

На правах рукописи

Столбова Мария Георгиевна

**РАЗРАБОТКА ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ ПРОБИОТИКОВ
НА ОСНОВЕ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ КЛЕТОК**

14.04.01 – Технология получения лекарств

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Пермь – 2018

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:

Петров Александр Юрьевич – доктор фармацевтических наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, исполняющий обязанности заведующего кафедрой фармации и химии;

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-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Санкт-Петербург.

Защита диссертации состоится 26 декабря 2018 г. в 14.00 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 « ____ » _____ 2018 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат химических наук

Замараева Татьяна Михайловна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Негативное воздействие окружающей среды, несбалансированное питание, нерациональное применение антибактериальных препаратов, жизнь в условиях хронического стресса и многие другие факторы, сопровождающие современного человека в течение всей его жизни, приводят к серьезным нарушениям микробиоты, чаще всего в виде кишечного дисбиоза различной степени тяжести. Поддержание и восстановление микробиологического статуса, как одного из определяющих условий здоровья всего организма, является актуальной задачей здравоохранения [Ткаченко Е. И., 2014, Ардатская М. Д., 2015, Машарова А. А., 2018].

С целью нормализации микробиоценозов рекомендуется применять препараты, содержащие живые микроорганизмы и вещества микробного (пробиотики) или иного (пребиотики) происхождения, стимулирующие рост и активность облигатной микрофлоры [Захаренко С. М., 2017, Евсютина Ю. В., 2018, Раскина К. В., 2018].

Традиционный выпуск пробиотиков в виде сухой биомассы во флаконах не отвечает современным требованиям рынка лекарственных средств. Улучшение потребительских свойств связано с производством этих препаратов в виде капсул и дозированных порошков. Такие лекарственные формы приняты в настоящее время для многих зарубежных пробиотиков. К тому же, учитывая выраженную чувствительность клеток, особенно бифидобактерий, к действию желудочного сока и желчи, представляется актуальным использование технологических приемов, направленных на повышение их устойчивости при пероральном приеме [Несчисляев В. А., 2004, Феклисова Л. В., 2015, De Prisco A., 2016].

Конструирование препаратов с иммобилизованными на различных сорбентах пробиотическими бактериями можно рассматривать как один из способов повышения их резистентности к энтеральным средам [Несчисляев В. А., 1989, Бондаренко В. М., 2008, Корочинский А. В., 2010, Вахитов Т. Я., 2018]. Использование иммобилизации бактерий предполагает достижение технологического и терапевтического эффектов. Адсорбированные клетки, как правило, более устойчивы к воздействию неблагоприятных факторов. Они лучше сохраняют жизнеспособность при лиофилизации, в процессе технологических манипуляций с сухой биомассой, при хранении препарата. Иммобилизованные бактерии менее чувствительны к воздействию желудочного сока и желчи. Кроме того, биологическая активность сорбента позволяет дополнить спектр терапевтического действия пробиотика [Бурмистров В. А., 2007, Белова И. В., 2014].

К настоящему времени на российском фармацевтическом рынке представлены сорбированные на косточковом активированном угле препараты «Бифидумбактерин форте» и «Пробифор» (иммобилизованные бифидобактерии), «Флорин форте» (иммобилизованные бифидо- и лактобактерии), которые широко применяются в лечебной практике. Использование иммобилизованных пробиотиков способствует наступлению быстрого клинического эффекта и более раннему восстановлению нарушенного микробиоценоза [Феклисова Л. В., 2005, Шишов Г. В., 2008, Феклисова Л. В., 2010]. Фармацевтический рынок России постоянно пополняется новыми энтеросорбентами, которые могут быть использованы в разработке иммобилизованных пробиотиков [Широбоков В. П., 2013, Бородин Ю. И., 2014, Филиппова В. А., 2016].

Вышеуказанное свидетельствует о целесообразности и актуальности поиска и применения новых перспективных сорбентов в технологии различных лекарственных форм пробиотических препаратов.

Степень разработанности темы диссертации. Исследования В. А. Несчисляева [1989, 2005] в сфере изучения свойств и разработки технологии адсорбированных

пробиотиков в значительной мере способствовали развитию направления по созданию препаратов на основе иммобилизованных клеток.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы является разработка состава и технологии лекарственных форм пробиотиков на основе иммобилизованных бифидо- и лактобактерий с использованием органических сорбентов природного происхождения.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Отработать оптимальные технологические приемы иммобилизации пробиотических клеток и провести сравнительное изучение протективных свойств сорбентов: гомогенат бурых водорослей (фукус, ламинария), альгинат натрия, клетчатка, отруби пшеничные ферментированные, лигнин гидролизный (полифепан), семена льна, крахмал прежелатинизированный, микрокристаллическая целлюлоза (МКЦ).

2. Определить влияние сорбентов на эффективность сублимационного высушивания иммобилизованной биомассы клеток и исследовать биологические и технологические свойства лиофилизатов бифидо- и лактобактерий – основного компонента лекарственных форм (лиофилизат во флаконе, капсулы) пробиотиков.

3. Модифицировать технологические свойства лиофилизатов иммобилизованной биомассы клеток для получения капсулированной лекарственной формы пробиотиков.

4. Разработать состав и технологию капсулированного пробиотика на основе иммобилизованных бифидобактерий, изучить его качественные характеристики и сохраняемость, подготовить нормативную документацию (НД).

Научная новизна. Впервые апробирован и реализован комплексный подход к созданию пробиотиков на основе иммобилизованных клеток, включающий совокупность микробиологических и технологических приемов конструирования, изготовления и стандартизации капсулированного препарата.

Изучено влияние группы органических сорбентов природного происхождения, ранее не применявшихся в производстве пробиотических препаратов, на биологические и технологические свойства клеточной биомассы.

В сравнительных исследованиях выявлен выраженный протективный эффект сорбентов на основе бурых водорослей (ламинария, фукус), характеризующийся повышенной защитой клеток от бактерицидного воздействия пищеварительных соков и, соответственно, более высоким уровнем выживаемости иммобилизованных бифидо- и лактобактерий при прохождении желудочно-кишечного тракта (ЖКТ).

Предложен вариант адаптации технологических свойств лиофилизированной биомассы иммобилизованных бифидобактерий для получения капсулированной формы пробиотика.

Практическая значимость работы заключается в расширении арсенала пробиотических препаратов, предназначенных для коррекции дисбиозов, и технологических новациях в сфере производства пробиотиков. Изучено влияние различных сорбентов на специфическую активность, устойчивость к действию биологических жидкостей и физические свойства (гигроскопичность, сыпучесть, насыпная плотность) лиофилизированной биомассы бифидо- и лактобактерий – основного компонента лекарственных форм (сухая биомасса во флаконе, капсулы) пробиотиков.

Определены вспомогательные вещества для лиофилизата бифидобактерий, позволяющие получать однородный порошок с удовлетворительными показателями сыпучести, гигроскопичности и насыпной плотности для дозирования в капсулы.

Разработан состав и способ получения капсулированного пробиотического препарата «Имбикапс» на основе бифидобактерий, иммобилизованных на гомогенате бурых водорослей. Определены необходимые параметры специфической активности

разработанного пробиотика и предложены методы их контроля. Подготовлен и утвержден пакет НД на производство данного препарата, получено свидетельство о государственной регистрации.

Материалы диссертации могут служить методической основой в сфере разработок иммобилизованных пробиотиков. Представленная технология получения сухой биомассы на основе иммобилизованных клеток может быть применена для любого производственного пробиотического штамма бифидо- и лактобактерий с последующим конструированием лекарственной формы препарата на ее основе.

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.

Методология и методы исследования. Методологическая основа исследования связана с известными трудами отечественных ученых в сфере создания высокоэффективных пробиотиков и оригинальных технологических решений для изготовления их лекарственных форм. В настоящем диссертационном исследовании были использованы физико-химические, микробиологические, технологические, аналитические и статистические методы.

Положения, выносимые на защиту:

1. Способ получения иммобилизованных бифидо- и лактобактерий для создания пробиотических препаратов.

2. Характеристика протективных свойств сорбентов в отношении производственных штаммов бифидо- и лактобактерий в моделируемых условиях ЖКТ и при лиофилизации.

3. Получение лиофилизатов иммобилизованных бифидо- и лактобактерий с технологическими и биологическими свойствами, пригодными для организации производственного выпуска капсулированной лекарственной формы пробиотиков.

4. Состав, технология и биологические свойства капсулированного пробиотика «Имбикапс» на основе иммобилизованных бифидобактерий.

Степень достоверности и апробация результатов работы. Научные положения и заключение, сформулированные в диссертации, базируются на большом объеме проведенных экспериментальных исследований, выполненных с использованием современных методов анализа и последующей статистической обработкой результатов исследования.

Основные результаты работы доложены на Всероссийской научно-практической конференции «Вакцинология 2010. Совершенствование иммунобиологических средств профилактики, диагностики и лечения инфекционных болезней» (Москва, ноябрь 2010); 13 Международном Славяно-Балтийском научном форуме «Санкт-Петербург – Гастро-2011» (Санкт-Петербург, май 2011); XIII региональная научно-практическая конференция студентов и молодых ученых (Пермь, апрель 2011); межвузовской научной конференции студентов и молодых ученых «Современные проблемы фармацевтической науки», посвященной 75-летию ПГФА (Пермь, апрель 2012); 17-м Международном Славяно-Балтийском научном форуме «Санкт-Петербург – Гастро-2015» (Санкт-Петербург, май 2015), Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 120-летию филиала АО «НПО «Микроген» в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед» (Пермь, июнь 2018).

Публикации. По материалам исследования опубликовано 11 работ (из них 2 в изданиях, рекомендованных ВАК РФ).

Диссертационная работа выполнена в соответствии с тематическим планом научно-исследовательских работ ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Минздрава России (№ 01.9.50007417).

Личный вклад автора. Данные, приведенные в диссертации, получены при непосредственном участии автора на всех этапах планирования и проведения экспериментальных исследований на базе ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Минздрава России и в филиале АО «НПО «Микроген» в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед».

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Исследования, представленные в диссертации, соответствуют формуле специальности 14.04.01 – технология получения лекарств, пункту 3 – Разработка технологий получения субстанции и готовых лекарственных форм, и пункту 4 – Исследования по изучению особенностей технологии получения готовых лекарственных форм из различных видов субстанций, сырья и вспомогательных веществ.

