МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

ХИЖНЯК ОКСАНА СЕРГІЇВНА

УДК 615.246; 615.331; 615.451; 615.453

РОЗРОБКА СКЛАДУ ТА БІОТЕХНОЛОГІЇ ОТРИМАННЯ КОМПЛЕКСНОГО ПРОБІОТИЧНОГО ПРЕПАРАТУ

15.00.01 – технологія ліків, організація фармацевтичної справи
та судова фармація

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата фармацевтичних наук

Харків – 2017

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана на кафедрі біотехнології, біофізики та аналітичної хімії Національного технічного університету «Харківський політехнічний інститут» Міністерства освіти і науки України, м. Харків.

Науковий керівник: доктор фармацевтичних наук, професор
КРАСНОПОЛЬСЬКИЙ ЮРІЙ МИХАЙЛОВИЧ,
Національний технічний університет «Харківський політехнічний інститут», професор кафедри біотехнології, біофізики та аналітичної хімії.

Офіційні опоненти: доктор фармацевтичних наук, професор
СТРЕЛЬНИКОВ ЛЕОНІД СЕМЕНОВИЧ,
Національний фармацевтичний університет, м. Харків, завідувач кафедри біотехнології;

кандидат фармацевтичних наук,
старший науковий співробітник
СІДЕНКО ЛАРИСА МИКОЛАЇВНА,
ДП «Державний науковий центр лікарських засобів і медичної продукції», м. Харків, старший науковий співробітник лабораторії технології готових лікарських засобів.

Захист дисертації відбудеться «___»_____201_ року о _____годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.605.02 у Національному фармацевтичному університеті за адресою: 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53.

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Національного фармацевтичного університету (61168, м. Харків, вул. Валентинівська, 4).

Автореферат розісланий «___»_____ 2017 року.

Учений секретар
спеціалізованої вченої ради
доктор фармацевтичних наук,
професор О.В. Посилкіна

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Останнім часом в Україні дуже гостро постає проблема захворювань шлунково-кишкового тракту різної етіології. У результаті зниження рівня пробіотичних штамів, зокрема біфідобактерій та лактобацил, порушуються процеси травлення та перебіг багатьох основних біохімічних процесів в організмі, внаслідок чого погіршується загальний стан організму та знижується його стійкість до дії патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів.

Головними причинами цього є неконтрольоване використання антибіотиків та неякісних біологічних добавок, недостатнє і нераціональне харчування, шкідливі звички, психо-емоційне перевантаження, швидкий ритм життя.

Основним засобом профілактики і лікування захворювань шлунково-кишкового тракту, викликаних дисбактеріозом, є препарати, що належать до групи пробіотиків, використання яких дозволяє покращити, а інколи й відновити стан мікрофлори кишечника та слизових оболонок організму людини, що приводить до загального покращання стану здоров'я та попереджає розвиток цілої низки хронічних захворювань.

На фармацевтичному ринку України лікарські пробіотичні препарати представлені доволі широко. Проте вітчизняному виробнику належить лише 16 % ринку, який представлений ліофілізованими монопрепаратами. Препарати закордонного виробництва становлять понад 80 %, з яких більшість належить до класу симбіотиків (44 %). Принциповою перевагою *вітчизняних* пробіотиків є адаптованість штамів мікроорганізмів, які в них використовуються, до української популяції населення.

Слід зазначити, що сучасна біотехнологія виробництва комплексних пробіотичних препаратів ґрунтується на окремому культивуванні різних штамів та їх подальшому об'єднанні у певних співвідношеннях. Враховуючи симбіоз корисної бактеріальної флори в організмі людини, особливості росту застосовуваних культур (зв'язок з киснем, продукція вітамінів, необхідність у певних нутрієнтах та ін.), необхідність у поживних компонентах на етапі відновлення в ентеральному середовищі, актуальним та доцільним є сумісне глибинне культивування різних штамів та внесення пребіотичного компонента, що матиме значний клінічний ефект.

До того ж корисними є не лише живі клітини, а й продукти їх метаболізму (органічні кислоти, бактеріоцини, вітаміни та ін.), які також мають позитивний вплив на перебіг біохімічних реакцій в організмі, що підтверджує необхідність збереження культурального середовища у складі комбінованого препарату перед висушуванням.

Серед пробіотичних препаратів вітчизняного виробництва відсутні сучасні кишковорозчинні лікарські форми комбінованих пробіотиків у вигляді капсул для профілактичного та лікувального застосування. Закордонний виробник віддає перевагу капсульованим формам (понад 50% із препаратів, представлених на українському ринку). У зв'язку з цим розробка оптимальних складів і технологій виробництва нових бактеріальних препаратів у вигляді кишковорозчинних капсул

на основі консорціуму пробіотичних бактерій з додаванням пребіотика є актуальною.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційна робота виконана відповідно до плану науково-дослідних робіт Національного технічного університету «Харківський політехнічний інститут» («Розробка та одержання препаратів на основі біотехнології наночасток; препаратів, що містять антиоксидантні та протипухлинні сполуки; препаратів на основі бактеріальних штамів та їх консорціумів», номер державної реєстрації 0110U001667) та проблемної комісії «Фармація» МОЗ і НАМН України (протокол № 5 від 04.03.2016 р.)

Мета і завдання дослідження. *Метою* роботи є обґрунтування складу, розробка технології та методів аналізу комплексного пробіотичного препарату з високими показниками біологічної активності у двох лікарських формах (ліофілізована маса у флаконах та капсули).

Для досягнення вказаної мети необхідно вирішити такі *завдання*:

- провести аналіз і узагальнити дані літератури стосовно пробіотичних препаратів, сучасного стану етіології, профілактики та лікування дисбіотичних станів кишечника;
- провести маркетингове дослідження фармацевтичного ринку України щодо забезпечення лікарськими засобами (ЛЗ) для лікування дисбіотичних порушень кишечника;
- визначити штами для створення бактеріального консорціуму та провести їх дослідження (органолептичні характеристики, мікроскопія, мікробіологічна чистота, активність кислотоутворення, кількість живих бактерій, адгезивна та антагоністична активність) з метою встановлення відповідності та визначення параметрів для подальшого порівняння;
- розробити склад поживного середовища для сумісного глибинного культивування пробіотичних штамів біфідобактерій та лактобацил; довести незмінність морфологічних характеристик та біологічних властивостей вказаних штамів при культивуванні на запропонованому середовищі;
- визначити оптимальний склад пробіотичних штамів для сумісного культивування (співвідношення та кількість генерацій); встановити параметри культивування (pH, час, температура);
- визначити пребіотичний компонент, який найбільше впливатиме на підвищення показників росту пробіотичних штамів, та встановити його максимально продуктивну концентрацію;
- дослідити умови ліофілізації (режим заморожування, швидкість підігріву, загальна тривалість процесу і температура досушування) бактеріальної біомаси та встановити режим сублімації; дослідити вплив обраного режиму на активність бактеріального консорціуму (кількість живих бактерій, активність кислотоутворення, адгезивна активність);
- встановити у дослідах *in vitro* ефективність (активність кислотоутворення, кількість живих бактерій, адгезивну активність, антагоністичну активність) отриманого методом глибинного культивування комплексного препарату на основі

біфідобактерій та лактобацил та перевірити його стабільність при зберіганні, встановити термін придатності;

- розробити склад і технологію промислового виробництва лікарських форм на основі синбіотичного бактеріального консорціуму: ліофільно висушеної мікробної маси у флаконах і кишковорозчинних капсул;

- розробити та опрацювати методики якісного та кількісного аналізу компонентів ЛЗ; розробити проекти МКЯ і технологічного регламенту на лікарські форми.

Об'єкт дослідження. Пробіотичні штами біфідобактерій та лактобацил, пребіотичний компонент, змішана культура з пробіотичних штамів бактерій, допоміжні речовини, суха ліофілізована біомаса у флаконах, маса для інкапсулювання, капсульована форма бактеріального консорціуму.

Предмет дослідження. Склад і технологія виробництва комплексного пробіотичного препарату для лікування дисбіотичних порушень. Дослідження симбіотичної взаємодії пробіотичних штамів біфідобактерій та лактобацил при глибинному культивуванні; впливу пребіотичного компонента на накопичення біомаси пробіотичних штамів; умов ліофілізації; активності кислотоутворення, кількості живих бактерій, антагоністичної та адгезивної активності пробіотичних штамів *in vitro* та ін.

Методи дослідження. При вирішенні поставлених у роботі завдань було використано загальноприйняті методи дослідження: фізичні, фізико-хімічні та фармакотехнологічні (визначення органолептичних показників, розчинність, рівень pH, втрата в масі при висушуванні та ін.); мікробіологічні (мікроскопія, ідентифікація бактерій за культурально-морфологічними ознаками, дослідження ростових характеристик пробіотичних штамів, визначення кількості живих бактерій та активності кислотоутворення, визначення антагоністичної та адгезивної активності); біологічні (вивчення біологічної нешкідливості препарату та його специфічної дії); математичні (статистична обробка результатів дослідження).

Наукова новизна одержаних результатів. Уперше науково та експериментально обґрунтовано технологічні аспекти створення синбіотичного препарату для лікування дисбіотичних порушень кишечника шляхом сумісного культивування біфідобактерій та лактобацил глибинним методом на розробленому поживному середовищі.

Розроблено склад і технологію одержання синбіотичного консорціуму в двох лікарських формах: ліофілізату у флаконах та кишковорозчинних капсул.

Розроблено поживне середовище для глибинного культивування консорціуму, технологічна модифікація якого дозволяє стандартизувати середовище та підвищити його поживну цінність.

