Вестник Тюменского государственного университета.
Экология и природопользование. 2016. Том 2. № 3. 96-105

Александр Сергеевич БАЖИН[1]
Владимир Павлович МЕЛЬНИКОВ[2]
Иван Михайлович БЕСЕДИН[3]
Людмила Федоровна КАЛЁНОВА[4]

УДК 57.017.3

ИЗУЧЕНИЕ РЕПАРАТИВНОГО И ИММУННОГО ПОТЕНЦИАЛА БАКТЕРИЙ *BACILLUS SP*. ИЗ МНОГОЛЕТНЕМЕРЗЛЫХ ПОРОД

[1] научный сотрудник отдела биоресурсов криосферы,
Тюменский научный центр СО РАН
aleksandrbazhin@mail.ru

[2] доктор геолого-минеральных наук, академик РАН,
председатель Тюменского научного центра СО РАН
melnikov@ikz.ru

[3] научный сотрудник, Тюменский научный центр СО РАН
teriolog@mail.ru

[4] доктор биологических наук,
главный научный сотрудник,
Тюменский научный центр СО РАН
lkalenova@mail.ru

Аннотация

На модели кожной раны установлено наличие высокого репаративного потенциала у бактерий *Bacillus sp*., выделенных из многолетнемерзлых пород, и продуктов их жизнедеятельности — метаболитов. Наиболее эффективными из них являются «тепловые», полученные при культивировании бактерий при 37ºС. При локальном нанесении на рану они способствуют оптимизации регенераторного процесса, сокращению времени контракции раны, уменьшению образования рубцовой ткани,

Цитирование: Бажин А. С. Изучение репаративного и иммунного потенциала бактерий *Bacillus sp.* из многолетнемерзлых пород / А. С. Бажин, В. П. Мельников, И. М. Беседин, Л. Ф. Калёнова // Вестник Тюменского государственного университета. Экология и природопользование. 2016. Том 2. № 3. С. 96-105.
DOI: 10.21684/2411-7927-2016-2-3-96-105

более полноценному восстановлению шерстного покрова. Мазь с «тепловыми» метаболитами ускоряет процесс репарации на 30% относительно мазевой основы, на 20% относительно лекарственного препарата «Солкосерил» и на 10% относительно самих бактерий.

Динамика формообразовательных процессов при заживлении дефекта кожи под влиянием бактерий *Bacillus sp.* и их метаболитов коррелирует с динамикой активности иммунной системы. Последовательность изменения активности различных звеньев иммунной системы (неспецифическая иммунорезистентность — клеточный иммунитет — гуморальный иммунитет) соответствует этапности развития репарационного процесса (повреждение — воспаление — восстановление). На основании полученных данных метаболиты *Bacillus sp*. можно отнести к модуляторам репаративного процесса с преобладанием механизмов регенерации.

Ключевые слова

Многолетнемерзлые породы, бактерии *Bacillus sp*., метаболиты, репарация, иммунная система.

DOI: 10.21684/2411-7927-2016-2-3-96-105

Введение

Обнаружение сообществ микроорганизмов в многолетнемерзлых породах разного геологического возраста и генезиса является свидетельством природной «криоконсервации» древних генов в виде «живых ископаемых». В стратегии самосохранения в криогенных средах бактерии выработали разнообразные механизмы адаптации, в том числе они способны быстро репарировать свою структуру, обладают высокой стрессоустойчивостью, синтезируют внеклеточные метаболиты со свойствами сигнальных молекул, которые функционируют в очень низких концентрациях, обладают неспецифическим действием и могут оказывать перекрестный эффект, в том числе на клетки человека [1, 5]. Появились первые сообщения, что метаболиты криогенных бактерий *Bacillus subtilis*, выделенных из мерзлотных почв Якутии, способствуют повышению активности иммунной системы и снижению заболеваемости животных в 5-20 раз [2, 8]. Представляется актуальным оценить иммунотропный и репаративный потенциал *Bacillus sp*., т. к. подобные исследования могут быть перспективны для получения новых биологически активных веществ со свойствами адаптогенов, иммуностимуляторов, репарантов и геропротекторов.

