

УДК 579.61

О. С. ХИЖНЯК, асп., НТУ «ХПІ», Харків;

Ю. М. КРАСНОПОЛЬСЬКИЙ, д-р фарм. наук, проф., НТУ «ХПІ», Харків

БІОТЕХНОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ СТВОРЕННЯ ПРЕПАРАТІВ НА ОСНОВІ ПРОБІОТИКІВ

Розглянута класифікація пробіотичних і пребіотичних препаратів, наведено перелік препаратів, представлених на українському ринку пробіотиків. Показана роль пробіотичних препаратів, яку вони виконують в організмі. Окремо представлені характеристики біфідобактерій та лактобацил. Розглянуті аспекти створення препаратів на основі безклітинних компонентів пробіотиків. Доведена необхідність розробки комбінованих препаратів на основі місцевих біоваріантів. Іл.: 0. Бібліогр.: 21 назв.

Ключові слова: пробіотики, пребіотики, симбіотики.

Вступ. В останні роки на організм людини постійно впливає цілий комплекс несприятливих факторів, які змінюють нормальне функціонування основних систем життєдіяльності. З одного боку, вплив екологічного стану, який постійно погіршується, зростання кількості стресових ситуацій, а з іншого – масове неконтрольоване застосування хіміотерапевтичних препаратів, у тому числі антибіотиків. У зв'язку з цим постало питання про способи конструювання і відновлення оптимальної мікрофлори, тобто мікроекології та ендоекології макроорганізму [1].

Аналіз останніх досліджень та літератури. В науковій літературі та офіційних документах, які мають відношення до проблем мікроекології, а також у повсякденному житті широку популярність отримала біотерапія. Теоретично це поняття існувало вже досить давно і вперше було описано І.І. Мечниковим [2], який виявив позитивний ефект, що мають молочнокислі бактерії на організм людини.

Взагалі біотерапія включає поняття «пробіотики» (ПР), «пребіотики», «симбіотики». Не слід ототожнювати ці поняття, адже кожне з них включає різні за походженням і функціональною активністю компоненти.

«Пробіотики» – природні ад'юванти, живі мікроорганізми, введення яких в організм людини сприяє підтриманню і відновленню біологічного балансу його нормофлори і має позитивний ефект [3,4,5].

«Пребіотики» – представляють собою речовини або дієтичні інгредієнти, які вибірково стимулюють ріст і біологічну активність мікроорганізмів у кишечнику [6,7].

«Симбіотики» – комбінація пробіотичного та пребіотичного компонентів з метою інтенсифікації позитивного ефекту на організм [8].

За деякими літературними даними до біотерапії також відносять «пробіотичні

продукти» (ПР-продукти) – ферментовані за допомогою бактерій кисломолочні продукти [9,10]. Відповідно ДСТУ 2212-93 «Молочна промисловість. Молоко і кисломолочні продукти. Терміни та визначення», кисломолочний продукт – це молочний продукт, який утворюється сквашуванням молока чи вершків, пахти, сироватки чистими культурами молочнокислих бактерій з можливим додаванням культур дріжджів, оцтовокислих чи пропіоновокислих бактерій, харчових добавок [11]. Ведення в склад кисломолочних продуктів спеціально селекціонованих штамів молочнокислих бактерій, біфідобактерій сприяє кращому засвоєнню кальцію в організмі людей різних вікових груп, зниженню рівня холестерину в крові, забезпечує фізіологічну необхідність у вітамінах, амінокислотах, антиоксидантах, активізує утворення мікробної лактази [12,13]. Але на наш погляд останній клас можна віднести лише до засобів профілактики розладів шлунково-кишкового тракту.

Коротко охарактеризувавши нові терміни та визначення, які з'явилися в області застосування мікробіотерапії, розглянемо класифікацію кожного класу речовин.