Доведено високу біологічну активність продуктів метаболізму консорціуму пробіотичних бактерій, що знаходяться у культуральному середовищі.

Визначено параметри культивування у розробленому середовищі, які забезпечують максимальне накопичення біомаси бактерій та їх біологічну активність, зокрема вид та кількість пребіотичного компонента.

Визначено, що в процесі сумісного культивування між зазначеними пробіотичними штамами утворюється симбіотичний тип взаємодії – поліпшення основних показників росту (активність кислотоутворення, кількість живих бактерій).

Встановлено, що процес глибинного культивування та застосований режим ліофілізації не пригнічують адгезивні властивості застосованих штамів.

Вивчено мікробіологічні властивості розробленого консорціуму та фізичні, фізико-хімічні, фармакотехнологічні властивості розроблених лікарських форм на його основі.

У дослідах *in vivo* підтверджено біологічні властивості розробленого бактеріального консорціуму та доведено його нешкідливість.

Розроблено раціональну технологію виготовлення препарату в двох лікарських формах – ліофільно висушеної мікробної маси у флаконах та кишковорозчинних капсул, методики контролю якості (МКЯ) лікарських форм.

За результатами проведених досліджень отримано патент України на корисну модель «Спосіб одержання синбіотичного бактеріального консорціуму для лікувально-профілактичних цілей» (№ 111319; Бюл. № 21 від 10.11.2016).

Практичне значення одержаних результатів. На основі даних про відсутність на українському фармацевтичному ринку вітчизняних препаратів-синбіотиків доведено необхідність створення комплексних пробіотичних препаратів, одержаних на основі глибинного культивування штамів біфідобактерій та лактобацил, з додаванням пребіотичного компонента. Розроблений препарат має високі показники біологічної активності.

Встановлені біотехнологічні параметри для глибинного культивування біфідобактерій та лактобацил у розробленому поживному середовищі стали основою розробки технології одержання комбінованого синбіотичного препарату. Розроблено проекти МКЯ бактеріального синбіотичного консорціуму в двох лікарських формах (ліофільно висушена мікробна маса у флаконах і капсульована). Технологію та проекти МКЯ бактеріального синбіотичного консорціуму апробовано в умовах промислового виробництва на ПАТ «Фармак» м. Київ (акт від 02.03.2016), ВАТ «Біосан», м. Вінниця (акт від 11.01.2016), ППНЛФ «Авіценна», м. Харків (акт від 21.01.2015).

Окремі фрагменти роботи упроваджено у навчальний процес кафедри органічного синтезу і нанотехнологій НТУ «ХПІ» при вивченні теми «Хімія і технологія біологічно активних сполук» (акт від 17.05.2016); кафедри онкології та дитячої онкології Харківської медичної академії післядипломної освіти (акт від 03.10.2016); кафедри фармації ВДНЗ України «Буковинський державний медичний університет» (акт від 02.11.2016); кафедри мікробіології, вірусології та імунології Харківського національного медичного університету (акт від 25.11.2016); кафедри експериментальної та клінічної фармакології з імунологією та алергологією ВДНЗ України «Українська медична стоматологічна академія» (акт від 04.01.2017). Окремі результати наукових досліджень упроваджено у роботу лабораторії молекулярної імунофармакології ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова НАМН України» (акт від 19.09.2016).

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота є самостійно завершеною науковою працею. Особисто здобувачем здійснено аналіз та узагальнення даних літератури стосовно досліджуваної проблеми. Проведено експериментальні дослідження щодо розробки складу поживного середовища для сумісного культивування біфідобактерій і лактобацил. Теоретично обґрунтовано та розроблено склад комплексного пробіотичного препарату і технологічні параметри його виробництва. Досліджено фізичні, фізико-хімічні, фармакотехнологічні та мікробіологічні властивості одержаного комплексного пробіотичного препарату в двох лікарських формах. Досліджено та узагальнено результати експериментів ліофілізації одержаних зразків. Вивчено адгезивні властивості бактерій у складі консорціуму. Автором теоретично й експериментально обґрунтовано склад і технологію отримання капсул на основі комплексного пробіотичного препарату. Формування мети, основних положень дисертації, аналіз і узагальнення результатів дослідження, формулювання висновків, підготовку до друку наукових статей проведено особисто за консультаціями наукового керівника дисертаційної роботи докт.фарм.наук, проф. Ю. М. Краснопольського.

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертації були представлені на: V Всеукраїнській науково-практичній конференції «Перші наукові кроки» (Кам'янець-Подільський, 2011); XX Міжнародній науково-практичній конференції «Інформаційні технології: наука, техніка, технологія, освіта, здоров'я» (Харків, 2012); II Міжнародній заочній науково-практичній конференції «Научная дискуссия: вопросы математики, физики, химии, биологии» (Москва, 2013); VIII Міжнародній науково-практичній конференції «Проблеми та перспективи розвитку науки» (Чернівці, 2013); Міжнародній науковій конференції студентів і молодих вчених «Актуальні питання сучасної медицини» (Харків, 2014); III Міжнародній науковій конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Фундаментальные и прикладные исследования в биологии» (Донецьк, 2014); XXII Міжнародній науково-практичній конференції «Інформаційні технології: наука, техніка, технологія, освіта, здоров'я» (Харків, 2014); XIII Міжнародній науково-практичній конференції «Проблеми та перспективи розвитку науки» (Чернівці, 2014); XXIII Міжнародній науково-практичній конференції «Інформаційні технології: наука, техніка, технологія, освіта, здоров'я» (Харків, 2015); Міжнародній науково-практичній конференції «Актуальні питання боротьби з інфекційними захворюваннями» (Харків, 2015).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 18 наукових праць: 8 статей, з яких 5 – у наукових фахових виданнях (з них 1 у закордонному виданні, 3 статті у журналах, що входять до міжнародних наукометричних баз, 1 патент на корисну модель, 10 публікацій у матеріалах конференцій.

Обсяг і структура дисертації. Дисертаційна робота викладена на 204 сторінках друкованого тексту (обсяг основного тексту – 148 сторінок), складається зі вступу, огляду літератури, 3 розділів експериментальної частини, загальних висновків, списку використаних джерел і додатків. Робота ілюстрована 39 таблицями та 25 рисунками. Список використаних джерел містить 181 найменування, з яких 51 іноземне.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У **вступі** дисертаційної роботи обґрунтовано актуальність теми та доцільність розробки вітчизняного комбінованого пробіотичного препарату, сформульовано мету та основні завдання проведених досліджень, відзначено наукову новизну і практичну цінність отриманих результатів, надано відомості щодо апробації результатів роботи, а також структура роботи.

У **першому розділі «Сучасні аспекти створення препаратів на основі пробіотичних культур»** проаналізовано дані літератури з питань значення та функцій нормальної мікрофлори кишечника, ролі пробіотичних бактерій у функціонуванні організму людини та лікування дисбіотичних порушень різної етіології. Проведено маркетинговий огляд фармацевтичного ринку пробіотичних препаратів, представлених в Україні. Розглянуто основні критерії відбору пробіотичних штамів і представлено розгорнуту характеристику роду біфідобактерій і лактобацил (морфолого-цитологічні, культуральні, фізіолого-біохімічні ознаки). Обгрунтовано доцільність розробки вітчизняних синбіотиків на основі біфідобактерій і лактобацил у комбінації з пребіотичним компонентом.

У **другому розділі «Обгрунтування загальної концепції досліджень. Матеріали та методи»** визначено загальну методологію досліджень стосовно розробки, стандартизації та контролю лікарського засобу на основі синбіотичного консорціуму в двох лікарських формах для лікування дисбіотичних порушень роботи кишечника. Наведено характеристику діючих та допоміжних речовин, які визначаються технологією отримання синбіотичного консорціуму та лікарських форм таких, як суха ліофілізована маса у флаконах та капсули.

Детально описано біологічні методи дослідження пробіотичних штамів, що входять до складу препарату (мікробіологічна чистота, кількість живих бактерій, визначення активності кислотоутворення, визначення антагоністичної активності, специфічної нешкідливості, адгезивної активності).

Застосовано такі фізико-хімічні методи дослідження, як: визначення ступеня каламутності бактеріальної біомаси, розчинність, визначення показника pH, втрата в масі при висушуванні та ін.; фармакотехнологічні дослідження (плинність, насипна густина та ін.) було проведено відповідно до методик ДФУ.

У **третьому розділі «Розробка складу та технології отримання бактеріального синбіотичного консорціуму»** наведено результати теоретичних та експериментальних досліджень стосовно обґрунтування складу синбіотичного консорціуму і технології його одержання.

З метою отримання пробіотичного препарату з високими показниками біологічної активності першочерговим завданням було визначення оптимального складу поживного середовища для сумісного глибинного культивування бактерій, яке б задовольняло ростовим вимогам культивованих штамів.

Поживні середовища для культивування бактеріальних клітин аналізують за вмістом загального й амінного азоту. Важливим є рівень біологічної доступності компонентів середовища. Нами стандартизовано поживне середовище для сумісного глибинного культивування бактеріальних клітин за вмістом амінного азоту,

визначено його показник на рівні (190 ± 15) мг%. З метою стандартизації вмісту амінного азоту нами проведено визначення вмісту основних компонентів – автолізату дріжджів і триптичного гідролізату казеїну. Для підвищення біологічної доступності та поживної цінності зазначених компонентів нами регламентовано ступінь гідролізу компонентів та модифіковано технологію їх одержання шляхом уведення додаткових стадій очищення від високомолекулярних сполук: стадія ультрафільтрації крізь мембрани з порогом відсікання 30–50 кДа і стерилізуючої фільтрації крізь мембрани з розміром пор 0,45 та 0,22 мкм.

