бактериальные культуры**

Референс-штаммы микроорганизмов получены из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск»:

бактерии группы кишечной палочки (БГКП) (4 штамма), включая патогенные *E. coli* 157 П.1 серотипа O157:H7 (*Escherichia coli* ATCC 35218, *Escherichia coli* O157:H7 ББС1, *Escherichia coli* K-202, *Escherichia coli* Mk1);

- бактерии *Staphylococcus* sp. (4 штамма), включая патогенные *S. aureus* ATCC1707 MRSA (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* 1707 MRSA, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990, *Staphylococcus epidermidis* 30 MRSA).

- бактерии *Streptococcus* sp. (4 штамма) (*Streptococcus agalactiae* 6445, *Streptococcus pyogenes* M 11, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *Streptococcus mutans* SS1083);

### 1.3. Исследуемые препараты

В ходе исследования использовали двукратные серийные разведения исследуемого препарата «ОСТЕОМЕД ФОРТЕ» (таблетка и отдельные активные компоненты без наполнителя - премикс).

Табл. 2. Рецептура «ОСТЕОМЕД ФОРТЕ» по ТУ 9197-060-41395157-12 с изм. № 1

Наименование ингредиентов	Количество ингредиентов, мг/табл	Количество ингредиентов, %
Цитрат кальция (активный компонент)	250,0	50,0
Лактоза (вспомогательный компонент, наполнитель)	188,0	37,6
Гомогенат трутневый адсорбированный (активный компонент)	50,0	10,0
Кальций стеариновокислый (вспомогательный компонент, скользящее вещество)	10,0	2,0
Витамин D <sub>3</sub> (субстанция с активностью 100000 МЕ/г) (активный компонент)	1,5 (150 МЕ)	0,3
Пиридоксина гидрохлорид (активный компонент)	0,5	0,1
Итого:	500,0	100,0

Маточный (основной) раствор готовили в дистиллированной воде, путем разведения 1 г препарата в 1 мл воды. Рабочие растворы препарата и его двукратные разведения (500мг/мл - 1 мг\мл) готовили из основного раствора с добавлением бульона Мюллера-Хинтона (МХБ).

### 1.4. Видовая идентификация микроорганизмов

Видовую идентификацию микроорганизмов проводили на масс-спектрометре MALDI-TOF Biotyper (Bruker, Германия).

### 1.5. Определение минимальной подавляющей концентрации (МПК)

**в отношении бактерий.**

МПК – минимальная концентрация, подавляющая видимый рост исследуемого микроорганизма в бульонной культуре или на плотной среде.

Определение МПК проводили микрометодом серийных разведений в бульоне. Метод основан на культивировании исследуемых культур в питательном бульоне в присутствии различных концентраций антибактериальных препаратов в стерильных 96-ти луночных планшетах. В качестве питательной среды использовали Мюллер-Хинтон бульон (МХБ).

В питательный бульон с соответствующей концентрацией исследуемого препарата вносили по 0,1 мл в 12 лунок в горизонтальных рядах в трёх повторах для 12-ти исследуемых штаммов патогенов. В отдельные ряды вносили бульон без препарата для контроля роста культур.

Из единичных колоний, выросших на среде Мюллера-Хинтона при 37°C в течение 18 часов, готовили суспензию с оптической плотностью 0,5 по стандарту МакФарланда в стерильном физиологическом растворе, что соответствует, приблизительно,  $1-2 \times 10^8$  КОЕ/мл. Затем суспензию разводили 1:100, добавляя 0,2 мл суспензии в колбу, содержащую 19,8 мл МХБ. Концентрация микроорганизмов при этом составляла 106 КОЕ/мл. Затем делали три последовательных десятикратных разведения полученной суспензии и высевали по 0,1 мл на плотную питательную среду для определения концентрации микробных клеток в колбе.

По 0,1 мл исходной суспензии вносили в лунки с исследуемым препаратом и контрольные лунки с бульоном. Конечная концентрация микроорганизма в каждой лунке составляла  $5 \times 10^5$  КОЕ/мл. Планшеты закрывали крышками и помещали в термостат (37 °C) на 20 часов. Наличие бактериального роста учитывали визуально (по наличию мутности в лунке). За минимальную подавляющую концентрацию (МПК) принимали минимальную концентрацию препарата, при которой рост бактерий отсутствовал через 20 ч инкубации.

#### **1.6. Определение минимальной бактерицидной концентрации (МБК) в отношении бактерий.**

Минимальную бактерицидную концентрацию (МБК) – определяли по результатам высева на плотные питательные среды. Для этого из всех лунок, в которых отсутствовал видимый рост (по наличию мутности), высевали по 10 мкл на питательную среду Мюллера-Хинтона. Результаты учитывали по наличию роста культуры в месте нанесения через 24 ч инкубирования при температуре 37°C<sup>0</sup>. Если рост в лунке отсутствовал, но при этом наблюдался рост исследуемой культуры при высеве из этой лунки на плотную питательную

среду, то эту концентрацию принимали за бактериостатическую. За МБК принимали наименьшее количество исследуемого препарата, которое подавляло жизнеспособность 99,9 % клеток.

