

На правах рукописи

**Федорова Татьяна Викторовна**

**ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ РАЗРАБОТКИ  
ПОЛИКОМПОНЕНТНОГО ПРОБИОТИКА НА ОСНОВЕ МЕТАБОЛИТОВ  
ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ ШТАММОВ ЛАКТО- И БИФИДОБАКТЕРИЙ**

14.04.01 – технология получения лекарств

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата фармацевтических наук

**Пермь – 2017**

Диссертационная работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук, доцент **Несчисляев Валерий Александрович**

**Официальные оппоненты:**

**Жилякова Елена Теодоровна** – доктор фармацевтических наук, профессор, федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» Министерства образования и науки Российской Федерации, заведующий кафедрой фармацевтической технологии;

**Пучнина Светлана Владимировна** – кандидат фармацевтических наук, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пермский государственный национальный исследовательский университет», старший научный сотрудник научно-исследовательской части.

**Ведущая организация:** федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Санкт-Петербург.

Защита диссертации состоится «\_\_» декабря 201\_\_ г. в \_\_.00 часов на заседании диссертационного совета Д 208.068.02 при федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации (614990, г. Пермь, ул. Полевая, д. 2, тел. (342) 233-55-01).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке (614070, г. Пермь, ул. Крупской, 46) и на сайте (<http://www.pfa.ru>) федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2017 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
кандидат химических наук

Замараева Татьяна Михайловна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Микрофлора кишечника является важным компонентом в единой системе поддержания гомеостаза организма человека. Состав нормальной микрофлоры желудочно-кишечного тракта может существенно изменяться под воздействием многочисленных неблагоприятных факторов различной природы, ведущая роль среди которых принадлежит бесконтрольному массовому использованию антибактериальных препаратов широкого спектра действия (Михайлова Е.С., 2009, Николаева С.В., 2009, Лоранская И.Д., 2011).

В практической микробиологии представляются перспективными исследования в сфере разработки нового поколения лекарственных средств, предназначенных для поддержания и восстановления симбиотических микробиоценозов, в том числе принципиально новых пробиотиков - метабиотиков, создаваемых на основе микробных экзометаболитов. Метаболитные субстанции реализуют свое положительное влияние путем угнетения роста условно-патогенных экзогенных и эндогенных микроорганизмов и стимуляции роста представителей нормофлоры (David L., 2001, Hijoja E., 2007, Алимбарова Л.М., 2010).

К преимуществам метаболитных пробиотиков следует отнести отсутствие потенциальной возможности угнетения индигенной микрофлоры, что возможно при приеме традиционных препаратов, содержащих живые бактерии. На Российском фармацевтическом рынке доминирует «Хилак форте» - представитель этой группы пробиотических препаратов, имеющий широкий перечень показаний к применению, включая: нарушения физиологической флоры тонкого и толстого кишечника во время и после лечения антибиотиками, лучевой терапии; гастроэнтерит, колит; энтерогенные заболевания желчного пузыря и печени; кожные болезни аллергического генеза и др. (Семикоз Н.Г., 2000, Щербаков И.Т., 2003, Пастухова В.А., 2007).

В связи с вышеизложенным представляется весьма актуальной разработка отечественного пробиотического препарата на основе метаболитов производственных штаммов лакто- и бифидобактерий, хорошо зарекомендовавших себя в терапевтической практике при коррекции дисбиотических нарушений.

### **Степень разработанности темы диссертации.**

Проблеме создания метаболитных пробиотиков посвящены работы отечественных авторов, включая Пшеничнова Р.А, Несчисляева В.А., Вахитова Т.Я. и др. Исследования Несчисляева В.А. с соавторами по разработке технологии метаболитного монопробиотика на основе экзометаболитов лактобактерий являются предпосылками создания комплексных препаратов на основе метаболитов нескольких бактериальных штаммов.

**Цель и задачи исследования.** Целью настоящей работы является разработка состава и технологии комплексного пробиотика на основе метаболитов производственных штаммов лакто- и бифидобактерий.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Отработать оптимальные параметры ультрафильтрационного выделения метаболитных комплексов из культуральной жидкости производственных штаммов пробиотических бактерий.

2. Исследовать физико-химические свойства и биологическую активность полученных экзометаболитных комплексов лакто- и бифидобактерий.

3. Оптимизировать состав и лекарственную форму метаболитного монопробиотика «Микростим».

4. Экспериментально обосновать состав и способ получения комплексного метабиотика.

**Методология и методы исследования.** Методологическую основу исследования составили труды как отечественных, так и зарубежных учёных по разработке принципиально новых пробиотиков (метабиотиков), создаваемых на основе микробных экзометаболитов пробиотических бактерий. Наряду с библиографическим, в работе были использованы аналитические и статистические методы исследования. В зависимости от поставленной цели и задач данные методы использовались на разных этапах исследования.

**Научная новизна.** Предложен и реализован комплексный методологический подход к созданию поликомпонентных метаболитных пробиотиков, включающий совокупность микробиологических и технологических приемов конструирования, изготовления и стандартизации препаратов.

Выявлено выраженное бактериотропное действие метаболитных комплексов, характеризующееся наличием эффекта стимуляции роста и активности кислотообразования пробиотических бактерий и угнетающим влиянием на условно-патогенные микроорганизмы.

Разработан состав и технология поликомпонентного пробиотика на основе метаболитов *Lactobacillus plantarum* 8P-A3, *Lactobacillus acidophilus* K3Ш24 и *Bifidobacterium bifidum* 1, обладающего более высокой антагонистической активностью в отношении условно-патогенных бактерий по сравнению с импортным аналогом «Хилак форте».

Предложен инновационный метод исследования влияния вспомогательных веществ, предназначенных для включения в состав метабиотиков, на представителей индигенной и условно-патогенной микрофлоры макроорганизма, заключающийся в измерении угнетения биолюминесценции тест-штамма *E. coli lum+*.

Определены необходимые параметры специфической активности разработанных метабиотиков и предложены методы их контроля.

**Теоретическая значимость работы** заключается в подтверждении адекватности и перспективности ультрафильтрации в волоконном аппаратном оформлении в качестве технологической основы получения экзометаболитных комплексов производственных штаммов лакто- и бифидобактерий. А также определяется совокупностью технологических новаций в сфере производства

пробиотиков и их контроля, которая может служить методической основой при разработке поликомпонентных метабиотиков.

**Практическая значимость работы.** Расширен арсенал лекарственных средств, предназначенных для коррекции дисбиотических состояний.

Подтверждена универсальность использования комплексной технологической схемы, сочетающей ультрафильтрационное выделение метаболитных фракций с одновременным получением клеточных концентратов, предназначенных, соответственно, для изготовления метабиотиков и традиционных клеточных пробиотиков, что значительно удешевляет получаемые препараты.