Материал и методы исследования

В качестве объекта исследования использован штамм М3 *Bacillus sp.*, выделенный из многолетнемерзлых пород позднего неогена (заповедник реликтовой мерзлоты на планете, Центральная Якутия, возраст пород 3,5-2,0 млн лет). Метаболиты бактерий штамма М3 *Bacillus sp*. получали в процессе инкубирования бактерий при положительных (37ºС) и отрицательных (−5ºС) температурах.

В качестве контроля сравнения использовали лекарственный препарат ранозаживляющего действия «Солкосерил» (Швейцария).

Исследование проведено на модели плоскостной полнослойной асептической кожной раны по С. Н. Турищеву в нашей модификации, которая состояла из двух пунктов: во-первых, использовался трафарет из оргстекла с отверстием 3,5×7,2 мм, во-вторых, рану формировали в нижней трети спины справа от позвоночника. Аликвоты бактерий готовили из расчета 2×10^6 микробных клеток (м. кл.) в 1 мл физиологического раствора. Дополнительно получали метаболиты РМО при отрицательных (−5ºС) и положительных (37ºС) температурах инкубации бактерий в течение 72 часов в физиологическом растворе. Для получения лечебных препаратов микроорганизмы обоих штаммов в дозе 2×10^6 м. кл./мл и метаболиты от 2×10^6 м. кл. соединяли с равным объемом геля из 2% целлюлозы, в который для контроля добавляли равный объем физиологического раствора. Мазевую композицию с испытуемым веществом в объеме 15-20 м. кл. локально наносили на поверхность раны один раз в день 5 дней подряд.

Эксперимент проведен на 224 инбредных мышах BALB/c весом 18-20 г. У 192 животных формировали кожную рану, 32 оставались интактными. Животных разделили на 6 групп: 1 — интактный контроль (КИ); 2 — обработка раны гелем (контроль мазевой основы, К); 3 — обработка раны лечебным препаратом «Солкосерил» (КС); 4 — обработка раны гелем с реликтовыми микроорганизмами *Bacillus sp.* (РМО); 5 — обработка раны гелем с «холодовыми» метаболитами, полученными при инкубации РМО при −5ºС (МБ-Х); 6 — обработка раны гелем с «тепловыми» метаболитами, полученными при инкубации РМО при 37ºС (МБ-Т).

Ежедневно, в течение 21 дня, оценивали состояние кожной раны и проводили измерение ее площади. Оценку функционального состояния иммунной системы проводили на 0, 3, 7, 14 и 21 сутки раневого процесса. У животных определяли индексы тимуса, селезенки и надпочечников — процентное отношение веса органа к весу тела. Оценивали способность адгезированных на стекле селезеночных макрофагов к поглощению (ФП) инактивированных дрожжевых клеток, а также их метаболическую активность в спонтанном варианте НСТ-теста (по Назаренко, Кишкун, 2009). Состояние гуморального иммунитета оценивалось по числу антителообразующих клеток (АОК) в 1×10^6 лимфоцитов селезенки методом Cunningham. Активность клеточного иммунитета оценивали по реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) по Crowle.

Все манипуляции с животными проведены в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к Приказу МЗ СССР № 755 от 12.03.1977 г.) и «Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» (ETSN № 123, Страсбург, 18 марта 1986 г.). Достоверность различий между группами оценивали по *t* критерию Стьюдента в программе SPSS

11,5 for Windows. Для удобства демонстрации отдельные результаты исследования представлены в виде рисунков, где показатели опытной группы выражены в процентах отличия от контрольного уровня.

Результаты и обсуждение

Визуальное наблюдение показало, что под влиянием РМО и «тепловых» метаболитов (МБ-Т) струп был значительно тоньше и мягче. Появление первых очагов эпителизации в опытных группах с РМО, МБ-Х и МБ-Т отмечено на 2 сутки, а в контроле с мазевой основой (КИ) и солкосерилом (КС) — на 3 сутки. Первые признаки роста шерсти были отмечены в группе с МБ-Т на 7 сутки, в группе с РМО — на 8 сутки, в остальных группах — на 9 сутки. К 21 суткам в группах РМО и МБ-Т отмечен хороший шерстный покров и практически полное отсутствие рубца. В группах с солкосерилом и МБ-Х шерстный покров также хороший, рубец слабо выражен. В группе контроля мазевой основы шерстный покров слабее, и рубец выражен более сильно.