Объем и структура диссертации. Работа изложена на 150 страницах машинописного текста, содержит 27 таблиц и 8 рисунков. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, 3 глав экспериментальных исследований, заключения, списка литературы, включающего 255 источников, из них 189 отечественных и 66 иностранных авторов, приложений на 6 с.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении изложены актуальность, цели и задачи исследования, научная новизна и практическая значимость работы.

В первой главе обобщены данные отечественной и зарубежной литературы о значении и функциях микробиоты человека, роли бифидо- и лактобактерий. Изложены сведения о пробиотиках. Освещены технологические аспекты процесса иммобилизации клеток как метода повышения стабильности пробиотических препаратов. Рассмотрен ассортимент пробиотических препаратов на основе иммобилизованных бифидо- и лактобактерий, представленных на Российском фармацевтическом рынке. Обоснована актуальность разработки препаратов и технологий для расширения арсенала пробиотиков.

Вторая глава включает описание объектов и методов исследования. В ней представлены характеристики производственных штаммов *Lactobacillus plantarum* 8P-A3, *Bifidobacterium bifidum* 1, перечислены питательные и защитные среды, применяемые для получения и контроля бактериальных культур, сорбенты и вспомогательные вещества, использованные в экспериментальных исследованиях. Представлены физико-химические, технологические, микробиологические и статистические методы исследования.

Третья глава посвящена исследованию процесса иммобилизации клеток пробиотических штаммов. В данной главе представлены материалы по апробации ряда органических сорбентов природного происхождения, потенциально приемлемых для иммобилизации пробиотических бактерий. Изучены их технологические свойства, подобрано оптимальное соотношение бактериальной взвеси и сорбента, исследован протективный эффект иммобилизации клеток при воздействии кислого раствора пепсина, а также при лиофильном высушивании.

Ключевым этапом в разработке препаратов на основе иммобилизованных клеток является подбор адекватного носителя. От его свойств зависит эффективность защиты микроорганизмов от негативного воздействия биологических жидкостей, а также способность к высвобождению в нижних отделах ЖКТ.

С целью изучения влияния иммобилизации на сохраняемость и свойства бифидо- и лактобактерий были использованы следующие носители – гомогенат бурых водорослей (фукус, ламинария), альгинат натрия, клетчатка, отруби пшеничные ферментированные, лигнин гидролизный (полифепан), семена льна, крахмал прежелатинизированный, МКЦ.

Для обеспечения наиболее полного связывания клеток рабочее разведение сорбента в асептических условиях смешивали с бактериальной взвесью при постоянном перемешивании в течение 30 мин. После этого культуру иммобилизованных клеток выдерживали в течение 5 сут при температуре (5 ± 3) °С и визуально оценивали полноту иммобилизации по характеру расслоения исследуемой взвеси с последующим определением количества живых бактерий в надосадочной жидкости. Наличие плотного осадка и прозрачной надосадочной жидкости свидетельствует о том, что большая часть бактерий находится в адсорбированном состоянии. Бактериальные взвеси бифидо- и лактобактерий без носителей при такой экспозиции не дают выраженную зону просветления и не образуют оформленного осадка из-за более низкой скорости седиментации.

Полученные результаты апробации свидетельствуют о высокой эффективности всех использованных сорбентов – полнота иммобилизации составила более 90 % (табл. 1, 2).

Таблица 1 – Иммобилизация бифидобактерий

№ варианта	Сорбент	Концентрация сорбента в рабочем разведении	КОЕ/мл		Полнота иммобилизации, %
			взвесь иммобилизованных клеток <i>B. bifidum</i> 1	надосадочная жидкость	
1	Ламинария лиофилизированная	2 %	$2,35 \times 10^8$	$0,03 \times 10^8$	> 98
2	Ламинарии слоевища измельченные	5 %	$1,93 \times 10^8$	$0,02 \times 10^8$	> 98
3	Фукус лиофилизированный	2 %	$2,35 \times 10^8$	$0,03 \times 10^8$	> 98
4	Фукуса слоевища измельченные	5 %	$2,25 \times 10^8$	$0,03 \times 10^8$	> 98
5	Альгинат натрия	1 %	$2,03 \times 10^8$	$0,15 \times 10^8$	> 90
6	Отруби ферментированные	5 %	$2,43 \times 10^8$	$0,09 \times 10^8$	> 95
7	Клетчатка	5 %	$2,43 \times 10^8$	$0,03 \times 10^8$	> 98
8	Семена льна	4 %	$2,58 \times 10^8$	$0,12 \times 10^8$	> 95
9	Лигнин гидролизный (полифепан)	10 %	$2,10 \times 10^8$	$0,07 \times 10^8$	> 95
10	Крахмал прежелатинизированный	4 %	$2,28 \times 10^8$	$0,16 \times 10^8$	> 90
11	Бакт. взвесь без сорбента (контроль)	–	$2,85 \times 10^8$	$1,80 \times 10^8$	–

Таблица 2 – Иммобилизация лактобактерий

№ варианта	Сорбент	Концентрация сорбента в рабочем разведении	КОЕ/мл		Полнота иммобилизации, %
			взвесь иммобилизованных клеток <i>L. plantarum</i> 8P-A3	надосадочная жидкость	
1	Ламинария лиофилизированная	2,5 %	$5,60 \times 10^9$	$1,75 \times 10^8$	> 95
2	Ламинарии слоевища измельченные	5 %	$4,30 \times 10^9$	$0,93 \times 10^8$	> 95
3	Фукус лиофилизированный	5 %	$5,35 \times 10^9$	$1,05 \times 10^8$	> 98
4	Альгинат натрия	2,5 %	$4,25 \times 10^9$	$2,00 \times 10^8$	> 95
5	Отруби ферментированные	5 %	$5,03 \times 10^9$	$0,95 \times 10^8$	> 98
6	Лигнин гидролизный (полифепан)	10 %	$5,40 \times 10^9$	$0,65 \times 10^8$	> 98
7	МКЦ	15 %	$4,45 \times 10^9$	$1,00 \times 10^8$	> 95
8	Бакт. взвесь без сорбента (контроль)	–	$5,80 \times 10^9$	$1,90 \times 10^9$	–

Анализ результатов контроля полноты сорбции показал, что для бифидобактерий наиболее эффективными являются носители на основе бурых водорослей и клетчатки, для лактобактерий – фукус лиофилизированный, отруби ферментированные и лигнин гидролизный (полифепан).

Следующим этапом исследований было изучение устойчивости иммобилизованных бифидо- и лактобактерий к действию кислого раствора пепсина. Для этого взвесь

адсорбированных клеток инкубировали при (37 ± 1) °С в кислом растворе пепсина в течение 30 мин. Для сравнения использовали нативную взвесь бифидо- и лактобактерий.

Количество жизнеспособных клеток бифидо- и лактобактерий в образцах перед началом испытания составляло не менее 10^8 КОЕ/мл и 10^9 КОЕ/мл соответственно. После инкубации в кислом растворе пепсина отмечено снижение выживаемости клеток в разной степени во всех экспериментальных образцах. В культурах бифидобактерий, содержащих в качестве сорбента альгинат натрия, отруби ферментированные, и в контроле отмечено снижение показателя КОЕ/мл на 5–6 порядков. Данные сорбенты не оказывают выраженного защитного эффекта в создаваемых неблагоприятных условиях в отношении бифидобактерий. Наибольшую устойчивость показали образцы, содержащие носители на основе ламинарии и фукуса, в меньшей степени защитный эффект оказали сорбенты на основе клетчатки, семян льна, лигнина гидролизного и крахмала прежелатинизированного (рис. 1).

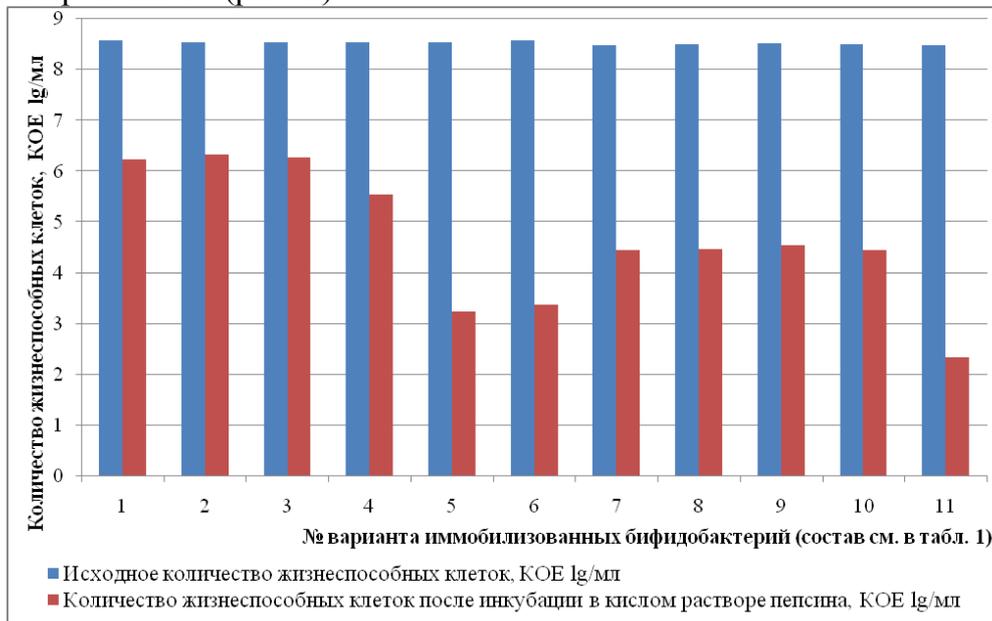


Рисунок 1 – Чувствительность бифидобактерий к действию кислого раствора пепсина

В образцах лактобактерий с сорбентами на основе бурых водорослей также отмечено максимальное сохранение жизнеспособных клеток. Несколько уступают защитные свойства альгината натрия, лигнина гидролизного (полифелана), отрубей ферментированных (рис. 2).

