

ОТЗЫВ

официального оппонента заведующего кафедрой фармацевтической технологии федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» Министерства образования и науки Российской Федерации доктора фармацевтических наук Жиликовой Елены Теодоровны по диссертации Федоровой Татьяны Викторовны на тему: «Технологические аспекты разработки поликомпонентного пробиотика на основе метаболитов производственных штаммов лакто- и бифидобактерий», представленной на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.01 – технология получения лекарств

Актуальность выполненного исследования

Роль физиологической работы желудочно-кишечного тракта является одним из факторов, поддерживающих здоровье организма. Важную роль в необходимых процессах ЖКТ играет сбалансированная микрофлора кишечника, характеризующаяся 95% полезных бактерий (из них 60% лактобактерий и бифидобактерий, остальные – непатогенные кишечные палочки, энтерококки), 5% – вредоносных (стафилококки, стрептококки, дрожжеподобные и плесневые грибы и другие). Однако, состав нормальной микрофлоры ЖКТ может существенно изменяться под воздействием многочисленных неблагоприятных факторов различной природы, включая антибиотикотерапию. Бесконтрольное массовое использование антибактериальных препаратов широкого спектра действия вызывает различные осложнения, в частности, развитие дисбиозов. При этом широко распространение штаммов патогенных микроорганизмов, устойчивых к антибиотикам, привело к резкому снижению эффективности терапии инфекционных заболеваний. В этой связи особую актуальность приобретают исследования в сфере разработки лекарственных средств, предназначенных для поддержания и восстановления симбиотических микробиоценозов, в том числе внедрение в медицинскую практику принципиально новых пробиотиков-метабиотиков, создаваемых на основе

микробных экзометаболитов. Именно этой тематике посвящена работа Федоровой Татьяны Викторовны - разработка состава и технологии комплексного пробиотика на основе метаболитов производственных штаммов лакто- и бифидобактерий, что является актуальным и своевременным.

Научная новизна, несомненно, в работе присутствует, и она в первую очередь заключается в том, что впервые разработан состав и технология нового поликомпонентного метаболитного пробиотика на основе метаболитов *Lactobacillus plantarum* 8P-A3, *Lactobacillus acidophilus* K₃Ш₂₄ и *Bifidobacterium bifidum* 1, обладающего доказанной высокой антагонистической активностью в отношении условно-патогенных бактерий. Выявлено выраженное бактериотропное действие метаболитных комплексов, характеризующееся наличием эффекта стимуляции роста и активности кислотообразования пробиотических бактерий и угнетающим влиянием на условно-патогенные микроорганизмы.

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

Теоретическая и практическая значимость полученных результатов работы заключается в расширении ассортимента отечественных лекарственных средств, предназначенных для коррекции дисбиотических состояний, и технологических новациях в сфере производства пробиотиков, что согласуется с реализацией федеральной целевой программы "Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу"

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.

Разработаны проекты нормативной документации (ТУ) на производство биологически активных добавок к пище «Микростим-лакто» и «Хилабикс» для ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России

Степень обоснованности и достоверности научных результатов, положений и выводов диссертации

Федорова Татьяна Викторовна использовала в своей работе современные технологические, физико-химические, микробиологические методы исследований. Исследования выполнены на достаточном научном уровне, что характеризует автора, как серьёзного и грамотного исследователя. Результаты исследований отвечают поставленным задачам, все положения, выдвинутые на защиту, научно обоснованы. Выводы и основные положения, сформулированные в диссертации, вытекают из экспериментальных результатов и представлены достаточно логично, они аргументированы и согласуются с поставленными задачами. Достоверность выводов подтверждена достаточным объемом представленного материала и аргументированным анализом полученных результатов, статистически обработанных.

Основные положения диссертации были доложены на 11 научно-практических конференциях всероссийского и международного уровней, кроме того, результаты исследований опубликованы им в 16 научных работах, из них 5 – в изданиях, рекомендуемых ВАК Минобрнауки России.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертационная работа соответствует паспорту специальности 14.04.01 – технология получения лекарств, а именно пункту 3 – разработка технологий получения субстанции и готовых лекарственных форм; пункту 4 – исследования по изучению особенностей технологии получения готовых лекарственных форм из различных видов субстанций, сырья и вспомогательных веществ.

Общая характеристика диссертационной работы

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, трех глав экспериментальных исследований, заключения, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы и приложений. Работа изложена на 128 страницах машинописного текста, иллюстрирована 28 таблицами и 30 рисунками (из них 22 в приложении). Список литературы, включает 145 источников, из них 114 отечественных и 31 иностранных авторов, приложения представлены на 15 с.

Диссертационная работа построена традиционно. Во введении представлена актуальность темы, приведены цель и задачи исследования, отмечена научная новизна и практическая значимость полученных результатов, а также изложены положения, выносимые на защиту.