Оптимизирован состав и лекарственная форма метаболитного монопробиотика «Микростим». В состав препарата введены вспомогательные вещества, которые значительно улучшили его органолептические характеристики при сохранении биологической активности и стабильности.

Материалы диссертационной работы используются в качестве лекционного материала и при проведении семинаров по теме «Пробиотики» на кафедре промышленной технологии лекарств с курсом биотехнологии Пермской государственной фармацевтической академии, а также входят в нормативную документацию на препараты «Микростим-лакто» и «Хилабикс» отделения препаратов бактериотерапии филиала ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России "Пермское НПО "Биомед".

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Способ получения метаболитных комплексов лакто- и бифидобактерий для конструирования пробиотических препаратов.
2. Характеристика бактериотропных свойств метаболитных комплексов производственных штаммов лакто- и бифидобактерий.
3. Выбор вспомогательных веществ для коррекции органолептических свойств пробиотика, содержащего метаболитный комплекс *L. plantarum* 8P-A3 («Микростим»).
4. Состав, технология и биологические свойства комплексного метаболитного пробиотика «Хилабикс».

**Степень достоверности и апробация работы.** Научные положения и выводы базируются на большом объёме проведённых исследований, выполненных с использованием современных методов анализа и последующей статистической обработкой результатов исследования.

Основные результаты работы представлены на Всероссийской конференции «Биомедицинская инженерия и биотехнология» (Курск, март 2011); XVIII Российском Национальном Конгрессе "Человек и Лекарство" (Москва, апрель 2011); 13 Международном Славяно-Балтийском научном форуме «Санкт-Петербург – Гастро-2011» (Санкт-Петербург, май 2011); I Всероссийской с международным участием школе-конференции молодых учёных «Современные проблемы микробиологии, иммунологии и биотехнологии» (Пермь, ноябрь 2011); X Съезд эпидемиологов, микробиологов паразитологов «Итоги и перспективы обеспечения

эпидемиологического благополучия населения российской Федерации» (Москва, апрель 2012); межвузовской научной конференции студентов и молодых ученых «Современные проблемы фармацевтической науки», посвященной 75-летию ПГФА (Пермь, апрель 2012); 14-го Международном Славяно-Балтийском научном форуме «Санкт-Петербург – Гастро-2012» (Санкт-Петербург, май 2012), 15-м Международном Славяно-Балтийском научном форуме «Санкт-Петербург – Гастро-2013» (Санкт-Петербург, май 2013), 16-м Международном Славяно-Балтийском научном форуме «Санкт-Петербург – Гастро-2014» (Санкт-Петербург, май 2014), 17-м Международном Славяно-Балтийском научном форуме «Санкт-Петербург – Гастро-2015» (Санкт-Петербург, май 2015), VIII Международной научно-практической конференции «Актуальные направления научных исследований: от теории к практике» (Чебоксары, май 2016).

**Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтических наук.**

Диссертационная работа выполнена в соответствии с тематическим планом научно-исследовательских работ государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профильного образования «Пермская государственная фармацевтическая академия Министерства здравоохранения Российской Федерации» (№ 01.9.50007417).

**Публикации.** По материалам исследования опубликовано 16 работ (из них 5 в изданиях, рекомендованных ВАК РФ).

**Личный вклад автора.** Данные, приведенные в диссертации, получены при непосредственном участии автора на всех этапах планирования и проведения экспериментальных исследований на базе ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России и в филиале ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России "Пермское НПО "Биомед", статистической обработки полученных результатов.

**Соответствие диссертации паспорту научной специальности.** Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 14.04.01 – технология получения лекарств. Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пунктам 3, 4 паспорта специальности – технология получения лекарств.

**Объем и структура диссертации.** Работа изложена на 128 страницах машинописного текста, иллюстрирована 28 таблицами и 30 рисунками (из них 22 в приложении), состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, 3 глав экспериментальных исследований, выводов, списка литературы, включающего 145 источников, из них 114 отечественных и 31 иностранных авторов, приложений на 15 с.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

*Первая глава* содержит анализ отечественной и зарубежной литературы, отражающий характеристику лакто- и бифидобактерий как основных представителей нормофлоры кишечника и биологической субстанции препаратов для ее восстановления. Отмечено, что представители индигенной микрофлоры играют значимую роль в поддержании гомеостаза макроорганизма. Представлен обзор продуктов жизнедеятельности пробиотических штаммов с описанием их биологической активности. Рассмотрен ассортимент пробиотических препаратов, представленных на Российском фармацевтическом рынке. Обоснована актуальность разработки отечественных препаратов и технологий для расширения арсенала пробиотиков метаболитного типа.

*Вторая глава* включает описание объектов и методов исследования. В ней представлены характеристики производственных штаммов *Lactobacillus plantarum* 8P-A3, *Lactobacillus acidophilus* К<sub>3</sub>Ш<sub>24</sub>, *Bifidobacterium bifidum* 1, перечислены питательные среды, применяемые для получения и контроля бактериальных культур, и вспомогательные вещества, использованные в экспериментальных исследованиях. Представлены физико-химические, технологические, микробиологические и статистические методы. Описан способ получения ультрафильтратов (УФ) из жидких бактериальных взвесей пробиотических микроорганизмов. Представлен инновационный метод исследования антимикробной активности метаболитных фракций, заключающийся в измерении биолюминесценции индикаторного рекомбинантного штамма *Escherichia coli lum+*.

*В третьей главе* представлены результаты исследований по получению и изучению свойств культуральных жидкостей (КЖ) пробиотических штаммов. Предложены и обоснованы марки разделительных аппаратов для ультрафильтрации на полых волокнах для получения метаболитных комплексов. Исследованы физико-химические и биологические показатели ультрафильтратов культуральных жидкостей лакто- и бифидобактерий. Выявлена зависимость между отсекающей характеристикой разделительного аппарата (номинальная отсекаемая молекулярная масса-НОММ) и степенью выраженности биологической активности получаемой метаболитной фракции.

При выборе технологического оборудования, необходимого для проведения ультрафильтрации, принимали во внимание критерии эффективности и экономичности процесса разделения. Марку разделительного волоконного аппарата определяли на основании расчета производительности волокна при пропускании через него исследуемых бактериальных взвесей. Полученные в ходе эксперимента данные показали, что полые волокна марок ВПУ-15ПА, ВПУ-100ПС и ВПУ-300 более чем в 2 раза эффективнее волокна марки ВПУ-5ПА (табл. 1).