Анализ динамики изменения скорости контракции раны, вычисленной по изменению площади раневой поверхности, показал следующее. В группе контроля мазевой основы (КИ) эпителизация раневой поверхности завершилась на 13 сутки. Под влиянием солкосерила и «холодовых» метаболитов (МБ-Х) эпителизация раневой поверхности завершилась на 12 сутки (на 8,3% быстрее, чем в контроле). Под влиянием РМО эпителизация раневой поверхности завершилась на 11 сутки (на 18,2% быстрее, чем в контроле и на 9,1% быстрее, чем в группе с солкосерилом).

Явным лидером модуляции репаративных процессов являются «тепловые» метаболиты, что отражено на рисунке 1. Под влиянием мази с МБ-Т процесс репарации ускорился на 30% относительно контроля мазевой основы,

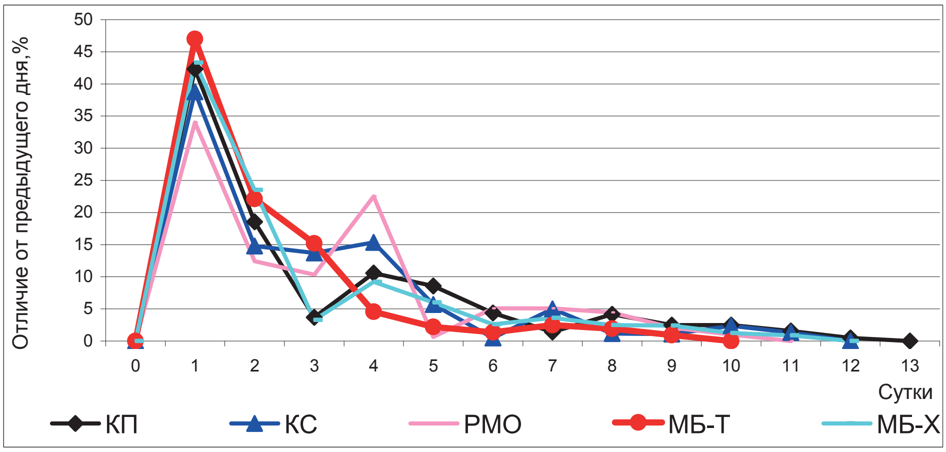

Рис. 1. Динамика изменения скорости контракции раны

Fig. 1. Changes in the speed of wound contraction

на 20% относительно солкосерила и МБ-Х, на 10% быстрее, чем под влиянием самих РМО. Сокращение времени контракции раны произошло за счет сокращения длительности фаз воспаления и грануляции на 1 сутки.

Учитывая, что иммунная система, помимо цензорной, обладает и морфогенетической функцией и активно участвует в восстановлении тканевого гомеостаза, исследована ее функциональная активность в динамике репарационного процесса. В фазу воспаления (3 сутки) у всех животных повышена фагоцитарная и метаболическая активность макрофагов (табл. 1). Это согласуется с известными данными о решающей роли макрофагов именно в первую фазу заживления раны, т. к. они отвечают за удаление омертвевших клеток путем фагоцитоза и секреции цитокинов, участвующих в процессе репарации [4, 9, 10]. Также во всех группах повышена активность клеточного иммунитета (табл. 1). Сумма этих данных свидетельствует об активации провоспалительных механизмов иммунной системы.

Хотелось бы обратить внимание на повышение (3 сутки) репарационного процесса активности гуморального (табл. 1) иммунитета у животных с РМО и МБ-Т, что может свидетельствовать о раннем включении иммунных механизмов с противовоспалительной активностью. В фазу пролиферации (7 сутки) общим для всех групп является, с одной стороны, снижение поглотительной активности макрофагов (ФП) и реакции клеточного иммунитета (ГЗТ) относительно предыдущей фазы (3 суток), а с другой — повышение функциональной активности гуморального иммунитета (АОК). Эти данные могут свидетельствовать об активации противовоспалительных механизмов иммунной системы, направленных на активацию синтеза белка de novo и восстановление нарушенного тканевого гомеостаза. В фазу эпителизации (14 сутки) общность реакций иммунной системы вне зависимости от особенностей лечебных препаратов проявилась относительной нормализацией активности макрофагов и клеточного иммунитета и сохранением активности гуморального иммунитета на повышенном уровне. К 21 суткам во всех группах отмечено сохранение активности гуморального иммунитета на повышенном уровне.

