

УДК 615.372

Н.А. Забокрицкий

## ИЗУЧЕНИЕ ЦИТОПРОТЕКТОРНЫХ СВОЙСТВ МЕТАБОЛИТОВ ШТАММА *BACILLUS SUBTILIS B-9909* НА КУЛЬТУРЕ ВЫДЕЛЕННЫХ ГЕПАТОЦИТОВ

ФБГУН Институт иммунологии и физиологии УрО РАН,  
г. Екатеринбург, Российская Федерация

**Резюме. Цель исследования** — изучение цитопротекторного действия БАВ (метаболитов, продуцируемых пробиотическими микроорганизмами рода *Bacillus*) стерильного фугата культуры пробиотических микроорганизмов ВКПМ *Bacillus subtilis B-9909* на культуру выделенных гепатоцитов при моделировании у них токсического поражения. Получение стерильного фугата культуры ВКПМ *Bacillus subtilis B-9909* проводили путем стерилизующей фильтрации культуральной жидкости данного штамма. Работа проводилась с использованием перевиваемой линии клеточной культуры Л-41, позволяющей оценивать токсичность различных субстратов на культурах клеток и выдерживающей токсическое воздействие в разных концентрациях. На первом этапе исследований для решения поставленных задач были определены максимальная нетоксическая доза стерильного фугата и минимальная токсическая доза СС14 по отношению к клеткам культуры Л-41. На следующем этапе исследований было изучено и доказано цитопротекторное действие БАВ, входящих в состав фугата штамма *Bacillus subtilis B-9909*, по отношению к клеткам линии Л-41. На модели токсического поражения культуры выделенных гепатоцитов было продемонстрировано цитопротекторное и регенеративное действие БАВ в составе фугата штамма *Bacillus subtilis B-9909*. В доклинических исследованиях по оценке токсичности и безопасности экспериментального образца нового биогепатопротектора на экспериментальных животных было установлено, что комплекс биологически активных веществ (метаболитов), вводимый внутривенно и внутривентально, является нетоксичным и безопасным для лабораторных животных и не вызывает у них каких-либо патологических изменений во внутренних органах и тканях. Основой нового биогепатопротектора, обладающего полифункциональным механизмом действия, позволяющего эффективно восстанавливать угнетенные функции печени с одновременной нормализацией иммунологических показателей, является входящий в его состав активный биокомпонент — метаболиты пробиотических спорообразующих бактерий, которые при введении в организм продуцируют комплекс биологически активных метаболитов (антибиотики, протеолитические, амилолитические и др. ферменты, иммуноглобулины, а также интерлейкины, витамины, протеины, аминокислоты и другие биоактивные вещества). Экспериментально установленное цитопротекторное действие комплекса БАВ, входящих в состав фугата культуры бактерий штамма *Bacillus subtilis B-9909*, позволит в дальнейшем обоснованно разрабатывать новые перспективные медицинские иммунобиологические препараты, обладающие защитным действием в отношении органов и тканей человека.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что БАВ в составе фугата штамма *Bacillus subtilis B-9909* не только обладают выраженным цитопротекторным действием, но и положительно влияют на регенеративные способности клеток печени, что является значимым фактором для дальнейшего использования данного штамма в качестве биокомпонента нового иммуностроительного биогепатопротектора.

**Ключевые слова:** метаболиты, цитопротектор, пробиотические микроорганизмы, клеточная культура, гепатоциты

Конфликт интересов отсутствует.

Контактная информация автора, ответственного за переписку:

Забокрицкий Николай Александрович

pharmusma@ Rambler.ru

Дата поступления 10.06.2022 г.

Образец цитирования:

Забокрицкий Н.А. Изучение цитопротекторных свойств метаболитов штамма *Bacillus subtilis* B-9909 на культуре выделенных гепатоцитов. Вестник уральской медицинской академической науки. 2022, Том 19, №3, с. 203–209, DOI: 10.22138/2500-0918-2022-19-3-203-209

## Введение

На сегодняшний день разработка новых перспективных лекарственных кандидатов, изучение специфических фармакологических механизмов их действия на различных биологических моделях, экстраполяция фармакологических показателей на человека, доклиническое изучение безопасности созданных экспериментальных образцов являются актуальными задачами современного здравоохранения.

