

ӘЛ-ФАРАБИ АТЫНДАҒЫ ҚАЗАҚ ҰЛТТЫҚ УНИВЕРСИТЕТІ

ӘОЖ 60: 616.34 (043)

Қолжазба құқығында

МАСИРБАЕВА АЙГЕРИМ ДУЙСЕНГАЛИЕВНА

**«Адамның ішек инфекциясына қарсы отандық бірегей дәрілік препаратының
технологиясын әзірлеу»**

8D05105- Биотехнология

Философия докторы (PhD)

дәрежесін алу үшін дайындалған диссертация

Отандық ғылыми жетекші:
б.ғ.д., профессор, академик
Саданов А.К.

Шетелдік ғылыми кеңесші:
Айнур Гуль Карахан, профессор
Сулеймен Демирел Университеті

Қазақстан Республикасы

Алматы, 2025

МАЗМҰНЫ	
БЕЛГІЛЕР МЕН ҚЫСҚАРТУЛАР.....	3
КІРІСПЕ	4
1.ӘДЕБИЕТТЕРГЕ ШОЛУ	10
1.1 Жедел ішек инфекциялық аурулары.....	10
1.2 Антибиотиктердің рөлі және олардың қолдануын шектеу.....	13
1.3 Адамның ішек инфекцияларын емдеуге арналған экологиялық таза пробиотикалық препараттар.....	15
1.4 Пробиотикалық препараттарды өндіру технологиясы.....	19
1.5 Пробиотикалық препараттардың клиникаға дейінгі сынақтарымен клиникалық зерттеу мәселелері.....	32
2. ЗЕРТТЕУ ОБЪЕКТІЛЕРІ, МАТЕРИАЛДАРЫ МЕН ӘДІСТЕРІ	
2.1 Зерттеу объектілері.....	34
2.2 Зерттеу материалдары.....	34
2.3 Зерттеу әдістері.....	34
2.3.1 Лактобактериялардың морфологиялық, дақылдық, биохимиялық қасиеттерін зерттеу және идентификациялау әдісі.....	37
2.3.2 БФС лиофильді кептіру және микробиологиялық тазалықты анықтау әдісі.....	38
2.3.3 Антагонистік белсенділікті анықтау әдісі.....	39
2.3.4 БФС және пробиотикалық препараттың сынамалық серияларын өндіру әдісі.....	40
2.3.5 Клиникаға дейінгі зерттеулерді жүргізу әдісі.....	42
2.3.6 Клиникалық зерттеулерді жүргізу әдісі.....	43
3.ЗЕРТТЕУ НӘТИЖЕЛЕРІ ЖӘНЕ ОЛАРДЫ ТАЛҚЫЛАУ	
3.1 Пробиотикалық дәрілік препараттың белсенді фармацевтикалық субстанциясын (БФС) жасау.....	42
3.1.1 БФС құрамындағы сүтқышқылды бактериялардың антагонистік белсенділігін анықтау.....	42
3.1.2 БФС өндіру технологиясын әзірлеу.....	49
3.2 «АС-Пробионорм» пробиотикалық дәрілік препаратын өндіру технологиясын әзірлеу.....	66
3.3 «АС-Пробионорм» пробиотикалық препаратының клиникаға дейінгі кезеңдері.....	75
3.4 Дәрілік препараттың клиникалық кезеңдері (1-ші және 2-ші кезеңдері).....	87
3.4.1 Клиникалық зерттеулердің 1-ші кезеңін жүргізу.....	87
3.4.2 Клиникалық зерттеулердің 2-ші кезеңін жүргізу.....	89
ҚОРЫТЫНДЫ.....	94
ПАЙДАЛАНЫЛҒАН ӘДЕБИЕТТЕР ТІЗІМІ.....	95
ҚОСЫМША А.....	110

БЕЛГІЛЕР МЕН ҚЫСҚАРТУЛАР

ЖИИ- жедел ішек инфекциялары

АІЖ-асқазан ішек жолдары

ДДСҰ- дүниежүзілік денсаулық сақтау ұйымы

ГУС- гемолитикалық уремиялық синдромы

ЕПА- ет пептонды агар

БФС- белсенді фармацевтикалық субстанция

НД- нормативтік документ

ҚМС- (кұрғақ майсыздандырылған сүт)

МБТ –микробиологиялық тазалық

ЕПС - (ет-пептонды сорпа)

КТБ- колония түзуші бірлік

ББҚ– биологиялық белсенді қоспа

КІРІСПЕ

Жұмыстың жалпы сипаттамасы

Диссертациялық жұмыс – белсенді фармацевтикалық субстанцияны (БФС) және оның дайын түрін алу технологиясын құру және дамытуға, сондай-ақ тышқандармен егеуқұйрықтарда клиникаға дейінгі зерттеулер жүргізуге және адамда 1-ші және 2-ші клиникалық зерттеулерді өткізуге бағытталған адамның ішек инфекцияларына қарсы «АС-Пробионорм» пробиотикалық препаратының технологиясын дамытуға бағытталған кешенді зерттеу.