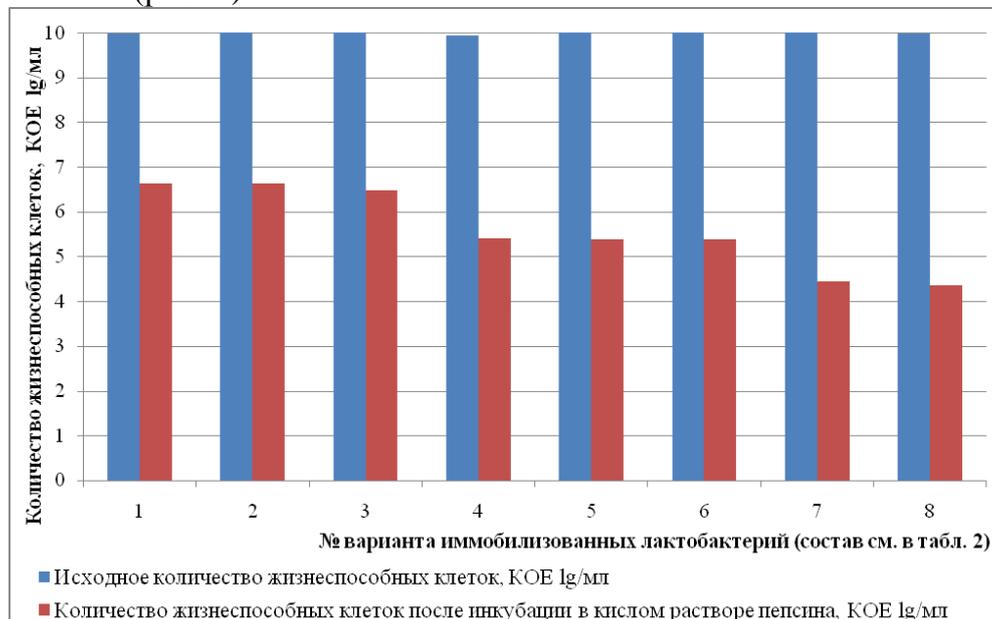


Рисунок 2 – Чувствительность лактобактерий к действию кислого раствора пепсина

Таким образом, предварительные исследования защитных свойств сорбентов показали, что выраженный протективный эффект на модели бифидо- и лактобактерий обеспечивают сорбенты на основе гомогената бурых водорослей. Данные сорбенты, а также, но в меньшей степени, клетчатка, лигнин гидролизный (полифепан), семена льна и крахмал были признаны перспективными для дальнейшей разработки пробиотических препаратов на основе иммобилизованных клеток.

Для изучения влияния иммобилизации на устойчивость к лиофилизации и стабильность лиофилизированных культур были использованы образцы бифидо- и лактобактерий с гомогенатом водорослей. Взвесь иммобилизованных клеток разливали во флаконы ФИ-5 по $(2,0 \pm 0,1)$ мл в двух вариантах – с добавлением защитной сахарозо-желатино-молочной (СЖМ) среды в количестве 25–30 % и без нее для изучения протективных и структурообразующих свойств носителей. В качестве контроля выступала нативная бактериальная взвесь бифидо- и лактобактерий. Для замораживания и высушивания был применен режим, используемый в производстве бифидум- и лактобактерина.

Анализ лиофилизированной биомассы бифидо- и лактобактерий во флаконах в составах № 1–5 показал, что сублимация позволяет получать сухой препарат, который по своим физическим свойствам (внешний вид, структура, время восстановления) не отличается от аналогичных параметров коммерческого бифидум- и лактобактерина. Исключение составил вариант № 6 (неиммобилизованные клетки без добавления среды СЖМ) – форма и структура биомассы во флаконе («таблетки») были неудовлетворительными.

Результаты периодического контроля иммобилизованных бифидобактерий (лиофилизат во флаконе) представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Лيوфилизированная биомасса бифидобактерий во флаконе

№ состава	Сорбент	Защитная среда	рН				КОЕ/мл, $\times 10^7$				Активность кислотообразования, °Т			
			исх.	6 мес.	12 мес.	18 мес.	исх.	6 мес.	12 мес.	18 мес.	исх.	6 мес.	12 мес.	18 мес.
1	Фукус	СЖМ	6,16	6,19	6,21	6,13	6,25 $\pm 1,49$	3,40 $\pm 0,31$	3,00 $\pm 0,58^*$	2,33 $\pm 0,33^*$	120,6	122,0	121,0	120,0
2		·	6,22	6,20	6,32	6,40	6,00 $\pm 0,58^{\#}$	2,12 $\pm 0,39^{*\#}$	2,75 $\pm 0,63^*$	0,80 $\pm 0,17^{*\#}$	132,0	121,0	123,0	122,0
3	Ламинария	СЖМ	6,31	6,32	6,19	6,07	6,50 $\pm 1,41$	5,67 $\pm 1,45$	3,63 $\pm 0,85$	2,83 $\pm 0,73^*$	130,0	126,0	124,0	121,0
4		·	6,25	6,15	6,14	6,15	5,20 $\pm 0,58^{\#}$	3,33 $\pm 0,67^*$	2,30 $\pm 0,24^*$	1,15 $\pm 0,35^{*\#}$	136,1	118,0	120,0	120,0
5	Контроль (бакт. взвесь)	СЖМ	6,29	6,30	6,24	6,20	7,86 $\pm 0,51$	5,25 $\pm 1,31$	3,65 $\pm 1,48^*$	2,75 $\pm 0,63^*$	141,2	138,0	126,0	125,0
6		·	6,24	6,09	6,00	5,87	7,25 $\pm 1,31$	4,00 $\pm 0,41^*$	1,28 $\pm 0,19^{*\#}$	0,60 $\pm 0,15^{*\#}$	139,2	126,0	126,0	115,0

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с исходным значением; # – $p < 0,05$ по сравнению с контролем со средой СЖМ

Во всех образцах уровень активности кислотообразования составлял не ниже 90 °Т, значение рН сохранялось в допустимых пределах (5,5–6,5), количество жизнеспособных бифидобактерий составляло не менее 10^7 КОЕ/мл, за исключением образцов № 2 и № 6 (составы без добавления СЖМ среды). В образцах без защитной среды показатель КОЕ/мл был достоверно ниже по сравнению с контролем. Уже после 6 мес хранения отмечается достоверное снижение выживаемости по сравнению с исходным значением в образцах иммобилизованных бифидобактерий без СЖМ среды (№ 2, 4, 6), после 12 мес –

в образцах состава № 1 (иммобилизованные клетки на фукусе) и № 5 (неиммобилизованные клетки), после 18 мес – в составе № 3 (иммобилизованные клетки на ламинарии). Таким образом, сорбент на основе ламинарии обеспечивает более длительную стабильность показателя выживаемости по сравнению с контрольным составом.

В составах лактобактерий № 4, 6 (без СЖМ среды) после 6 мес наблюдения отмечено достоверное снижение показателя КОЕ/мл по сравнению с исходным значением, после 12 мес – в образцах составов № 3, 5 (иммобилизованные клетки на ламинарии и контроль со средой СЖМ). После 18 мес хранения отмечена стабильность показателя КОЕ/мл лактобактерий, иммобилизованных на фукусе (состав № 1, 2). Во всех образцах активность кислотообразования сохранялась на уровне не ниже 200 °Т, значение рН было в допустимых пределах (4,5–6,0) (табл. 4).

Таблица 4 – Лиофилизированная биомасса лактобактерий во флаконе

№ состава	Сорбент	Защитная среда	рН				КОЕ/мл, ×10 ⁹				Активность кислотообразования, °Т			
			исх.	6 мес.	12 мес.	18 мес.	исх.	6 мес.	12 мес.	18 мес.	исх.	6 мес.	12 мес.	18 мес.
1	Фукус	СЖМ	5,58	5,36	5,42	5,07	1,22 ±0,30	1,13 ±0,47	0,92 ±0,22	0,75 ±0,09	284,0	274,0	258,1	252,5
2		·	5,32	5,25	5,34	5,20	0,33 ±0,03 [#]	0,25 ±0,03 [#]	0,23 ±0,12 [#]	0,25 ±0,05 [#]	263,0	260,0	244,9	239,4
3	Ламинария	СЖМ	5,66	5,47	5,56	5,24	1,32 ±0,17	1,18 ±0,13	0,90 ±0,06 ^{*#}	0,62 ±0,25 [*]	284,0	270,0	251,0	247,5
4		·	5,29	5,00	5,12	4,90	0,26 ±0,02 [#]	0,09 ±0,06 ^{*#}	0,06 ±0,01 ^{*#}	0,06 ±0,01 ^{*#}	265,0	254,0	252,0	242,4
5	Контроль (бакт. взвесь)	СЖМ	5,48	5,46	5,49	5,47	1,73 ±0,17	1,83 ±0,60	1,08 ±0,05 [*]	0,93 ±0,05 [*]	295,0	284,0	251,0	246,5
6		·	4,94	4,80	4,76	4,69	0,95 ±0,05 [#]	0,12 ±0,04 ^{*#}	0,08 ±0,02 ^{*#}	0,05 ±0,01 ^{*#}	264,0	245,0	251,1	247,5

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с исходным значением; # – $p < 0,05$ по сравнению с контролем со средой СЖМ

Несмотря на то, что физические свойства «таблетки» образцов иммобилизованных бифидо- и лактобактерий, лиофилизированных без добавления защитной СЖМ среды, не отличались от контроля со средой СЖМ, показатели выживаемости клеток были достоверно ниже, чем в контрольных образцах с неиммобилизованными клетками с добавлением данной защитной среды (табл. 3, 4). Таким образом, сорбенты на основе бурых водорослей обладают структурообразующими свойствами и не оказывают негативного влияния на физические свойства лиофилизированной биомассы во флаконе, однако, без добавления защитной СЖМ среды гомогенат бурых водорослей не обеспечивает необходимого сохранения жизнеспособности клеток в процессе лиофилизации и хранения препарата.

С целью изучения протективных и структурообразующих свойств коллагенового белка были получены экспериментальные образцы лактобактерий, иммобилизованных на коротковолокнистом коллагене, в форме лиофилизата во флаконе. Для получения образцов использовали гель концентрации 1 % и 5 %. Установлено, что на формирование структуры сухой биомассы во флаконе прямое влияние оказывает концентрация и количество коллагена в составе рабочего разведения носителя. Лучшей признана концентрация коллагена 1 %, а соотношение с бактериальной взвесью – 1:1. Однако, этот вариант значительно уступает качеству образцов препарата, полученного с использованием сорбента на основе бурых водорослей.