Продуктивність поживного середовища вивчали за активністю кислотоутворення біфідобактерій, культивованих на експериментальному та класичному варіантах. За результатами експерименту визначено середовище, яке, доповнюючи мінеральними солями, використовували для сумісного глибинного культивування біфідобактерій та лактобацил.

На обраному поживному середовищі проводили глибинне культивування таких штамів бактерій та їх композицій: *Bifidobacterium bifidum ЛВА-3, Bifidobacterium longum, Lactobacillus plantarum 8R-A3, Lactobacillus casei.* На основі максимальних значень основних показників росту (активність кислотоутворення, кількість живих бактерій) визначили штами для розробки бактеріального консорціуму.

Найвищі показники росту спостерігаються при сумісному культивуванні біфідобактерій штаму *Bifidobacterium bifidum ЛВА-3* і лактобацил штаму *Lactobacillus plantarum 8R-A3*. Показники росту консорціуму: активність кислотоутворення (383 ± 17)°Т та кількість живих бактерій (6,1 ± 0,17)$\cdot 10^9$ КУО/мл. Зазначений консорціум обрано для подальших досліджень.

На наступному етапі досліджували співвідношення бактерій в інокуляті та рівень генерації бактеріальних клітин. Критерій порівняння – основні показники росту культури та бактеріоскопічний контроль. Отримані результати наведено у табл. 1.

Таблиця 1

Склад та основні ростові показники досліджуваних зразків, n = 6

Номер зразка	Співвідношення бактерій в інокуляті	Біфідобактерії		Лактобацили	
		кількість живих бактерій, КУО/мл	активність кислотоутворення, °Т	кількість живих бактерій, КУО/мл	активність кислотоутворення, °Т
1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
1	1 : 1	10^{10}— 10^{11}	210 ± 7	(4,01±0,08)×10^9	320 ± 12
2	1 : 3*	10^{11}—10^{12}	238 ± 9	(5,28±0,15)×10^9	367 ± 17
3	3 : 1	10^{11}—10^{12}	218 ± 9	(2,14±0,05)×10^9	315 ± 12
4	Контроль лактобацил **	—	—	(3,84±0,11)×10^9	330 ± 15

Продовження таблиці 1

1	2	3	4	5	6
5	Контроль біфідо-бактерій	10^{10}—10^{11}	180 ± 8	—	—
6	1 : 1	10^{11}—10^{12}	180 ± 6	(6,1±0,12)×10^9	383 ± 10
7	1 : 3	10^{11}—10^{12}	215 ± 10	(8,95±0,22)×10^9	406 ± 16
8	3 : 1	10^{11}—10^{12}	210 ± 5	(3,28±0,09)×10^9	393 ± 14
9	Контроль лактобацил **	—	—	(4,48±0,12)×10^9	340 ± 16

Примітка:* — статистично значущі відмінності від групи № 1 (співвідношення 1 : 1) та групи № 3 (співвідношення 3 : 1) ($p \leq 0,05$); ** — зразки 1–5 містять лактобацили V генерації; зразки 6–9 – лактобацили VI генерації.

За даними табл. 1, високі показники росту підтверджують факт симбіотичного типу взаємодії між досліджуваними пробіотичними культурами. З даних, наведених у табл. 1, видно, що максимальні показники росту культур у двох групах експериментів спостерігаються у співвідношеннях біфідобактерії : лактобацили 1 : 3 – (5,28 ± 0,15)×10^9 КУО/мл, (367 ± 17) °Т та (8,95 ± 0,22)×10^9 КУО/мл, (406 ± 16) °Т з використанням лактобацил V та VI генерацій відповідно. Враховуючи результати бактеріоскопічного контролю щодо рівномірності розвитку бактеріальних клітин, для подальшої роботи нами було обрано варіант № 2 із співвідношенням біфідобактерії : лактобацили = 1 : 3 із застосуванням біфідобактерій II генерації та лактобацил V генерації. Проведена мікроскопія свідчить про збереження основних морфологічних ознак кожного штаму при сумісному культивуванні.

Велике значення для продуктивного культивування має комплекс фізичних і фізико-хімічних факторів (pH, температура, час). Відомо, що оптимальними умовами для росту і накопичення біомаси біфідобактерій є pH середовища (6,5 ± 0,1), температура культивування (38 ± 0,5)°С, а для лактобацил – pH середовища (7,0 ± 0,1), температура культивування (37 ± 0,5)°С. Тому для максимального накопичення біомаси під час культивування комбінованої бактеріальної культури на розробленому поживному середовищі нами запропоновано такі параметри: pH середовища на початковому етапі (6,5 ± 0,1) – 24 години; впродовж культивування pH перевіряли і коригували 10% розчином аміаку до pH (6,5 ± 0,1). Наступні 24 години pH перевіряли і коригували 10% розчином аміаку до pH (7,0 ± 0,1). Температура культивування протягом першої доби становила (38 ± 0,5)°С, протягом другої доби – (37 ± 0,5)°С (табл. 2). Встановлено, що запропонований режим культивування і склад поживного середовища дозволяють одночасно в одному об’ємі культивувати біфідобактерії та лактобацили.

Подальші дослідження були спрямовані на вибір пребіотичного компонента, який максимально ефективно стимулює накопичення біомаси при сумісному культивуванні.

Таблиця 2

Оптимальні умови росту біфідобактерій та лактобацил при окремому і глибинному культивуванні

Фактори	*Bifidobacterium bifidum ЛВА-3*	*Lactobacillus plantarum 8R-A3*	Сумісна бактеріальна культура	
			1-ша доба	2-га доба
pH	6,5 ± 0,1	7,0 ± 0,1	6,5 ± 0,1	7,0 ± 0,1
Температура, °С	38 ± 0,5	37 ± 0,5	38 ± 0,5	37 ± 0,5

Для проведення експерименту проводили окреме культивування *in vitro* біфідобактерій *Bifidobacterium bifidum ЛВА-3* та лактобацил *Lactobacillus plantarum 8R-A3* на середовищах з різними джерелами цукрів. Порівнювалися біфідогенні та лактогенні властивості таких полісахаридів: фруктоза, інулін, лактулоза, лактитол у концентраціях 1,0, 1,7, 2,0 % від загального об'єму середовища культивування. Критеріями порівняння були основні показники росту бактеріальних культур, кількість спожитого аміаку та бактеріоскопічний контроль. Дані біфідогенної та лактогенної дії зазначених джерел цукрів наведено у табл. 3 і 4.

Таблиця 3

Показники активності біфідобактерій залежно від внесеного джерела цукрів, n = 6

№ зразка	Джерело цукрів	Кількість цукрів, %	Кількість доданого аміаку**, мл	Активність кислото-утворення, °Т	Кількість живих бактерій, КУО/мл
К	Лактоза	1,0	1,15 ± 0,05	235 ± 10	10^{10}— 10^{11}
0	Контроль	—	0,50 ± 0,02	150 ± 6	10^{7}—10^{8}
1	Фруктоза	1,0	1,05 ± 0,03	160 ± 7	10^{8}—10^{9}
2		1,7	1,30 ± 0,06	175 ± 8	10^{8}—10^{9}
3		2,5	1,32 ± 0,04	190 ± 8	10^{8}—10^{9}
4	Інулін	1,0	0,55 ± 0,02	125 ± 5	10^{7}—10^{8}
5		1,7	0,57 ± 0,02	175 ± 7	10^{7}—10^{8}
6		2,5	0,60 ± 0,02	180 ± 8	10^{7}—10^{8}
7	Лактулоза	1,0	1,60 ± 0,08	240 ± 10	10^{11}—10^{12}
8		1,7	1,52 ± 0,07	240 ± 10	10^{11}—10^{12}
9		2,5	1,30 ± 0,05	225 ± 10	10^{11}—10^{12}
10	Лактитол	1,0	1,65 ± 0,05	265 ± 12*	10^{11}—10^{12}
11		1,7	1,50 ± 0,04	240 ± 7*	10^{11}—10^{12}
12		2,5	1,55 ± 0,05	250 ± 9*	10^{11}—10^{12}

Примітка: * — статистично значущі відмінності від групи інших використаних цукрів ($p \leq 0,05$). Для 1% лактитолу у порівнянні з іншою кількістю цукрів ($p \leq 0,05$).; ** — використовували 10% розчин аміаку.

Таблиця 4

Показники активності лактобацил залежно від внесеного джерела цукрів, n = 6

№ зразка	Джерело цукрів	Кількість цукрів, %	Кількість доданого аміаку**, мл	Активність кислото-утворення, °Т	Кількість живих бактерій, 10^9 КУО/мл
К	Лактоза	1,0	1,60 ± 0,05	350 ± 15	4,12 ± 0,11
0	Контроль	—	0,60 ± 0,02	180 ± 6	2,21 ± 0,10
1	Фруктоза	1,0	1,24 ± 0,05	228 ± 9	2,65 ± 0,12
2		1,7	1,35 ± 0,06	295 ± 10	2,92 ± 0,14
3		2,5	1,42 ± 0,07	300 ± 12	3,01 ± 0,15
4	Інулін	1,0	0,60 ± 0,02	220 ± 8	2,69 ± 0,12
5		1,7	0,87 ± 0,03	290 ± 13	3,10 ± 0,12
6		2,5	0,92 ± 0,04	295 ± 12	3,28 ± 0,14
7	Лактулоза	1,0	1,50 ± 0,07	340 ± 15	3,79 ± 0,10
8		1,7	1,94 ± 0,07	390 ± 18	4,28 ± 0,15
9		2,5	1,98 ± 0,08	387 ± 17	4,41 ± 0,18
10	Лактитол	1,0*	2,01 ± 0,06	400 ± 15*	4,73 ± 0,12*
11		1,7*	2,00 ± 0,04	390 ± 12*	4,46 ± 0,15*
12		2,5*	1,82 ± 0,04	387 ± 10*	5,23 ± 0,17*

Примітка: * — статистично значущі відмінності від групи інших використаних цукрів ($p \leq 0,05$). Для 1% лактитолу у порівнянні з іншою кількістю цукрів ($p \leq 0,1$).; ** — використовували 10% розчин аміаку.