Воздействия на организм человека неблагоприятных экологических, климатогеографических, социальных (алкоголизация населения, бытовые отравления и др.) и профессиональных факторов, а также неблагоприятная эпидобстановка могут приводить к нарушению функций ряда систем, органов и тканей макроорганизма, что обуславливает, в конечном итоге, рост заболеваемости и смертности среди населения Российской Федерации. Как правило, в патогенезе различных нозологических единиц важная роль отводится повреждению клеточных элементов тканей.

В последнее десятилетие существенно возрос интерес как ученых, так и практических врачей к пробиотическим препаратам. Значительно расширилось их применение, успешно разрабатываются оригинальные композиции и лекарственные формы пробиотиков, расширяется их производство, исследуются новые, перспективные области применения данных препаратов [1, 3, 5].

Все более широко в лечебную практику внедряются новые пробиотики на основе аэробных спорообразующих бацилл (биоспорин, споробактерин, бактисубтил и др.), но до последнего времени, по данным литературы, не рассматривалось цитопротекторное действие пробиотических спорообразующих бактерий [2, 4, 7].

В связи с этим представляет значительный интерес изучение цитопротекторного действия комплекса биологически активных веществ (БАВ), продуцируемых пробиотическими бациллами рода *Bacillus* [7].

**Цель исследования** – оценка цитопротекторного действия БАВ (метаболитов, продуцируемых пробиотическими микроорганизмами рода *Bacillus*) стерильного фугата культуры пробиотических микроорганизмов ВКПМ *Bacillus subtilis* B-9909 на культуру выделенных гепатоцитов при моделировании у них токсического поражения.

## Материалы и методы

В работе использовали микроорганизмы штамма ВКПМ *Bacillus subtilis* B-9909.

Паспортные характеристики штамма:

Штамм ВКПМ *Bacillus subtilis* B-9909 депонирован в БРЦ ВКПМ.

Штамм не является генетически модифицированным. Бактериальные клетки представляют собой аэробные грамположительные спорообразующие палочки размером 0,8–2,7 мкм, расположенные одиночно или в виде цепочек. В аэробных условиях образуют овальные споры, которые располагаются в клетках центрально. При спорообразовании раздувания клеток не наблюдается. На питательных средах: МПА, сусло-агаре, среде Громько, среде Гаузе 2, клеточная культура растет обильно, образуя через сутки большие (до 15–20 мм в диаметре) желтовато-бежевые шероховатые колонии с выростами, край колонии волнистый, колонии агар не врастают, легко снимаются петлей. В жидких средах культура клеток образует плотную пленку с ярко выраженной складчатостью, бульон в течение всего срока культивирования остается прозрачным, при встряхивании пленка плохо разбивается. В мазках из суточной культуры, выращенной на среде Гаузе 2, обнаруживаются прямые палочковидные клетки размером 2,3–2,3×0,9–1,2 мкм, располагающиеся одиночно или в виде коротких цепочек. Клетки подвижные, содержат центрально расположенные споры овальной формы. При спорообразовании клетки не раздуваются. Культура не растет в анаэробных условиях.

Диапазон рН для роста 6,5–7,5; оптимальная температура культивирования (361)°С. Продуцирует каталазу, реакция  $\pm$  Фогес Проскуэра положительная, хорошо растет в присутствии NaCl. Гидролизует крахмал, казеин, желатин разжижает медленно, не разлагает мочевины, не образует сероводород и индол. Нитраты восстанавливает, цитрат натрия не утилизирует. Ферментирует с образованием кислоты без газа глюкозу, сахарозу, фруктозу. Галактозу и мальтозу не использует. Штамм не обладает гемолитической, лецитиназной коагулазной активностями, не нуждается для роста в аминокислотах и витаминах. Культура обладает выраженной ферментативной активностью, характеризуется высокой антагонистической активностью по отношению к различным видам патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. Штамм является продуцентом  $\alpha$ -интерферона. В аэробных условиях в МПБ культура образует пленку. В анаэробных условиях не растет, гидролизует мочевины. Бактериальная культура *B. subtilis B-9909* образует каталазу; дает положительную реакцию Фогес-Проскауэра; растет в присутствии NaCl; гидролизует крахмал и казеин; разжижает желатин. При росте в МПБ образует аммиак, не образует сероводород и индол. Ферментирует глюкозу, арабинозу, ксилозу с образованием кислоты без газа. Редуцирует нитраты, обесцвечивает метиленовую синь. Не обладает коагулазной, гиалуронидазной, гемолитической лецитиназной активностями.