Динамика формообразовательных процессов при заживлении дефекта кожи под влиянием изученных препаратов коррелирует с динамикой активности иммунной системы. Последовательность изменения активности ее различных звеньев (клеточные факторы врожденной иммунорезистентности — клеточный иммунитет — гуморальный иммунитет) соответствует этапности развития репарационного процесса (повреждение — воспаление — восстановление). Механизмы регуляции репарационных процессов иммунной системой соответствуют общим закономерностям регуляции воспалительного процесса и сопровождаются последовательной сменой активности провоспалительных механизмов на противовоспалительные. Использование «тепловых» метаболитов РМО способствует оптимизации регенераторного процесса, сокращению времени контракции раны, уменьшению образования рубцовой ткани, более полноценному восстановлению шерстного покрова.

Таблица 1

Состояние функциональной активности иммунной системы

Table 1

The state of the immune system functional activity

Показатели	Контроль интактный (КИ)	Контроль мазевой основы (К)	«Солкосерил» (КС)	РМО	МБ-Т	МБ-Х
3 сутки						
ФП, %	15,0±1,5	25,8±2,13 **	24,6±1,74**	24,3±1,77 **	24,1±1,8 **	24,3±2,21**
НСТ, %	10,3±0,87	23,3±1,48 **	21,1±1,36**	17,4±1,34 **,^^,+	17,6±1,53 **,^^,+	20,7±1,57**
ГЗТ, %	24,0±1,88	39,5±3,05 **	35,6±2,75 **	32,1±2,97 **,^	31,44±2,32 **,^	33,4±3,33**
АОК/10^6	978±106	1144±123	1234±136	1545±144**,^	1653±121**,^,+	1262±131
7 сутки						
ФП, %	14,2±0,97	17,4±1,3 *	16,4±1,57	16,7±1,55	15,1±1,68	17,8±1,64 *
НСТ, %	9,9±0,73	15,7±1,3 *	13,1±0,94*,^^	14,9±1,11 *,^	12,5±0,98 ^	13,9±0,91 *
ГЗТ, %	24,6±1,5	32,5±3,13 *	28,8±2,94*	28,5±2,76	27,5±2,45	30,2±3,3 *
АОК/10^6	958±73	1600±113 **	1753±148**	1923±172 **,^	2179±197**,^,+	1667±172**
14 сутки						
ФП, %	14,5±1,1	16,7±1,4	15,3±1,37	15,7±1,48	14,6±1,4	16,3±1,5
НСТ, %	9,4±0,7	12,6±1,5 *	11,2±1,06	12,6±1,13 *	9,4±1,1 ^	12,4±1,3 *
ГЗТ, %	25,2±1,8	27,5±2,1	27,2±2,16	26,2±1.93	25,9±2,25	26,7±2,24
АОК/10^6	897±82	1616±149 **	1732±163 **	1641±147 **	1543±163 **	1496±126 **
21 сутки						
ФП, %	14,9±1,1	15,1±1,1	14,6±1,2	15,2±1,3	14,3±1,3	14,3±1,5
НСТ, %	10,1±0,8	10,6±1,1	9,4±1,1	11,2±1,13	10,3±0,83	10,4±0,94
ГЗТ, %	24,7±2,1	25,2±2,2	24,2±2,1	24,4±2,13	24,2±2,36	25,2±2,4
АОК/10^6	937±77	1330±79 **	1415±117**	1418±137 **	1352±148 **	1296±87 **

Примечание: достоверность отличия от интактного контроля (* — p<0,05; ** — p<0,01); от контроля мазевой основы (^ — p<0,05; ^^ — p<0,01); от лекарственного препарата «Солкосерил» (+ — p<0,05)

NB: the accuracy of the difference from the intact control (* — p < 0.05; ** — p < 0.01); from the ointment base control (^ — p < 0.05; ^^ — p <0.01); from the Solkoseril drug (+ — p <0.05)

Подобные эффекты характерны для модуляторов репарационного процесса с преобладанием механизмов физиологической регенерации [6].

Полученные данные позволяют высказать мнение, что многолетнемерзлые породы можно рассматривать как криомембрану [3, 7], способствующую селекции потомков палеобактерий с особым адаптивным потенциалом, который можно использовать для повышения активности иммунной системы и репарационного потенциала современных живых систем.