Глава 1. «Обзор литературы»

Глава изложена на 16 страницах и содержит информацию о составе и функциях нормофлоры, характеристику лактобактерий и бифидобактерий. Представлен аналитический обзор пробиотических препаратов, которые зарегистрированы на фармацевтическом рынке Российской Федерации. Результаты анализа, свидетельствуют о преобладании на российском фармацевтическом рынке зарубежных пробиотических препаратов, включая бактериальные и бесклеточные, а также свидетельствуют о существенной роли их метаболитов в поддержании системы гомеостаза и нормальной жизнедеятельности макроорганизма. Кроме того, проведен краткий анализ технологических приемов производства препаратов этой группы. Исходя из вышесказанного, представляется перспективным направление, связанное с конструированием пробиотических препаратов на основе метаболитов пробиотических бактерий, что позволит расширить ассортиментный ряд отечественных лекарственных средств, восстанавливающих

нормофлору. Нельзя не отметить список использованной литературы – практически все источники изданы в период 2008-2017 годы, что подтверждает современность и актуальность выбора объекта, методов и приёмов исследования, только 7,5% библиографических ссылок относятся к более раннему периоду.

Глава 2. «Материалы и методы исследования» изложена на 11 страницах и приводит описание объектов исследования, использованных материалов, сред, оборудования, содержит необходимые ссылки на используемую НД и литературу методического характера. Глава выполнена в классической форме и позволяет оценить современность использованных методов исследования и их объемность.

Глава 3. «Выделение метаболитных комплексов из культуральных комплексов из культуральных жидкостей лакто- и бифидобактерий»

Исследована динамика накопления биомассы и получены бактериальные взвеси пробиотических штаммов *L. plantarum* 8P-A3, *L. acidophilus* К₃Ш₂₄ и *B. bifidum* 1 при реакторном культивировании на казеиново-дрожжевых питательных средах.

Проведенные исследования разделительных аппаратов показали, что волокна марок ВПУ-15ПА, ВПУ-100ПС, ВПУ-300ПС обладают достаточно высокой производительностью, а разделительные аппараты с волокнами ВПУ-5ПА значительно уступают им по данному показателю. Это очень важный этап исследования, так как именно правильно выбранное оборудование и материалы зачастую определяют оптимальные характеристики производственного процесса.

Исследованы физико-химические свойства ультрафильтратов (УФ) культуральных жидкостей (КЖ) производственных штаммов лакто- и бифидобактерий, установлено, что лактобактерии по сравнению с

бифидобактериями накапливают большее количество веществ кислотного характера (116 °Т и 29 °Т соответственно).

В ходе проводимых экспериментов изучено влияние УФ КЖ на рост и активность кислотообразования пробиотических штаммов. Кислотообразование является интегральным показателем, в том числе антагонистической активности пробиотических штаммов по отношению к УПМ (условно-патогенным микроорганизмам). Данное влияние обусловлено выработкой органических кислот в процессе жизнедеятельности пробиотических бактерий. В качестве питательной среды для исследования биологической активности

При исследовании биологических свойств УФ КЖ производственных штаммов лакто- и бифидобактерий, установлено, что все образцы стимулируют рост индигенной микрофлоры и её антагонистическую активность. Выявлено более выраженное пробиотическое действие фракций 15 кДа и 100 кДа по сравнению с фракцией 300 кДа. Экспериментальные данные обработаны статистически.

Глава 4. «Оптимизация состава и формы выпуска метаболитного монопрепарата «Микростим»

Четвертая глава является по объему небольшой, изложена на 12 страницах, но с точки зрения технологии – одной из основных. Основной задачей исследований, изложенной в 4 главе направлена на оптимизацию состава препарата «Микростим». Препарат получен на основе УФ КЖ *L. plantarum* 8P-A3, и содержит низкомолекулярные метаболиты лактобактерий (разработан в Пермском НПО «Биомед» в 2005 году). По своим потребительским характеристикам этот препарат имеет ряд недостатков, к которым следует отнести: не совсем удобную лекарственную форму (раствор во флаконах по 10 мл для наружного и внутреннего применения) и органолептические особенности (кисло-дрожжевой запах и сильносоленый вкус). В качестве корригентов вкуса и вспомогательных

веществ были использованы лимонная кислота, сахар-рафинад, сахароза, фруктоза, лактоза, ароматизатор «карамель», раствор молочной кислоты, сорбат калия. Несколько не понятно почему автор выбрал именно эти компоненты, сахар-рафинад и сахароза имеют приблизительно, одинаковой индекс сладости, фруктоза считается корригентом с более высоким корригирующим индексом сладости, а их количества одинаковы.