По совокупности результатов исследований биологических и технологических свойств носителей можно сделать вывод, что апробированные сорбенты обеспечивают высокий процент иммобилизации клеток, но при этом они в различной степени оказывают защитный эффект в отношении бифидо- и лактобактерий в присутствии желудочного сока, а также структурирующий эффект при лиофилизации бактериальных культур во флаконах. Полученные данные позволяют рассматривать сорбенты на основе бурых водорослей как наиболее перспективные для иммобилизации пробиотических клеток и для разработки лекарственных форм пробиотических препаратов на их основе.

В четвертой главе представлены результаты исследования физико-химических, биологических и технологических свойств образцов лиофилизированной биомассы иммобилизованных бифидо- и лактобактерий, стабильности ее параметров в процессе хранения. Данная биомасса предназначена для получения капсулированной лекарственной формы пробиотиков.

Для лиофилизации иммобилизованной бактериальной взвеси использовали защитную СЖМ среду. Бактериальную суспензию разливали в металлические кассеты по (0,55±0,05) л, подвергали лиофильному высушиванию, извлекали из кассет, закладывали на хранение и ежеквартально контролировали основные физико-химические и биологические параметры полученных составов.

Результаты контроля образцов сухой биомассы иммобилизованных бифидобактерий представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Параметры сухой биомассы бифидобактерий в процессе хранения

№ состава биомассы	Сорбент	рН				КОЕ/0,2 гр, ×10 ⁸				Активность кислотообразования, °Т			
		исх.	6 мес	12 мес	18 мес	исх.	6 мес	12 мес	18 мес	исх.	6 мес	12 мес	18 мес
1	Ламинария лиофилизированная	6,31	6,18	6,13	6,04	2,43 ±0,23	2,38 ±0,53	1,94 ±0,09	1,40 ±0,20*	139,0	115,5	115,0	113,0
2	Ламинарии слоевища измельченные	6,32	6,26	6,22	6,12	2,60 ±0,35	2,03 ±0,08	1,92 ±0,05	1,04 ±0,09*	149,5	120,0	122,0	120,0
3	Фукус лиофилизированный	6,31	6,20	6,19	6,15	2,50 ±0,21	2,26 ±0,20	2,02 ±0,14	1,26 ±0,19*	147,6	116,5	112,0	110,0
4	Фукуса слоевища измельченные	6,27	6,17	6,13	6,0	2,35 ±0,53	1,88 ±0,45	1,62 ±0,17	1,12 ±0,18*	144,8	114,6	115,0	113,0
5	Альгинат натрия	6,23	6,25	6,24	6,10	2,53 ±0,28	2,43 ±0,23	1,45 ±0,17*	0,88 ±0,14*#	132,4	117,1	109,0	110,0
6	Отруби пшеничные ферментированные	6,31	6,20	6,19	6,14	2,15 ±0,17	1,40 ±0,16*#	1,17 ±0,19*#	1,00 ±0,06*#	138,1	100,9	112,0	108,0
7	Клетчатка	6,32	6,25	6,24	6,10	2,28 ±0,19	1,98 ±0,10	1,45 ±0,17*	1,00 ±0,14*	139,0	111,6	110,0	105,0
8	Семена льна	6,25	6,22	6,23	6,05	2,48 ±0,21	1,76 ±0,17*#	1,08 ±0,11*#	0,86 ±0,07*#	138,1	112,7	118,0	114,0
9	Лигнин гидролизный (полифепан)	6,11	5,99	5,99	5,80	2,48 ±0,21	2,08 ±0,05	1,65 ±0,16*	1,02 ±0,07*	140,0	115,1	120,0	115,0
10	Крахмал прежелатинизированный	6,16	6,19	6,15	6,10	2,25 ±0,19	1,55 ±0,22*#	1,25 ±0,07*#	0,93 ±0,11*#	137,1	104,8	115,0	114,0
11	Контроль	6,10	6,08	6,01	6,00	2,83 ±0,51	2,78 ±0,48	1,77 ±0,11*	1,42 ±0,19*	143,4	142,1	142,0	124,0

Примечание: * – p<0,05 по сравнению с исходным значением; # – p<0,05 по сравнению с контролем

В течение 18 мес активность кислотообразования бифидобактерий сохранялась на уровне, превышающем 90 °Т, значение рН определялось в допустимых пределах (5,5–

6,5). Однако, апробированные сорбенты в разной степени оказывают влияние на выживаемость клеток. Количество жизнеспособных бифидобактерий в составах с сорбентом на основе бурых водорослей, отрубей, клетчатки, лигнина гидролизного и в контрольном варианте составляло не менее 10^8 КОЕ/0,2 г биомассы после 18 мес. В составах биомассы, в которых в качестве сорбента применяли отруби пшеничные ферментированные, семена льна и крахмал, отмечено статистически значимое снижение показателя выживаемости после 6 мес хранения. После 12 мес хранения статистически значимое снижение показателя КОЕ отмечено в составах с альгинатом натрия, клетчаткой, лигнином гидролизным и в контроле. Стоит отметить, что в составах, содержащих в качестве сорбента бурые водоросли, показатель выживаемости статистически значимо снижается по сравнению с исходным значением после 18 мес хранения биомассы, тогда как в контрольном составе показатель КОЕ достоверно снижается после 12 мес хранения. Таким образом, сорбент на основе бурых водорослей обеспечивает более длительную стабильность показателя выживаемости бифидобактерий.

На модели сухой биомассы лактобактерий апробированы следующие носители: гомогенат бурых водорослей (фукус, ламинария), альгинат натрия, отруби пшеничные ферментированные, лигнин гидролизный (полифепан), МКЦ. Анализ результатов периодического контроля физико-химических и биологических показателей сухой биомассы показал, что в течение 18 мес хранения во всех образцах количество жизнеспособных лактобактерий составляло не менее 10^9 КОЕ/0,2 г биомассы, показатель кислотообразования был не ниже 200 °Т, а значение рН находилось в допустимых пределах (4,5–6,0) (табл. 6).

Таблица 6 – Параметры сухой биомассы лактобактерий в процессе хранения

№ состава биомассы	Сорбент	рН				КОЕ/0,2 гр, $\times 10^9$				Активность кислотообразования, °Т			
		исх.	6 мес.	12 мес.	18 мес.	исх.	6 мес.	12 мес.	18 мес.	исх.	6 мес.	12 мес.	18 мес.
1	Ламинария лиофилизированная	5,52	5,35	5,31	5,20	3,23 $\pm 0,89$	2,68 $\pm 0,26$	2,12 $\pm 0,08$	1,82 $\pm 0,14^*$	241,2	240,0	240,0	224,0
2	Ламинарии слоевища измельченные	5,43	5,31	5,40	5,32	3,95 $\pm 0,85$	3,18 $\pm 0,09$	2,25 $\pm 0,12$	1,70 $\pm 0,16^*$	241,2	240,0	238,0	230,0
3	Фукус лиофилизированный	5,44	5,31	5,30	5,27	3,67 $\pm 0,38$	2,77 $\pm 0,25$	2,75 $\pm 0,31$	1,89 $\pm 0,12^*$	243,3	242,0	238,0	234,0
4	Альгинат натрия	5,40	5,30	5,24	5,20	4,12 $\pm 0,38$	2,53 $\pm 0,26^{*#}$	1,93 $\pm 0,08^{*#}$	1,28 $\pm 0,18^{*#}$	247,4	243,0	240,0	235,0
5	Отруби пшеничные ферментированные	5,45	5,40	5,40	5,24	3,43 $\pm 0,15$	2,95 $\pm 0,19$	2,20 $\pm 0,08^*$	1,67 $\pm 0,11^*$	245,3	240,0	236,0	234,0
6	Лигнин гидролизный (полифепан)	5,44	5,35	5,32	5,30	3,58 $\pm 0,37$	2,76 $\pm 0,20$	2,63 $\pm 0,35$	1,87 $\pm 0,08^*$	243,3	242,0	240,0	230,0
7	МКЦ	5,51	5,36	5,31	5,30	3,17 $\pm 0,41$	2,52 $\pm 0,14^{\#}$	1,43 $\pm 0,18^{*#}$	1,31 $\pm 0,13^{*#}$	247,4	245,0	238,0	234,0
8	Контроль	5,52	5,32	5,30	5,21	3,83 $\pm 0,31$	3,10 $\pm 0,23$	2,18 $\pm 0,28^*$	1,77 $\pm 0,15^*$	247,4	243,0	238,0	235,0

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с исходным значением; # – $p < 0,05$ по сравнению с контролем

В составе биомассы лактобактерий с сорбентом на основе альгината натрия отмечено статистически значимое снижение показателя выживаемости клеток после 6 мес хранения. В составах биомассы, содержащих отруби пшеничные ферментированные, МКЦ и в контроле отмечено статистически значимое снижение показателя выживаемости после 12 мес хранения. Сорбенты на основе гомогената бурых

водорослей и лигнина гидролизного обеспечивают стабильность показателя выживаемости лактобактерий в течение 18 мес хранения биомассы.

Следующим этапом исследований было изучение выживаемости клеток *in vitro* в условиях, имитирующих процесс пищеварения в желудке и кишечнике человека. В качестве модельных сред использовали кислый раствор пепсина (рН 1,8±0,2), щелочной раствор панкреатина (рН 8,2±0,2) и желчь медицинскую консервированную (рН 7,2).

Установлено, что количество жизнеспособных бифидобактерий в регидратированных образцах иммобилизованной биомассы и в контрольном образце до контакта с модельными средами составляло не менее 10^8 КОЕ/мл. После инкубации в кислом растворе пепсина максимальное сохранение жизнеспособных клеток обеспечивали сорбенты на основе ламинарии и фукуса – показатель выживаемости снизился на 3 порядка по сравнению с исходным уровнем. Менее выражены протективные свойства клетчатки, семян льна, лигнина гидролизного и крахмала прежелатинизированного – после действия кислого раствора пепсина количество жизнеспособных бифидобактерий в этих образцах сохраняется на уровне 10^4 КОЕ/мл. Значительное изменение выживаемости наблюдалось в биомассе иммобилизованных бифидобактерий с альгинатом натрия, отрубями ферментированными и в контрольном составе – показатель КОЕ снизился на 5 порядков и более (рис. 3).