Табл.3. Описание исследуемой серии препарата «ОСТЕОМЕД ФОРТЕ»

№ п/п	Наименование продукции, № партии/серии	Дата изготовлен ия/срок годности	Результат наружного осмотра партии (состояние упаковки, маркировки)	Количество отобранных образцов		
				для испытаний и иденти- фикации, г	для контрольно го хранения, г	Итого , г
1	2	3	4	5	6	7
I	ОСТЕОМЕД ФОРТЕ, таблетки 500 мг, Арт. ОФ_1623	10.04.2019	Упаковка 120 табл., 5 упаковок	120 X5 X0,5	0	300

### 1.7. Выбор видов и количества микроорганизмов

Для достижения цели и поставленных задач были использованы бактерии группы кишечной палочки (БГКП) (4 штамма), включая патогенные *E. coli* 157 П.1 серотипа O157:H7 (*Escherichia coli* ATCC 35218, *Escherichia coli* O157:H7 ББС1, *Escherichia coli* K-202, *Escherichia coli* Mk1); бактерии *Staphylococcus* sp. (4 штамма), включая патогенные *S. aureus* ATCC1707 MRSA и *Staphylococcus epidermidis* 30 MRSA (метициллин устойчивый) (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* 1707 MRSA, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990, *Staphylococcus epidermidis* 30 MRSA), а также бактерии *Streptococcus* sp. (4 штамма) (*Streptococcus agalactiae* 6445, *Streptococcus pyogenes* M 11, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *Streptococcus mutans* SS1083). Все используемые в работе штаммы бактерий представлены в таблице 1.

Табл 4. Характеристика используемых в исследовании по определению антибактериальной активности препарата «ОСТЕОМЕД ФОРТЕ», а также его компонентов

Вид микроорганизма	Название штамма	Откуда поступил	Особенности штамма
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 35218	Американская коллекция типовых культур (ATCC, США)	Используется как тест- штамм для контроля качества питательных сред
<i>Escherichia coli</i>	O157:H7 ББС1	Выделен из кишечника бройлерного цыплёнка	содержит ген rfb, не имеет генов stx1, stx2 eae,

			детерминирующих продукцию веротоксинов
<i>Escherichia coli</i>	K-202	Клинический иолят	Используется для изучения устойчивости к цефалоспоринам
<i>Escherichia coli</i>	Mк1	клинический материал, Московская область, 2008 г.	Клинический изолят
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	Американская коллекция типовых культур (ATCC, США)	Используется как тест-штамм для контроля качества питательных сред
<i>Staphylococcus aureus</i>	1707 MRSA	клинические образцы, Московская обл.	Клинический изолят, гнойная рана, содержит ген токсина GSEAR
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 14990	Американская коллекция типовых культур (ATCC, США)	Клинический изолят
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	30 MRSA	клинический изолят, Московская область, 2010 г.,	Клинический изолят
<i>Streptococcus agalactiae</i>	6445	клинический материал, Московская область, 2014 г.	Клинический иолят
<i>Streptococcus pyogenes</i>	M 11	клинические образцы, Московская обл., 2012 г.	Предназначен для размножения и тестирования специфических бактериофагов
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC 49619	Американская коллекция типовых культур (ATCC, США)	Выделен из мокроты 75-летнего мужчины
<i>Streptococcus mutans</i>	SS 1083	Американская коллекция типовых культур (ATCC, США)	Используется как тест-штамм для контроля качества питательных сред (альфа-гемолиз)

## 1.8. Клеточные культуры

В экспериментах по оценке возможного цитотоксического действия препарата «ОСТЕОМЕД ФОРТЕ» использовали перевиваемую человеческую линию эпителиальных клеток HeLa S3. Клеточная линия приобретена у Американской коллекции типовых культур ATCC (American Type Culture Collection). Перед использованием культура клеток была тестирована на жизнеспособность с помощью раствора трипанового синего, а также на отсутствие бактериальной и грибковой контаминации, наблюдаемой при осмотре культуральных флаконов под световым микроскопом.

Питательные среды и условия культивирования, пробоподготовка

В качестве среды для культивирования линии HeLa S3 использовали среду Игла в модификации Дульбекко (DMEM) с содержанием 2мМ L-глутамина и 10% инактивированной фетальной бычьей сыворотки (Gibco, Thermo Fisher, США). Клетки выращивали в 75 см<sup>2</sup> культуральных флааконах (Corning, США) в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> при 37°C, не превышая 70%-80% конфлюэнции. При подготовке к экспериментам использовали стандартную методику пересева адгезивных клеток: с поверхности флаакона со сформированным клеточным монослоем убирали питательную среду и вносили раствор трипсина-ЭДТА 0,05% (раствор трипсина 0,05%, ЭДТА - 0,53 мМоль в растворе Хенкса, не содержащем солей кальция и магния). Через 10 мин убирали раствор трипсина-ЭДТА и отделяли клетки от пластиковой подложки аккуратным постукиванием по флаакону. Затем во флаакон вносили 5-8 мл питательной среды и доводили концентрацию клеточной суспензии до 2,22 10<sup>5</sup> кл/мл. Подсчет клеток производили с помощью автоматического счетчика клеток TC20™ (Bio-Rad, США). Полученную суспензию клеток в среде помещали в лунки 96-луночных планшетов по 90 мкл на лунку. Таким образом каждая лунка содержала 2 X 10<sup>4</sup> клеток. Для исследования воздействия коммерчески доступных таблеток «ОСТЕОМЕД ФОРТЕ» и премикса из действующих веществ спустя 5, 24, 72 и 120 часов после внесения исследуемых субстанций в различных концентрациях, подготовили 4 культуральных планшета. Таким образом, для каждого из 4 временных интервалов учета результатов был предусмотрен отдельный планшет, крайние лунки которого были заполнены 1%-ном раствором CuSO<sub>4</sub>, остальные 60 лунок были заполнены клеточной суспензией. Подготовленные планшеты оставляли в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (Panasonic Corp., Япония) на ночь для кондиционирования и адгезии клеток. Все планшеты были засеяны единовременно суспензией клеток из одного пассажа для максимального единообразия (качественного и количественного) клеточного содержимого в каждой лунке.