В результате проведенных физико-химических исследований было установлено, наиболее оптимальным составом является использование ароматизатора карамель (0,1 мл/л) и сорбата калия (3,6 мл/л). В результате исследования влияния выбранных экспресс-методом ингибирования биolumинесценции установлено, что раствор ароматизатора карамель (0,1 мл/л) и раствор сорбата калия (3,6 мл/л) оказывает угнетающее действие на свечение тест-штамма *E. coli lum+*.

Глава 5. «Разработка комплексного метабиотика «Хилабикс»

Это заключительная глава исследования, она достаточно объемная и изложена на 20 страницах. В результате предварительных исследований активности метаболитных фракций предложено два варианта композиции, включающей смесь экзометаболитов трех пробиотических штаммов и корректирующие органолептические свойства вспомогательные вещества, необходимые для стабильности препарата при хранении:

Хилабикс 15: УФ КЖ *L. plantarum* 8P-A3 (15 кДа) - 2 части УФ КЖ *L. acidophilus* К₃Ш₂₄ (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* К₃Ш₂₄ (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. Несколько не понятно, почему в обоих составах одинаковое количество вспомогательных веществ.

На основании проведенных физико-химических исследований разработан метаболитный пробиотик «Хилабикс 15» и «Хилабикс 100» обладающий выраженной пробиотической и доказанной антибактериальной активностью, позволяющий расширить ассортимент препаратов для коррекции дисбиотических нарушений отечественного производства, не уступающих по совокупности потребительских свойств зарубежным аналогам.

Разработанная технология метабиотиков является универсальной и может быть применена для получения препарата на основе активной экзометаболитной фракции любого производственного пробиотического штамма.

Замечания по содержанию и оформлению работы

Несмотря на общее благоприятное впечатление при прочтении работы возникли некоторые замечания и вопросы:

1. В разделе практическая значимость – хорошо бы привести акты внедрения в учебный процесс кафедры, указанной в работе (или озвучить их в докладе, указать на слайде).
2. В некоторых случаях название препаратов написано в кавычках «Хилак форте», в некоторых без – Хилак форте.
3. Заключение по литературному обзору С. 29– из вышеизложенного не следует, что ультрафильтрация является наиболее рациональным и щадящим методом выделения метаболитных комплексов, об этой операции только упоминание.
4. Ссылка на ГФ XII, вып. 1, (ОФС 42-0048-07), но существует ссылка на ГФ 13. ОФС.1.2.1.0004.15 Ионметрия; ОФС.1.2.4.0002.15 Микробиологическая чистота – ГФ- 13.
5. С.44. «и внесении рН корректирующих и углеводных добавок». Не совсем понятна фраза, может быть корректирующих. Термин корректирующих в фармацевтической технологии принято потреблять для исправления органолептических характеристик, чаще всего - вкуса.

6. С.64. Как определяли вкус, по какой методике (Тенцовой, определения индекса вкуса....?).

7. С.77. таблица 20 в таблице приведены не спектры, а диапазон рабочей длины волны при УФ- спектрофотометрировании.

8. С. 69,70,82,83 Технологические схемы представлены (а они обозначены в тексте как схемы) не в соответствии с ОСТ 64-02-003-2002. Продукция медицинской промышленности. Технологические регламенты производства. Содержание, порядок разработки, согласования и утверждения (по НД обозначений ТО – нет). Возможно, более корректным было бы их назвать «Алгоритм....» или «Последовательность технологических операций....»

9. В тексте встречаются некорректные обороты, опечатки, ошибки.

Высказанные вопросы и замечания не носят принципиального характера и не снижают ценности диссертационной работы.

Заключение

Таким образом, диссертационная работа Федоровой Татьяны Викторовны на тему: «Технологические аспекты разработки поликомпонентного пробиотика на основе метаболитов производственных штаммов лакто- и бифидобактерий», представленная на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.01 – технология получения лекарств, является завершенной научной квалификационной работой, в которой содержится решение важной научной задачи современной фармацевтической технологии по изучению и созданию пробиотических лекарственных средств, аналогичных препарату «Хилабикс», оптимизирован состав оригинального отечественного препарата «Микростим».

Диссертационная работа Федоровой Татьяны Викторовны соответствует требованиям п. 9 – 14 «Положения о порядке

присуждения ученых степеней», утвержденное постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 (в ред. постановления Правительства РФ от 21.04.2016 № 335), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор Федорова Татьяна Викторовна заслуживает присуждения ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.01–технология получения лекарств.

Официальный оппонент

Заведующий кафедрой фармацевтической технологии федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» Министерства образования и науки Российской Федерации, доктор фармацевтических наук, (15.00.01 – технология лекарств и организация фармацевтического дела), профессор

Жилякова Елена Теодоровна

308015, г. Белгород, ул.Победы, 85, тел.: +7(4722)301427, +79103663892
Сайт: <http://www.bsu.edu.ru/> Электронная почта: ezhilyakova@bsu.edu.ru

23 ноября 2017 года