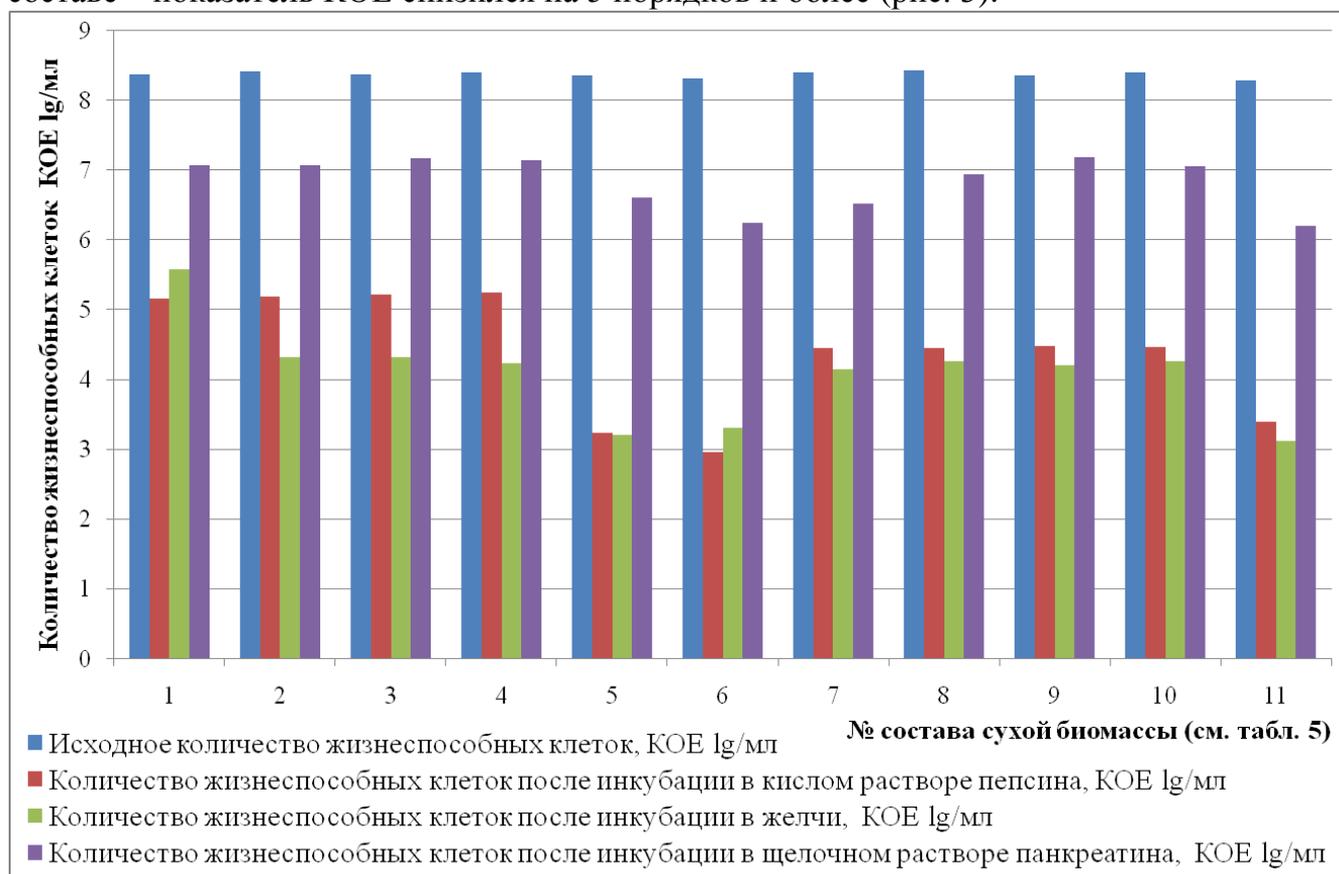


Рисунок 3 – Выживаемость бифидобактерий в модельных средах

Контакт с желчью в течение 2 ч снизил показатель КОЕ на 4–5 порядков в образцах иммобилизованных и свободных клеток. Высокая чувствительность к действию желчи отмечена у образцов контрольного состава, образцов с альгинатом натрия и отрубями ферментированными. Самая высокая устойчивость к действию желчи отмечена у образцов биомассы с ламинарией лиофилизированной. Щелочной раствор панкреатина не оказывает значительного влияния на выживаемость клеток – после экспозиции в течение 2 ч показатель КОЕ снизился на 1–2 порядка по сравнению с исходным значением.

Количество жизнеспособных лактобактерий в регидратированных образцах биомассы до экспозиции с модельными средами составляло не менее 10^9 КОЕ/мл. После инкубации в кислом растворе пепсина отмечено снижение показателя КОЕ на 3 порядка в образцах биомассы с сорбентами на основе ламинарии и фукуса. Несколько уступают протективные свойства сорбентов на основе альгината натрия, отрубей пшеничных и лигнина гидролизного – после действия кислого раствора пепсина количество жизнеспособных лактобактерий в этих образцах сохраняется на уровне 10^5 КОЕ/мл (снижение показателя КОЕ на 4 порядка). Выраженная чувствительность к действию кислого раствора пепсина отмечена в образцах биомассы с МКЦ и в контрольном составе без сорбента. После 2-часовой совместной экспозиции с желчью показатель КОЕ сохраняется на уровне 10^9 КОЕ/мл в образцах с сорбентом на основе лиофилизированного порошка ламинарии и фукуса, снижение выживаемости на один порядок отмечено в образцах с ламинарией и лигнином гидролизным. Щелочной раствор панкреатина не оказал значительного влияния на выживаемость лактобактерий – уровень показателя КОЕ снизился на 1 порядок после 2-часовой экспозиции (рис. 4).

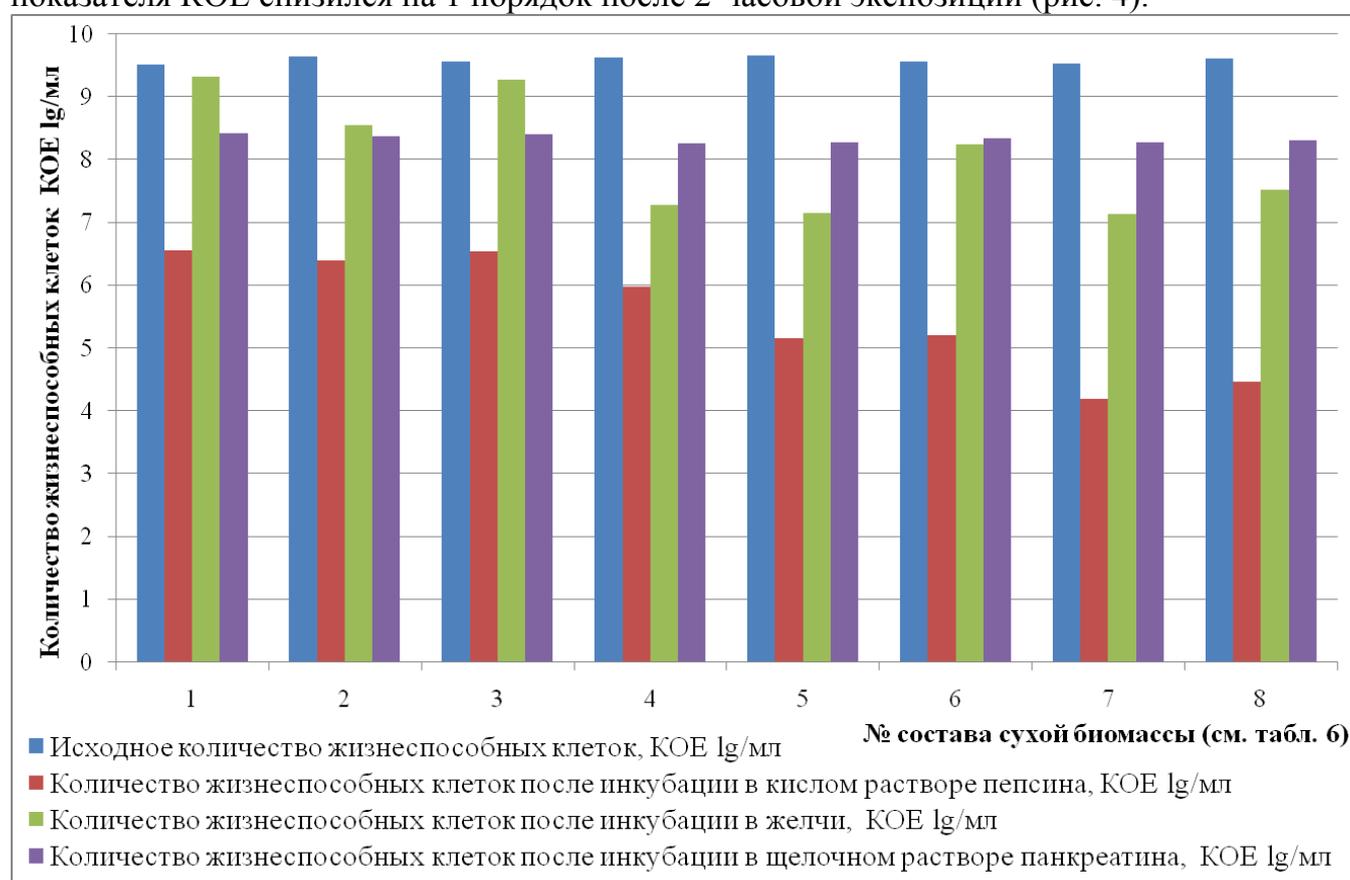


Рисунок 4 – Выживаемость лактобактерий в модельных средах

Протективные свойства фукуса и ламинарии можно объяснить тем, что указанные сорбенты, взаимодействуют с соляной кислотой желудочного сока и образуют изотропный гель с включенными в него иммобилизованными клетками бифидо- и лактобактерий. Образованная «гелевая капсула» предохраняет клетки от дальнейшего воздействия соляной кислоты и пепсина и тем самым способствует сохранению их жизнеспособности. В тонком кишечнике происходит растворение геля и высвобождение клеток.