Таким образом, данное исследование позволило установить наличие высокого репаративного потенциала как у бактерий *Bacillus sp.,* так и у их метаболитов. Способность к регуляции репаративных процессов в макроорганизме проявляется у бактерий *Bacillus sp.* в относительно небольших дозах — 15-20×10^3 м. кл. и при локальном нанесении на раневую поверхность. Явным лидером модуляции репаративных процессов при заживлении дефектов кожи являются «тепловые» метаболиты, которые уже на 3 сутки повышают активность гуморального иммунитета на 34% и способствуют сокращению времени репарации кожной раны на 20% относительно лекарственного препарата «Солкосерил». Эти данные могут свидетельствовать о наличии у «тепловых» метаболитов *Bacillus sp.* свойств иммуностимулятора с репаративным эффектом.

Заключение

При локальном нанесении на раневую поверхность метаболиты *Bacillus sp.*, полученные при 37ºC*,* проявляют свойства иммуностимулятора с репаративным эффектом — способствуют преимущественному повышению активности гуморального иммунитета и сокращению времени репарации кожной раны относительно лекарственного препарата «Солкосерил».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абызов С. С. Микрофлора континентальных и морских льдов Антарктики (к проблеме использования айсбергов как ресурсов пресной воды) / С. С. Абызов, И. И. Мицкевич // Микробиология. 1993. Т. 62. № 6. С. 994-1017.
2. Заварзин Т. А. Бактерии и состав атмосферы / Т. А. Заварзин. М.: Наука, 1984. 192 с.
3. Калёнова Л. Ф. Влияние метаболитов бактерий *Bacillus sp*. из вечной мерзлоты на скорость репарации кожной раны / Л. Ф. Калёнова, А. С. Бажин, М. А. Новикова // Вестник новых медицинских технологий. 2014. Т. 21. № 4. С. 53-61.
4. Brancato S. K. Wound macrophages as key regulators of repair: origin, phenotype, and function / S. K. Brancato, J. E. Albina // Am. J. Pathol. 2011. Vol. 178. No 1. Pp. 19-25.
5. Brouchkov A. V. Relict microorganisms of cryolithozone as possible objects of gerontology / A. V. Brouchkov, V. P. Melnikov, Yu. G. Sukhovei // Advances in Gerontology. 2011, Vol. 1. No 1. Pp. 39-44.

6. Gurtner G. C. Wound repair and regeneration / G. C. Gurtner, S. Werner, Y. Barrandon, M. T. Longaker // Nature. 2008. Vol. 453. No 7193. Pp. 314-321.
7. Kalenova L. F. Effects of permafrost microorganisms on skin wound reparation / L. F. Kalenova, A. S. Bazhin, M. A. Novikova // Bulletin of experimental biology and medicine. 2015. Vol. 158. No 4. Pp. 478-482.
8. Katayama T. Phylogenetic analysis of bacteria preserved in a permafrost ice wedge for 25,000 years / T. Katayama, M. Tanaka, J. Moriizumi // Appl. Environ. Microbiol. 2007. Pp. 2360-2363.
9. Lucas T. Differential roles of macrophages in diverse phases of skin repair / T. Lucas, A. Waisman, R. Ranjan, J. Roes, T. Krieg, W. Mtiller, A. Roers, S. A. Eming // J. Immunol. 2010. Vol. 184. No 7. Pp. 3964-3977.
10. Mahdavian Delavary B. Macrophages in skin injury and repair / B. Mahdavian Delavary, W. M. van der Veer, M. van Egmond, F. B. Niessen, R. H. Beelen // Immunobiology. 2011. Vol. 216. No 7. Pp. 753-762.

Aleksandr S. BAZHYN[1]
Vladimir P. MELNIKOV[2]
Ivan M. BESEDIN[3]
Lyudmila F. KALYONOVA[4]

THE STUDY OF REPARATIVE AND IMMUNE POTENTIAL OF *BACILLUS SP*. BACTERIA FROM PERMAFROST

[1] Researcher, Department of Cryosphere Bioresources,
Tyumen Scientific Center,
Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences
aleksandrbazhin@mail.ru

[2] Dr. Sci. (Geol-Mineral.), Academician of the Russian Academy of Sciences,
Chairman of the Tyumen Scientific Center,
Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences
melnikov@ikz.ru

[3] Researcher, Tyumen Scientific Center,
Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences
teriolog@mail.ru

[4] Dr. Sci. (Biol.), Chief Research Scientist,
Tyumen Scientific Center,
Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences
lkalenova@mail.ru