Приготовление рабочих растворов «ОСТЕОМЕД ФОТРЕ» и премикса активных действующих веществ

Разведения исследуемых субстанций проводили в асептических условиях, используя стерильный фосфатно-солевой буфер (ФСБ, 137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 10 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,76 мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4), непосредственно перед занесением в планшеты с клеточной культурой. Исключение: витамин D3 растворяли в 96% спирте.

Для приготовления 10% (100 мг/мл) суспензии коммерчески доступного препарата «Остеомед-форте», одну таблетку массой 500 мг помещали в мерную колбу и доводили

объем до 5 мл фосфатно-солевым буфером. Содержимое колбы интенсивно перемешивали в течение 10-15 минут до полного диспергирования таблетки.

Для приготовления премикса из действующих компонентов, имитирующего 10%-ную суспензию таблетированной формы, по отдельности подготавливали 10%-ные суспензии/растворы цитрата кальция, трутневого гомогената, витамина D3 и витамина B6, а затем соединяли в одной пробирке следующим образом: 500 мкл цитрата кальция + 100 мкл трутневого гомогената + 3 мкл витамина D3 + 1 мкл витамина B6 + 394 мкл ФСБ. Суспензии перед отбором перемешивали пипетированием.

Затем с диспергированной таблеткой и премиксом проводили серию двукратных разведений. В результате получали суспензии таблетки с концентрациями (в % и мг/мл):

%	10	5	2,5	1,25	0,625	0,3125	0,15625	0,078125
мг/мл	100	50	25	12,5	6,25	3,125	1,5625	0,78125

После 12-часовой инкубации планшеты вынимали из CO<sub>2</sub>-инкубатора, переносили в ламинарный шкаф и добавляли по 10 мкл суспензии каждой из подготовленных концентраций в 3 лунки (3 повторности). Также в 6 лунок добавили по 10 мкл ФСБ (положительный контроль), в другие 6 лунок по 10 мкл 0,25% раствора мертиолята натрия (Oskar Tropitzsch, Германия) в ФСБ (отрицательный контроль). Мертиолят натрия – вещество, обладающее выраженным цитотоксическим действием. Способен вызвать 100% гибель клеток за несколько часов при концентрации в среде выше 0,01%. Схема титрования образцов и расположение контролей приведена на рис. 1. Затем подготовленные планшеты убирали в CO<sub>2</sub>-инкубатор.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CuSO <sub>4</sub>											
B	CuSO <sub>4</sub>	1%	0,5%	0,25%	0,125%	0,0625%	0,0313%	0,0156%	0,0078%	ФСБ	ФСБ	CuSO <sub>4</sub>
C	CuSO <sub>4</sub>	1%	0,5%	0,25%	0,125%	0,0625%	0,0313%	0,0156%	0,0078%	ФСБ	ФСБ	CuSO <sub>4</sub>
D	CuSO <sub>4</sub>	1%	0,5%	0,25%	0,125%	0,0625%	0,0313%	0,0156%	0,0078%	ФСБ	ФСБ	CuSO <sub>4</sub>
E	CuSO <sub>4</sub>	1%	0,5%	0,25%	0,125%	0,0625%	0,0313%	0,0156%	0,0078%	Мертиолят	Мертиолят	CuSO <sub>4</sub>
F	CuSO <sub>4</sub>	1%	0,5%	0,25%	0,125%	0,0625%	0,0313%	0,0156%	0,0078%	Мертиолят	Мертиолят	CuSO <sub>4</sub>
G	CuSO <sub>4</sub>	1%	0,5%	0,25%	0,125%	0,0625%	0,0313%	0,0156%	0,0078%	Мертиолят	Мертиолят	CuSO <sub>4</sub>
H	CuSO <sub>4</sub>											

Таблетка – строки ABCD

Премикс – строки EFGH

Рис.1. Схема заполнения планшетов с клеточной культурой HeLa S3 анализируемыми образцами и расположение контролей

Цитотоксический тест MTT

Цитотоксическое действие препарата «ОСТЕОМЕД ФОРТЕ» оценивали по снижению суммарной активности митохондриальных клеточных дегидрогеназ в микротесте МТТ. Фотометрический метод МТТ является одним из наиболее общепринятых методов оценки цитотоксичности (Mossmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays // J. Immunol. Methods. – 1983. – V.65. – P.55) и основан на способности дегидрогеназ митохондрий восстанавливать желтую растворимую соль МТТ (3-(4,5-диметтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромида), в результате чего в цитоплазме клеток накапливаются гранулы нерастворимого формазана пурпурного цвета. Таким образом, количество окрашенных клеток и степень пурпурного окрашивания их цитоплазмы коррелирует с общей жизнеспособностью клеточного монослоя. По изменению оптической плотности, измеренной при длине волны 540 нм (ОП540) в лунках, где инкубировали то или иное количество препарата, делали вывод о его цитотоксическом действии.