Таблица 1 - Характеристика производительности разделительных аппаратов

Марка разделительного волокна	Производительность по фильтрату в зависимости от типа волокна, л/ч			
	Вода очищенная	Бактериальная взвесь		
		L. plantarum 8P-A3	V. bifidum 1	L. acidophilus K <sub>3</sub> Ш <sub>24</sub>
ВПУ-5ПА	2,00	0,01	0,01	0,02
ВПУ-15ПА	6,00	0,43	0,26	0,44
ВПУ-100ПС	20,00	0,54	0,46	0,61
ВПУ-300ПС	24,00	0,71	0,54	0,71

Исследование физико-химических свойств полученных ультрафильтратов показало их различие. Величина показателя кислотности культур и ультрафильтратов лактобактерий была выше, чем у бифидобактерий, что свидетельствовало о более высоком антагонистическом потенциале (табл. 2). Величина показателя pH ультрафильтратов не имела существенных отличий после прохождения бактериальной взвеси через различные ультрафильтрационные волокна. Количество пептидов в УФ КЖ V. bifidum 1 было более низким по сравнению с L. plantarum 8P-A3 и L. acidophilus K<sub>3</sub>Ш<sub>24</sub>, что можно объяснить однотипной биохимической активностью относительно близких видов пробиотических бактерий на аналогичных питательных средах.

Таблица 2 - Физико-химические показатели ультрафильтратов культуральных жидкостей

Показатель	УФ КЖ штамма- продуцента	Номинальная отсекаемая молекулярная масса (НОММ), кДа		
		15	100	300
pH	L. plantarum 8P-A3	6,31±0,03	6,32±0,02	6,55±0,03
	L. acidophilus K <sub>3</sub> Ш <sub>24</sub>	3,72±0,01	3,62±0,03	3,61±0,03
	V. bifidum 1	6,04±0,01	6,21±0,02	6,42±0,01
	L. plantarum 8P-A3	1,1599±0,01	1,2358±0,01	1,2358±0,01
	L. acidophilus K <sub>3</sub> Ш <sub>24</sub>	1,1633±0,03	1,1737 ±0,04	1,2427±0,02
	V. bifidum 1	1,1391±0,04	1,1391±0,02	1,2358±0,07
Кислотность, °Т	L. plantarum 8P-A3	42,60±5,95	42,63±6,10	40,17±5,94
	L. acidophilus K <sub>3</sub> Ш <sub>24</sub>	86,16±3,08	111,51±9,02	116,66±4,94

Продолжение таблицы 2

Показатель	УФ КЖ штамма-производителя	Номинальная отсекаемая молекулярная масса (НОММ), кДа		
		15	100	300
Кислотность, °Т	<i>V. bifidum</i> 1	27,89±1,39	26,18±1,52	29,79±1,76
Пептиды, мг/мл	<i>L. plantarum</i> 8P-A3	1,25±0,03	1,87±0,03	1,87±0,02
	<i>L. acidophilus</i> К <sub>3</sub> Ш <sub>24</sub>	0,37±0,03	1,87±0,01	1,87±0,02
	<i>V. bifidum</i> 1	0,31±0,01	0,44±0,01	0,94±0,05
Аминный азот, %	<i>L. plantarum</i> 8P-A3	0,11±0,01	0,14±0,02	0,14±0,01
	<i>L. acidophilus</i> К <sub>3</sub> Ш <sub>24</sub>	0,03±0,01	0,04±0,01	0,05±0,01
	<i>V. bifidum</i> 1	0,12±0,01	0,13±0,01	0,13±0,02

Методы анализа для оценки биологической активности ультрафильтратов включали использование бактериальных культур *L. plantarum* 8P-A3 («Лактобактерин сухой») и *V. bifidum* 1 («Бифидумбактерин сухой») в качестве модельных представителей нормофлоры макроорганизма (таблица 3, 4).

Таблица 3 - Влияние метаболитных комплексов на рост и активность кислотообразования *L. plantarum* 8P-A3 (раствор глюкозы 0,5%)

УФ КЖ штамма производителя	НОММ, кДа	Контроль (без УФ КЖ)	Опыт	Коэффициент стимуляции
Прирост оптической плотности тест-штамма, D <sub>540нм</sub>				Роста
<i>L. plantarum</i> 8P-A3	15	0,324±0,03	0,451±0,04*	1,39±0,01
	100		0,490±0,06*	1,51±0,03
	300		0,472±0,02*	1,46±0,02
<i>L. acidophilus</i> К <sub>3</sub> Ш <sub>24</sub>	15	0,186±0,01	0,728±0,05*	3,91±0,04
	100		0,716±0,03*	3,84±0,02
	300		0,543±0,06*	2,92±0,03
<i>V. bifidum</i> 1	15	0,240±0,03	0,513±0,04*	2,14±0,03
	100		0,490±0,02*	2,04±0,02
	300		0,542±0,04*	2,25±0,03

Продолжение таблицы 3

УФ КЖ штамма продуцента	НОММ, кДа	Контроль (без УФ КЖ)	Опыт	Коэффициент стимуляции
Прирост общей кислотности тест-штамма, °Т				Кислотообразования
L. plantarum 8P-A3	15	19,25±0,14	24,55±1,43*	1,28±0,06
	100	19,25±0,14	26,72±1,61*	1,39±0,08
	300		22,78±1,72*	1,19±0,08
L. acidophilus К3Ш24	15	21,42±0,10	42,86±0,35*	2,00±0,07
	100		47,96±0,5* #	2,24±0,05#
	300		37,78±1,22*	1,76±0,09
B.bifidum 1	15	21,50±0,52	36,50±0,87*	1,70±0,01
	100		31,23±0,54* #	1,45±0,02#
	300		30,74±1,45* #	1,42±0,07#

Примечание

- \* -  $p < 0,001$  – по t-критерию Стьюдента по сравнению с контролем;
- # -  $p < 0,001$  – по t-критерию Стьюдента по сравнению с НОММ 15 кДа.

Величина показателя прироста оптической плотности культур L. plantarum 8P-A3 и B. bifidum 1 при добавлении разных фракций ультрафильтратов статистически отличалась от контрольных значений. После инкубации бактериальных культур в растворе глюкозы 0,5 % с добавлением метаболитных комплексов УФ КЖ L. acidophilus К3Ш24 он в 4 раза (для L. plantarum 8P-A3) и в 3 раза (для B. bifidum 1) превышает контрольный показатель.