Не является генетически модифицированным. Согласно классификации микроорганизмов, приведенных в Санитарных правилах СП 1.2.731-99, штамм относится к микроорганизмам, непатогенным для человека, и поэтому работа со штаммом не требует специальных мер предосторожности.

Характеристики указанного штамма в процессе культивирования и хранения не изменяются и в полной мере соответствуют показателям, описанным в паспорте на данный штамм.

Работа проводилась также с использованием перевиваемой линии клеточной культуры Л-41 КД/84 (Авторское свидетельство № 3981708/28-13/159566; ФС-42-3724-99, рег. № по РЛС-94/161/171), находящейся на хранении в музейной коллекции соматических клеток человека и животных ЕНИИВИ.

В работе использовали фугат, полученный путем стерилизующей фильтрации культуральной жидкости штамма пробиотических микроорганизмов *B. subtilis B-9909*.

Получение стерильного фугата культуры *B. subtilis B-9909* проводили путем стерилизующей фильтрации культуральной жидкости данного штамма.

Культивирование штамма *B. subtilis B-9909* осуществляли глубинным способом на качалке (220 об·мин<sup>-1</sup>°С) в течение 30 ч. При этом готовили посевной материал в концентрации  $1 \times 10^6$  кл·см<sup>-3</sup>. В колбы объемом 100,0 см<sup>3</sup> вносили по 20,0–25,0 см<sup>3</sup> питательной среды, после чего добавляли посевной материал в указанной дозе и помещали на качалку [6].

По окончании цикла глубинного культивирования содержимое всех колб сливали в одну емкость, определяли концентрацию КОЕ (БК) в 1,0 см<sup>3</sup> культуральной жидкости и помещали в холодильник на 24 ч (4 $\pm$ 2°С).

Перед этапом стерилизующей фильтрации проводили центрифугирование культуральной жидкости на центрифуге ОПН-3 при 3000 об·мин<sup>-1</sup> в течение 10 мин.

Для получения стерильного фугата монтировали системы для фильтрации и стерилизовали их в автоклаве в стандартном режиме. Вакуумную фильтрацию осуществляли последовательно, через целлюлозные фильтры ( $d = 11$  мкм, 0,30 мкм и 0,22 мкм). Стерильность полученного фильтрата проверяли путем посева 0,1 см<sup>3</sup> на тиогликолевую среду и среду 199. Срок наблюдения составлял 5 суток. Полученный фугат считали стерильным, если по окончании срока наблюдения не наблюдался рост микрофлоры в указанных средах (замутнение во флаконах) [5].

Гепатоциты получали из печени мышей-сосунков, которых умерщвляли путем цервикальной дислокации шейных позвонков. Печень диспергировали в смеси равных объемов растворов трипсина Версена. Суспензию клеток вносили в пенициллиновые флаконы и культивировали в среде. Игла с двойной концентрацией аминокислот, витаминов и 20% бычьей сывороткой. Выделенные (эксплантированные) гепатоциты в количестве (5-8) $\times 10^6$  кл. см<sup>-3</sup> инкубировали в течение 96 ч в термостате при (37 $\pm$ 1)°С. Монослой гепатоцитов на стенках пенициллиновых флаконов был представлен в виде тонкой, белесоватого цвета пленки, плотно прилегающей к стеклу. Микроскопически гепатоциты хорошо распластаны на стекле, плотно прилегают друг к другу, имеют веретенообразную форму, четкие границы и ядро по центру клетки, группы клеток образуют однонаправленные тяжи.

Токсичность исследуемых проб оценивали *in vitro* по изменению пролиферативной активности

клеток культуры Л-41. Методика определения токсичности основана на установлении различий между интенсивностью прироста числа клеток культуры Л-41 на разные сроки наблюдения (24, 72 и 96 ч) [4, 6].

Критерием проявления минимального токсического действия считали снижение более чем на 20% величины, как минимум, одного из трех показателей пролиферативной активности испытуемых проб по сравнению с контролем.

Максимальную нетоксическую дозу определяли также по сравнению показателей пролиферативной активности в испытуемых пробах и в контроле. Критерием проявления максимального нетоксического действия считали снижение не более чем на 20% величин определяемых показателей пролиферации в опытных группах, по сравнению с контролем.

Непосредственно перед выполнением анализа готовили рабочую клеточную культуру Л-41. Количество клеток подсчитывали в камере Горяева при микроскопии повторностях. Из трех полученных результатов подсчета клеток рассчитывали среднее арифметическое значение, которое принимали за среднюю концентрацию клеток в рабочей культуре. Количество клеток в рабочей клеточной культуре доводили до  $(4-5) \times 10^4$  кл·см<sup>-3</sup>.