В различные сроки инкубации (5, 24, 72 и 120 ч) в лунки добавляли по 10 мкл стокового раствора МТТ и инкубировали в течение 4 ч. Раствор МТТ был приготовлен разбавлением навески из набора Vybrant® MTT Cell Proliferation Assay Kit (Molecular Probes V13154, Thermo Fisher, США) в 1 мл фосфатно-солевого буфера. Затем аккуратно удаляли 85 мкл содержимого лунок и лизировали клеточный монослой добавлением 175 мкл диметилсульфоксида (ДМСО, Sigma-Aldrich, США). Для обеспечения полного лизиса клеток и равномерного растворения кристаллов формазана каждый ряд в 96-луночных планшетах тщательно перемешивали пипетированием с помощью многоканального дозатора. Оптическую плотность клеточного лизата измеряли при длине волны 540 нм на планшетном спектрофотометре xMark (Bio-Rad, США).

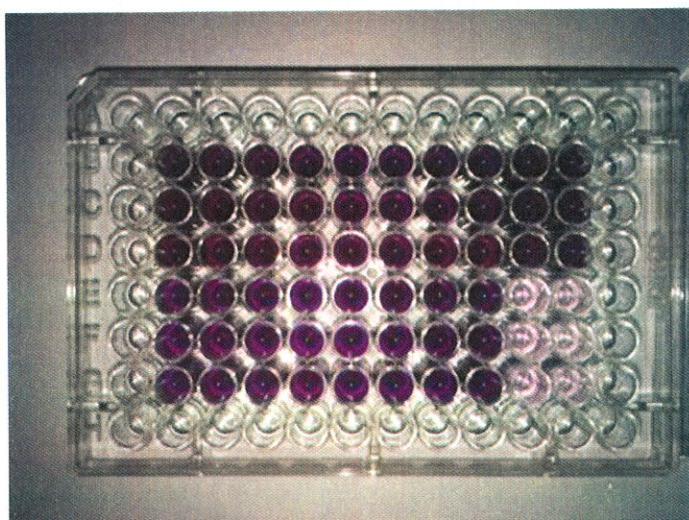


Рис. 2. Экспериментальный 96-луночный планшет после проявки в микротесте МТТ.

Жизнеспособность клеток в каждой опытной лунке была рассчитана по следующей формуле: (1), где

$v$  – жизнеспособность клеток в данной опытной лунке;

$\text{ОП}540i$  – оптическая плотность клеточного лизата, измеренная в данной опытной лунке при длине волны 540 нм;

$\bar{\text{ОП}}540K+$  – усредненное значение оптической плотности клеточного лизата в контрольных лунках группы «К+» (положительный контроль, к клеткам добавлен только ФСБ) измеренное при длине волны 540 нм;

$\bar{\text{ОП}}540K-$  – усредненное значение оптической плотности клеточного лизата в контрольных лунках группы «К-» (отрицательный контроль, в среде присутствует 0,025% раствор мертиолята натрия), измеренное при длине волны 540 нм.

Статистическая обработка результатов проводилась с помощью программного сервиса GraphPad Prism (<https://www.graphpad.com/>)

## 2. Результаты исследований

2.1 Определение минимальной подавляющей (МПК) и минимальной бактерицидной концентрации (МБК) препарата «ОСТЕОМЕД ФОРТЕ», а также его активного компонентов цитрата кальция, витамина В6, витамина D3 и трутневого гомогената.

Определение МПК и МБК исследуемых препаратов проводили микрометодом серийных разведений в бульоне на планшетах. В работе использовали диапазон двукратных разведений препаратов, в стерильной дистиллированной воде, от 500 до 1 мг/мл.

Следует отметить, что при приготовлении основного, а также рабочих растворов была отмечена неполная растворимость препаратов, исходно предоставленных для исследования в виде порошков. (Табл.5) Нерастворенная часть препаратов выпадала в осадок на дно лунки плашек для культивирования. Чем выше была концентрация исследуемого препарата, тем интенсивнее цвет бульона для разведения. В связи с помутнением питательного бульона во всех разведениях в результате неполного растворения исследуемых препаратов – оказалось затруднительным определение МПК в лунках планшета по завершении инкубации исследуемых культур бактерий. Поэтому наличие роста бактерий и изменение КОЕ по завершении инкубации учитывали по результатам высея на плотные питательные среды не содержащие исследуемые компоненты препарата (табл. 6)

Таблица 5. Концентрации маточных растворов тестируемых препаратов

Название препарата	Концентрация маточного раствора
Трутневый гомогенат адсорбированный	1, г/мл
Остеомед форте	1 таблетка/мл
Витамин D3	1, г/мл
Цитрат кальция	0,5, г/мл
Витамин В6	1, г/мл

Примечание: рабочие растворы готовили при методом двукратных ступенчатых разведений маточных растворов препаратов.