Abstract

A high reparative potential of *Bacillus sp*. bacteria is set on the skin wound model. The bacteria have been isolated from permafrost and their metabolic products — metabolites. The most effective are the “thermal” metabolites produced by culturing the bacteria at 37°C. When applied locally to the wound, they optimize the regenerative process: reduce the time of wound contraction, retract a scar tissue, and renew a coat. The ointment with “thermal” metabolites accelerates the repair process by 30% relative to the ointment base,

Citation: Bazhyn A. S., Melnikov V. P., Besedin I. M., Kalyonova L. F. 2016. “The Study of Reparative and Immune Potential of *Bacillus Sp*. Bacteria from Permafrost”. Tyumen State University Herald. Natural Resource Use and Ecology, vol. 2, no 3, pp. 96-105.
DOI: 10.21684/2411-7927-2016-2-3-96-105

by 20% — relative to the Solkoseril pharmaceutical, and by 10% — relative to the bacteria themselves. The dynamics of the formative processes in the healing of skin defects under the influence of *Bacillus sp*. bacteria and their metabolites are correlated with the dynamics of the immune system activity. The sequence of changes in the activity of various parts of the immune system (nonspecific immunoresistance-cellular immunity — humoral immunity) corresponds to the phases of the reparation process (damage — inflammation — recovery). Based on these data, *Bacillus sp*. metabolites can be attributed to the modulators of the reparation process with predominant regeneration mechanisms.

Keywords

Permafrost, *Bacillus sp*. bacteria, metabolites, repair, immune system.

DOI: 10.21684/2411-7927-2016-2-3-96-105

REFERENCES

1. Abyzov S. S., Mitskevich I. I. 1993. "Mikroflora kontinentalnyh i morskih ldov Antarktiki (k probleme ispolzovaniya aysbergov kak resursov presnoy vody)" [The Microflora of Continental and Sea Ice of Antarctica (The Use of Icebergs as the Freshwater)]. Microbiology, vol. 62, no 6, pp. 994-1017.
2. Brancato S. K., Albina J. E. 2011. "Wound Macrophages as Key Regulators of Repair: Origin, Phenotype, and Function". American Journal of Pathology, vol. 178, no 1, pp. 19-25.
3. Brouchkov A. V., Melnikov V. P., Sukhovei Yu. G., et al. 2011. "Relict Microorganisms of Cryolithozone as Possible Objects of Gerontology". Advances in Gerontology, vol. 1, no 1, pp. 39-44.
4. Gurtner G. C., Werner S., Barrandon Y., Longaker M. T. 2008. "Wound Repair and Regeneration". Nature, vol. 453, no 7193, pp. 314-321.
5. Kalyonova L. F., Bazhyn A. S., Novikova M. A. 2014. "Vliyanie metabolitov bakteriy *Bacillus sp*. iz vechnoy merzloty na skorost reparacii kozhnoy rany" [The Effect of *Bacillus sp*. Bacteria Metabolites from the Permafrost on the Rate of Skin Wound Repair]. Journal of New Medical Technologies, vol. 21, no 4, pp. 53-61.
6. Kalyonova L. F., Bazhyn A. S., Novikova M. A. 2015. "Effects of Permafrost Microorganisms on skin Wound Reparation". Bulletin of Experimental Biology and Medicine, vol. 158, no 4, pp. 478-482.
7. Katayama T., Tanaka M., Moriizumi J., et al. 2007. "Phylogenetic Analysis of Bacteria Preserved in a Permafrost Ice Wedge for 25.000 Years". Applied and Environmental Microbiology, April, pp. 2360-2363.
8. Lucas T., Waisman A., Ranjan R., Roes J., Krieg T., Mtiller W., Roers A., Eming S. A. 2010. "Differential Roles of Macrophages in Diverse Phases of Skin Repair". Journal of Immunology, vol. 184, no 7, pp. 3964-3977.
9. Mahdavian Delavary B., van der Veer W. M., van Egmond M., Niessen F. B., Beelen R. H. 2011. "Macrophages in Skin Injury and Repair". Immunobiology, vol. 216, no 7, pp. 753-762.
10. Zavarzin T. A. 1984. Bakterii i sostav atmosfery [Bacteria and Composition of the Atmosphere]. Moscow: Nauka, p. 192.