Через 24, 72 и 96 ч из каждого трех флаконов опытных и контрольных проб сливали ростовую среду (среда Игла и среда 199, в равных пропорциях, с добавлением 20% сыворотки крови крупного рогатого скота) и добавляли во флаконы по 2,0 см<sup>3</sup> раствора Версена. Далее пробы выдерживали в термостате при температуре  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  15-25 мин, после чего проводили ресуспендирование путем интенсивного встряхивания в течение 1 мин. Подсчет количества клеток проводили в камере Горяева для каждой из шести (трех опытных и трех контрольных) проб не менее трех раз. Вычисляли средние величины концентрации клеток в 1,0 см<sup>3</sup> ростовой среды.

Для исследования цитопротекторного действия стерильного фугата штамма *B. subtilis B-9909* по отношению к клеточной тест-системе (популяция клеток Л-41) с воспроизведенной моделью токсического поражения вводили однократную и 1/2 от однократной максимальные нетоксические дозы.

Токсическое поражение популяции клеток линии Л-41 осуществляли путем введения в пенициллиновые флаконы однократной и двукратной минимальных токсических СС14.

*Цитопротекторную эффективность* стерильного фугата в условиях моделирования токсического поражения выделенных гепатоцитов определяли по изменению плотности монослоя клеток. Регенеративную способность выделенных гепатоцитов определяли по изменению митотического индекса. Клетки культивировали на покровных стеклах в чашках Петри. После образования монослоя культуральную среду добавляли СС14 в концентрации однократной и двукратной минимальной токсической дозы. В течение опыта (через 24, 72 и 96 ч) клетки фиксировали и окрашивали гематоксилином-эозином. Для определения митотического индекса подсчитывали количество митозов в 800–1000 клетках на 1 покровное стекло. В каждом препарате просчитывали 20 полей зрения, в трех повторностях. Изменение плотности монослоя определяли по изменению среднего числа клеток в поле зрения микроскопа.

Для исследования цитопротекторного действия БАВ стерильного фугата штамма *B. subtilis B-9909* в клеточную тест-систему, представленную популяцией выделенных гепатоцитов, с воспроизведенной моделью токсического поражения вводили однократную и 1/2 от максимальной нетоксической дозы.

Воспроизведение токсического поражения популяции гепатоцитов осуществляли путем введения в пенициллиновые флаконы однократной и двукратной минимальных токсических СС14.

Общая продолжительность наблюдения за пролиферативной активностью выделенных гепатоцитов после введения СС14 и стерильного фугата составляла 96 ч.

Морфологические изменения клеток изучали в световом микроскопе на живых культурах и окрашенных препаратах.

Статистическую обработку осуществляли с помощью пакетов компьютерных программ Microsoft Office Excel 2010 и “Statistica 6.0”. Использовали метод дисперсионного анализа (ANOVA). Оценку нормальности распределения полученных данных проводили по методу Колмогорова-Смирнова. Для оценки достоверности межгрупповых различий использовали параметрический F-критерий Фишера в зависимости от нормальности распределения данных. Проверку статистических гипотез осуществляли при критическом уровне значимости  $p < 0,05$ .

## Обсуждение

На первом этапе для решения поставленных задач были определены максимальная нетоксическая доза стерильного фугата и минимальная токсическая доза  $CCl_4$  по отношению к клеткам культуры Л-41.

На следующем этапе исследований было изучено и доказано цитопротекторное действие БАВ, входящих в состав фугата штамма *B. subtilis B-9909* по отношению к клеткам линии Л-41.

На модели токсического поражения культуры выделенных гепатоцитов было показано цитопротекторное и регенеративное действия БАВ в составе фугата штамма *B. subtilis B-9909*.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что БАВ (метаболиты) в составе фугата штамма *B. subtilis B-9909* не только обладают выраженным цитопротекторным действием, но и положительно влияют на регенеративные способности клеток печени, что является значимым фактором для дальнейшего перспективного использования данного штамма в качестве биокомпонента нового лечебно-профилактического препарата.