Таким образом, эксперименты по изучению выживаемости бифидо- и лактобактерий в модельных средах в условиях *in vitro*, имитирующих пищеварение в желудке и кишечнике человека, подтвердили высокую чувствительность пробиотических микроорганизмов штаммов *B. bifidum* 1 и *L. plantarum* 8P-A3 к действию биологических жидкостей. Результаты исследований, представленные на рисунках 3, 4

показывают, что бактерицидные свойства желудочного сока и желчи относятся к числу критических факторов, негативно влияющих на жизнеспособность пробиотических микроорганизмов. Однако, иммобилизация клеток позволяет повысить резистентность бифидо- и лактобактерий к действию модельных сред, имитирующих секреты ЖКТ человека. Установлено, что выраженными протективными свойствами обладают сорбенты на основе бурых водорослей (ламинарии и фукуса), при этом защитный эффект объясняется сочетанием наличия полисахаридов в гомогенате водорослей, так и других активных компонентов (хлорофилл, фукоидан, природные антиоксиданты и т.д.). Данные сорбенты, а также сорбенты, оказывающие менее выраженный протективный эффект (альгинат натрия, отруби пшеничные ферментированные, клетчатка, лигнин гидролизный, семена льна и крахмал прежелатинизированный) можно считать пригодными для производства пробиотических препаратов на основе иммобилизованных клеток.

Антагонистическую активность иммобилизованных бифидо- и лактобактерий, существенно влияющую на эффективность их терапевтического применения, определяли с помощью тестов отсроченного антагонизма и ингибирования биолюминесценции. Полученные данные свидетельствовали о том, что иммобилизованные бифидо- и лактобактерии в ряде случаев обладают определенными преимуществами по антагонистической активности в сравнении с несорбированными клетками.

Необходимым критерием выбора перспективных составов биомассы иммобилизованных бифидо- и лактобактерий являются технологические параметры: остаточная влажность, насыпная плотность, сыпучесть и гигроскопичность.

Для получения порошка, обеспечивающего наполнение подходящих капсул достаточным количеством бактериальных клеток (КОЕ не менее 10^8), предпочтительны образцы биомассы с высокой насыпной плотностью.

Результаты контроля технологических параметров сухой биомассы бифидобактерий представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Технологические параметры сухой биомассы бифидобактерий

№ состава биомассы	Сорбент	Сыпучесть, г/с	Насыпная плотность, кг/м ³	Насыпная плотность уплотненная, кг/м ³	Остаточная влажность, %	Гигроскопичность, % (φ = 100%)
1	Ламинария лиофилизированная	5,92±0,30	284,37±0,76	404,52±0,81	1,58±0,05	27,58±0,20
2	Ламинарии слоевища измельченные	5,20±0,34	207,22±0,84	309,40±0,49	1,65±0,10	28,78±0,17
3	Фукус лиофилизированный	5,95±0,39	247,33±0,50	377,04±0,72	1,95±0,09	24,28±0,17
4	Фукуса слоевища измельченные	5,96±0,43	305,22±0,58	360,22±0,97	1,60±0,07	32,15±0,26
5	Альгинат натрия	Определение затруднено	227,13±0,68	334,04±0,64	1,58±0,05	33,78±0,15
6	Отруби ферментированные	5,13±0,27	209,92±0,64	307,78±0,53	3,46±0,02	18,48±0,24
7	Клетчатка	5,86±0,31	278,95±0,51	388,44±0,90	1,78±0,06	25,43±0,21
8	Семена льна	Определение затруднено	229,52±0,42	331,58±1,07	1,60±0,04	36,58±0,18
9	Лигнин гидролизный	5,34±0,47	256,77±0,78	332,76±0,83	1,78±0,06	30,20±0,15
10	Крахмал прежелатинизированный	4,56±0,27	229,22±0,92	359,18±0,97	1,55±0,03	22,95±0,19
11	Контроль	5,18±0,33	225,10±0,98	353,12±1,01	1,72±0,07	30,88±0,31

Наиболее высокой насыпной плотностью обладали составы лиофилизированной биомассы иммобилизованных бифидобактерий № 1, 4, 7, 9 которые также за счет опосредованного влияния насыпной плотности имеют относительно высокие значения сыпучести.

Культура иммобилизованных бифидобактерий в результате лиофильного высушивания образует пористую массу («аэрогель») за счет содержания сорбента и защитной СЖМ среды. При извлечении лиофилизата из кассет и его измельчении (протиранием через металлическую сетку с размером ячеек 0,5 мм) происходит разрушение структуры с образованием неоднородной массы (с различным фракционным составом) с преобладанием мелких аморфных частиц. При этом показатели сыпучести не обладают стабильностью при определении методом свободного высыпания из воронки.

Составы, содержащие в качестве сорбента альгинат натрия (состав № 5) и семена льна (состав № 8) имеют более аморфную структуру за счет наличия полисахаридов, не обладают сыпучестью (ее определение было затруднено), имеют более низкие показания насыпной плотности.

Все образцы лиофильно высушенной биомассы бифидобактерий обладали высокой гигроскопичностью и в ходе их обработки относительно быстро теряли свои исходные свойства. При определении сыпучести происходило значительное налипание частиц биомассы на воронку прибора и наблюдалось последующее снижение ее текучести вплоть до зависания.

Результаты контроля технологических параметров сухой биомассы лактобактерий представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Технологические параметры сухой биомассы лактобактерий

№ состава биомассы	Сорбент	Сыпучесть, г/с	Насыпная плотность, кг/м ³	Насыпная плотность уплотненная, кг/м ³	Остаточная влажность, %	Гигроскопичность, % (φ = 100%)
1	Ламинария лиофилизированная	Определение затруднено	254,40±24,2	353,00±17,6	1,7±0,2	13,25±0,16
2	Ламинарии слоевища измельченные	Определение затруднено	280,40±11,3	389,70±22,0	1,6±0,2	13,67±0,23
3	Фукус лиофилизированный	Определение затруднено	238,40±28,2	370,71±34,1	1,5±0,2	14,16±0,14
4	Альгинат натрия	Определение затруднено	258,77±18,8	384,62±17,1	1,6±0,2	13,58±0,19
5	Отруби пшеничные ферментированные	Определение затруднено	268,03±20,6	384,60±15,6	1,8±0,2	14,39±0,21
6	Лигнин гидролизный (полифепан)	Определение затруднено	283,07±11,3	397,90±22,1	1,6±0,2	13,11±0,24
7	МКЦ	Определение затруднено	312,70±10,6	394,90±22,1	1,5±0,2	14,23±0,17
8	Контроль	Определение затруднено	273,65±33,2	389,74±22,1	1,7±0,2	14,08±0,22

Наиболее высокой насыпной плотностью обладали составы биомассы лактобактерий № 2, 6, 7, содержащие в качестве сорбента ламинарии слоевища измельченные, лигнин гидролизный и МКЦ. Образцы биомассы № 1 и 3, обладающие устойчивостью к условиям, имитирующим ЖКТ человека, имеют достаточную насыпную плотность и перспективны для капсулонаполнения.

Таким образом, с учетом биологических и технологических показателей наиболее перспективными вариантами сухой биомассы иммобилизованных лактобактерий были

признаны составы № 1, 2, 3, 6, 7, а иммобилизованных бифидобактерий – № 1, 4, 7, 9 которые могут быть использованы в разработке порошков для наполнения капсул.

Учитывая более выраженную чувствительность бифидобактерий штамма *B. bifidum* 1 к действию неблагоприятных факторов верхних отделов ЖКТ человека, в дальнейшей работе использовали перспективные составы иммобилизованных бифидобактерий № 1, 4, 7, 9.

В пятой главе представлена разработка состава и технологии получения бифидосодержащего препарата в форме капсул «Имбакапс». Приведены результаты исследования физико-химических и технологических свойств экспериментальных образцов пробиотика в процессе хранения, дано описание технологического процесса производства препарата на основе иммобилизованных бифидобактерий и оценка качества полученной лекарственной формы.

Специфика сухой биомассы бифидобактерий (высокая гигроскопичность и, как следствие, нестабильность или отсутствие сыпучести, слеживаемость лиофилизатов в процессе хранения и обработки) ограничивает ее пригодность для непосредственного заполнения твердых желатиновых капсул. Основной путь повышения технологических свойств лиофилизатов заключается в подборе веществ-влагорегуляторов, обеспечивающих снижение гигроскопичности и улучшение сыпучести данной биологической субстанции.

В качестве таких вспомогательных веществ применяли лактозу (М 80) и каолин. Для обеспечения стандартности гранулометрического состава получаемых образцов биомассу измельчали с помощью сетки с размером ячеек 0,5 мм.

Для обоснования необходимого количества вспомогательных веществ были изготовлены составы порошков на основе образцов биомассы иммобилизованных бифидобактерий (составы № 1, 4) с различным содержанием каолина и лактозы, изучена их гигроскопичность и стабильность физических показателей при повышенной влажности воздуха и насыпная плотность. Показатели гигроскопичности полученных порошков имели близкие значения и не позволяли сделать однозначное прогностическое заключение об их стабильности. Поэтому в процессе экспозиции составов при относительной влажности воздуха 100 % проводили контроль их гигроскопичности с одновременной оценкой физического состояния (изменение цвета порошка, сохранение сыпучести). Порошки с лактозой через 1–2 ч теряли сыпучесть, происходила контракция объема порошка и изменение его цвета. Составы, в которых в качестве вспомогательного вещества применяли каолин, сохраняли свои свойства даже через 24 ч экспозиции. Для получения стабильных составов с лактозой в качестве вспомогательного вещества ее необходимо вводить в значительном количестве в соотношении 1:1 – 1:2 по отношению к биомассе бифидобактерий, что применительно к капсульной форме приводит к увеличению объема и массы дозы.

Более перспективным был признан вариант порошка с каолином в количестве 20 % от массы лиофилизата. Увеличение его содержания не приводит к значимому снижению гигроскопичности и уменьшает насыпную плотность порошка.

Для комплексной оценки влияния сорбента и вспомогательного вещества на технологические свойства порошков были наработаны варианты составов на основе наиболее перспективных образцов биомассы бифидобактерий (составы № 1, 4, 7, 9) с каолином (в количестве 20 % от массы лиофилизата) и лактозой (в количестве 30 % от массы лиофилизата), изучены их технологические параметры.

Допустимая сыпучесть отмечалась у состава № 4 и соответствовала значениям $(2,5 \pm 0,5)$ г/с, удовлетворительную сыпучесть, соответствующую значениям $(3,0–6,5)$ г/с, показали составы № 1, 2, 5, 7. Образцы порошков № 3, 6, 8 с лактозой обладали значительно более высоким показателем сыпучести в сравнении с порошками, в состав

которых входит каолин. Однако, как было отмечено выше, введение лактозы не обеспечивает сохранение свойств порошка в процессе хранения. Было отмечено еще одно свойство каолина – введение его в состав порошка в количестве не менее 20 % от количества сухой биомассы бифидобактерий обеспечивает антифрикционный эффект, который выражается в снижении адгезии порошка к рабочим частям капсулозаполнительных машин. Это особенно важно при высокой скорости капсулирования. В составы с лактозой для обеспечения бесперебойной работы капсульных машин требуется дополнительное введение магния стеарата или талька (табл. 9).