Таблица 4 - Влияние метаболитных комплексов на рост и активность кислотообразования B. bifidum 1 (раствор глюкозы 0,5%)

УФ КЖ штамма продуцента	НОММ, кДа	Контроль (без УФ КЖ)	Опыт	Коэффициент стимуляции
Прирост оптической плотности тест-штамма, D <sub>540nm</sub>				Роста
L. plantarum 8P-A3	15	0,250±0,02	0,505±0,03*	2,04±0,26
	100		0,547±0,01*	2,19±0,16
	300		0,499±0,03*	2,02±0,24
L. acidophilus К3Ш24	15	0,085±0,02	0,228±0,02*	2,74±0,56
	100		0,395±0,02* #	4,68±0,30#

Продолжение таблицы 4

УФ КЖ штамма продуцента	НОММ, кДа	Контроль (без УФ КЖ)	Опыт	Коэффициент стимуляции
Прирост оптической плотности тест-штамма, D <sub>540нм</sub>				Роста
L. acidophilus К <sub>3</sub> Ш <sub>24</sub>	300	0,085±0,02	0,215±0,01*	2,57±0,37
B. bifidum 1	15	0,211±0,02	0,288±0,04	1,47±0,20
	100		0,399±0,05*	2,08±0,40
	300		0,319±0,08	1,73±0,58
Прирост общей кислотности тест-штамма, °Т				Кислотообразования
L. plantarum 8P-A3	15	3,80±0,02	8,02±0,27*	2,11±0,06
	100		8,96±0,20* #	2,36±0,08#
	300		8,50±2,18*	2,24±0,58
L. acidophilus К <sub>3</sub> Ш <sub>24</sub>	15	2,04±0,01	5,60±0,53*	2,74±0,26
	100		6,12±0,20*	3,00±0,15
	300		2,10±0,23	1,00±0,10
B. bifidum 1	15	2,68±0,21	5,70±0,41*	2,17±0,16
	100		8,87±1,55*	3,44±0,62
	300		7,53±1,12*	3,05±0,63

## Примечания

- \*- p<0,001 – по t-критерию Стьюдента по сравнению с контролем;
- # - p<0,001 – по t-критерию Стьюдента по сравнению с НОММ 15 кДа

Исследования антибактериального действия метаболитных комплексов на штамм E. coli lum+ (модель условно-патогенной культуры) в экспресс-тесте угнетения билюминесценции показали, что наиболее активной является фракция 15 кДа (табл. 5).

Таблица 5 - Антимикробная активность метаболитных комплексов

УФ КЖ штамма продуцента	НОММ, кДа	Индекс антибактериальной активности, %		
		Время совместной экспозиции, мин		
		5	60	120
B. bifidum 1	15	96,56±0,08	95,57±0,05	96,17±0,02

Продолжение таблицы 5

УФ КЖ штамма продуцента	НОММ, кДа	Индекс антибактериальной активности, %		
		Время совместной экспозиции, мин		
		5	60	120
V. bifidum 1	100	93,94±0,09	95,83±0,08	95,51±0,08
	300	96,05±0,28	96,25±0,10	96,77±0,06
L. plantarum 8P-A3	15	98,90±0,04	99,27±0,03	99,30±0,03
	100	88,10±0,10*	84,21±0,19*	82,49±0,05*
	300	32,34±0,07	50,95±0,42	43,61±0,44
L. acidophilus K <sub>3</sub> Ш <sub>24</sub>	15	98,92±0,19	99,26±0,06	99,56±0,01
	100	98,28±0,36	98,36±0,03*	98,46±0,02*
	300	90,67±0,06	87,82±0,07	85,12±0,23

Примечание – \* -  $p < 0,001$  по t-критерию Стьюдента по сравнению с 15 кДа.

Таким образом, скрининг экзометаболических фракций пробиотических бактерий штаммов *L. plantarum* 8P-A3, *L. acidophilus* K<sub>3</sub>Ш<sub>24</sub> и *V. bifidum* 1 позволил определить эффективность их влияния на идиогенную и условно-патогенную микрофлору в зависимости от номинальной отсекаемой молекулярной массы (НОММ). В ходе проведения экспериментов были установлены метаболитные фракции с преобладающим антимикробным влиянием на условно-патогенные микроорганизмы (УПМ) и с выраженной пробиотической активностью.

В четвертой главе представлены материалы исследования по оптимизации лекарственной формы и состава метаболитного монопробиотика «Микростим», обладавшего неприятным вкусом, а также недостаточно удобной для потребителя формой выпуска (в стеклянных флаконах по 10-20 мл). Данный препарат, представляющий собой низкомолекулярные метаболиты лактобактерий штамма *Lactobacillus plantarum* 8P-A3, был разработан в 2005 году в Пермском НПО «Биомед». Доклинические испытания препарата показали, что «Микростим» оказывает антибактериальное действие на патогенные и условно-патогенные микробы, такие как *Shigella* sp., *Escherichia coli*, *Proteus* sp., *Klebsiella* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* и *Staphylococcus epidermalis* и другие.

Используемые для изготовления пробиотических препаратов питательные среды придают конечному продукту специфические органолептические свойства, коррекцию которых с целью улучшения проводили путем введения дополнительных вспомогательных веществ, такие как подсластители, ароматизаторы и консерванты.

Варианты составов, включающие лимонную кислоту, имели кислый вкус, который частично нивелировался при добавлении подсластителей - сахара рафинада, лактозы, фруктозы и др. Применение дисахаров в количестве 100,0 г/л в составе

композиции не влияло на биохимическую активность бифидобактерий, а активность лактобактерий увеличивалась в 2 раза по сравнению с контролем.

Введение в составы ароматизатора способствовало маскировке неприятного запаха и изменяло вкус с сильносоленого на солоноватый. Включение в состав композиций сорбата калия не отражалось на физико-химических и органолептических параметрах препарата. Было установлено, что при содержании данного консерванта в количестве 0,3 г/л, составы быстро подвергались контаминации при применении (через 5 дней при трехкратном ежедневном открывании упаковки). Увеличение концентрации консерванта до 1,1 г/л обеспечивало более длительное сохранение микробиологической чистоты экспериментальных составов при моделировании процесса вскрытия упаковки.

В результате исследования влияния вспомогательных веществ на симбионтную микрофлору были получены данные, анализ которых позволил заключить, что ароматизатор карамель и сорбат калия в используемых количествах обладают индифферентными свойствами в отношении лакто- и бифидофлоры макроорганизма. Результаты исследования стабильности позволили установить срок хранения для измененной лекарственной формы метабиотика (капли для наружного и внутреннего применения во флаконе-капельнице объемом 100 мл), продолжительностью 1,5 года (срок наблюдения).

По результатам оптимизации метаболитного монопробиотика, получившего наименование «Микростим-лакто», был составлен соответствующий проект нормативной документации.

*Пятая глава* включает материал по разработке комплексного метаболитного пробиотического препарата «Хилабикс». Изложен процесс конструирования состава препарата, данные исследования физико-химических и биологических свойств, а также их стабильность при хранении. Представлена технологическая схема получения препарата с характеристикой контрольных точек.

В результате исследований по конструированию комплексного метабиотика было определено два перспективных варианта метаболитной композиции следующего состава:

#### **Хилабикс 15:**

- УФ КЖ *L. plantarum* 8P-A3 15 кДа  
2 части;
- УФ КЖ *L. acidophilus* К<sub>3</sub>Ш<sub>24</sub> 15 кДа  
1 часть;
- УФ КЖ *B. bifidum* 1 15 кДа 1 часть;
- Раствор сорбата калия 30% 3,6 мл/л;
- Ароматизатор карамель и.н. 0,1 мл/л.