Класифікація пробіотиків. ПР представлені п'ятьма поколіннями: I покоління – монокомпонентні препарати. Містять один штам бактерій (біфідобактерій, лактобактерій та ін.); II покоління – антагоністи, що самостійно елімінуються з організму. Складаються зі спорових бацил та дріжджеподібних грибів; III покоління – комбіновані препарати. Містять кілька штамів бактерій. Бактерії, що входять до його складу можуть відноситись до одного або різних видів та посилюють дію один одного; IV покоління – синбіотики – комбінація пробіотичного і пребіотичного компоненту; V покоління – рекомбінантні або генно-інженерні ПР створені на основі генно-інженерних штамів мікроорганізмів, їх структурних компонентів та метаболітів, мають задані характеристики [14].

На фармацевтичному ринку України ПР представлені доволі широко. Переважно це препарати, які містять біфідо-, коли- та лактобактерії, дріжджі. На сьогодні широкому колу споживачів доступні сотні ПР-продуктів харчування, харчові добавки, та їх кількість, зареєстрованих в Україні, постійно зростає. В наш час на українському ринку лікарських препаратів переважають імпортовані ПР. Закордонні фірми займають біля 90% українського фармацевтичного ринку в цій області.

Класифікація пребіотиків. Аналіз речовин, що здатні стимулювати ріст нормальної мікрофлори привів до класифікації пребіотичних компонентів на наступні групи: моносахариди і спирти (ксилоза, ксилобіоза, рафіноза, сорбіт); олігосахариди (лактоулоза, фруктоолігосахариди, галактоолігосахариди, ксилоолігосахариди); полісахариди (пектині, декстрин, інουλін); ферменти (β -галактозидаза мікробного походження, протеази сахароміцетів); пептиди (соєві, молочні); антиоксиданти (вітаміни групи В, вітамін Е, аскорбінова кислота) [6,7].

Серед пребіотиків, зареєстрованих на території України виділяють: Дуфалак, лактулоза (Solvay Pharma); Лактувит, лактулоза (Юрія-фарм); Нормазе, лактулоза (Moltenis); Лактулакс, лактулоза (Genom Biotech) [15,16].

Перелік найпопулярніших препаратів-ПР, зареєстрованих в Україні представлено у таблиці [15,16]:

Таблиця – Перелік пробіотиків, зареєстрованих в Україні

Монокомпонентні препарати	Лактобактерин (суха речовина), Росія, Україна
	Біфідумбактерин (суха речовина), Росія
	Біо-Гая (каплі)
	Колібактерин (суха речовина), Україна
	А-Бактерин (суха речовина), Україна
Полікомпонентні	Біфіформ-бебі (каплі), Данія
	Лінекс (капсули), Словенія
	Біфіформ (капсули), Данія
	Біфікол (флакони), Україна
Комбіновані (симбіотики)	Лактовіт форте (капсули), Великобританія
	Лацидофіл (капсули), Україна
	Біфіформ дитячий (порошок)
	Лактив-ратіофарм (капсули, порошок, флакони), Італія
	Біфіформ комплекс (таблетки), Данія
Рекомбінантні	Субалін (суха речовина), Україна
	Хілак, хілак-форте (каплі), Німеччина
Самоелімінуючі	Бактисубтіл (капсули), Югославія
	Ентерожерміна (питні ампули), Франція
	Біоспорин (суха речовина), Росія
	Ентерол (суха речовина), Франція

Методика отримання ПР препарату поєднує в собі простоту технології і складність її виконання. ПР випускаються в чотирьох основних формах – суха речовина, рідка форма, капсули, супозиторії. Початком будь-якого продукту є постадійне культивування: відновлення та накопичення маточної культури, виробничий посів, додавання середовища висушування. Далі залежно від майбутньої форми препарат розливають у флакони або висушують. Висушену культуру вводять у желатинову капсулу або використовують у складі супозиторію. Полікомпонентні препарати та симбіотики об'єднують перед додаванням середовища висушування. На кожній стадії препарат проходить контроль на чистоту, кількість живих бактерій, та у ряді препаратів здібність до кислотоутворення.