Таблица 6. Концентрации растворов для определения МПК и МБК исследуемых препаратов против различных бактериальных патогенов

	Трутневый гомогенат, мг/мл						Остеомед форте, таблетка				
	500	250	125	63	32	16	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
<i>E. coli</i> ATCC 35218	500	250	125	63	32	16	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
<i>E. coli</i> O157:H7	500	250	125	63	32	16	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
<i>E. coli</i> K-202	500	250	125	63	32	16	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
<i>E. coli</i> M <sub>K</sub> 1	500	250	125	63	32	16	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	500	250	125	63	32	16	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
<i>S. aureus</i> 224/228 MRSA	500	250	125	63	32	16	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
<i>S. epidermidis</i> ATCC 14990	500	250	125	63	32	16	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
<i>S. epidermidis</i> 30 MRSA	500	250	125	63	32	16	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32

	Витамин D3, г/мл				Цитрат кальция, г/мл			Витамин В6, г/мл			
	500	250	125	63	250	125	63	31	500	250	125
<i>E. coli</i> ATCC 35218	500	250	125	63	250	125	63	31	500	250	125
<i>E. coli</i> O157:H7	500	250	125	63	250	125	63	31	500	250	125
<i>E. coli</i> K-202	500	250	125	63	250	125	63	31	500	250	125
<i>E. coli</i> M <sub>K</sub> 1	500	250	125	63	250	125	63	31	500	250	125
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	500	250	125	63	250	125	63	31	500	250	125
<i>S. aureus</i> 224/228 MRSA	500	250	125	63	250	125	63	31	500	250	125
<i>S. epidermidis</i> ATCC 14990	500	250	125	63	250	125	63	31	500	250	125
<i>S. epidermidis</i> 30 MRSA	500	250	125	63	250	125	63	31	500	250	125

	Трутневый гомогенат 1, г/мл						Остеомед форте 1, таблетка				
	500	250	125	63	32	16	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
<i>S. mutans</i> MO 201	500	250	125	63	32	16	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
<i>S. agalactiae</i> 6445	500	250	125	63	32	16	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
<i>S. pyogenes</i> M11	500	250	125	63	32	16	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	500	250	125	63	32	16	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32

	Витамин D3 1, г/мл				Цитрат кальция 0,5, г/мл				Витамин В6 1, г/мл		
<i>S. mutans</i> MO 201	500	250	125	63	250	125	63	31	500	250	125
<i>S. agalactiae</i> 6445	500	250	125	63	250	125	63	31	500	250	125
<i>S. pyogenes</i> M11	500	250	125	63	250	125	63	31	500	250	125
<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	500	250	125	63	250	125	63	31	500	250	125

Рост культуры

В результате исследований было показано, что в диапазоне от 1 до 500 мг/мл (от 1\2 до 1\64 для таблетированной формы ОСТЕОМЕД ФОРТЕ) антибактериальная активность исследуемых препаратов («ОСТЕОМЕД ФОРТЕ», а также его компонентов цитратат а кальция, витамина В6, Витамина D3 и трутневого гомогената) в отношении грамположительных патогенных бактерий *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. agalactiae*, *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *S. mutans* и грамотрицательных бактерий *E. coli* не выявлена.

Достоверно определяемый ингибирующий эффект в отношении исследуемых бактерий как для таблетированной формы, так и активных компонентов «ОСТЕОМЕД ФОРТЕ» отсутствует. Рост культуры наблюдается в диапазоне концентраций от 1 до 500 мг/мл (Табл.6).

*Оценка возможного цитотоксического действия препарата «ОСТЕОМЕД ФОРТЕ»*

В течение отчетного периода было проведено четыре микротеста МТТ, по результатам которых получены значения ОП540 клеточных лизатов (Приложение 1). По формуле (1) были рассчитаны показатели жизнеспособности клеток HeLa S3 в каждой опытной лунке культуральных планшетов. На основании полученных значений составлена таблица 7, в которой отражены усредненные показатели жизнеспособности.

Табл 7. Усредненные значения жизнеспособности клеточной популяции HeLa S3 в эксперименте с препаратом «ОСТЕОМЕД ФОРТЕ»

Концентрация, %	Жизнеспособность клеток HeLa S3 (среднее значение), в, %							
	Таблетка				Премикс			
	5 часов	24 часа	72 часа	120 часов	5 часов	24 часа	72 часа	120 часов
1	97,266485	93,863735	94,74104	93,041287	78,041197	83,248484	79,353537	65,972088
0,5	98,859956	92,628899	92,198349	87,972475	82,860474	85,198224	79,916495	68,511339
0,25	91,086928	90,874133	94,046725	89,61039	90,024615	86,920494	85,508538	78,639271
0,125	87,485426	85,804809	92,892663	87,885249	89,597098	73,813908	84,316945	77,883311
0,0625	88,936391	84,678293	91,654157	90,763714	90,944423	74,041378	88,623569	85,384764
0,03125	91,877186	83,486785	94,009195	93,748789	96,139396	93,105503	92,320323	87,953092
0,015625	93,755668	87,082972	97,189904	96,782322	95,608239	95,780979	97,20867	92,672999
0,0078125	98,45835	97,091638	98,916307	99,147122	96,100531	97,925693	97,949897	98,720682

Данные, полученные после обработки результатов измерений ОП540 были загружены в программу GraphPad Prism 7.0 для построения кривых, характеризующих жизнеспособность клеточного монослоя спустя различные периоды инкубации (рис. 3, 4, 5, 6). Для построения пределов погрешности было выбрано среднеквадратическое отклонение (SD).