#### **Хилабикс 100:**

- УФ КЖ *L. plantarum* 8P-A3 100 кДа  
2 части
- УФ КЖ *L. acidophilus* К<sub>3</sub>Ш<sub>24</sub> 100 кДа  
1 часть
- УФ КЖ *B. bifidum* 1 100 кДа 1 часть
- Раствор сорбата калия 30% 3,6 мл/л
- Ароматизатор карамель и.н. 0,1 мл/л

Препарат представляет собой стерильный комплекс экзометаболитов пробиотических бактерий трех производственных штаммов с корректирующим вкусом и

запах ароматизатором, а также с добавлением консерванта, обеспечивающего стабильность при хранении и применении. Физико-химические свойства вариантов препарата представлены в таблице 6.

Наличие отличий физико-химических показателей составов Хилабикс 15 и Хилабикс 100 позволило предположить различие их биологической активности, что удалось подтвердить при проведении дальнейшего исследования.

Таблица 6 - Физико-химические показатели комплексных метабиотиков

Показатель	Значение/Описание	
	Хилабикс 15	Хилабикс 100
Внешний вид	Прозрачная жидкость светло-коричневого цвета с слабым запахом карамели с специфическим вкусом.	
рН	5,50±0,50	5,80±0,30
Кислотность, °Т	56,02±2,01	74,74±1,34
Сухой остаток, г/мл	0,0463±0,0069	0,0568±0,0073
Общий азот, мг/мл	3,5±0,2	3,9±0,1
Аминный азот, %	0,64±0,04	0,65±0,05
Белковый азот, мг/мл	0,19±0,04	0,21±0,03
Пептиды, мг/мл	1,17±0,03	1,33±0,04
Плотность, г/см <sup>3</sup>	1,012±0,002	1,013±0,001
Вязкость, мПа*с	1,1340±0,0024	1,2568±0,0031

Оба варианта препарата оказывают стимулирующее влияние на кислотообразование представителей индигенной микрофлоры, что повышает антагонистическую активность последних по отношению к условно-патогенным штаммам. Хилабикс 15 в 2 раза увеличивает кислотообразование *L. plantarum* 8P-A3, а Хилабикс 100 - в 3 раза увеличивает кислотообразование *B. bifidum* 1 (табл. 7). Показатель прироста общей кислотности обоих тест-штаммов и показатель прироста оптической плотности *L. plantarum* 8P-A3 увеличивается почти в 3 раза при культивировании штамма в обедненной питательной среде. По штамму *B. bifidum* 1 этот прирост менее выражен у обоих вариантов метабиотика.

Таблица 7 - Влияние образцов препарата на рост и активность кислотообразования лакто- и бифидобактерий (раствор глюкозы 0,5%)

Образец	Прирост оптической плотности, $D_{540\text{nm}}$		Прирост общей кислотности, °T	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
	Тест-штамм <i>L. plantarum</i> 8P-A3			
Хилабикс 15	0,250±0,02	0,740±0,05*	22,46±0,36	44,91±1,45*
Хилабикс 100		0,710±0,07*		36,62±2,86* #
Тест-штамм <i>B. bifidum</i> 1				
Хилабикс 15	0,161±0,08	0,192±0,10	2,87±0,61	4,42±0,68
Хилабикс 100		0,213±0,09		8,16±0,14* #

Примечания:

- \* -  $p < 0,001$  по t-критерию Стьюдента по сравнению с контролем;
- # -  $p < 0,05$  по t-критерию Стьюдента по сравнению с препаратом 15.

Обе метаболитные композиции обладают угнетающим действием на энтеробактерии *E. coli lum+*. Цельные препараты быстро и значительно (более чем на 90%) ингибируют биолюминесценцию тест-штамма. Разведение метабиотиков в 10 раз позволило выявить достоверные отличия их антибактериальной активности (табл.8).

Таблица 8 - Антимикробная активность составов «Хилабикс»

УФ КЖ штамма продуцента	Разведение, раз	Индекс антибактериальной активности, %		
		Время совместной экспозиции, мин		
		5	60	120
Хилабикс 15	0	99,80±0,19	99,96±0,20	99,97±0,10
	5	94,46±0,40	94,71±0,24	90,52±3,48
	10	77,36±2,26***	72,86±0,86***	61,68±5,71**
Хилабикс 100	0	98,99±0,34	99,53±0,18	99,67±0,16
	5	73,36±3,21	64,21±7,95	63,83±6,88
	10	67,04±6,24*	54,15±8,40	50,27±5,79*
«Хилак-форте»	0	99,96±0,11	99,99±0,25	99,98±0,23
	5	89,08±0,14	88,30±0,15	87,11±0,12
	10	49,55±0,13	50,23±0,17	33,06±0,16

Примечания

- \*\*\* -  $p < 0,001$  по t-критерию Стьюдента в сравнении с «Хилак форте»;

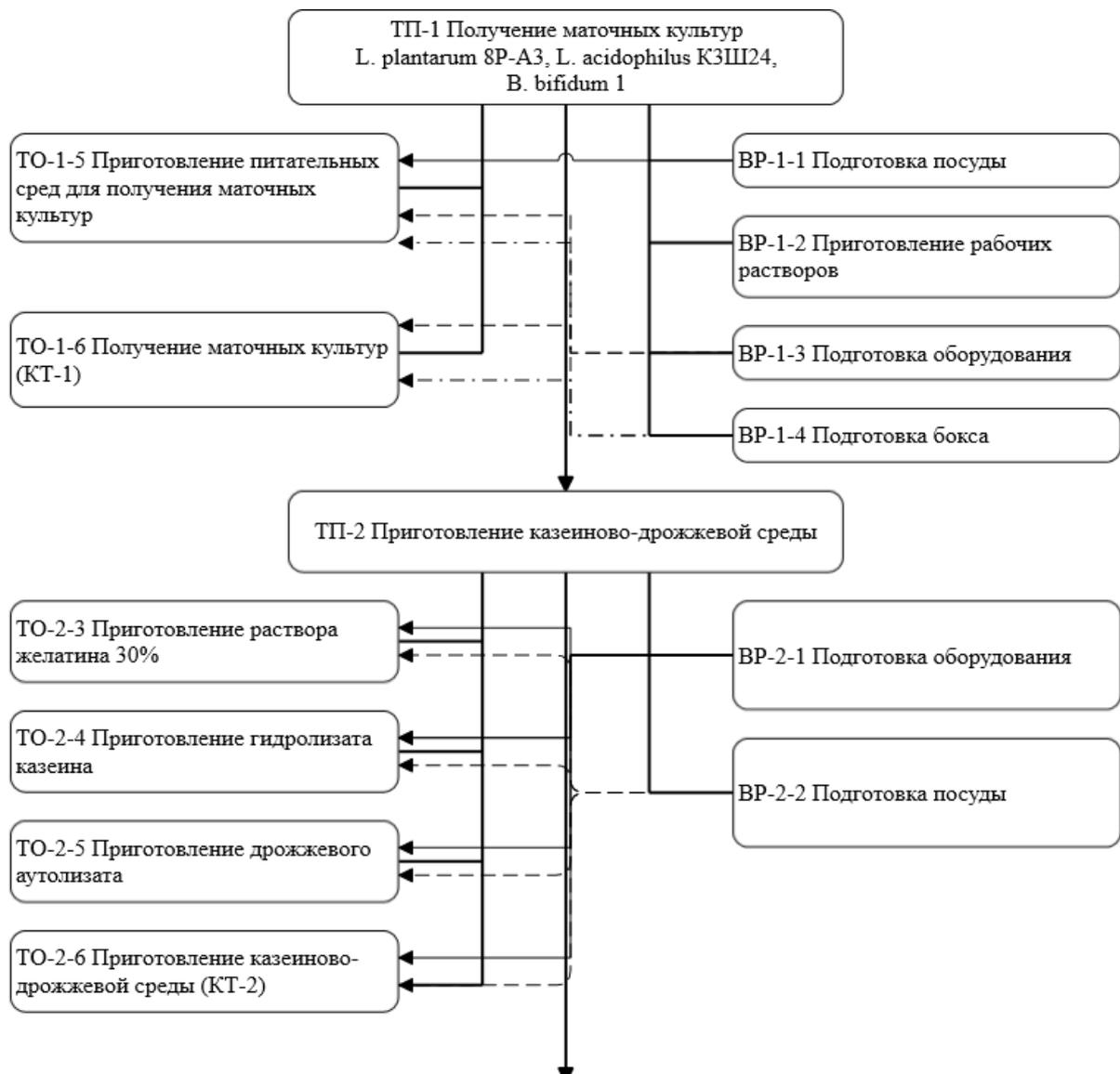
2. \*\* -  $p < 0,01$  по t-критерию Стьюдента в сравнении с «Хилак форте»;