Жүргізілген зерттеулер барысында лиофильді кептіру ортасының компоненттері бар пробиотикалық бактериялардың микробтық массасынан тұратын белсенді фармацевтикалық субстанцияны өндіру технологиясын және магний стеараты қосылған БФС негізіндегі дәрілік пробиотикалық препараттың дайын түрін өндіру технологиясын қамтитын өндіру технологиясы әзірленді.

«АС-Пробионорм» препаратына клиникаға дейінгі зерттеулер оның ішек таяқшаларына, сальмонеллаларға және стафилококктарға қарсы фармакологиялық белсенділігін бағалау; коммерциялық пробиотик «Лациодофил-WM» салыстырғанда емдік-профилактикалық тиімділігін зерттеу; коммерциялық Ферталь® препаратына қатысты өткір уыттылықты зерттеу; созылмалы уыттылықты зерттеу; зерттелетін препаратты өндіру үшін қолданылатын штамдарда асқазан сөлінің және өт әсеріне төзімділік сынамасын жүргізе отырып, зерттелетін препаратта фагтардың болуын анықтау үшін жүргізілді. «АС-Пробионорм» пробиотикалық препаратының клиникаға дейінгі сынақтары кезінде оның қауіпсіздігі мен биологиялық тиімділігі расталды. Пробиотикалық препараттың қауіпсіздігі мен тиімділігі *in vitro* және тәжірибелік жануарлар үлгілерінде *in vivo* дәлелденгендіктен, адам ағзасына емдік және профилактикалық әсерін одан әрі бағалау мүмкін болды.

Препараттың клиникалық сынағының бірінші кезеңі 20 дені сау еріктілердің қатысуымен жүргізілді, нәтижелері оның төзімділігі мен қауіпсіздігі зерттелді. Препаратты клиникалық сынаудың екінші кезеңі дисбактериозбен ауыратын 210 науқастың қатысуымен өткізілді, нәтижелері оның тиімділігі мен қауіпсіздігін зерттеу туралы мәліметтерді берді. Жұмыс барысында микробиологиялық молекулалық-генетикалық, фармакобиотехнологиялық әдістер қолданылды.

Тақырыптың өзектілігі

Жедел ішек инфекциялары (ЖИИ) әлем бойынша, соның ішінде Қазақстанда да, жұқпалы аурулар құрамында әлі де алдыңғы қатарда тұр. ДДСҰ сарапшыларының бағалауынша, жыл сайын 600 миллион адам, яғни әлемдегі әр оныншы адам, ластанған тағамдарды тұтынғаннан кейін сырқаттанады, ал 420 000 адам осы аурудың салдарынан көз жұмады. ЖИИ-дің ерекшелігі – жұғу көрсеткішінің жоғары болуында, бұл аурумен ересектер де, балалар да жиі ауырады [1-5].

Қазақстанда да ішек инфекцияларымен сырқаттанушылық өсіп отыр. Денсаулық сақтау ұлттық орталығы – ДСҰО деректері бойынша ДСҰО-ның

эпидемиологтары ішек инфекцияларымен ауыратындар санының артқанын тіркеген. 2024 жылдың алғашқы бес айында республикасы бойынша 4986 жедел ішек инфекциясы жағдайы тіркелген (2023 жылы – 4764 жағдай), сонымен қатар сальмонеллездің – 316 жағдайы (2023 жылы – 405), дизентерияның – 79 жағдайы (2023 жылы – 84), ротавирусты энтериттің – 765 жағдайы (2023 жылы – 623) анықталған.

Елде жүргізіліп жатқан жедел ішек инфекцияларына қатысты санитарлық-эпидемиологиялық мониторинг өткен жылдың сәйкес кезеңімен салыстырғанда сырқаттанушылықтың өсіп келе жатқанын көрсетуде.