Наведений перелік препаратів є не повним, але вже на його основі можна зробити висновок про велику увагу, яка зараз надається ПР. Враховуючи вище зазначені причини, ПР набирають нової сили і ХХІ століття прийнято оголосити ерою ПР. Але чому саме вони? Це пов'язано з тим, що пробіотикотерапія має беззаперечні переваги, до яких, перш за все, слід віднести те, що за суміщенням ознак мікроекологічної відповідності і лікувально-профілактичної ефективності вона не має пріоритетної альтернативи у порівнянні з іншими препаратами [17]. Цей вибір також залежить від великого переліку функцій, які вони виконують в організмі. Зупинимось докладніше на цьому питанні.

Основна маса ПР препаратів основана на різних штаммах біфідобактерій та лактобацил. Біфідо- та лактобактерії займають провідне місце, підтримуючи баланс та стабілізуючи гомеостаз за рахунок надійної адгезії до слизової оболонки кишечника, визначаючи основні локуси існування для інших мікроорганізмів. Обидва види бактерій продукують молочну кислоту, визначаючи стан кислотності у шлунково-кишковому тракті та на слизових оболонках статевих шляхів. Вони продукують бактеріоцини, які мають антимікробну дію проти потенційно патогенних штамів кишкової мікрофлори, мають сильні антагоністичні властивості по відношенню до багатьох умовно патогенних і патогенних мікроорганізмів, попереджають колонізацію і розвиток патологічних процесів; відповідають за теплове забезпечення організму та енергозабезпечення епітелію; регулюють перистальтику кишечника, підтримують іонний гомеостаз; виводять екзогенні та ендогенні субстрати з організму; стимулюють імунну систему та місцевий імунітет; підтримують фізико-хімічні параметри гомеостазу приепітеліальної зони; приймають участь у протипухлинному нагляді та синтезі вітамінів, ферментів, антибіотиків, гормоноподібних субстанцій, незамінних амінокислот, низькомолекулярних жирних кислот, пептидів, сигнальних молекул, у тому числі нейротрансмітерів [8].

Кожен вид бактерій також виконує специфічні функції. Так біфідобактерії регулюють морфофункціональний стан слизової оболонки каналу травлення і його моторно-евакуаторну функцію, перешкоджають проникненню мікробів у верхні відділи та інші внутрішні органи (за рахунок колонізаційної резистентності). Молочна та оцтова кислоти, які продукують біфідобактерії створюють у кишечнику кислу реакцію, яка попереджає розмноженню патогенної, гнилісної та газоутворюючої мікрофлори [18]. Біфідобактерії здатні виділяти бактеріоцини (біфідин та біфілонг), які проявляють антимікробну активність по відношенню до багатьох видів ентеробактерій, вібріонів, стрептококів та стафілококів [19].

Лактобактерії приймають участь у гідролізі вуглеводів, продукують лізоцим, лактоцидин, ацидофілін, перекуси, антибіотики та бактеріоцини [18]; пригнічують розвиток синьогнійної палички, стафілококів, ешерихій, протей, деяких видів шигел, сераций, сальмонел, стрептококів; перетворюють холестерин у копростанол [20].

Мета досліджень, постановка проблеми. Провівши аналіз останніх досліджень та літератури, можна зробити висновок, що в сучасних умовах життя ПР є важливим та необхідним інструментом захисту здоров'я людини. У зв'язку з цим виникає необхідність створення комплексу заходів направлених на забезпечення населення ефективними, безпечними та доступними засобами корекції мікробіоценозу, створеними на основі місцевих біоваріантів; розробку концепції використання ПР у харчуванні людей та профілактиці захворювань шлунково-кишкового тракту в масовому масштабі.