3. \* -  $p < 0,05$  по t-критерию Стьюдента в сравнении с «Хилак форте».

При равных значениях рН ( $5,8 \pm 0,1$ ) «Хилабикс» в большей степени угнетает свечение *E. coli lum+* по сравнению с препаратом «Хилак форте».

Для удобства приема потребителем пробиотического препарата было решено использовать лекарственную форму в виде капель для перорального введения. Жидкий препарат разливали во флаконы вместимостью 100 мл. Марка стекла для флакона подбиралась с учетом специфики состава и особенностей хранения метаболитного монопробиотика. Были выбраны флаконы из темного нещелочного стекла импортного производства (SGD, Франция-Германия), которые снабжались каплеобразователями и закрывались крышкой с кольцом контроля вскрытия.

Процесс производства комплексного метабиотика включает 10 основных стадий:



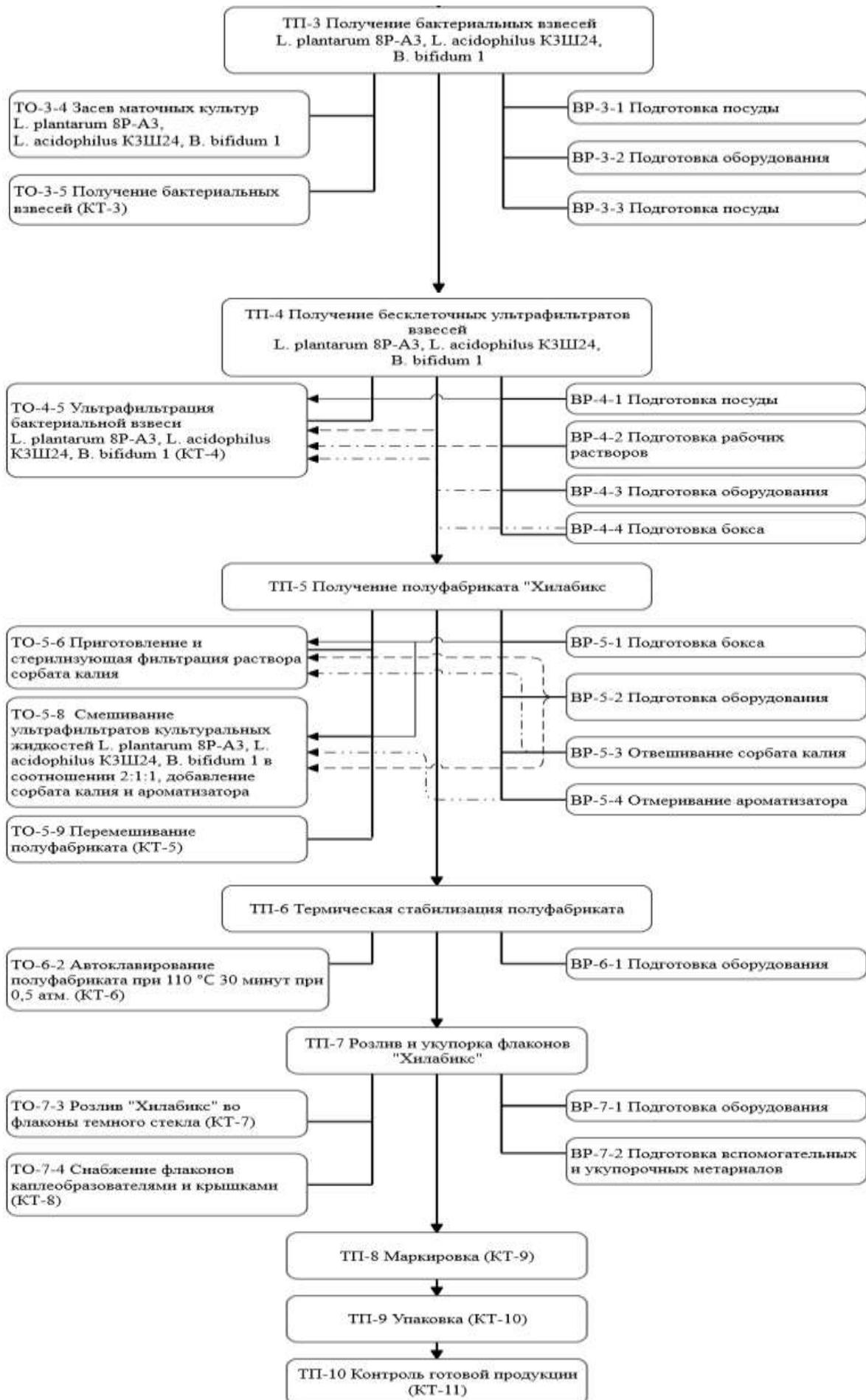


Рисунок 1 – Технологическая схема получения «Хилабикс»

Для получения качественного продукта на всех технологических стадиях предусмотрены контрольные точки, которые представлены в таблице 9.