Ауру көрсеткіші 100 мың халыққа шаққанда 24,87-ні құрады (2022 жылы – 24,03). Сонымен қатар, ауруға шалдығу ай сайын артып келеді, әсіресе 14 жасқа дейінгі балалар арасында – бұл топтағы көрсеткіш 67,07-ге жеткен (2023 жылы – 61,94), яғни 8,28%-ға өскен [6].

Ішек инфекцияларының кең таралуы, орташа ауыр және ауыр түрлерінің жиі кездесуі, сондай-ақ асқынулардың болуы — бұл аурулар тобын емдеу тактикасын оңтайландыру жолдарын іздеуді қажет етеді.

Жұқпалы ауруларды емдеудің қиындығы антибиотиктер мен химиотерапевтік препараттарды жаппай және ретсіз пайдалануға байланысты, бұл патогендердің дәрі-дәрмекке төзімділігінің дамуына алып келді [7]. Қазіргі уақытта ЖИИ-ді емдеудің заманауи стратегиясы ішекте орналасқан инфекциялық ошақты жою мақсатында ішек микробиоценозын түзетуге бағытталған емдік шараларға басымдық береді.

Осыған байланысты соңғы уақытта әлемде ішек және несеп-жыныс жолдары инфекцияларын емдеуде антибиотиктердің орнына асқазан-ішек жолдарының симбионт микроорганизмдері негізіндегі пробиотиктерді қолдану жиілеп отыр. Ең кең таралғандары – сүтқышқылды және бифидобактериялар, олардың патогендік әлеуеті сарапшылардың пікірінше, жалпы қабылданған дозаларда ауыз қуысы арқылы қабылдауға жеткілікті түрде төмен. Бұл препараттар патогендік микрофлораны тез басып, организмнің иммундық жүйесін жоғарылатады [8].

Осыған байланысты, жақында әлемде ішек және урогенитальды инфекцияларды емдеу үшін антибиотиктердің орнына асқазан - ішек жолдарының симбионтты микроорганизмдеріне негізделген пробиотиктерді қолдану ұсынылады. Сүтқышқылдары мен бифидобактериялар ең көп қолданылады, олардың патогендік әлеуеті осы саладағы сарапшылар жалпы қабылданған дозаларда ауыз қуысы арқылы қолдану үшін жеткілікті төмен деп санайды. Бұл препараттар патогендік микрофлораны тез басады, дененің иммундық жүйесін белсендіреді

Сүтқышқылы бактериялары мен бифидобактериялар ең көп қолданылады, өйткені стандартты дозаларда ішке қабылдағанда олардың патогенділігі өте төмен деп бағаланады. Бұл микроорганизмдер патогендік бактерияларды тез басып, иммундық жүйені ынталандырады. Аталған пробиотикалық препараттар патогендік микрофлораны белсенді түрде тежейді

және адам ағзасының иммундық жүйесін жақсартады [9]. Пробиотиктерді тиімді дозада қолдану адам ағзасына оң әсер етуі мүмкін [10].

Пробиотиктер дисбиоз кезінде ішек микрофлорасын реттеу мен сақтауға, сондай-ақ оның бұзылуын алдын алуға қолданылады [11,12].

Пробиотиктерді жедел диареяны емдеуде қолдануға қатысты жинақталған ғылыми деректер олардың тиімділігін дәлелдеп, бұл топтағы препараттарды Еуропалық балалар гастроэнтерологиясы, гепатологиясы және тамақтану қоғамы (European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition-ESPGHAN) мен Еуропалық балалар жұқпалы аурулары қоғамының (European Society for Pediatric Infectious Disease-ESPID) тәжірибелік ұсынымдарына енгізуге мүмкіндік берді [13].

Пробиотиктер кейбір жұқпалы аурулар кезінде антимикробтық препараттарды қолдану қажеттілігін азайту үшін де пайдалы. Зерттеулер көрсеткендей, пробиотиктерді антибиотиктермен бірге қолдану антимикробтық терапияның ұзақтығын қысқартуға ықпал етеді [14–15].

Қазіргі уақытта нарықта тірі микроорганизмдер негізіндегі пробиотикалық препараттар көптеп ұсынылған. Алайда ішек инфекцияларына қарсы белгілі пробиотикалық құралдар әрдайым тиімді бола бермейді [16, 17]. Мұның себебі, микробқа қарсы әсер етудің жеткіліксіз спектрі; арнайы патогендерге антагонистік штамдар таңдалмауымен байланысты.