Як видно з табл. 3 і 4, інтенсифікація метаболічних процесів біфідобактерій та лактобацил (кількість доданого аміаку) спостерігалася при внесенні лактулози і лактитолу в усіх концентраціях. Аналіз контролю живих бактерій показав, що при внесенні до поживного середовища лактитолу і лактулози кількість живих бактеріальних клітин знаходиться на вищому за $4 \cdot 10^9$ КУО/мл рівні для лактобацил та в межах 10^{11}— 10^{12} КУО/мл для біфідобактерій. Додавання інших джерел цукрів дає значно нижчі показники.

Показником активності накопиченої біомаси є активність кислотоутворення. Як видно з табл. 3 і 4, додавання лактитолу і лактулози підвищує активність кислотоутворення біфідобактерій до майже одного рівня і становить (240–265)°Т (табл. 3) та лактобацил до рівня (340–400)°Т (табл. 4).

Морфологічні ознаки бактерій *Bifidobacterium bifidum ЛВА-3* та *Lactobacillus plantarum 8R-A3* при культивуванні на всіх варіантах поживного середовища були збережені. Їх відповідність даним, описаним у літературі, підтверджена результатами бактеріоскопічного контролю.

Для визначення остаточної концентрації пребіотичного компонента було проведено культивування бактеріального консорціуму з унесенням 1,0 % лактитолу та 1,7 % лактулози. Дані наведені в табл. 5.

Таблиця 5

Показники активності бактеріального консорціуму залежно від джерел цукрів, n = 6

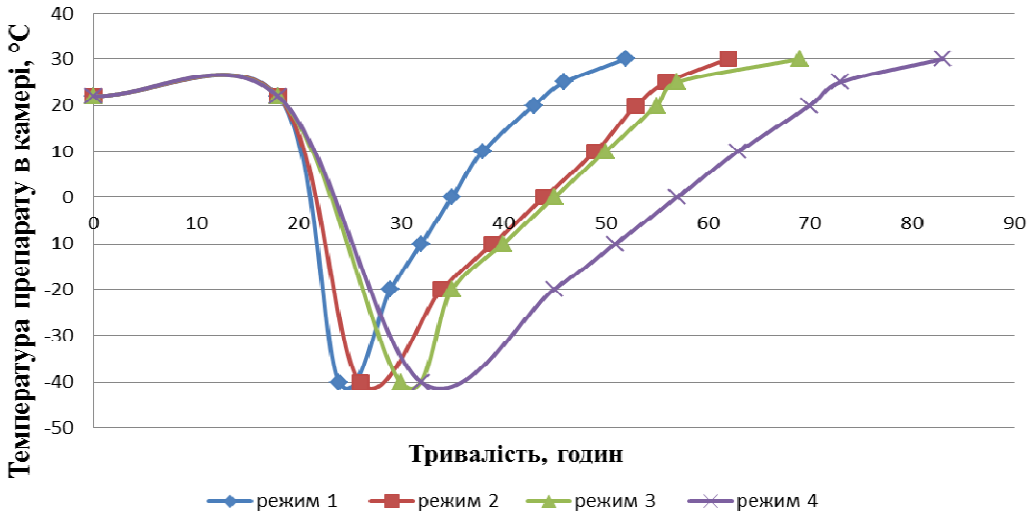
Показник активності консорціуму		Лактитол, 1,0 %	Лактулоза, 1,7 %	Без внесення цукрів
Кількість доданого аміаку*, мл		3,5 ± 0,15	3,2 ± 0,12	2,4 ± 0,1
Активність кислото-утворення, °Т	на Блаурока	288 ± 10	291 ± 12	238 ± 9
	на МРС-1	392 ± 18	380 ± 15	367 ± 17
Кількість живих бактерій, КУО	на Блаурока	10^{11}—10^{12}	10^{11}—10^{12}	10^{10}—10^{11}
	на МРС-4	$(6,4 \pm 0,2)\cdot 10^{9}$	$(6,1 \pm 0,2)\cdot 10^{9}$	$(5,28 \pm 0,15)\cdot 10^{9}$

Примітка: * — використовували 10% розчин аміаку.

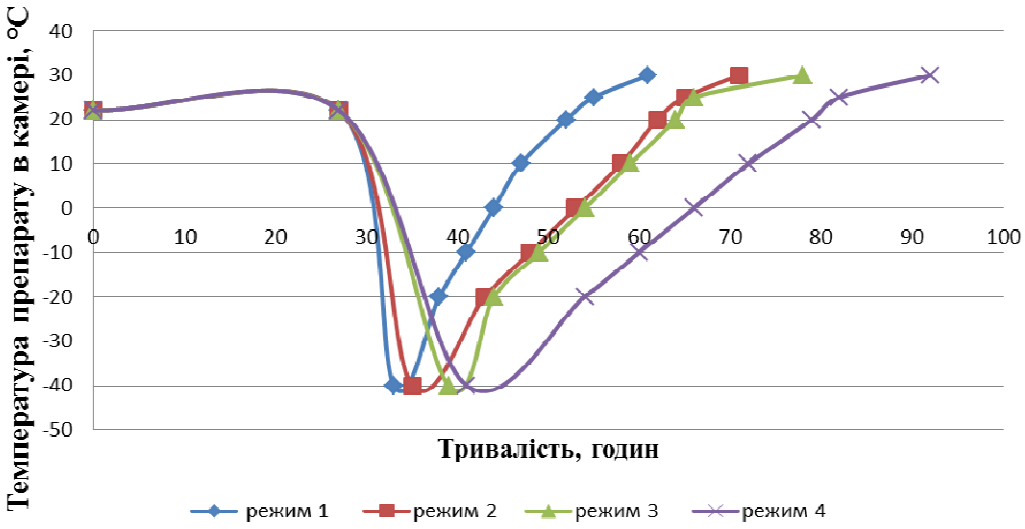
Як видно з даних табл. 5, додавання до пробіотичного консорціуму лактитолу у кількості 1,0 % і лактулози у кількості 1,7 % характеризується високими показниками росту бактеріальної культури і знаходиться на близькому рівні. Однак лактитол, на відміну від лактулози, не перетравлюється деякими умовно-патогенними і патогенними мікроорганізмами (*E.coli*, *St.aureus, Cl.perfringens*); має рівномірну біфідо- і лактогенну дію; ферментація бактеріями лактитолу не впливає на рівень глюкози та інсуліну у крові; лактитол здатний змінювати співвідношення протеолітичних і сахаролітичних бактерій у бік останніх, що важливо при лікуванні печінкової енцефалопатії, цирозу та гепатиту. Тому для подальшої роботи нами обрано лактитол.

Інтенсивність метаболічних процесів бактерій під час культивування приводить до трансформації цукрів в органічні кислоти, що є кінцевими продуктами метаболізму пребіотичних компонентів. Тому для підтримання бактерій під час відновлення в ентеральному середовищі пребіотичний компонент вносили повторно в аналогічній кількості одночасно із середовищем висушування. Це дає можливість додаткового пригнічення проліферації протеолітичної, потенційно патогенної й умовно-патогенної флори кишечника, зменшити вміст аміаку мікробного походження, скоротити проникнення цих токсичних речовин у кров та інтенсифікувати їх виведення разом з іншими аміногенними субстратами з організму.

На наступному етапі нами було проведено вивчення технологічних параметрів ліофілізації бактеріальних культур. Ліофілізація – одна з критичних стадій отримання пробіотичних препаратів, тому потребує досконального вивчення процесу заморожування та стандартизації температурного режиму висушування. Для отримання кінцевого продукту належної якості нами було опрацьовано чотири режими ліофілізації, які відрізнялися температурою заморожування, температурою підігріву полиць, тривалістю і температурою досушування препарату. Мінімальний тиск в камері 4,0 – 6,0 Па. Зазначені режими ліофілізації були опрацьовані при двох режимах заморожування: повільному та швидкому (рис. 1). Режими заморожування відрізняються часом адаптації культури до поступового зниження температури і тривають відповідно 27 та 18 годин.



А – швидке заморожування



В – повільне заморожування

Рис. 1. Порівняння режимів ліофільного висушування бактеріального консорціуму при швидкому та повільному заморожуванні

Якість ліофільно висушеної бактеріальної маси оцінювали згідно з показниками якості, закладеними у проекті МКЯ: опис, втрата в масі при висушуванні, морфологія бактерій, активність кислотоутворення, кількість живих бактерій, розчинність, pH.

Оптимальним визначено режим № 2: повільне заморожування, загальна тривалість ліофілізації 70 годин, швидкість підігріву препарату 2°С/год, температура досушування 25°С протягом 6 год. Для підтвердження раціонального вибору режиму ліофілізації нами проведено подальше дослідження адгезивних властивостей бактерій у складі комбінованої синбіотичної культури в порівнянні з адгезивними властивостями монокультур біфідобактерій та лактобацил.

Дослідження адгезивної активності проводили за методом фотоколориметрії. Субстратом адгезії були формалізовані еритроцити людини 0(I) Rh+ групи крові. Для постанови досліду готували суспензію мікроорганізмів контрольних та експериментальних зразків з концентрацією 10^9 клітин/мл на основі 0,9 % розчину натрію хлориду. Результати дослідження наведено у табл. 6.