## Заключение

Проведены исследования по оценке цитопротекторного действия БАВ, входящих в состав стерильного фугата, полученного культуральной жидкости штамма *B. subtilis B-9909*, являющегося активным биокомпонентом экспериментального образца нового гепатопротекторного препарата. Экспериментально обоснованы минимальная токсическая доза  $CCl_4$  ( $500 \text{ мкл} \cdot \text{см}^{-3}$ ) и максимальная нетоксическая доза стерильного фугата штамма *B. subtilis B-9909* (0,1 %).

Таким образом, полученные результаты по изучению защитного действия комплекса БАВ стерильного фугата культуры пробиотических бацилл рода *Bacillus* на линию перевиваемых клеток Л-41 и выделенных гепатоцитов свидетельствуют об их выраженном цитопротекторном и регенеративном действии, что делает штамм *B. subtilis B-9909* перспективным для конструирования нового биогепапротектора.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Ардатская М.Д., Столярова Л.Г., Архипова Е.В., Филимонова О.Ю. Метабиотики как естественное развитие пробиотической концепции. Рецепт, 2019, 2, 22, 291-298.
2. Забокрицкий Н.А. Оценка иммуностропного действия пробиотика бацилакт в составе трансдермальных терапевтических систем. Российский иммунологический журнал, 2017, 11, 2(20), 126-129.
3. Забокрицкий Н.А. Принципиальные направления научных исследований по обоснованию и разработке новых иммунобиологических препаратов. Экспериментальная и клиническая фармакология, 2018, S, 81, 85-86.
4. Забокрицкий Н.А., Сарапульцев П.А. Экспериментальное обоснование возможности создания нового метаболического препарата. Российский иммунологический журнал, 2018, 3, 12(21), 295-300.
5. Забокрицкий Н.А. Фармакологическая оценка иммуностропной активности нового гелевого метабиотика на факторы клеточного и гуморального иммунитета при экспериментальном моделировании термических ожогов кожи. Российский иммунологический журнал, 2020, 2, 23, 125-132.
6. Лабинская А.С., Блинкова Л.П., Ещина А.С., Булаева Г.В., Вертиев Ю.В., Винокуров А.Е., Горобец О.Б., Дарбеева О.С., Жиленков Е.Л., Зверьков Д.А., Иванова С.М., Иванова Т.С., Корн М.Я., Кривопалова Н.С., Лукин И.Н., Мельникова В.А., Нехорошева А.Г., Романова Ю.М., Сидоренко С.В., Скаженик В.Ю., Скала Л.З., Трухина Г.М. Общая и санитарная микробиология с техникой микробиологических исследований. – СПб: Лань, 2016. – 588 с.
7. Lee N.K., Paik H.D., Kim W.S. *Bacillus* strains as human probiotics: characterization, safety, microbiome, and probiotic carrier. Food science and biotechnology, 2019, Vol.28, no. 5, pp. 1297-1305.

## Автор

Забокрицкий Николай Александрович

ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» УрО РАН

Доктор медицинских наук, доцент, старший научный сотрудник лаборатории иммунофизиологии и иммунофармакологии

620049, Российская Федерация, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, 106  
pharmusma@rambler.ru

*N.A. Zabokritskiy*

## EXPERIMENTAL EVALUATION OF THE CYTOPROTECTIVE EFFECT OF PROBIOTIC METABOLITES OF *BACILLUS SUBTILIS B-9909* STRAIN ON THE CULTURE OF ISOLATED HEPATOCYTES

Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences,  
Yekaterinburg, Russian Federation

**Abstract.** *The aim* of the study was to study cytoprotective effect of BAS (metabolites produced by probiotic microorganisms of the genus *Bacillus*) of a sterile puffer culture of probiotic microorganisms of the *Bacillus subtilis* VCPM B-9909 on the culture of isolated hepatocytes when modeling their toxic damage. The preparation of a sterile puffer culture of *Bacillus subtilis B-9909* was carried out by sterilizing filtration of the culture fluid of this strain. The work was carried out using a transferable L-41 cell culture line, which allows assessing the toxicity of various substrates on cell cultures and withstanding toxic effects in different concentrations. At the first stage of the research, the maximum non-toxic dose of sterile fugate and the minimum toxic dose of  $\text{CCl}_4$  in relation to the cells of the L-41 culture were determined to solve the tasks set. At the next stage of research, cytoprotective effect of BAS, which are part fugate strain *Bacillus subtilis B-9909*, was studied and proved in relation to the cells of the L-41 line. cytoprotective and regenerative effects of BAS in the composition fugate strain *Bacillus subtilis B-9909* were demonstrated on the model of toxic damage to the culture of isolated hepatocytes. In preclinical studies to assess the toxicity and safety of an experimental sample biohepatoprotector on experimental animals, it was found that the complex of biologically active substances (metabolites) administered intragastrically intraperitoneally is non-toxic and safe for laboratory animals and does not cause any pathological changes in their internal organs and tissues. The basis biohepatoprotector, which has a multifunctional mechanism of action that allows to effectively restore depressed liver functions, while simultaneously normalizing immunological parameters, is its active biocomponent — metabolites of probiotic spore-forming bacteria, which, when introduced into the body, produce a complex of biologically active metabolites (antibiotics, proteolytic, amyolytic, etc. enzymes, immunoglobulins, as well as interleukins, vitamins, proteins, amino acids, and others bioactive substances). The experimentally established cytoprotective effect of the complex of BAS, which are part fugate culture of *Bacillus subtilis* strain B-9909, will allow us to develop new promising medical immunobiological drugs that have a protective effect on human organs and tissues in the future.