Сонымен қатар, фармацевтикалық нарықта ұсынылған пробиотиктерге жүргізілген талдаулар олардың қаптамасында көрсетілген мәліметтер шындыққа әрдайым сәйкес келмейтінін көрсетіп отыр.

Қазақстанда отандық пробиотикалық препараттар өндірілмейді, негізінен импорттық өнімдер пайдаланылады. Осыған байланысты олардың өндірісіне қатысты отандық деректер өте аз.

Пробиотикалық препараттарды өндіру — бұл көп еңбекті талап ететін, бірнеше кезеңнен тұратын күрделі процесс. Пробиотикалық микроорганизмдер емдік препараттың немесе биологиялық белсенді қоспаның құрамына енгізілмес бұрын, олар бірқатар талаптарға сәйкестігі тұрғысынан тексерілуі тиіс [18].

Таңдалатын штамдардың тиімділігі мен қауіпсіздігі ғылыми негізделген болуы, жақсы технологиялық қасиеттерге ие болуы, өндірісте масштабтауға бейімделуі, сондай-ақ центрифугалау, кептіру және сақтау кезінде тіршілік етуі мен функционалдығын жоғалтпауы қажет. Асқазан-ішек жолының жоғарғы бөліктерінде тіршілік етуі жоғары және аш ішек пен тоқ ішекте белсенділігі - міндетті талаптардың қатарында.

Патогендерге қарсы тиімділігімен қатар жоғарыда аталған барлық қасиеттерге ие микроорганизмдерді іріктеу - ұзақ әрі күрделі процесс [19, 20].

Сүтқышқылды бактериялар құрамын қамтитын препараттарды өнеркәсіптік өндіру-бұл күрделі процесс. Пробиотикалық препараттарды өндірудегі негізгі мәселелердің бірі-таңдалған штамның немесе штамдар қауымдастығының бастапқы қасиеттерін сақтай отырып, биомассаны жинақтау

болып табылады. Биомассаны масштабтап алу әдетте ферментация әдісімен жүзеге асырылатындықтан, бұл процесті мұқият жоспарлау мен бақылау қажет.

Ішек инфекцияларына қарсы отандық препарат технологиясын өндіру жоғары ғылыми және практикалық маңыздылыққа ие, өйткені ол фармацевтикалық дамуды, микробиологиялық зерттеулерді, тиімділік пен қауіпсіздікті клиникаға дейінгі және клиникалық бағалауды қамтитын тәсілді қажет етеді, Қазақстанның денсаулық сақтау жүйесін жетілдіруге, фармацевтикалық тәуелсіздігін нығайтуға және халықтың денсаулығын жақсартуға үлес қосады.

Зерттеу жұмысының мақсаты:

Адамның ішек инфекцияларына қарсы дәрілік пробиотикалық препараттың технологиясын әзірлеу.

Зерттеу міндеттері:

1. Лактобактериялардың морфологиялық, дақылдық, биохимиялық қасиеттерін зерттеу және идентификациялау.
2. Пробиотикалық дәрілік препараттың белсенді фармацевтикалық субстанциясын (БФС) және оның дайын түрін өндіру технологиясын әзірлеу
3. Жануарлардың эксперименттік модельдерінде препараттың клиникаға дейінгі сынақтарын жүргізу.
4. Препараттың адамдарға клиникалық сынақтарын жүргізу (1 және 2 кезеңдері)

Зерттеу объектілері:

БФС жасау үшін ішек ауруларының қоздырғыштарына қарсы жоғары антагонистік белсенділікке ие сүтқышқылды бактериялар-*Lactobacillus fermentum* 30 және *Lactobacillus cellobiosus* 36 қолданылды.

Сүтқышқылды бактерияларының *Lactobacillus fermentum* 30 және *Lactobacillus cellobiosus* 36 негізіндегі «АС-Пробионорм» пробиотикалық дәрілік препараты болды.

Зерттелген *L. fermentum* 30+ *L. cellobiosus* 36 дақылдарының ассоциациясының антагонистік белсенділігі келесі тест-дақылдарға қатысты анықталды: *Escherichia coli* ATCC: 8739тм, *Escherichia coli* ATCC: 11229тм, *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovar *typhimurium* ATCC: 14028тм, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *typhimurium* ATCC: 29630тм, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-p, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* ATCC:10031тм, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC:9027тм.