Таблиця 6

Основні показники росту та адгезивної активності контрольних та експериментальних зразків, n = 3

№ зразка	Активність кислотоутворення, °Т		Кількість живих бактерій КУО/мл		Показник адгезії, %
	на Блаурока	на МРС-1	на Блаурока	на МРС-4	
1	185 ± 5		10^8—10^9		60,0 ± 1,2
2		240 ± 10		$(3,8±0,07)×10^9$	28,4 ± 0,5
3	191 ± 9	280 ± 12	10^9—10^{10}	$(4,1±0,1)×10^9$	70,7 ± 1,4
4	196 ± 8	290 ± 10	10^9—10^{10}	$(6,2±0,15)×10^9$	50,7 ± 1,01
5	208 ± 10	305 ± 15	10^{10}—10^{11}	$(4,8±0,12)×10^9$	80,0 ± 1,5
6	192 ± 6	290 ± 12	10^9—10^{10}	$(6,3±0,13)×10^9$	61,3 ± 1,12

Примітка: $p \leq 0,05$. 1 – контрольний зразок біфідобактерій; 2 – контрольний зразок лактобацил; 3 – зразок містить штам біфідобактерій *B.bifidum ЛВА-3* (II генерація) та штам лактобацил *L.plantarum 8P-A3* (V генерація) у співвідношенні 1 : 3 та пребіотичний компонент лактулозу в кількості 1,7 %; 4 – зразок містить штам біфідобактерій *B.bifidum ЛВА-3* (II генерація) та штам лактобацил *L.plantarum 8P-A3* (VI генерація) у співвідношенні 1 : 3 та пребіотичний компонент лактулозу в кількості 1,7 %; 5 – зразок містить штам біфідобактерій *B.bifidum ЛВА-3* (II генерація) та штам лактобацил *L.plantarum 8P-A3* (V генерація) у співвідношенні 1 : 3 та пребіотичний компонент лактитол в кількості 1,0 %; 6 – зразок містить штам біфідобактерій *B.bifidum ЛВА-3* (II генерація) та штам лактобацил *L.plantarum 8P-A3* (VI генерація) у співвідношенні 1 : 3 та пребіотичний компонент лактитол в кількості 1,0 %.

За результатами даних, наведених у табл. 6, видно, що сумісне культивування біфідобактерій і лактобацил не приводить до втрати адгезивних властивостей бактерій у складі комплексного препарату (зразки 3–6); обраний режим ліофільного висушування не пошкоджує структуру бактеріальних клітин і дозволяє отримувати продукт високої якості (показник адгезії зразків на рівні «високий» та «дуже високий»). Слід зазначити, що адгезивна властивість пробіотичних мікроорганізмів з додаванням пребіотичного компонента лактитол (зразки 5, 6) має кращі показники, ніж лактулози (зразки 3, 4). Результати, наведені у табл. 6, підтверджують раціональність вибору складу синбіотичного консорціуму (зразок № 5) для розробки лікарського препарату, враховуючи високі показники адгезивної активності пробіотичних бактерій.

У **четвертому розділі «Розробка складу і технології виробництва лікарських форм пробіотичного препарату»** наведено результати теоретичних та експериментальних досліджень стосовно обґрунтування вибору та концентрації допоміжних речовин при розробці капсульованої форми препарату, а також технології виготовлення пробіотичного препарату в двох лікарських формах:

ліофільно висушеній мікробній масі у флаконах та кишковорозчинних капсул. Досліджено стабільність та фармакотехнологічні властивості препаратів у процесі зберігання.

За результатами комплексних досліджень, представлених у 3 розділі, нами відпрацьовано технологічний процес отримання ліофілізованого синбіотичного консорціуму у флаконах. Кожен флакон містить 5 лікарських доз. Одна лікарська доза має склад: не менше $1 \cdot 10^9$ біфідобактерій штаму *B.bifidum ЛВА-3* і не менше $4 \cdot 10^9$ лактобацили штаму *L.plantarum 8P-A3*, пребіотичний компонент лактитол. Блок-схему технологічного процесу виробництва препарату у флаконах наведено на рис. 2.

Нами розроблено склад капсульної суміші, який включає ліофілізовану біомасу пробіотичних бактерій як діючу речовину; лактози моногідрат (mesh 200) та мікрокристалічну целюлозу марки 101, як наповнювачі для підвищення плинності. Кількісне співвідношення наповнювачів у складі капсульної суміші встановлено на рівні 70 : 30 – лактоза : мікрокристалічна целюлоза (МКЦ) відповідно. Окрім того, лактоза та МКЦ мають пребіотичні властивості, що важливо при використанні пробіотичних мікроорганізмів. Як антифрикційну речовину використано кремнію діоксид (аеросил марки 200). При виборі аеросилу важливою була відсутність його негативного впливу на бактеріальну біомасу, що підтверджено низкою власних досліджень (визначення активності кислотоутворення бактерій у складі капсульних сумішей). Результати наведені у табл. 7.

Таблиця 7

Визначення активності кислотоутворення бактерій у зразках капсульних сумішей, n = 3

Номер зразка	Назва розпушувача	Кількість розпушувача, %	Значення показника активності кислотоутворення, °Т
1	Кальцію стеарат	2	200 ± 6
2	Аеросил (марки 200)	3	340 ± 10
3	Аеросил (марки 200)	6	330 ± 8
4	Аеросил (марки 200)	9	335 ± 12
5	Субстанція без розпушувача	—	360 ± 14

Примітка: P = 95 %.

Як видно з даних, представлених у табл. 7, застосування кальцію стеарату як розпушувача (при використанні інших компонентів у незмінній кількості) має негативний вплив на бактерії і викликає значне зниження їх активності кислотоутворення до рівня (200 ± 6)°Т. Показник активності кислотоутворення бактерій без застосування розпушувачів незначно відрізняється від зразків з аеросилом (марки 200) і становить (360 ± 14)°Т. Застосування аеросилу (марки 200), на відміну від кальцію стеарату, має кращий ефект, оскільки показник активності кислотоутворення досить високий і має значення (330–340)° Т.

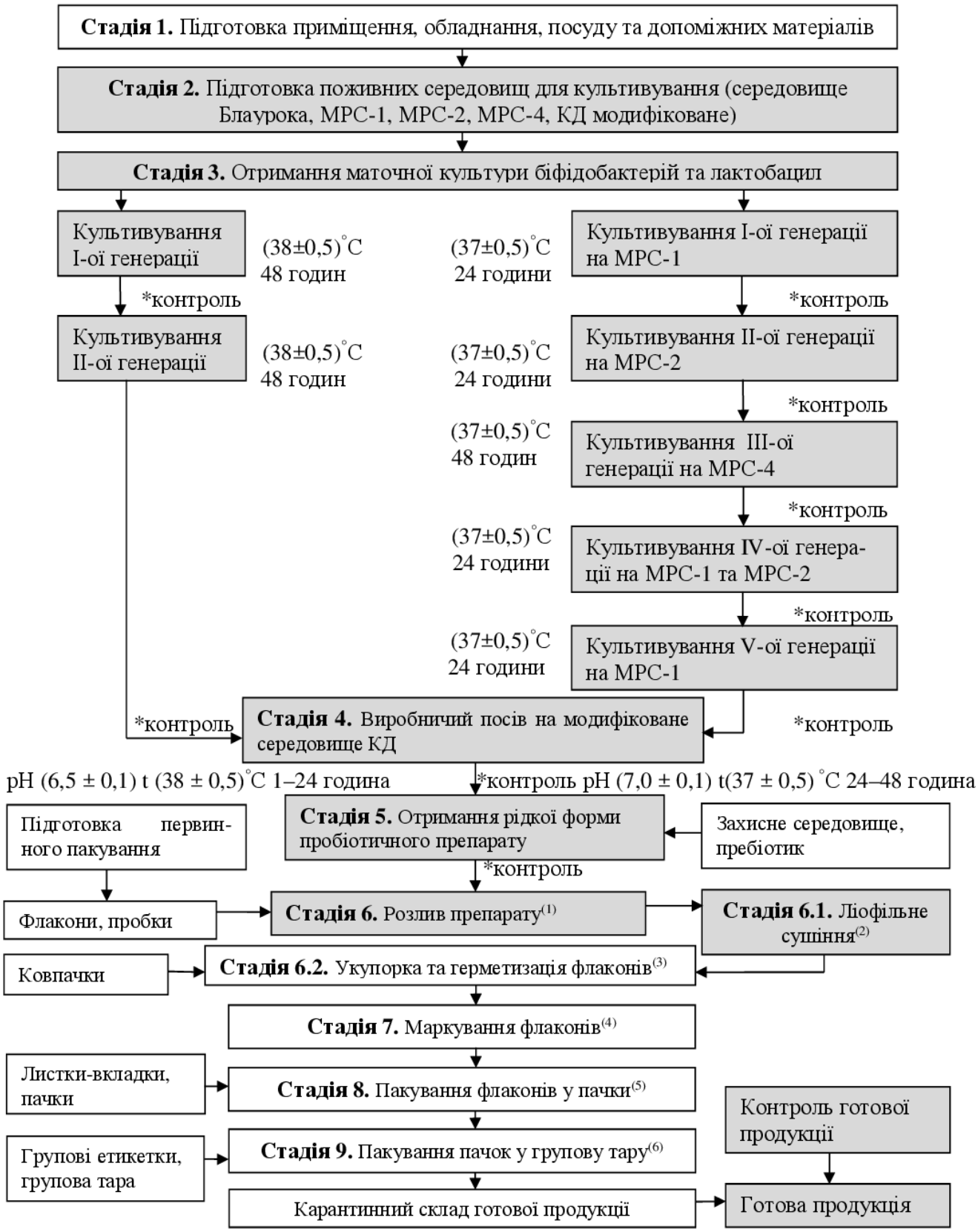


Рис 2. Блок-схема технологічного процесу одержання препарату у флаконах: *контроль – кожне пересівання супроводжується контролем на мікробіологічну чистоту; (1) – наповнення флаконів; (2) – технологічні параметри ліофілізації (температура, тиск, тривалість); (3) – якість висушеного матеріалу (візуальний огляд); (4) – правильність маркування; (5) – якість упаковки, цілісність пачки, кількість флаконів у пачці; (6) – комплектність, правильність друку.