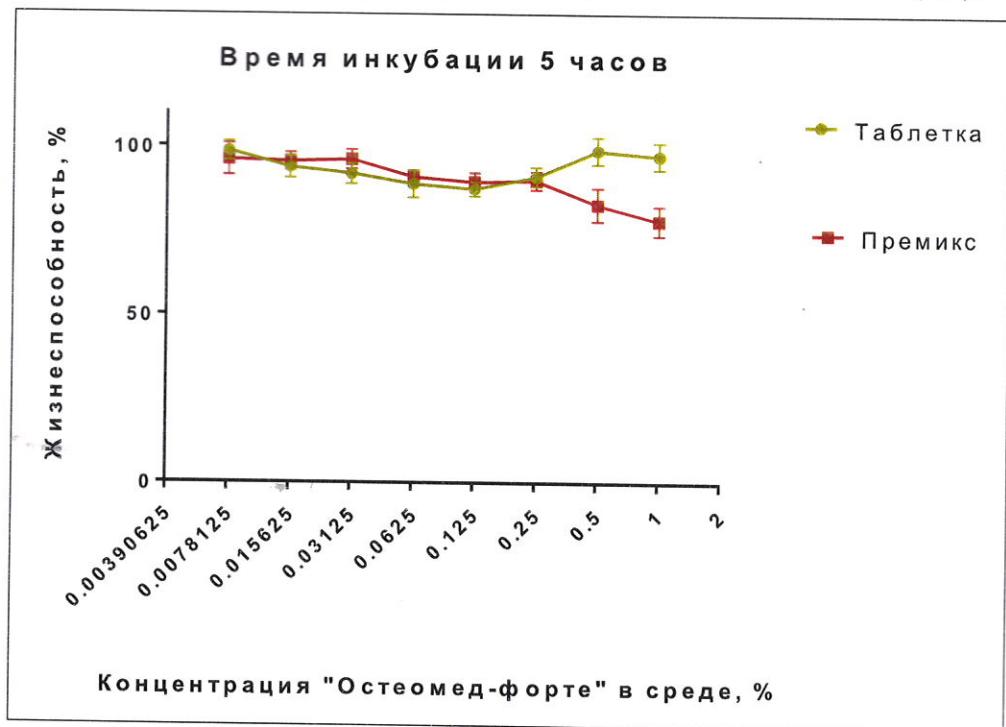


Рис. 3. Динамика жизнеспособности культуры клеток HeLa S3 после инкубации с препаратом «ОСТЕОМЕД ФОРТЕ» в форме таблетки и премикса (5 часов).

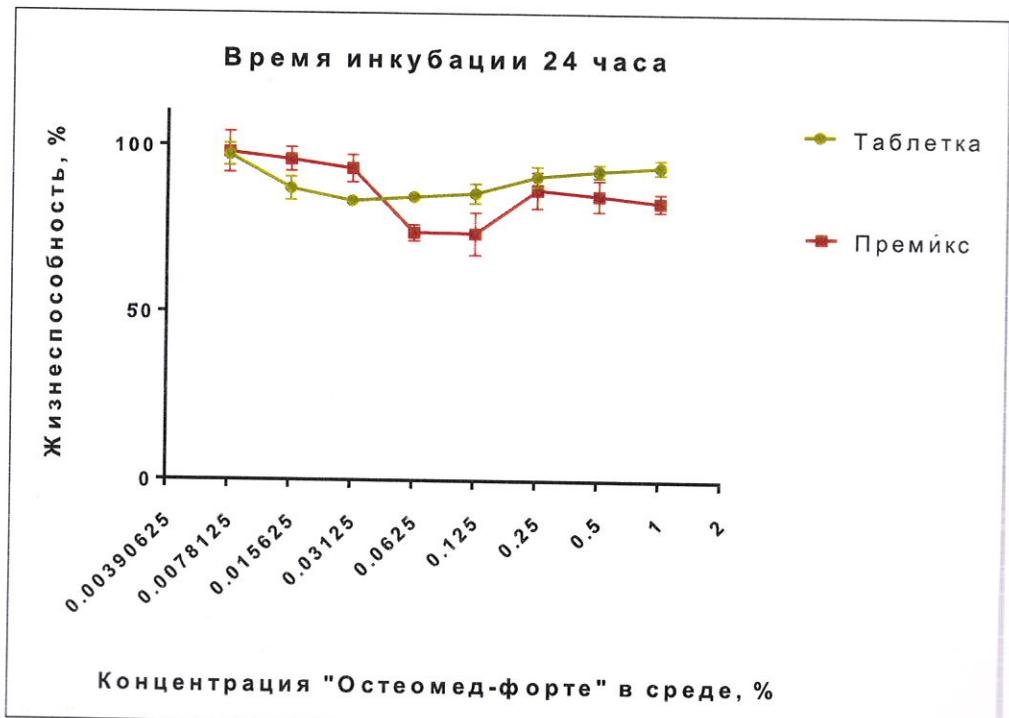


Рис. 4. Динамика жизнеспособности культуры клеток HeLa S3 после инкубации препаратом «ОСТЕОМЕД ФОРТЕ» в форме таблетки и премикса (24 часа).