«АС-Пробионорм» пробиотикалық дәрілік препаратының клиникаға дейінгі сынақтары зертханалық ақ тышқандарда, салмақтары 30-32 г (лат. *Mus musculus*) мен егеуқұйрықтарда, салмағы 180-200 г (лат. *Rattus*) жүргізілді. «АС-Пробионорм» пробиотикалық дәрілік препаратының 1,2 клиникалық кезеңдерінде субъект ретінде адамдар қатысты.

Зерттеу әдістері

Диссертациялық жұмыс барысында тәжірибелер зертханалық жағдайда микробиологиялық әдістер, антагонистік белсенділігі антагонизм әдістері-диффузды ойықтар, перпендикуляр сызықтары, қос қабатты агар әдісімен анықталды. Лактобактериялардың өндірістік штамдарының морфологиялық, дақылдық және биохимиялық қасиеттерінің болуымен, сондай-ақ олардың молекулалық-генетикалық сәйкестендірілуімен Сангер әдісімен геннің 16s rRNA реттілігі арқылы анықталды. Микроорганизмдерді өсіріп биомассаны алу үшін қоректік орта қосып ферментация әдісімен жүргізіледі, ДНҚ-ның сандық талдауы NanoDrop ND 2000 спектрофотометрінің көмегімен 260 нм толқын ұзындығында жүргізілді, сонымен қатар 1% агарозды геледе электрофоретикалық әдіспен ДНҚ-ны сапалы бағалау жүргізілді. t-студенттік критерий (t test Student), параметрлік және Мет: U-критерийі не-Уитни (Mann Whitney u test), бояу критерийі-Уоллис (Kruskal Wallis test H), хи-квадрат критерийі (Chi-squared test) клиникалық зерттеулеріне қолданылды.

Зерттеудің ғылыми жаңалығы мен теориялық маңыздылығы:

ЖИИ-мен күресте пробиотикалық препараттардың тиімділігін арттыру, дұрыс таңдалған микробтық құрамның және оларды өндірудің оңтайлы технологиясының арқасында олардың әсер ету спектрін кеңейту бойынша зерттеулер өзекті болып табылады.

Диссертациялық жұмысты орындау барысында:

1. Лактобактериялардың морфологиялық, дақылдық, биохимиялық қасиеттерін зерттеу және идентификациялау жүргізілді.

2 «АС-Пробионорм» пробиотикалық дәрілік препаратының белсенді фармацевтикалық субстанциясын (БФС) және оның дайын түрін өндіру технологиясы алғаш рет әзірленді.

3 Алғаш рет эксперименттік жануарларға «АС-Пробионорм» препаратының клиникаға дейінгі сынақтарының нәтижелері туралы зерттеулер жүргізілді.

4 Алғаш рет «АС-Пробионорм» (1-2 кезеңдері) адамдарға препараттың клиникалық сынақтарының нәтижелері туралы зерттеулер жүргізілді.

Ішек инфекцияларын емдеуде тиімділікті арттыру үшін отандық пробиотикалық препараттың өндіріс технологиясы әзірленді.

Дайындалған технология, клиникаға дейінгі және клиникалық зерттеулерді жүргізу және өндіру ұйымдастырумен бірге Қазақстанның ішкі фармацевтикалық нарығын дамытуға ықпал етеді. Жаңа отандық пробиотикалық препараттың өндірісі Қазақстанда ішкі нарықта және басқа елдерге экспорттауға мүмкіндік береді.

Практикалық құндылықтарын зерттеу.

Адамның ішек инфекцияларын емдеудің тиімділігін арттыру үшін жаңа отандық «АС-Пробионорм» дәрілік препаратының өндіру технологиясы әзірленді. Клиникаға дейінгі және клиникалық зерттеулер жүргізе отырып әзірленген технология, өндірісті одан әрі ұйымдастыру Қазақстанның ішкі фармацевтикалық нарығын дамытуға ықпал ететін болады. Бұл препараттың

өндірісі Қазақстанда пайдалану үшін, сондай-ақ басқа елдерге экспорттау үшін ұйымдастырылуы мүмкін.

Қорғауға ұсынылатын негізгі қағидалар:

1. Пробиотикалық дәрілік препараттың және оның дайын түрінің белсенді фармацевтикалық субстанциясын (БФС) өндіру технологиясы адамның ішек инфекцияларын емдеу үшін тиімді сапалы пробиотикалық препаратты шығаруды қамтамасыз етеді.

2. Пробиотикалық препараттың клиникалық сынақтары оның биологиялық белсенділігін, қауіпсіздігі мен тиімділігін эксперименттік жануарларда дәлелдеуге мүмкіндік береді.