Приймаючи закордонні препарати-ПР слід враховувати, що найбільш високу ефективність мають ПР, основу яких складають «місцеві» штами мікроорганізмів. Принциповою перевагою вітчизняних ПР є адаптованість

штамів, які є їх основою, до української популяції населення. Тому недостатня кількість вітчизняних препаратів є великим недоліком української біотехнологічної промисловості.

Слід зупинитися ще на одній формі випуску ПР. В останній час достатньо широко представлені препарати ПР, зокрема, лактобактерій та біфідобактерій у рідкому вигляді. Дана форма має ряд переваг: в більш короткий термін комплекс бактерій пригнічує активність патогенної мікрофлори; попереджає проникненню в організм ендотоксинів, відновлюючи захисну біоплівку на всіх слизових. Ефект пов'язаний з тим, що біфідобактерії та лактобацили потрапляють в організм людини в «нативному» стані і не підлягають змінам у процесі технологічної обробки, наприклад, ліофільного висушування. Бактерії при ліофілізації значно змінюють свою активність, знаходячись у стані анабіозу і відновлення активності настає лише після 3 – 5 розмножень, потрапляючи у сприятливе для розмноження середовище. Доволі часто бактерії просто не встигають це зробити, потрапивши, у сухому вигляді, у кишечник, та виводяться з каловими масами. Їм необхідно 8 – 10 годин для переходу в активний фізіологічний стан, що не потрібно при використанні рідкої форми ПР. За нашими даними, при прийомі біфідобактерій вони зберігають життєздатність, проходячи через шлунок в кишечник, і визначаються через 8 годин після прийому у дистальних відділах повздошної кишки у кількості, яка складає 35 – 40% від загальної кількості бактерій. Однак недоліком такої форми є невеликий термін збереження препарату.

Матеріали досліджень. Не можливо не звернути увагу ще на один напрямок – створення препаратів на основі безклітинних компонентів ПР. Деякі виробники препаратів ПР передбачають очищення від середовища культивування і метаболітів, що дозволяє, на їх думку, уникнути неприємного запаху та смаку, який притаманний ПР. Однак висока концентрація біологічно активних компонентів, до числа яких відносяться бактеріоцини, протеази та ін. дозволяють розглядати культуральну рідину ПР як перспективний матеріал для розробки на його основі лікарських препаратів та біологічно активних добавок. Безклітинні продукти на основі ПР-бактерій можна оцінювати як різновидність ПР-препаратів. Безклітинний мікробний ПР-продукт – нове покоління препаратів на основі метаболітів і структур ПР-штамів та ізолятів. Розроблюються принципово нові метаболіти для ПР, наприклад, при одночасній участі лактобацил та біфідобактерій і людини.

Метою наших дослідів є вивчення антибактеріальної та імуностимулюючої активності продуктів метаболізму бактерій. У роботі був досліджений стерильний фільтрат культуральної рідини (СФКР) *B.bifidum* 1 і *L.plantarum* 8P-A3 у співвідношенні 1:2. Кислотність фільтрату 228⁰T. У роботі було проведено дві групи експериментів.

1. При вивченні імуностимулюючої активності мишам одноразово підшкірно вводили анатоксин стовбняку у дозі 0.2 мл (2 ЕС). Тваринам протягом 21 доби вводили (СФКР) внутрішньочеревно (в/ч) чи per os у дозі 0.5 мл. Контрольній групі мишей (50 тварин) СФКР не вводили. Далі тваринам в/ч вводили анатоксин стовбняку у дозі 50 dlm і спостерігали за виживанням тварин

протягом 7 діб. Виявлено, що у контрольній групі виживання мишей становило 62%. У той же час, у групі тварин, які отримували СФКР виживання було вище: 76% при введенні *per os* та 88% при введенні в/ч. Продукти життєдіяльності бактерій при введенні тваринам, імунізованим вакциною, підвищують імунну відповідь на введений антиген.