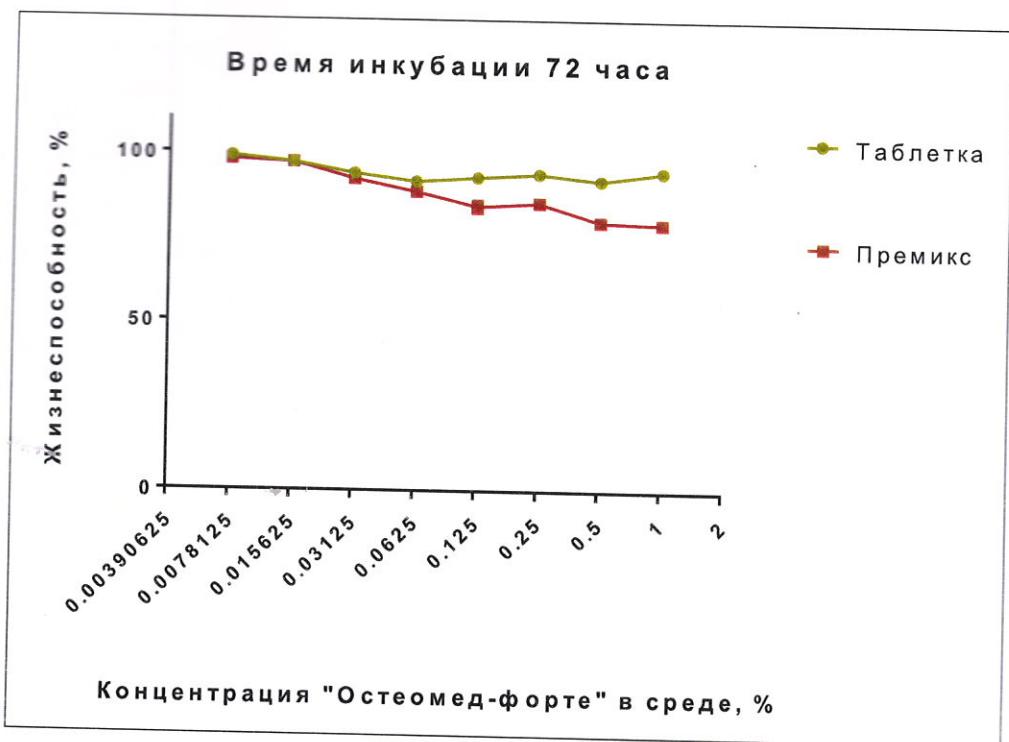


Рис 5. Динамика жизнеспособности культуры клеток HeLa S3 после инкубации с препаратом «ОСТЕОМЕД ФОРТЕ» в форме таблетки и премикса (72 часа).

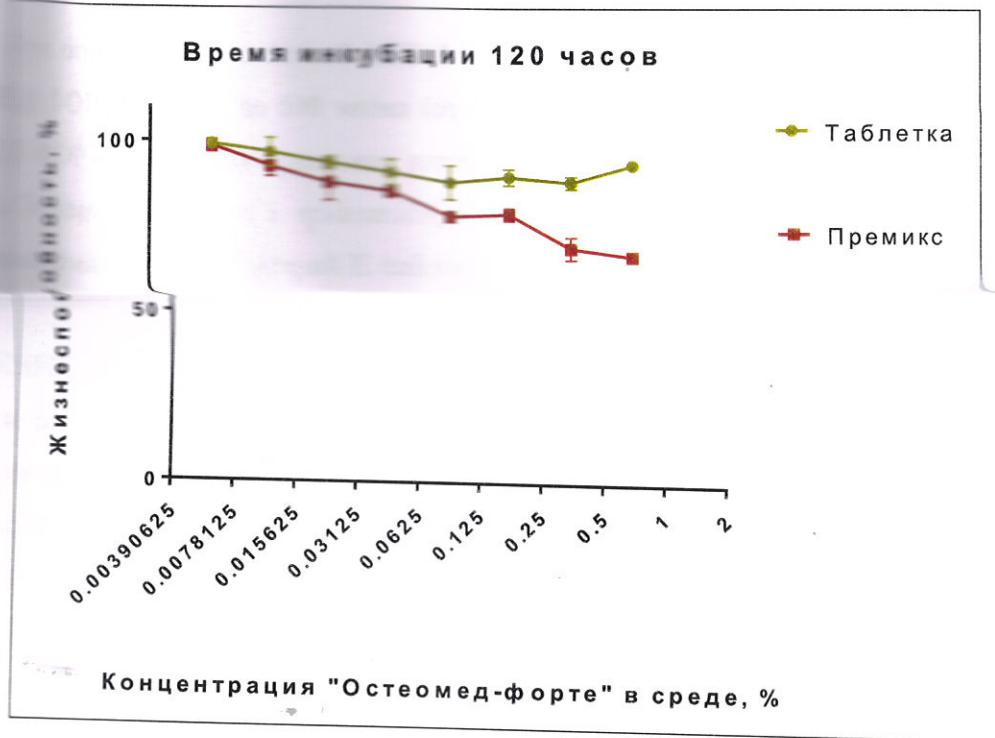


Рис 6. Динамика жизнеспособности культуры клеток HeLa S3 после инкубации с препаратом «ОСТЕОМЕД ФОРТЕ» в форме таблетки и премикса (120 часов).

Примечание. Если значение жизнеспособности в опыте было ниже 100%, то предполагали относительное ухудшение жизненных показателей клеточной культуры после воздействия препарата: клетки снижали свою метаболическую активность и/или их количество уменьшалось (снижалась пролиферативная активность). NOAEL составил 0,0078125% (78,125 мкг/мл) исследуемого препарата в питательной среде клеток. IC50 в исследованном диапазоне концентраций не обнаружена.

### 3. Выводы:

3.1 Препарат «ОСТЕОМЕД ФОРТЕ» не обладает цитотоксическим действием в отношении клеточной культуры HeLa S3: 0 баллов по шкале цитотоксичности в ГОСТ ISO 10993-5-2011.