3. Препараттың клиникалық сынақтары (1-2 кезеңдері) адамдарда оның төзімділігін, қауіпсіздігі мен тиімділігін дәлелдейді.

Жұмыстың ғылыми зерттеу бағдарламасымен байланыстылығы

Диссертациялық жұмыс **AP14870162** «Адамның ішек инфекцияларына қарсы кең спектрлі отандық «АС-Пробионорм» пробиотикалық дәрілік препаратын клиникалық сынақтан өткізу» (2022-2024 жж.) тақырыбындағы ғылыми жоба аясында орындалды.

Жұмыстың апробациясы:

Диссертациялық жұмыстың материалдары келесі конференцияларда баяндалып, талқыланды:

- Халықаралық Фараби оқулары.Халықаралық ғылыми конференция материалдары «Фарабиәлемі» (2024 ж., 6-8 сәуір, Алматы).
- М.А.Айтхожин атындағы Молекулалық биология және биохимия институтының 40 жылдығына арналған жас ғалымдар халықаралық ғылыми конференциясы(2023 ж., Алматы).

Басылымдар:

Диссертацияның негізгі мазмұны 12 баспа жұмысында көрініс тапқан, оның ішінде 4 мақала Web of Science және Scopus мәліметтер базаларында индекстелетін журналдарда (Процентиль 56, Q2), 6 мақала республикалық ғылыми журналдарда, 2 тезис халықаралық конференциялар материалдарында және 1 Өнертабысқа ұсынылған.

Қорғауға ұсынылатын ғылыми жұмыс нәтижелерінің жасақталуына қосқан докторанттың жеке үлесі:

Зерттеу жұмысының нәтижелері, әдеби деректерге шолу, мақсат-міндеттерін анықтау, тәжірибелік зерттеулерді жүргізу және алынған нәтижелерді талдау, статистикалық өңдеу автордың жеке қатысуымен орындалды.

Диссертация көлемі мен құрылымы:

Диссертация 100 беттен, белгілеулермен қысқартулар, кіріспе, әдебиеттерге шолу, зерттеу объектілері, материалдары мен әдістері, зерттеу нәтижелері мен талқылау, қорытынды бөлімдерінен, 203 пайдаланылған әдебиет тізімінен, 17 кестеден, 13 суреттен тұрады.

1. ӘДЕБИЕТТЕРГЕ ШОЛУ

1.1 Жедел ішек инфекциялық аурулары

Жедел ішек инфекциялары (ЖИИ) – әлемдегі ең кең таралған аурулардың бірі. Дүниежүзілік денсаулық сақтау ұйымы (ДДСҰ) сарапшыларының зерттеулері бойынша, жыл сайын 600 миллион адам, яғни әлемдегі әрбір оныншы адам, ластанған азық-түлікті тұтынғаннан кейін ауырады, ал 420 000 адам осы аурудан көз жұмады. Бұл инфекциялар балалар мен ересектер арасында кең таралған. Ішек инфекциялары – бұл ас қорыту жолдарының (АҚЖ) жедел жұқпалы аурулары, олар жалпы интоксикация белгілерімен және инфекция қоздырғышының АҚЖ-ға түсуі арқылы энтеральды механизммен беріледі [21-23].

Ішек аурулары дамушы елдерде нәрестелер мен кішкентай балалар арасындағы сырқаттанушылық пен өлім-жітімнің негізгі себептерінің бірі болып қала береді. Вирустық патогендерден басқа, ішек инфекцияларының негізгі қоздырғыштары – бактериялық патогендер. Адамның ас қорыту жолында кездесетін бактериялар негізінен *Enterobacteriaceae* тұқымдасына жатады, олардың көпшілігі ішек жолдарының қалыпты флорасын құрайды, дегенмен, адамның денсаулық жағдайы өзгерген кезде патогенді әсері бар бактериялар, мысалы, *E. coli* және *Shigella*, ағзада ішек инфекциясын тудырады. Бұл инфекция нәжіс құрамының өзгеруімен, диареямен, ішектен қан кетуімен және басқа да белгілермен көрініс береді, ал ауыр жағдайларда өмірге қауіп төндіруі мүмкін [24].