На основі комплексу проведених досліджень нами запропоновано такий склад капсульної суміші для виробництва кишковорозчинних капсул (табл. 8).

Таблиця 8

Склад капсульної суміші

Склад на одну капсулу	Склад капсули, %	Маса компонентів, г
Біомаса бактерій: штам *B.bifidum ЛВА-3* і штам *L.plantarum 8Р-А3*	69,2	0,256
Лактози моногідрат mesh 200	15,0	0,056
МКЦ 101	6,8	0,025
Аеросил 200	9,0	0,033
Загальна кількість	100,0	0,37

Результати проведених досліджень покладені в основу розробки технології отримання капсул, блок-схема якої наведена на рис. 3. Для капсульної маси обрано тверді желатинові кишковорозчинні капсули № 2 із блакитною непрозорою кришкою і синім непрозорим корпусом.

Відповідно до ДФ України 2 видання та розробленого проекту МКЯ контроль препаратів проводили за показниками: опис, розчинність, pH, втрата в масі при висушуванні, мікробіологічна чистота, бактеріоскопічний контроль, кількість живих бактерій, активність кислотоутворення, однорідність маси (для капсул), розпадання (для капсул). Проведені дослідження підтвердили стабільність препаратів (ліофільно висушена мікробна маса у флаконах і кишковорозчинні капсули) у процесі зберігання у відповідних упаковках (скляні флакони та контурна чарункова упаковка) в сухому, захищеному від прямого світла місці, при температурі (2–8)°С протягом 1 року.

Результати досліджень з визначення загальної токсичності, ембріотоксичності та загальної фармакології проводилися на базі Центральної НДЛ Донецького ДМУ імені М.Горького під керівництвом проф. Уманського В.Я. Доклінічні дослідження проводилися на лабораторних мишах, самцях та самках, вагою 18—20 г, віком 60 діб, а також на новонароджених мишатах. Для оцінювання безпеки створеного пробіотичного препарату (ліофільно висушена мікробна маса у флаконах) визначали його комплексну дію на організм дослідних тварин. При вивченні хронічної токсичності препарату підтверджено його нетоксичність. Досліди, проведені на вагітних самках мишей, показали повну відсутність ембріотоксичності препарату. Показана його стимулювальна дія на ріст, розвиток і життєздатність тварин. Перевірка ефективності фізіологічної дії препарату на мишах показала наявність стабілізувального впливу на роботу шлунково-кишкового тракту, швидке відновлення мікробіоценозу кишечника мишей.

Нами проведено визначення антагоністичної активності препарату у флаконах, дані наведено у табл. 9.

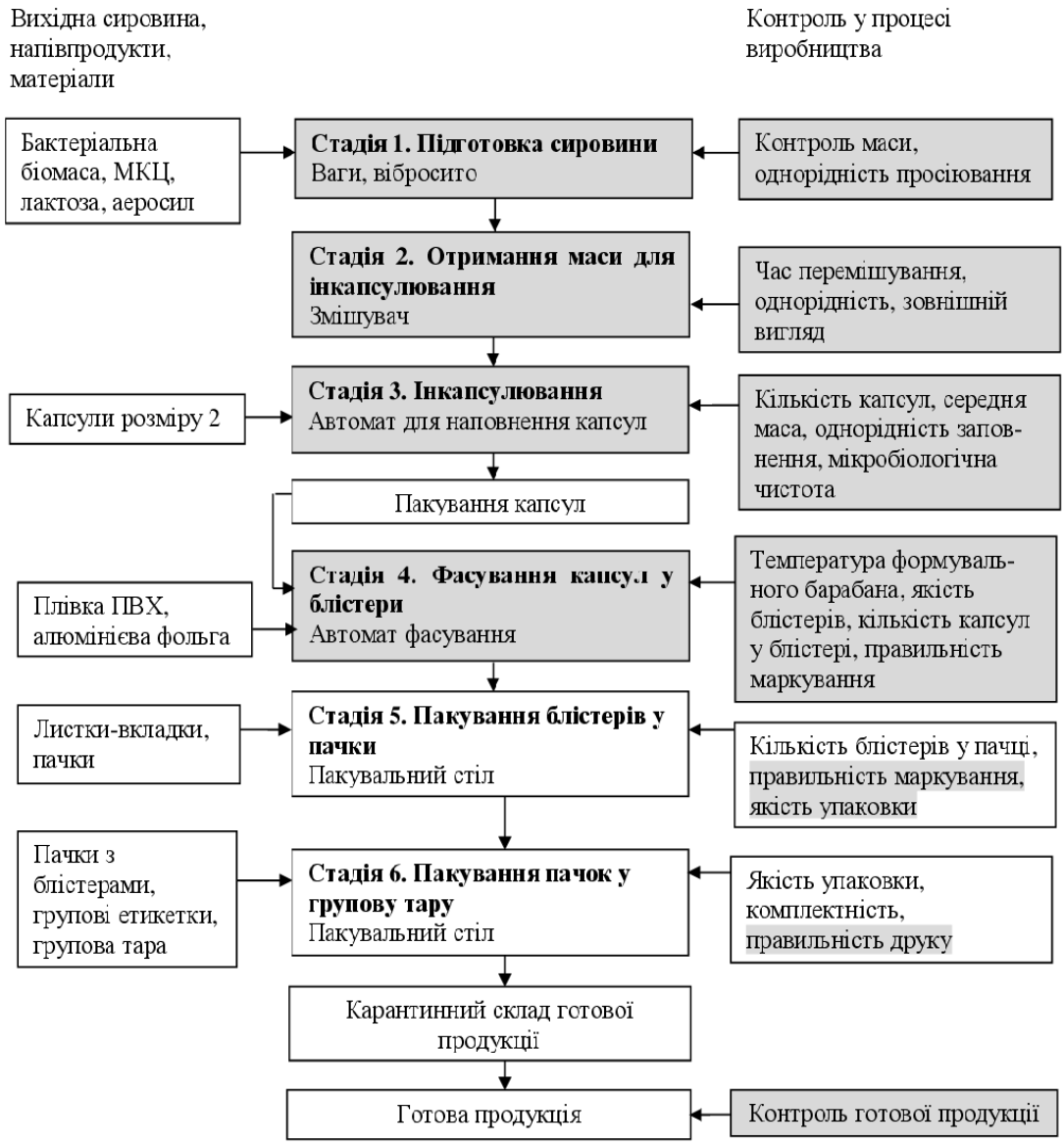


Рис. 3. Блок-схема технологічного процесу виготовлення препарату у капсулах

Таблиця 9

Порівняння показників антагоністичної активності комплексного препарату та монопрепаратів-пробіотиків, n = 5

Тест-штами	Зона затримки росту тест-штамів, мм		
	Ліофільно висушена мікробна маса у флаконах	Біфідум-бактерин	Лакто-бактерин
Sh.flexneri 170	27,4 ± 0,32	18,8 ± 0,27	25,3 ± 0,41
Sh.flexneri 337	23,8 ± 0,45	18,6 ± 0,44	22,7 ± 0,42
Sh.sonnei 5063	22,5 ± 0,18	19,3 ± 0,34	20,8 ± 0,28
E.coli 157	23,9 ± 0,35	21,3 ± 0,49	23,8 ± 0,49
Pr.vulgaris 170	22,4 ± 0,37	19,8 ± 0,70	21,6 ± 0,27
Pr.mirabilis	21,9 ± 0,43	17,6 ± 0,53	20,6 ± 0,37
St.aureus 209	22,1 ± 0,31	—	21,8 ± 0,29

Висока концентрація біологічно активних компонентів у складі середовища культивування, до яких належать бактеріоцини, протеази та ін., дозволяють зробити висновок про раціональність його збереження у складі препарату перед стадією ліофільного висушування.

Нами було проведено дві групи експериментів з вивчення імуностимулювальної та антибактеріальної активності стерильного фільтрату культуральної рідини бактеріального консорціуму на лабораторних мишах. У результаті дослідження встановлено, що продукти життєдіяльності бактерій при уведенні тваринам: 1) підвищують імунну відповідь тварин імунізованих адсорбованою вакциною проти правцю, з подальшим уведенням правцевого токсину; 2) знижують летальність при зараженні культурою *Sh.flexneri*.

Проведені дослідження демонструють високу біологічну активність продуктів життєдіяльності штамів-пробіотиків і підтверджують їх ад'ювантну активність у формуванні імунітету.

ВИСНОВКИ

Уперше теоретично обґрунтовано й експериментально підтверджено склад синбіотичного бактеріального консорціуму для профілактики та лікування захворювань шлунково-кишкового тракту різної етіології. Розроблено технологію отримання ліофілізованої форми у флаконах та капсульованої форми препарату. Розроблено методи стандартизації та проекти МКЯ лікарських форм синбіотичного бактеріального консорціму.