Таблица 9 – Технологические параметры порошков для наполнения капсул на основе иммобилизованных бифидобактерий

№ состава порошка	Сорбент	Вспомогательное вещество (% относительно общей массы порошка)	Сыпучесть, г/с	Насыпная плотность, кг/м ³	Насыпная плотность уплотненная, кг/м ³
1	Ламинария лиофилизированная	Лактоза (30 %)	3,88±0,33	582,5±6,8	909,1±4,9
2		Каолин (20 %)	3,32±0,30	550,3±9,4	882,1±2,6
3	Фукуса слоевища измельченные	Лактоза (30 %)	8,65±0,88	626,9±6,2	793,6±5,7
4		Каолин (20 %)	2,30±0,11	543,3±9,3	833,3±7,7
5	Клетчатка	Каолин (20 %)	3,80±0,14	488,8±5,5	765,7±5,7
6		Лактоза (30 %)	8,00±0,48	541,4±4,1	769,2±6,8
7	Лигнин гидролизный (полифепан)	Каолин (20 %)	3,24±0,34	498,3±5,2	760,6±7,4
8		Лактоза (30 %)	8,04±0,54	538,4±6,0	714,3±3,6

Таким образом, экспериментально установлено, что оптимальным наполнителем является каолин в количестве 20 % от массы лиофилизата.

Выбор оптимального типоразмера капсулы проводили с учетом нескольких факторов. Во-первых, порошок должен максимально заполнять объем капсулы, во-вторых, доза порошка в капсуле должна содержать не менее 10⁸ КОЕ бифидобактерий, что соответствует 0,2 г лиофилизата или 0,25 г порошка.

Наиболее подходящими для наполнения являются твердые желатиновые капсулы № 2 со средней вместимостью 0,37 см³. Полезный объем выбранного номера капсулы обеспечивает возможность ее наполнения порошком с необходимой дозировкой бифидобактерий на начало срока годности препарата (количество КОЕ/доза не менее 10⁸).

Образцы порошков помещали в твердые желатиновые капсулы № 2 (Capsugel, Бельгия) при помощи капсульной машины МС-1,2 (Италия). У полученных экспериментальных образцов были определены: средняя масса капсулы, средняя масса содержимого капсулы и отклонения от показателей средней массы. Все образцы капсул соответствовали требованиям ОФС.1.4.2.0009.15 «Однородность массы дозированных лекарственных форм», что позволяет сделать заключение о приемлемости технологических свойств полученных порошков для наполнения капсул.

С целью изучения стабильности пробиотика на основе иммобилизованных бифидобактерий экспериментальные образцы капсул были заложены на хранение при температуре (5±3) °С и ежеквартально контролировались по основным показателям:

внешний вид, распадаемость, потеря в массе при высушивании, рН, специфическая активность.

В процессе и к концу срока наблюдения (18 мес) внешний вид препарата на основе иммобилизованных бифидобактерий в капсулах практически не изменялся и представлял собой порошок серовато-белого цвета с различными оттенками в зависимости от применяемого сорбента. Во всех образцах уровень активности кислотообразования составлял не ниже 90 °Т, значение рН сохранялось в допустимых пределах (5,5–6,5), распадаемость капсул в воде не превышала 20 мин, потеря в массе при высушивании составляла не более 3,5 %. Значение показателя выживаемости клеток сохранялось на уровне 10^8 КОЕ/г, однако стоит отметить, что в составах с лактозой (серии капсул № 1, 3, 6, 8) данный показатель статистически значимо снижался после 12 мес хранения по сравнению с исходным значением, тогда как в образцах с каолином показатель КОЕ/г статистически значимо снижается после 18 мес хранения, за исключением образца № 7 с сорбентом на основе лигнина гидролизного.

Таким образом, результаты периодического контроля экспериментальных образцов капсул подтверждают, что сорбент на основе бурых водорослей и каолин в качестве вспомогательного вещества обеспечивают стабильность физико-химических и биологических показателей капсул на основе иммобилизованных бифидобактерий в течение 18 мес хранения, что является преимуществом по сравнению с другими экспериментальными образцами и определяет выбор производственного варианта состава капсул.

На основании проведенных экспериментальных работ были получены 5 экспериментально-производственных серий препарата «Имбикапс» с применением сорбента на основе ламинарии, как наиболее экономически выгодного варианта. Экспериментально-производственные серии получали с использованием автоматической капсулонаполняющей машины Zanasi 40F (ИМА, Италия). Капсулы упаковывали в полимерные банки с винтовой горловиной из полиэтилена высокой плотности, с крышками с силикагелевой вставкой и контролем первого вскрытия.

Полученные серии препарата «Имбикапс» были заложены на хранение при температуре (5 ± 3) °С и ежеквартально контролировались в течение 21 мес по показателям, представленным в разработанной спецификации (табл. 10).

Таблица 10 – Спецификация препарата «Имбикапс», капсулы.

Наименование показателя	Метод	Норма
1	2	3
Описание	Органолептический	Твердые желатиновые капсулы цилиндрической формы с полусферическими концами с сухим порошком бежевого или беловато-серого цвета с редкими темными вкраплениями со специфическим запахом.
Подлинность	Микроскопический, ГФ XIII, ОФС.1.7.2.0012.15 Бактериологический	В мазках, окрашенных по Граму, должны быть неподвижные грамположительные полиморфные палочки длиной 4–5 мкм с бифуркацией на одном или двух концах, располагающиеся в виде скоплений или отдельных клеток. Устанавливается по присутствию в препарате живых бифидобактерий одновременно с их количественным определением.
Вкус содержимого капсулы	Органолептический	Сладковатый

Продолжение таблицы 10

1	2	3
Активность кислотообразования, °Т	Метод кислотно-основного титрования, ГФ XIII, ОФС.1.7.2.0009.15	Не менее 90
pH	Потенциометрический, ГФ XIII, ОФС.1.2.1.0004.15	От 5,5 до 6,5
Потеря в массе при высушивании, %, не более	Гравиметрический, ГФ XIII, ОФС.1.2.1.0010.15	3,5
Средняя масса капсулы, г	Весовой, ГФ XIII, ОФС.1.4.2.0009.15	От 0,29 до 0,33
Распадаемость, мин	Визуальный, ГФ XIII, ОФС.1.4.2.0013.15	Не более 20 мин в воде
Бифидобактерий штамма <i>B. bifidum</i> 1, КОЕ/г	Бактериологический, ГФ XIII, ОФС.1.7.2.0009.15	Не менее 5×10^8
БГКП (колиформы), КОЕ/1,0 г	Микробиологический, ГФ XIII, ОФС.1.2.4.0002.15	Не допускается
<i>Escherichia. coli</i> , КОЕ/5,0 г		Не допускается
<i>Staphylococcus aureus</i> , КОЕ/1,0 г		Не допускается
Патогенные, в т.ч. сальмонеллы, КОЕ/10 г		Не допускается
Дрожжи, КОЕ/1,0 г, не более		50
Плесени, КОЕ/1,0 г, не более		50
Упаковка		По 40 или 60 капсул в полимерной банке с крышкой с силикагелевой вставкой и кольцом контроля первого вскрытия. По 1 банке в картонной пачке.
Маркировка		В соответствии с ТУ 9197-161-14237183-2011 изм. № 1.
Транспортирование		При температуре от 2 до 8 °С
Хранение		При температуре от 2 до 8 °С
Срок годности		18 мес

Результаты периодического контроля показали, что при хранении в течение 21 мес качество твердых желатиновых капсул соответствовало предъявляемым к данной форме требованиям согласно спецификации на препарат «Имбикапс». Это свидетельствует о пригодности разработанной рецептуры и технологии капсульной формы препарата на основе иммобилизованных клеток для внедрения в производство.

Данные, полученные при проведении теста ингибирования билюминесценции свидетельствуют, что препарат «Имбикапс» на основе иммобилизованных бифидобактерий обладает определенным преимуществом по биологической активности в сравнении с аналогичными отечественными пробиотиками. Он превосходит аналоги по антагонистической составляющей, выраженной в виде индекса антагонистической активности (ИАА), соответствующего уровню (%) подавления свечения тест-штамма.

Бифидобактерии в составе препарата «Имбакапс» в начале совместной экспозиции подавляли биолюминесценцию сенсора на 86 %, через 2 ч отмечено снижение ИАА до 71 %, после 2-х ч ИАА увеличивается, достигая 98 % к 24 ч совместной экспозиции. У «Бифидумбактерина форте» отмечена динамика в сторону снижения ИАА с 75 % в начале экспозиции до 6 % к 6 ч, после наступала фаза стимуляции свечения сенсора (прирост > 75 % в сравнении с уровнем свечения в контрольном образце). Бифидумбактерин весь период совместной экспозиции проявлял низкий уровень подавления свечения – с начала экспозиции и до 4 ч ИАА не превышал 40 %, после 4-х часов ИАА уменьшался до 15 % (рис. 5).