Таблица 9 - Перечень контрольных точек и нормируемых показателей

КТ	Наименование этапа	Контролируемый показатель
КТ-1	2.4. Получение маточных культур штаммов <i>L. plantarum</i> 8P-A3, <i>B. bifidum</i> 1, <i>L. acidophilus</i> К <sub>3</sub> Ш <sub>24</sub>	Не должны содержать посторонней микрофлоры, плесневелых и дрожжеподобных грибов
КТ-2	2.6. Приготовление казеиново-дрожжевой среды	pH=(6,5±0,1); аминный азот (0,120±0,015) %, не должна содержать посторонней микрофлоры, плесневелых и дрожжеподобных грибов
КТ-3	3.5 Получение бактериальной взвеси лакто- и бифидобактерий	Взвесь <i>L. plantarum</i> 8P-A3: pH=(6,4±0,4); содержание живых лактобактерий в 1 мл не менее 10 <sup>8</sup> , не должна содержать посторонней микрофлоры, плесневелых и дрожжеподобных грибов. Взвесь <i>L. acidophilus</i> К <sub>3</sub> Ш <sub>24</sub> : pH=(6,4±0,4); содержание живых лактобактерий в 1 мл не менее 10 <sup>8</sup> ; не должна содержать посторонней микрофлоры, плесневелых и дрожжеподобных грибов. Взвесь <i>B. bifidum</i> 1: pH=(5,5±0,5); содержание живых лактобактерий в 1 мл не менее 10 <sup>8</sup> ; не должна содержать посторонней микрофлоры, плесневелых и дрожжеподобных грибов.
КТ-4	4.5 Получение бесклеточного ультрафильтра культуральной жидкости лакто- и бифидобактерий	Должен быть прозрачным
КТ-5	5.8 Получение полуфабриката	pH=(5,0-6,0); кислотность не ниже 40 °Т; должен быть прозрачным
КТ-6	6.2 Стабилизация термической обработкой полуфабриката	Должен оставаться прозрачным
КТ-7	Розлив во флаконы-капельницы метабиотика, укупорка флаконов пробками	Отклонения от номинального объёма флакона: ±2% [100±2] мл
КТ-8	Розлив во флаконы-капельницы, укупорка флаконов пробками	Визуальный контроль внешнего вида подтеки продукта на поверхности флакона отсутствуют, пробки не деформированы и плотно фиксированы на флаконах
КТ-9	Маркировка	Проверка качества расположения этикетки на флаконе, контроль качества и правильности маркировки на этикетке

		флакона (номер партии, дата изготовления, срок годности)
КТ-10	Упаковка	Правильность и соответствие маркировки на флаконе и пачке (номер партии, дата изготовления, срок годности)
КТ-11	Контроль готовой продукции	Показатели: - органолептические свойства; - рН=(5,0 - 6,0); - плотность: 1,010 – 1,020 г/см <sup>3</sup> ; - подлинность (УФ-спектр поглощения) и количество белкового азота не менее 0,1 мг/мл; - кислотность: не ниже 40 °Т; - отсутствие лакто- и бифидобактерий - микробиологическая чистота.

По разработанной технологии было получено по 3 серии вариантов препарата и проведена оценка их качества, подготовлен проект нормативной документации. Полученные серии препарата соответствовали требованиям разработанной спецификации, представленной в таблице 10.

Таблица 10 - Спецификация «Хилабикс» капли для перорального применения

Показатель	Метод	Нормы
Описание	Визуальный, органолептический	Прозрачная жидкость от коричневого до темно-коричневого цвета со специфическим вкусом и слабым ароматом карамели
Подлинность	СФМ	УФ-спектр препарата должен иметь максимум поглощения при 259±5 нм («Хилабикс 15»), 260±5 нм («Хилабикс 100») и минимум поглощения при 230±5 нм («Хилабикс 15») и 235±5 нм («Хилабикс 100»).
Подлинность	Колориметрический ГФ XII, вып.1, с. 111	Белковый азот не менее 0,2±0,1 мг/мл
Прозрачность	ГФ XII, вып 1, с. 98	Препарат должен быть прозрачным
рН	Потенциометрический ГФ XII, вып.1, с.89	От 5,0 до 6,0
Плотность	ГФ XII, вып 1, с. 40, метод 3	1,010 – 1,020 г/мл
Номинальный объем	ГФ XI, вып 2, с. 140	Отклонение номинального объема не должно превышать 2%

Продолжение таблицы 10

Показатель	Метод	Нормы
Герметизация	МУК 4.1/4.2.588-96, с. 64	Препарат должен быть герметичен
Стерильность	Метод прямого посева по МУК 4.1/4.2.588-96, с. 25	Препарат должен быть стерильным
Безвредность	Биологический	Препарат должен быть безвредным
Специфическая активность	Биоллюминесценция	Цельный препарат должен подавлять свечение люминесцентного штамма <i>E. coli</i> не менее чем на 95% через 30 минут совместной экспозиции
Упаковка		100 мл во флаконе. 1 флакон с инструкцией по применению в картонной пачке.
Транспортирование		При температуре не выше 25 °С
Хранение		В сухом, защищенном от света месте при температуре не выше 25 °С
Срок годности		1,5 года

Наблюдения за стабильностью составов «Хилабикс» (капли для перорального применения) проводили в течении 18 месяцев (срок наблюдения). Результаты контроля позволили сделать заключение о стабильности «Хилабикс 15» и «Хилабикс 100» при хранении в течении всего наблюдаемого срока при комнатной температуре. По результатам доклинического исследования составов Хилабикс 15 и Хилабикс 100 будет принято решение по выбору наиболее эффективной композиции.

Таким образом, разработанный метаболитный пробиотик «Хилабикс», обладающий выраженной пробиотической и доказанной антибактериальной активностью, позволит расширить линейку препаратов для коррекции дисбиотических нарушений и пополнить арсенал отечественных пробиотиков, не уступающих по совокупности потребительских свойств зарубежным препаратам, а разработанная универсальная технология по получению метаболитных пробиотиков может быть применена для выделения активной экзометаболитной фракции любого производственного пробиотического штамма с последующим конструированием лекарственной формы препарата на её основе.

## ВЫВОДЫ

1. Установлены оптимальные условия разделения культуральных жидкостей на бактериальные концентраты и высокоактивные фракции (ультрафильтраты) с использованием разделительных аппаратов с номинальной отсекаемой молекулярной массой в диапазоне 15 – 100 кДа.

2. Все исследуемые образцы метаболитных фракций обладают биологической активностью. Выявлена зависимость между отсекающей характеристикой разделительного аппарата и степенью выраженности биологической активности получаемой метаболитной фракции. По совокупности исследуемых параметров лучшие показатели антимикробной активности обнаружены у ультрафильтратов, полученных с использованием разделительных аппаратов с номинальной отсекаемой молекулярной массой 15 кДа, а более выраженная пробиотическая активность наблюдалась у ультрафильтрата культуральной жидкости *L. plantarum* 8P-A3 и *L. acidophilus* K<sub>3</sub>Ш<sub>24</sub> - 100 кДа.