1. На основі результатів фізичних, фізико-хімічних, мікробіологічних, біологічних та фармакотехнологічних досліджень, результати яких викладено в дисертації, розроблено та стандартизовано склад і технологію промислового виробництва двох форм синбіотичного бактеріального консорціуму: ліофільно висушеної мікробної маси у флаконах і кишковорозчинних капсул.

2. Проаналізовано й узагальнено дані літератури щодо пробіотичних препаратів для профілактики та лікування захворювань шлунково-кишкового тракту різної етіології. За результатами проведеного маркетингового дослідження ринку препаратів на основі пробіотичних штамів встановлено, що 84% лікарських засобів цієї групи – препарати закордонного походження, 16% – українського – монокомпонентні препарати. Закордонні виробники віддають перевагу симбіотикам (44% від загальної кількості зареєстрованих ЛЗ). Визначено, що перспективність розширення асортименту пробіотичних препаратів полягає у розробці технології синбіотичних продуктів.

3. Визначені штами мікроорганізмів, які максимально придатні для бактеріального консорціуму, мають високі показники біологічної активності та відповідають певним автентичним ознакам: біфідобактерії штаму *Bifidobacterium bifidum ЛВА-3* і лактобацил *Lactobacillus plantarum 8Р-А3*.

4. Досліджено оптимальний склад поживного середовища для сумісного глибинного культивування біфідобактерій штаму *B.bifidum ЛВА-3* і лактобацил *L. plantarum 8Р-А3*, що задовольняє ростовим вимогам бактеріальних культур.

Поживне середовище стандартизовано за вмістом амінного азоту на рівні (190 ± 10) мг%. Запропонована технологія застосування ультрафільтрації та стерилізуючої фільтрації забезпечує доступність та цілісність факторів росту поживного середовища. Вивчення імуностимулювальної та антибактеріальної активності фільтрату культуральної рідини бактеріального консорціуму продемонструвало необхідність її збереження в препараті як ефективного імуностимулятора.

5. Уперше досліджена можливість сумісного культивування бактерій штамів *B. bifidum ЛВА-3* і лактобацил *L. plantarum 8Р-А3*. Вивчено основні характеристики культивування: pH, час, температура, співвідношення та кількість генерацій. Досліджено різні варіанти режимів культивування бактеріального консорціуму. На основі рівня показників росту обрано режим, що враховує особливості культивування кожного штаму: перша доба: pH (6,5 ± 0,1), температура (38 ± 0,5) °С; друга доба: pH (7,0 ± 0,1), температура (37 ± 0,1) °С. Тривалість сумісного культивування – 48 год. Співвідношення посівного матеріалу в інокуляті *B. bifidum ЛВА-3* II генерації / *L. plantarum 8Р-А3* V генерації – 1 : 3.

6. Досліджено вплив різних пребіотичних компонентів на основні показники росту бактерій у консорціумі. Показано, що лактитол має високу біфідогенну і лактогенну дію у порівнянні з іншими джерелами цукрів та визначено його концентрацію (1 ± 0,1) %.

7. Досліджено основні показники бактеріальної активності синбіотичного бактеріального консорціуму. Показано, що сумісне глибинне культивування біфідобактерій штаму *B.bifidum ЛВА-3* та лактобацил *L. plantarum 8Р-А3* дозволяє одержати препарат з високими показниками росту бактеріальних культур. Вивчено показники росту бактерій у консорціумі: активність кислотоутворення; кількість живих бактерій – не менше $1 \cdot 10^{12}$ КУО/мл біфідобактерій, не менше – $6 \cdot 10^{9}$ КУО/мл лактобацил.

8. Вивчено умови ліофілізації бактеріальної біомаси та встановлено режим сублімації (повільне заморожування та швидкість процесу – 2°С/год, температура досушування – 25°С протягом 6 год), який не пошкоджує морфологічні, мікробіологічні та біохімічні властивості культури. Підтверджено збереження високого рівня адгезивних властивостей бактерій у складі консорціуму після ліофілізації на рівні 80 % (високоадгезивні). При цьому показник адгезивної активності монопрепаратів біфідобактерій і лактобацил відповідно становив 60 та 28 %.

9. Встановлено, що рівень активності кислотоутворення, антагоністичної активності та кількості живих бактерій ліофілізованого бактеріального консорціуму перевищує аналогічні показники монокультур-пробіотиків, як препаратів порівняння, на (10–15) % та (5 – 15) % відповідно.

10. Проведено вибір допоміжних компонентів для одержання капсульної форми пробіотичних штамів. Встановлено відсутність негативного впливу компонентів капсульної суміші на активність бактеріальної культури – активність кислотоутворення (335 ± 12) °Т. Досліджено відповідність показників якості лікарських форм на основі бактеріального синбіотичного консорціуму встановленим

вимогам при зберіганні в зазначених умовах (температура, світло, упаковка). Встановлено термін зберігання 1 рік.

11. Із метою стандартизації розроблених препаратів опрацьовано методики контролю якості, серед яких антагоністична активність, кислотоутворення, визначення кількості живих бактерій та інші фармакопейні методи, на основі яких розроблено проекти МКЯ на розроблені лікарські форми.

12. Проведені доклінічні дослідження ліофілізованого бактеріального синбіотичного консорціуму підтверджують біологічну активність, імунологічну безпечність та відсутність токсичної дії.

13. Розроблену технологію отримання ліофілізованої форми у флаконах та капсульованої форми комплексного пробіотичного препарату апробовано в умовах ПАТ «Фармак», ВАТ «Біосан», ППНЛФ «Авіценна».

14. Фрагменти дисертаційної роботи впроваджено в навчальний процес низки ВНЗ медичного та фармацевтичного профілю України.

Список опублікованих праць за темою дисертації

Статті

1. Khiznnyak, O.S. Immunobiological properties of medicinal product obtained on the basis of strains of *Bifidobacteria* and *Lactobacilli* / O.S. Khizhnyak // Annals of Mechnikov's Institute. – 2014. – № 2. – P. 49–53 – Режим доступу : http://nbuv.gov.ua/j-pdf/ami_2014_2_11.pdf.

2. Хижняк, О.С. Вивчення адгезивних властивостей біфідобактерій та лактобацил при сумісному культивуванні / О.С. Хижняк // Фармаком. – 2015. – № 1. – С. 71–74.

3. Хижняк, О.С. Розробка складу капсульної маси профілактичного засобу на основі пробіотичних бактерій / О.С. Хижняк // Фармаком. – 2015. – № 3/4. –С.43–48.

4. Хижняк, О.С. Разработка комплексного пробиотического препарата для лечебно-профилактических целей / О.С. Хижняк // Научные ведомости Белгородского государственного университета. – 2016. – № 5 (226). – С. 165–169.

5. Хижняк, О.С. Технологія отримання бактеріального синбіотичного препарату / О.С. Хижняк // Journal «ScienceRise». – 2016. – № 4/4(21). – С. 53–59.

6. Хижняк, О.С. Біотехнологічні аспекти створення препаратів на основі пробіотиків / О.С. Хижняк, Ю.М. Краснопольський // Вісник Національного технічного університету «Харківський політехнічний інститут»: збірник наукових праць. Тематичний випуск: Технологія органічних і неорганічних речовин і екологія. – Харків: НТУ «ХПІ», 2012. – № 44 (950). – С. 72–78. (Особистий внесок: проведення експериментальних досліджень, аналіз одержаних результатів, написання статті).

7. Хижняк, О.С. Біотехнологічні аспекти отримання комплексного препарату, який містить різні штами пробіотичних культур / О.С. Хижняк, Ю.М. Краснопольський // Вісник Національного технічного університету «Харківський політехнічний інститут»: збірник наукових праць. Тематичний випуск: Технологія

органічних і неорганічних речовин і екологія. – Харків: НТУ «ХПІ», 2013. – № 4 (978). – С. 113–120. (Особистий внесок: проведення експериментальних досліджень, аналіз одержаних результатів, написання статті).

8. Хижняк, О.С. Изучение пребиотических свойств заменителя сахара лактитола в условиях *in vitro* / О.С. Хижняк // Вісник НТУ "ХПІ". Серія: Нові рішення в сучасних технологіях. – 2014. – № 26 (1069). – С. 140–148.

Патенти

9. Патент № 111319 України на корисну модель. МПК (2015.010 A61K 35/741, (2015.01) A61K 35/745, (2015.01) A61K 35/747, (2006.01) C12N 1/20. Спосіб одержання синбіотичного бактеріального консорціуму для лікувально-профілактичних цілей / Ю. М. Краснопольський, О. С. Хижняк. – № u 2016 03895; заявл. 11.04.2016 р; опубл. 10.11.2016. – Бюл. № 21. (Особистий внесок: патентний пошук, проведення експериментальної частини досліджень і оформлення заявки).

Тези

10. Хижняк, О.С. Розробка ефективної форми лікарського засобу, який містить біфідобактерії / О.С. Хижняк, Ю.М. Краснопольський // Перші наукові кроки – 2011: V Всеукраїнська науково-практична конференція, м. Кам'янець-Подільський, 13-14 квіт. 2011 р.: тези доповіді. – Кам'янець-Подільський, 2011. – С. 522.

11. Хижняк, О.С. Перспективність створення вітчизняних препаратів-пробіотиків / О.С. Хижняк, Ю.М. Краснопольський // Інформаційні технології: наука, техніка, технологія, освіта, здоров'я : міжнар. науково-практична конференція, м. Харків, 15-17 трав. 2012 р.: тези доповіді. – Х., 2012. – С. 320.