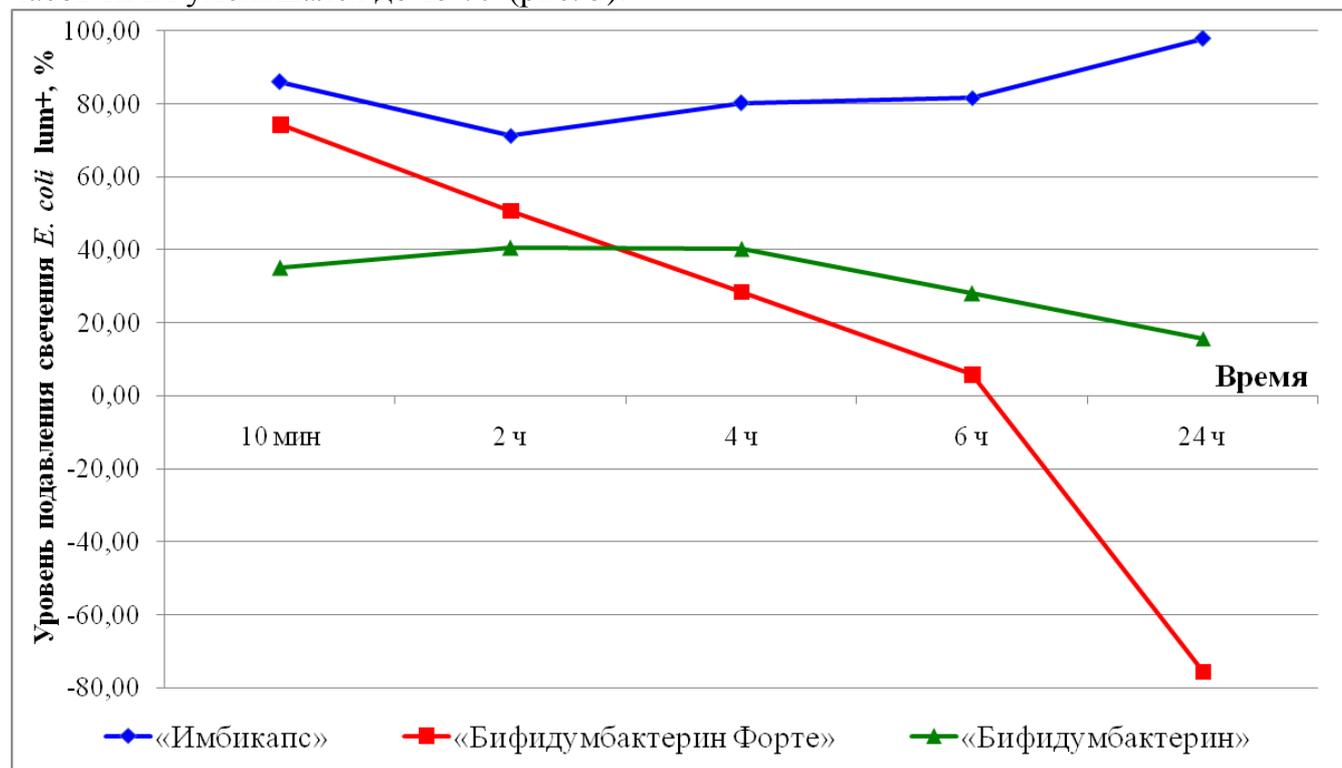


Рисунок 5 – Влияние препаратов на биолюминесценцию *E. coli lum⁺*

Тест ингибирования биолюминесценции позволяет оценивать именно препараты, а не потенциал штамма, культивируемого на питательной среде. В данном тесте также оценивается метаболическая составляющая препарата, которая играет существенную роль в реализации биологической активности пробиотика. В технологии изготовления препарата «Имбакапс» предусмотрено полное сохранение экзацеллюлярного комплекса, обуславливающего антагонистическую активность.

На основании проведенного исследования была разработана технологическая схема получения пробиотика «Имбакапс» в твердых желатиновых капсулах.

Процесс производства препарата включает 10 стадий:

- 1 стадия – Получение воды очищенной;
- 2 стадия – Санитарная подготовка производства;
- 3 стадия – Получение маточной культуры бифидобактерий штамма *B. bifidum 1*;
- 4 стадия – Приготовление казеиново-дрожжевой среды КД-5;
- 5 стадия – Получение взвеси бифидобактерий;
- 6 стадия – Приготовление сорбента, защитных сред и вспомогательного вещества;
- 7 стадия – Имобилизация, внесение защитных сред, розлив и лиофилизация бактериальной культуры;
- 8 стадия – Приготовление полуфабриката препарата в виде порошка;
- 9 стадия – Капсулирование и обеспыливание;
- 10 стадия – Фасовка, маркировка, упаковка.

На всех стадиях производства предусмотрен внутривыпускной контроль, обеспечивающий соответствие промежуточной продукции заданным требованиям.

На препарат «Имбикапс» разработан и утвержден пакет НД (ТУ, ТИ), получено свидетельство о государственной регистрации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Апробированные органические сорбенты природного происхождения обеспечивают высокий процент (более 90) иммобилизации клеток, но при этом они в различной степени оказывают защитное действие в отношении бифидо- и лактобактерий в моделируемых условиях ЖКТ, а также структурирующий эффект при лиофилизации бактериальных культур во флаконах (лекарственная форма – лиофилизат во флаконе).

2. Изучены биологические, физико-химические и технологические параметры сухой биомассы иммобилизованных бифидо- и лактобактерий. Экспериментально доказано, что сорбенты на основе бурых водорослей (ламинарии и фукуса) обладают выраженными протективными свойствами в условиях *in vitro*, имитирующих пищеварение в желудке и кишечнике человека. Данные сорбенты, а также сорбенты, оказывающие менее выраженный протективный эффект (альгинат натрия, отруби пшеничные ферментированные клетчатка, полифепан, семена льна и крахмал прежелатинизированный) можно считать пригодными для производства пробиотических препаратов на основе иммобилизованных клеток.

3. Установлено, что каолин в качестве вспомогательного вещества в количестве 20 % от массы лиофилизата иммобилизованных бифидобактерий обеспечивает получение стабильного порошка для капсулирования с приемлемыми технологическими свойствами.

4. Разработан состав и технология получения пробиотического препарата в капсулах «Имбикапс» на основе иммобилизованных бифидобактерий. Определены параметры его специфической активности. Подготовлен и утвержден пакет НД (ТУ, ТИ) на производство данного препарата, получено свидетельство о государственной регистрации.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Столбова, М. Г. Исследование устойчивости бифидобактерий к биологическим жидкостям (желудочному соку, желчи) / М. Г. Столбова, В. А. Несчисляев, Л. М. Эпштейн // Тезисы Всероссийской научно-практической конференции «Вакцинология 2010. Совершенствование иммунобиологических средств профилактики, диагностики и лечения инфекционных болезней». – Москва, 2010. – С. 106.

2. Столбова, М. Г. Влияние иммобилизации на устойчивость пробиотических организмов к биологическим жидкостям / М. Г. Столбова, В. А. Несчисляев // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции : сб. науч. тр. – Пенза, 2011. – Вып. 66. – С. 594–595.

3. К вопросу об использовании иммобилизованных клеток в производстве пробиотиков / В. А. Несчисляев, М. Г. Столбова, И. В. Красильников, К. А. Лыско // Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. – 2011. – № 2–3. – С. М65.

4. Столбова, М. Г. Апробация защитной среды на основе коллагена для лиофилизации пробиотиков / М. Г. Столбова, В. А. Несчисляев // Химия. Экология. Биотехнология 2011 : тез. докл. XIII регион. науч.-практ. конф. студентов и молодых ученых. – Пермь, 2011. – С. 78–79.

5. Столбова, М. Г. К вопросу использования сорбентов в производстве пробиотических препаратов / М. Г. Столбова, В. А. Несчисляев // Вестн. урал. мед. акад.

науки : темат. вып. по микробиологии, иммунологии и биотехнологии. – 2011. – № 4/1 (38). – С. 54.

6. Ефремова, К. А. К вопросу устойчивости иммобилизованных бифидобактерий к биологическим жидкостям / К. А. Ефремова, М. Г. Столбова // Вестн. Перм. гос. фармацевт. акад. – 2012. – № 9. – С. 225–227.

7. Несчисляев, В. А. Разработка и исследование капсулированной лекарственной формы пробиотика на основе иммобилизованных бифидобактерий / В. А. Несчисляев, М. Г. Столбова, П. А. Мокин, В. П. Бондарев // Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2013. – № 2 (46). – С. 35–38.

8. Несчисляев, В. А. Разработка и исследование капсулированной лекарственной формы пробиотика «Имбикапс» [Электронный ресурс] / В. А. Несчисляев, М. Г. Столбова, П. А. Мокин // Современ. пробл. науки и образования. – 2014. – № 2. – Режим доступа: <http://www.science-education.ru/116-12686>.

9. Несчисляев, В. А. Пробиотики на основе иммобилизованных лактобактерий: апробация перспективных сорбентов / В. А. Несчисляев, М. Г. Столбова, К. А. Лыско // Эксперим. и клинич. гастроэнтерология. – 2015. – № 5, вып. 117. – С. 102.

10. Столбова, М. Г. Сравнительный анализ антагонистической активности пробиотических препаратов на основе иммобилизованных бифидобактерий / М. Г. Столбова, В. А. Несчисляев // Перспективы развития производства и применения иммунобиологических препаратов в XXI веке : материалы конф. – Пермь, 2018. – С. 220–224.

11. Влияние иммобилизации на биологические свойства лактобактерий [Электронный ресурс] / М. Г. Столбова [и др.] // Современ. пробл. науки и образования. – 2018. – № 4. – Режим доступа: <http://www.science-education.ru/article/view?id=27975>.

Столбова Мария Георгиевна (Россия)

Разработка лекарственных форм пробиотиков на основе иммобилизованных клеток.

Исследованы протективные свойства группы сорбентов, апробированных для иммобилизации бифидо- и лактобактерий. Выявлены выраженные защитные свойства сорбентов на основе бурых водорослей (ламинария, фукус) в условиях, имитирующих процесс пищеварения в желудке и кишечнике человека. Изучено влияние иммобилизации на биологические и технологические свойства лиофилизированной клеточной биомассы. Разработан состав и технология получения препарата «Имбикапс» в твердых желатиновых капсулах с использованием лиофилизированной клеточной биомассы бифидобактерий, изучена его стабильность и специфическая активность. Подготовлен и утвержден пакет НД (ТУ, ТИ) на производство данного препарата, получено свидетельство о государственной регистрации.

Maria G. Stolbova, Russia

Development of Pharmaceutical Forms of Probiotics Based on Immobilized Cells.

Protective properties of a group of sorbents tested for immobilization of bifido- and lactobacteria have been studied. Pronounced protective properties have been detected in the sorbents based on brown algae (Laminaria, Fucus) in conditions imitating the process of digestion in the ventricle and intestinal tract of a human. The influence of immobilization on biological and technological properties of the lyophilized cellular biomass has been studied. The composition and manufacturing technology of “Imbicaps” pharmaceutical preparation in hard gelatin capsules have been developed with the use of the lyophilized cellular biomass of bifidobacteria; its stability and specific activity have been studied. A set of regulatory documents (technical specifications, standard operating procedures) for manufacturing of this pharmaceutical preparation has been prepared and approved; the state registration certificate has been received.