Thus, as a result of the conducted studies, it was found that the BAS in the composition fugate of the *Bacillus subtilis B-9909* strain not only have a pronounced cytoprotective effect, but also have a positive effect on the regenerative abilities of liver cells, which is a significant factor for the further use of this strain biocomponent immunotropic biohepatoprotector.

**Keywords:** metabolites, cytoprotector, probiotic microorganisms, cell culture, hepatocytes

There is no conflict of interest.

Contact details of the corresponding author:

Nikolai A. Zabokritskiy

pharmusma@rambler.ru

Received 10.06.2022

For citation:

Zabokritskiy N.A. Experimental evaluation of the cytoprotective effect of probiotic metabolites of *Bacillus subtilis* B-9909 strain on the culture of isolated hepatocytes. Vestn. Ural. Med. Akad. Nauki. = Journal of Ural Medical Academic Science. 2022, Vol. 19, no. 3, pp. 203–209. DOI: 10.22138/2500-0918-2022-19-3-203-209 (In Russ)

## REFERENCES

1. Ardatskaya M.D., Stolyarova L.G., Arkhipova E.V., Filimonova O.Yu. Metabiotics as a natural development of a probiotic concept, 2019, 2, 22, 291-298. URL: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=37266050> (in Russ)
2. Zabokritskiy N.A. Preclinical evaluation of immunotropic action of probiotics bacilack transdermal therapeutic system, 2017, 11, 2(20), 126-129 URL: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=29826623> (in Russ)
3. Zabokritskiy N.A. Principal directions of scientific research on the justification and development of new immunobiological drugs, 2018, S, 81, 85-86 DOI: 10.30906/0869-2092-2018-81-5s-1-306. (in Russ)
4. Zabokritskiy N.A., Sarapultsev P.A. Experimental justification of the possibility of creating the new metabolic drug, 2018, 3, 12(21), 295-300 DOI: 10.31857/S102872210002398-2.(in Russ)
5. Zabokritskiy N.A. Pharmacological assessment of immunotropic activity of new gel metabiotic on cellular and humoral immunity in experimental modeled thermal skin burns, 2020, 2, 23, 125-132. DOI: 10.46235/1028-7221-314-PAO (in Russ)
6. Labinskaya A.S., Blinkova L.P., Eshina A.S., Bulaeva G.V., Vertiev Yu.V., Vinokurov A.E., Gorobets O.B., Darbeeva O.S., Zhilenkov E.L., Zverkov D.A., Ivanova S.M., Ivanova T.S., Korn M.Ya., Krivopalova N.S., Lukin I.N., Melnikova V.A., Nekhorosheva A.G., Romanova Yu.M., Sidorenko S.V., Skazenik V.Yu., Skala L.Z., Trukhina G.M. General and Sanitary Microbiology with the Technique of microbiological research. - Saint Petersburg: Lan, 2016, 588 p. URL: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=26850922> (in Russ)
7. Lee N.K., Paik H.D., Kim W.S. Bacillus strains as human probiotics: characterization, safety, microbiome, and probiotic carrier. Food science and biotechnology, 2019, Vol.28, no. 5, pp. 1297-1305 DOI:10.1007/s10068-019-00691-9

## Author

Nikolai A. Zabokritskiy

Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of RAS

MD, Associate Professor, Senior Researcher of the laboratory of immunophysiology and immunopharmacology

106 Pervomayskaya street Yekaterinburg Russian Federation 620049

pharmusma@rambler.ru