2. При вивченні антибактеріальної активності у якості тест-штаму використовували культуру *Sh.Flexneri* у дозі 200 млн. Дослідження проводили за двома напрямками: мишам вводили суміш культури і СФКР у співвідношенні 1:1 чи в/ч заражували тварин у дозі 0.1 мл, з послідуочим введенням СФКР в/ч у дозі 0.5 мл протягом 7 діб. Контрольній групі вводили лише культуру *Sh.Flexneri*. Виявлено, що використання СФКР приводить до зниження летальності у мишей при інкубації патогенних бактерій і СФКР. У порівнянні з контролем летальність була знижена на 25 – 30%. На нашу думку, продукти, які накопичуються у середовищі культивування, бактеріюцини, кислоти, адгезини, ферменти, блокують патогенну мікрофлору, захищаючи таким чином організм заражених тварин від загибелі.

Результати досліджень. Проведені дослідження демонструють високу біологічну активність продуктів життєдіяльності штамів ПР і можливість створення препарату, який матиме імуностимулюючу та антибактеріальну дію на основі біологічно активних сполук, які секретують мікроорганізми. Крім того, не доцільно при отриманні препаратів ПР проводити відокремлення бактерій від культуральної рідини, звільнюючи їх від продуктів метаболізму.

Висновки. Створення та широке впровадження в медицину високоякісних ПР на основі українських біоваріантів фізіологічної мікрофлори, споріднених до біоценозів жителів України є актуальним та важливим завданням. У зв'язку з цим важливим є розробка комбінованих ПР, що містять різні види бактерій, у першу чергу, біфідобактерії та лактобацили. У багатьох клінічних дослідженнях наведено ефективність комбінацій, що мають комплексний механізм дії, на відміну від монопрепаратів, які дуже часто виявлялися неефективними. ПР-препарати, що містять біфідобактерії та лактобацили, надаватимуть виражений лікувальний ефект по всій довжині кишечника, оскільки вони концентруються, в основному, у товстому відділі кишечника, а лактобактерії – у тонкому [21]. Саме тому метою нашої подальшої роботи є створення високоефективного полікомпонентного ПР-препарату з додаванням пребіотичного компоненту.

Список літератури: 1. Уголев А. М. Теория адекватного питания и трофология. – Санкт-Петербург, 1991. – 305 с. 2. Мечников И. И. Этюды оптимизма. – М., 1988. – 327 с. 3. Parker R. Amin. Nutr. Health. – 1974. – 29. – Р. 4 – 8. 4. Fuller R. Probiotics in man and animals // J. Appl. Bacteriol. 1989. – 66. – Р. 365 – 378. 5. Gibson G. R., Robefroid M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics // J. Nutr. – 1995. – 125, №6. – Р. 1401 – 1412. 6. Шендеров Б. А. Микроэкологическая токсикология: Реальность, проблемы и перспективы // Антибиотики и микроэкология человека и животных. – М., 1988. – С. 32 – 40. 7. Шендеров Б. А., Манвелова М. А., Степанчук Ю. Б. и др. Пробиотики и функциональное питание // Антибиотики и химиотерапия. – 1997. – 42, №7. – С. 30 – 34. 8. Дехтяренко Н. В., Шинкаренко Л. М., Дуган О. М. Критерії відбору пробіотичних штамів мікроорганізмів // Наукові записки. Біологія та екологія. 2007. Т 67. С. 30 – 36. 9. Смирнов В. В., Коваленко Н. К., Подгорский В. С., Сорокулова И. Б. Пробиотики на основе живых культур микроорганизмов.