Дамыған елдерде әр адам жылына кемінде бір рет жедел диарея ауруын бастан өткереді. Балалар арасында аурушандық жоғары және аурудың клиникалық көрінісі айқынырақ болады. Әлем бойынша жыл сайын шамамен 1,5 миллиард жағдай және 1,5-2,5 миллион жедел ішек инфекцияларынан (ЖИИ) болатын өлім жағдайлары тіркеледі, негізінен 5 жасқа дейінгі балалар арасында және дамушы елдерде жиі кездеседі [25].

Зерттеулер бойынша, Сахараның оңтүстігіндегі Африка елдерінде кемінде бір түрдегі ішек паразитімен 250 миллионға дейін адам жұқтырылған [26]. Ішек инфекциясының таралуы мектеп оқушыларыарасында Орталық Суданда 90% [27], Танзанияда 48,7% [28], Буркина-Фасода 84,7% [29] және Руандада 50,0% [30] құрайтыны туралы мәліметтер бар. Эфиопияда ЖИИ таралу деңгейі аймаққа байланысты әртүрлі болып келеді [31, 32]. Мысалы, *Ascaris lumbricoides* (*A. lumbricoides*) инфекциясы Эфиопияның таулы аймақтарында 29%, қоңыржай климатты өңірлерде 35% және ойпаттарда 38% жиілікпен кездескен [33].

Ресейде жедел ішек инфекцияларымен сырқаттанушылық деңгейі 2021 жылы 2020 жылмен салыстырғанда 2,5 есе артқан. ЖИИ ошақтарының саны да ұлғайды. Коронавирус пандемиясының бірінші жылында Ресейде ЖИИ-дің 71 ошағы тіркелген болатын, бұл соңғы 11 жылдағы ең төменгі көрсеткіш еді. Ал 2021 жылы мұндай ошақтардың саны 184-ке жеткен. Ауырғандар саны да 980-ден 2306 адамға дейін артты. Салыстыру үшін: 2019 жылы 213 ошақ анықталып, 2422 адам ауырған болатын. Референс-орталықтың мәліметтері

бойынша, 2021 жылы ЖІИ топтық сырқаттанушылық ошақтары 15 өңірде тіркелмеген (2020 жылы – 31 өңірде) [34].

2021 жылдың қаңтар-желтоқсан айларында Қазақстан Республикасында тіркелген инфекциялық аурулар ішінде ең көп таралғаны – жедел ішек инфекциялары, олармен 8,9 мың адам ауырған. 100 мың халыққа шаққандағы ең жоғары сырқаттанушылық көрсеткіштері Қызылорда облысында – 108,7 жағдай, Ақтөбе облысында – 101,6 жағдай және Жамбыл облысында – 97,1 жағдай тіркелген [35].

Дүниежүзілік денсаулық сақтау ұйымының (ДДСҰ) диареялық аурулармен күресу бағдарламасы жедел ішек инфекциясынан болатын өлім-жітімді, әсіресе ауыр эксикозбен байланысты жағдайларды біршама төмендетті. Алайда, ЖІИ-ның қолайсыз клиникалық нәтижелері әлі де жоғары деңгейде қалып отыр. Бұл мәселе аурудың созылмалы ағымы мен өлім-жітім себептерін зерттеуді, сондай-ақ тиімді емдеу әдістерін іздеуді өзекті мәселе ретінде қарастырады [36, 37].

Адамдар арасында жиі кездесетін инфекциялардың бірі – ішек аурулары, олардың қоздырғыштары *Escherichia coli* (*E. coli*), сальмонеллалар, ал кейбір жағдайларда *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Edwardsiella* және ашытқы тәрізді саңырауқұлақтар болып табылады.

Патогенді *E. coli*-дің бес негізгі ішкі түрі бар, олардың ішінде ең жоғары патогенділігімен ерекшеленетіндері – энтеротоксигенді *E. coli* (ЕТЕС) және энтерогеморрагиялық *E. coli* (ЕНЕС). Бұл бактериялар алдымен ішек эпителиалдық жасушаларына адгезия жасап, бактерияларын фимбриялар арқылы колонизациялайды, содан кейін жасушалардың қызметін бұзатын көп мөлшерде токсиндер бөледі. ЕТЕС негізінен диарея тудырса, ЕНЕС геморрагиялық колит пен гемолитико-уремиялық синдромның (ГУС) жаһандық өршуіне себеп болған [38-41].

Тағы бір кең таралған бактерия, ол – *Shigella*, оған *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii* және *Shigella sonnei* жатады. *Shigella* негізінен жедел ішек инфекциясын тудырады, оның клиникалық белгілері жеңіл су тәрізді диареядан бастап, ауыр бактериалды дизентерияға дейін өзгеруі мүмкін. Бұл патогенді бактерия антибиотиктерге жоғары төзімділігімен ерекшеленеді [42].