12. Хижняк, О.С. Доклиническое изучение совместно выращенных штаммов *Bifidobacterium bifidum ЛВА-3* и *Lactobacillus plantarum* / О.С. Хижняк // Актуальні питання сучасної медицини – 2014: міжнар. наукова конференція студентів і молодих вчених, м. Харків, 17–18 квіт. 2014 р.: тези доповіді. – Х.: ХНУ ім. В.Н. Каразіна. – 2014. – С. 127.

13. Хижняк, О.С. Необхідність сумісного глибинного культивування штамів пробіотиків / О.С. Хижняк // Фундаментальные и прикладне исследования в биологии – 2014: III междунар. научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых, г. Донецк, 24–27 февр. 2014 г.: тезисы доклада. – Донецк., 2014. – С.130.

14. Хижняк, О.С. Доведення пребіотичної активності лактитолу при сумісному культивуванні біфідобактерій та лактобацил / О. С. Хижняк // Інформаційні технології: наука, техніка, технологія, освіта, здоров'я : XXII міжнар. науково-практична конференція, м. Харків, 15–17 жовт. 2014 р.: тези доповіді. – Х., 2014. – С. 344.

15. Хижняк, О.С. Совместное выращивание пробиотических штаммов лактобацилл и бифидобактерий / О.С. Хижняк // Научная дискусския : вопросы математики, физики, химии, биологии : II междунар. заочная научно-практическая конференция, г. Москва, 19 марта 2013 г.: тезисы доклада. – М., 2013. – С. 87–92.

16. Хижняк, О.С. Пребіотики – необхідний компонент комплексного пробіотичного препарату / О.С. Хижняк // Проблеми та перспективи розвитку науки: матеріали VIII міжнар. науково-практичної конференції, м. Чернівці, 21–22 груд. 2013 р.: тези доповіді. – Чернівці: БЕФ, 2013. – С. 180–181.

17. Хижняк, О.С. Порівняльна характеристика пребіотичних властивостей деяких полісахаридів / О.С. Хижняк // Проблеми та перспективи розвитку науки: матер. XIII міжнар. науково-практичної конференції, м. Чернівці, 28–29 черв. 2014 р.: тези доповіді. – Чернівці: БЕФ, 2014. – С. 6–7.

18. Хижняк, О.С. Вивчення впливу сумісного культивування біфідобактерій та лактобацил на їх адгезивні властивості / О.С. Хижняк // Інформаційні технології: наука, техніка, технологія, освіта, здоров'я : XXIII міжнар. науково-практична конференція, м. Харків, 20–22 трав. 2015 р.: тези доповіді. – Х., 2015. – С. 272.

19. Хижняк, О.С. Вплив діоксиду кремнію на бактеріальну активність пробіотиків у складі капсульної маси / О.С. Хижняк // Актуальні питання боротьби з інфекційними захворюваннями: міжнар. науково-практична конференція, м. Харків, 14–15 трав. 2015 р.: тези доповіді. – Х., 2015. – С. 52.

АНОТАЦІЯ

Хижняк О.С. Розробка складу та біотехнології отримання комплексного пробіотичного препарату. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук за спеціальністю 15.00.01 – технологія ліків, організація фармацевтичної справи та судова фармація. – Національний фармацевтичний університет, Харків, 2017.

Дисертаційну роботу присвячено науковому обґрунтуванню та розробці технології отримання синбіотичного бактеріального консорціуму в двох лікарських формах: ліофільно висушеної у флаконах та капсул.

Проведено комплекс теоретичних і експериментальних досліджень з вивчення поживної цінності використаних допоміжних речовин з метою розробки поживного середовища для сумісного глибинного культивування. Експериментально підтверджено симбіотичний тип взаємодії використаних штамів-пробіотиків. Встановлено оптимальний склад бактерій у консорціумі (генерації та співвідношення), технологічні параметри культивування (pH, температура, тривалість циклу). Доведено біфідо- та лактогенну дію застосованого пребіотичного компонента – лактитолу та визначено його необхідну концентрацію. Визначено режим ліофільного висушування бактеріального консорціуму та експериментально доведено збереження основних ростових показників та високого рівня адгезивної активності ліофілізованої культури. У дослідах *in vivo* підтверджено безпечність запропонованого бактеріального консорціуму. Розроблено технологію одержання бактеріального консорціуму в двох лікарських формах та проект методик контролю якості лікарських форм.

Ключові слова: технологія, біфідобактерії, лактобацили, лактитол, консорціум, симбіоз, синбіотик, сумісне глибинне культивування, поживне середовище, ліофілізація, ліофільна маса, капсули, методи контролю якості.

АННОТАЦИЯ

Хижняк О.С. Разработка состава и биотехнологии получения комплексного пробиотического препарата. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 15.00.01 – технология лекарств, организация фармацевтического дела и судебная фармация. – Национальный фармацевтический университет, Харьков, 2017.

Диссертация посвящена научному обоснованию и разработке технологии получения синбиотического бактериального консорциума в двух лекарственных формах: лиофильно высушенной во флаконах и капсул.

С целью создания питательной среды, максимально полно удовлетворяющей все ростовые требования бактериальных культур, входящих в состав консорциума, был проведен комплекс теоретических и экспериментальных исследований по изучению питательной ценности компонентов питательных сред. На основе полученных данных разработана питательная среда для совместного глубинного культивирования штаммов бифидобактерий и лактобацилл.

С целью получения бактериального комплекса с высоким уровнем симбиотического типа взаимодействия были исследованы несколько штаммов бифидобактерий и лактобацилл в различных комбинациях. Наиболее высокие показатели были установлены в комбинациях – *Bifidobacterium bifidum ЛВА-3* и *Lactobacillus plantarum 8R-A3*. На основе результатов проведенных исследований определено количественное соотношение бактериальных штаммов в составе консорциума, установлены генерации бактерий, применяющихся для совместного глубинного культивирования. Учтены основные физические параметры роста индивидуальных культур, на основе чего разработаны параметры совместного глубинного культивирования (температура, pH, время).

В ходе экспериментальных исследований по интенсификации роста бактериальных культур при внесении дополнительного источника питания – пребиотического компонента – было установлено, что эффективным компонентом, обладающим выраженной бифидогенной и лактогенной активностью, является лактитол. Установлена его необходимая концентрация.

Проведены исследования по выбору режима лиофильного высушивания. Эффективность выбранного режима подтверждается высокими показателями роста и уровня адгезивной активности бактериальной культуры после лиофилизации. Это свидетельствует о сохранении целостности бактериальной клетки.

На основе микробиологических, фармакотехнологических и биологических исследований теоретически и экспериментально обоснованы состав и технология получения капсульной формы бактериального консорциума.

С целью стандартизации разработанных препаратов (лиофильно высушенная форма во флаконах и капсулы) разработаны проекты методик контроля качества. Исследовано влияние упаковки (флаконы, капсулы) и условий хранения на стабильность препарата в течение всего срока годности.

Фармакологическими доклиническими исследованиями подтверждена специфическая активность и безопасность разработанного бактериального

консорциума. В ряде экспериментов определено иммуностимулирующее и антибактериальное действие стерильного фильтрата культуральной жидкости, отделенного от бактериальной клетки.

Ключевые слова: технология, бифидобактерии, лактобациллы, лактитол, консорциум, симбиоз, синбиотик, совместное глубинное культивирование, питательная среда, лиофилизация, лиофильная масса, капсулы, методы контроля качества.

ABSTRACT

Khzhnyak O.S. Development of the composition and biotechnology of the multipurpose probiotic preparation. – Manuscript.

The thesis for the degree of candidate of pharmaceutical sciences, specialty 15.00.01 – Drug technology, organization of pharmacy and pharmacy court. – National Pharmaceutical University, Kharkiv, 2017.

The thesis is dedicated to scientific grounding and development of the technology of obtaining symbiotic bacterial consortium in two pharmaceutical forms (lyophilized and capsule).

The complex of theoretical and experimental studies on the nutritional value of excipients, which are used, has been conducted. The main goal of the experiments was to develop a culture medium for compatible deep cultivation. The symbiotic type of interaction strains of probiotics, which are used, has been experimentally confirmed. The optimum composition of bacteria in the consortium (generation and value), technological parameters of culturing (pH, temperature, time) have been identified.

The influence of lactitol on the increase of bifidobacteria and lactobacilli was proved and was determined it’s necessary concentration.

Researches on the choice of the mode of freeze drying were carried. Effectiveness of the selected mode is confirmed by high growth rates and level of adhesive activity of the bacterial culture after lyophilization. It demonstrates preservation of a wholeness of the bacterial cell.

On the basis of microbiological, pharmacotechnological and biological researches the composition and technology of producing of capsule form of bacterial consortium both theoretically and experimentally proved. Draft methods of quality control for the purpose of standardization of the developed medicines (freeze-dried form in vials and capsules) were developed.

The effect of packing (vials, capsules) and storage conditions on stability of medicine during all expiration date was investigated. Specific activity and safety of the developed bacterial consortium have been confirmed by pharmacological preclinical researches.

In a series of experiments is defined the immunostimulating and antibacterial action of the sterile filtrate culture fluid, separated from the bacterial cells.

Keywords: technology, bifidobacteria, lactobacilli, lactitol, consortium, symbiosis, symbiotic, compatible deep cultivation, nutrient medium, lyophilization, mass of lyophilization, capsules, methods of quality control.

Перелік умовних скорочень

ДСТУ – Державний стандарт України

ДФУ – Державна фармакопея України

КД – казеїново-дріжджове поживне середовище

КУО – колонієутворювальні одиниці

ЛЗ – лікарський засіб

МКЦ – мікрокристалічна целюлоза

МКЯ – методики контролю якості

МРС – молочне ростове середовище

ШКТ – шлунково-кишковий тракт