Микробиол. журн. 2002. – 64, №4. – с. 62 – 80. **10.** Коваленко Н.К. Кисломолочные продукты, их качество и влияние на здоровье человека. Проблемы харчування. 2003. - №1. – с. 78 – 81. **11.** ДСТУ 2212-93 «Молочна промисловість. Молоко і кисломолочні продукти. Терміни та визначення». // Держстандарт України. Київ; 1993. – с. 2. **12.** Григоров Ю. Г., Коркушко О. В., Семесько Т. М. и др. Влияние нового кисломолочного продукта «Лактогеровит» на показатели здоров'я людей старших возрастов // Проблемы старения и долголетия. – 1994. – 4. – С. 105 – 113. **13.** Коваленко Н. К., Касумова С. А., Тиньянова Н. З. и др. Использование селекционированных штаммов молочнокислых бактерий для получения лечебно-профилактических продуктов // Антибиотики и колонизационная резистентность: Труды ВНИИА. – М., 1990. – Вып XIX. – С. – 182 – 185. **14.** Бондаренко В. М., Грачева Н. М. Пробиотики, пребиотики и синбиотики в терапии и профилактике кишечных дисбактериозов // Фарматека. 2003. № 7. С. 56-63. **15.** Охотникова Е. Н. Микробиоценоз кишечника: Основные понятия, нарушения и их коррекция // Фах педіатрія. 2010. №7. С. – 28 – 36. **16.** Смирнов В. В., Коваленко Н. К. и др. Пробиотики на основе живых культур микроорганизмов // Мікробіологічний журнал. 2002, Т.64, №4. С. – 62 – 80. **17.** Н. І.Філімонова, О. М.Дика та ін.. Основні властивості пробіотиків та жовчорезистентність // Клінічна фармація. 2011. – Т.15, №2. С. 38 – 40. **18.** Шендеров Б. А. Медицинская микробная экология и функциональное питание. Т. 1, Т. 3.: Пробиотики и функциональное питание. — М.: ГРАНТЬ, 2001. **19.** Бондаренко В. М., Грачева Н. М., Мацулевич Т. В. Дисбактериозы кишечника у взрослых. — М.: КМК Scientific Press, 2003. — 224 с. **20.** Христич Т. Н. Микробиоценоз кишечника: механизмы развития, клиника дисбиоза и возможная коррекция его нарушений // Сучасна гастроентерологія. 2010. №1(51). С. 86 – 91. **21.** Гордієнко П. А., Чуєшов В. І. Розробка складу та технології таблеток-ядер комбінованого пробіотика // Фармаком. 2009, №3. С. 19 – 23.

УДК 579.61

Биотехнологические аспекты создания препаратов на основе пробиотиков / Хижняк О. С., Краснопольский Ю. М. // Вестник НТУ «ХПИ». Серия «Новые решения в современных технологиях». – Харьков: НТУ «ХПИ». – 2012. - № 44(950). С. 72 – 78.

Рассмотрена классификация пробиотических и пребиотических препаратов, приведен перечень препаратов, представленных на украинском рынке пробиотиков. Показана роль пробиотических препаратов, выполняемая ими в организме. Отдельно представлены характеристики бифидобактерий и лактобацилл. Рассмотрены аспекты создания препаратов на основе бесклеточных компонентов пробиотиков. Доказана необходимость разработки комбинированных препаратов на основе местных биовариантов. Из.: 0. Библиогр.: 21 назв.

Ключевые слова: пробиотики, пребиотики, симбиотики.

UDC 579.61

Biotechnological aspects of creating drugs based on probiotics/ Khizhnyak O., Krasnopolsky Y. // Bulletin of NTU "KhPI". Subject issue: New decisions of modern technologies. – Kharkov: NTU "KhPI". – 2012. - № 44(950). P. 72 – 78.

Reviewed the classification of drugs, a combination of prebiotic and Probiotic is a list of the products presented on the Ukrainian market of probiotics. The role of probiotic preparations carried out by them in the body. Separately considered characteristics of bifidobacteria and Lactobacilli. Reviewed aspects of production drugs on basis of noncellular components of probiotics. Demonstrated the need to develop combined preparations on the basis of local biovariants. . Im.: 0: DBMS is drawn is developed.: 21

Keywords: probiotics, prebiotics, simbiotiks.

Надійшла до редакції 31.07.12