3.2. Корреляционная зависимость между концентрацией препарата «ОСТЕОМЕД ФОРТЕ» и жизнеспособностью клеток не установлена.

3.3 Различий между таблетированной формой и премиксом из активных действующих веществ «ОСТЕОМЕД ФОРТЕ» в концентрациях 0,5 - 1% (5 - 10 мг/мл), по показателю жизнеспособности клеток HeLa S3 не установлено. Вместе с тем, при концентрации препарата в среде 1% показатель жизнеспособности клеток HeLa S3 премикса был ниже, чем таблетированной формы «ОСТЕОМЕД ФОРТЕ» примерно на 18%, что может свидетельствовать об ингибирующем действии премикса на метаболизм клеток HeLa S3.

3.4. При определении значений МПК/МБК в диапазоне концентраций препарата «ОСТЕОМЕД ФОРТЕ» от 1 до 500 мг/мл (от 1\2 до 1\64 для таблетированной формы ОСТЕОМЕД ФОРТЕ) антибактериальная активность в отношении грамположительных патогенных бактерий *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. agalactiae*, *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *S. mutans* и грамотрицательных бактерий *E. coli* не выявлена.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные *in vitro* результаты показали:

- в диапазоне концентраций от 1 до 500 мг/мл препарат «ОСТЕОМЕД ФОРТЕ», а также его активные компоненты цитрат кальция, витамин В6, Витамин D3 и трутневый гомогенат не оказывали антибактериального действия на референс-штаммы бактерии группы кишечной палочки (БГКП), бактерии *Staphylococcus* sp., а также бактерии *Streptococcus* sp.
- достоверных различий в антибактериальной активности таблетированной формы препарата «ОСТЕОМЕД ФОРТЕ», а также его активных компонентов (цитрат кальция витамин В6, Витамина D3 и трутневый гомогенат) против исследуемых видов бактерий не выявлено.
- препарат «ОСТЕОМЕД ФОРТЕ» не обладает цитотоксическим действием в отношении клеточной культуры HeLa S3: 0 баллов по шкале цитотоксичности (ГОСТ ISO 10993-5-2011).

## Приложение 1

Измеренные значения оптической плотности клеточных лизатов в микротестах МТТ (необработанные данные)

Raw Data{Wavelength:540.0}

	5 часов											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	2,962	3,036	2,688	2,638	2,607	2,828	2,775	2,906	2,929	2,978		
C	2,914	2,838	2,804	2,68	2,787	2,677	2,881	2,988	2,984	3,063		
D	2,765	2,89	2,672	2,568	2,604	2,72	2,714	2,839	2,882	2,868		
E	2,257	2,37	2,622	2,619	2,719	2,786	2,759	2,737	0,373	0,403		
F	2,476	2,62	2,763	2,757	2,767	2,932	2,886	2,98	0,361	0,367		
G	2,424	2,539	2,697	2,673	2,667	2,836	2,868	2,834	0,374	0,388		
H												

Raw Data{Wavelength:540.0}

	24 часа											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	3,082	3,117	3,098	2,967	2,87	2,788	2,891	3,319	3,254	3,103		
C	3,193	3,107	3,054	2,841	2,797	2,776	2,81	3,11	3,577	3,265		
D	3,07	3,007	2,917	2,793	2,83	2,823	3,018	3,214	3,332	3,292		
E	2,791	2,705	2,712	2,272	2,452	3,021	3,054	3,023	0,235	0,227		
F	2,704	2,985	3,025	2,631	2,59	3,237	3,269	3,339	0,221	0,222		
G	2,87	2,855	2,967	2,591	2,473	3,017	3,199	3,358	0,231	0,223		
H												

Raw Data{Wavelength:540.0}

	72 часа											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	3,619	3,456	3,497	3,46	3,446	3,567	3,648	3,676	3,671	3,726		
C	3,541	3,441	3,558	3,454	3,45	3,537	3,654	3,724	3,791	3,788		
D	3,51	3,502	3,541	3,559	3,445	3,488	3,629	3,715	3,823	3,662		

E	2,973	3,043	3,204	3,114	3,361	3,504	3,686	3,632	0,206	0,198
F	3,023	3,017	3,221	3,262	3,37	3,503	3,648	3,686	0,186	0,195
G	3,034	3,03	3,261	3,183	3,287	3,405	3,599	3,694	0,194	0,166
H										

Raw Data{Wavelength:540.0}

A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
B	3,367	3,238	3,241	3,323	3,454	3,578	3,613	3,633	3,692	3,692	3,633	3,502
C	3,376	3,21	3,331	3,245	3,403	3,383	3,575	3,585	3,585	3,585	3,585	3,557
D	3,348	3,12	3,165	2,991	3,131	3,327	3,324	3,523	3,523	3,523	3,523	3,594
E	2,489	2,488	2,871	2,82	3,121	2,977	3,297	3,511	0,181	0,181	0,181	0,167
F	2,436	2,423	2,8	2,842	3,03	3,288	3,468	3,536	0,176	0,176	0,176	0,133
G	2,373	2,649	2,934	2,865	3,15	3,301	3,288	3,63	0,172	0,172	0,172	0,153
H												

120  
часов

Пронумеровано, прошнуровано,  
скреплено подписью и печатью  
(25) двадцать пять листа (ов)  
Зав. отделом делопроизводства  
Хрусталева Т.В.