3. Усовершенствован состав и оптимизирована лекарственная форма метаболитного монопробиотика «Микростим». Органолептические свойства улучшены за счет добавления сорбата калия и ароматизатора карамель. Разработана технологическая схема производства модернизированного препарата «Микростим-лакто, капли для наружного и внутреннего применения» во флаконах-капельницах по 100 мл.

4. Разработан состав и технология комплексного метаболитного пробиотика «Хилабикс» на основе ультрафильтратов культуральных жидкостей производственных штаммов бактерий: *L. plantarum* 8P-A3, *L. acidophilus* K<sub>3</sub>Ш<sub>24</sub> и *B. bifidum* 1. Доказано пробиотическое действие «Хилабикс» на представителей симбионтной микрофлоры, характеризующееся эффектом стимуляции роста и активности кислотообразования клеток. По антагонистической активности в отношении условно-патогенных бактерий разработанный препарат «Хилабикс» обладает более выраженным действием по сравнению с импортным аналогом «Хилак форте».

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Несчисляев, В.А. Влияние метаболитов лактобактерий на способность энтеробактерий к образованию биопленок / В.А. Несчисляев, **Т.В. Крылова\***, Л.П. Чистохина // XVIII Российский национальный конгресс «Человек и лекарство», 11–15 апр. 2011 г., Москва : сб. материалов конгр. : (тез. докл). – Москва, 2011. – С. 452–453.

2. Сравнительная характеристика антимикробного действия экзометаболитов пробиотических штаммов бактерий / Несчисляев В.А., **Крылова Т.В.\***, Чистохина Л.П., Валиева Е.М. // Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. – 2011. – № 2–3. – С. М65 М65b.

3. К вопросу о терапевтическом потенциале и вариантах аппликации метабиотиков / Несчисляев В.А., **Крылова Т.В.\***, Чистохина Л.П., Соснина О.Ю.,

Петровских В.П. // Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. – 2011. – № 2–3. – С. М65 – М65с.

4. Технологические аспекты выделения бактериальных метаболитных комплексов / **Крылова Т.В.\***, Чистохина Л.П., Несчисляев В.А., Николаева А.М. // Биомедицинская инженерия и биотехнология : материалы IV Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием.– Курск, 2011. – С. 58–61.

5. **Несчисляев, В.А. Пробиотическая активность метаболитных комплексов бифидобактерий / В.А. Несчисляев, Т. В. Крылова\*, Л. П. Чистохина // Вестн. Урал. мед. акад. науки. – 2011. – № 3/1 (37). – С. 85–86.**

6. **Несчисляев, В. А. К вопросу определения антимикробной активности метаболитов пробиотических штаммов / В. А. Несчисляев, Т. В. Крылова\*, Л. П. Чистохина // Вестн. Урал. мед. акад. науки. – 2011. – № 4/1 (38). – С. 104–105.**

7. Несчисляев, В.А. К вопросу использования ароматизаторов при разработке пробиотических препаратов / В.А. Несчисляев, **Т.В. Крылова\***, Л.П. Чистохина // Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. – 2012. – № 2–3. – С. М46–47.

8. Несчисляев В.А. Терапия инфекционных заболеваний: перспективный подход / В. А. Несчисляев, Л. П. Чистохина, **Т. В. Крылова\*** // Инфекция и иммунитет. – 2012. – Т. 2, № 1–2. – С. 304.

9. Несчисляев В.А. Оценка влияния пищевых ароматизаторов и консервантов на лакто- и бифидобактерии / В. А. Несчисляев, **Т. В. Крылова\***, Л. П. Чистохина // Инфекция и иммунитет. – 2012. – Т. 2, № 1–2.– С. 564.

10. **Состав и биологическая активность метаболитных комплексов из культуральной жидкости бифидобактерий / Т.В. Крылова\*, Л.П. Чистохина, В.А. Несчисляев, А.М. Николаева // Вестн. биотехнологии и физико-хим. биологии им. Ю. А. Овчинникова. – 2012. – Т. 8, № 2. – С. 27–30.**

11. **Крылова, Т. В.\*** К вопросу расширения номенклатуры метабиотиков на Российском фармацевтическом рынке // Вестник ПГФА. – 2012. – № 9. – С. 234–236.

12. К вопросу разработки биопрепаратов с пробиотическим и специфическим антибактериальным действием / Несчисляев В.А., Стукова Г.И., **Крылова Т.В.\***, Лыско К.А., Функнер Е.В. // Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. – 2013. – № 2. – С. М22.

13. Несчисляев, В.А. Исследование специфической активности комплексного метаболитного пробиотика / Несчисляев В.А., **Крылова Т.В.\***, Чистохина Л.П. // Биопрепараты. Профилактика. Диагностика. Лечение. – 2013. – № 2 (46). – С. 32–34.

14. **К вопросу специфической активности метаболитного пробиотика / Несчисляев В.А., Федорова Т.В. // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2014. - № 5(105). – С. 73а.**

15. **Метаболитные аутопробиотики / Несчисляев В.А., Столбова М.Г., Федорова Т.В., Орлова Е.В // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2015. – № 5(117). – С. 103.**

16. К вопросу разработки высокоэффективных метаболитных пробиотиков / Несчисляев В.А, Мокин П.А, Федорова Т.В. // Актуальные направления научных исследований: от теории к практике. - 2016. - № 2 - 1 (8). – С. 15 – 17.

\* - Т.В. Крылова – далее Т.В. Федорова

**Федорова Татьяна Викторовна (Россия)**

**Технологические аспекты разработки поликомпонентного пробиотика на основе метаболитов производственных штаммов лакто- и бифидобактерий.**

*Разработан состав и способ получения метаболитных пробиотиков с использованием ультрафильтратов культуральной жидкости лакто- и бифидобактерий. Определены оптимальные условия ультрафильтрации бактериальных взвесей. Изучено бактериотропное действие метаболитных комплексов. Предложен оптимальный метод определения пригодности вспомогательных веществ для использования в составе метабиотиков, основанный на применении реакции ингибирования биolumинесценции тест-штамма *E. coli lum+*. Разработанный поликомпонентный метабиотик «Хилабикс» обладает более выраженной ингибирующей активностью в отношении условно-патогенных микроорганизмов, чем препарат-аналог «Хилак-форте».*

**Tatiana Viktorovna Fedorova (Russia)**

**Technological aspects of polycomponent probiotic development on the basis of metabolites of lacto- and bifidobacteria master seed strains.**

*A composition and a method for producing of metabolic probiotics using ultrafiltrates of a culture broth of lacto- and bifidobacteria have been developed. The optimal conditions for ultrafiltration of bacterial suspensions have been determined. The bacteriotropic effect of metabolic complexes has been studied. An optimal method for determining the suitability of excipients for use in the composition of metabiotics is proposed and based on the reaction of bioluminescence inhibition of the *E. coli lum +* test strain. The inhibitory activity of the developed polycomponent metabiotic "Hilabiks" against opportunistic microorganisms is more pronounced than the one of its analog "Hilak-forte".*