Salmonella- әлемдегі диареялық аурулардың төрт негізгі қоздырғышының бірі. Көптеген сальмонеллездік инфекциялар жеңіл түрде өтсе де, кей жағдайларда өмірге қауіп төндіруі мүмкін. Аурудың ауырлығы науқастың ағзасының ерекшеліктеріне және *Salmonella* серотипіне байланысты болады [43].

Финляндиялық зерттеушілер *Enterobacteriaceae* тұқымдасына жататын бактериялардың ішек микробиомында көп мөлшерде болуы адамдардың өлім қаупінің жоғарылауымен байланысты екенін анықтады (15 жылдық бақылау кезеңі алынған). Бұған дейінгі зерттеулерде *Enterobacteriaceae* бактерияларының көптігі мен ішек қатерлі ісігінің арасындағы байланыс

дәлелденген. Сонымен қатар, ішектің қабыну аурулары энтеробактериялардың шамадан тыс өсуіне ықпал ететіні көрсетілген [44].

Citrobacter- ауруханаішілік ангиогендік инфекциялар мен несеп-жыныс жолдарының инфекцияларының жиі кездесетін себептерінің бірі. Бұл бактерия гастроэнтерит пен токсикоинфекциялардың, аурухана ішілік инфекциялардың, менингиттің, ми абсцестерінің, урологиялық аурулардың, іріңді инфекциялар мен сепсисінің өршуіне әкелуі мүмкін. Соңғы жылдары әлемде, әсіресе балалар мекемелерінде, *Citrobacter* тудыратын жаппай улану жағдайлары периодты түрде тіркелуде. Олардың негізгі себебі – тағам дайындау технологиясының бұзылуы [45, 46].

Proteus туысына жататын үш негізгі түр- *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris* және *Proteus penneri* адам үшін патогенді болып табылады, олардың ішінде *Proteus mirabilis* инфекциялардың 75–90%-ын тудырады. Протеймен байланысты жедел ішек инфекциялары көбінесе иммунитеті төмен немесе әлсізденген ерте жастағы балаларда кездеседі. Протей инфекциясының пайда болуына антибиотиктерді бақылаусыз қолдану да ықпал етуі мүмкін. Ауру әдетте гастроэнтерит, гастрит және колиэнтерит түрінде өтеді [47, 48].

Эдвардсиелла (*Edwardsiella*)- *Enterobacteriaceae* тұқымдасына жататын бактериялар тобы. Бұл бактериялар көптеген жылы қанды жануарлар арасында ауру қоздырғыштары ретінде белгілі. Адамдарда *Edwardsiella* инфекциясы негізінен асқазан-ішек жолдарына әсер етеді, сирек тері зақымдануларын тудырады, ал кейбір жағдайларда сепсиске әкелуі мүмкін [49].

Қалыпты жағдайда *Candida* туысына жататын микроскопиялық саңырауқұлақтар асқазан-ішек жолдарының шырышты қабатында аз мөлшерде болуы мүмкін. Бірақ жергілікті немесе жалпы иммунитеттің төмендеуі кезінде ішек флорасының тепе-теңдігі бұзылып, саңырауқұлақтардың қарқынды өсуіне жағдай жасалады. Көп жағдайда *Candida* инфекциясы инвазиялық емес формада өтеді, яғни ішек саңылауында дамып, тіндерге терең енбейді. Өмірлік әрекеті барысында бұл саңырауқұлақтар токсиндер бөліп, шырышты қабатты тітіркендіреді, ішек дисфункциясына әкеледі және жалпы жағдайдың нашарлауына себеп болады [50].

Қазіргі заманғы көзқарасқа сәйкес, ЖИИ терапиясы кешенді және кезеңдік болуы керек, ал дәрілік заттарды таңдау аурудың этиологиясы, ауырлығы, фазасы, клиникалық формасы, науқастың жасы және оның жалпы жағдайын ескере отырып жүргізілуі қажет. ЖИИ емдеу кешені келесі құрамдас бөліктерді қамтиды:

- Диеталық терапия
- Этиотропты терапия (аурудың себебін жоюға бағытталған)
- Патогенетикалық терапия (аурудың даму механизмін басуға арналған)
- Симптоматикалық терапия (симптомдарды жеңілдетуге бағытталған)

Инфекциялық процестің әртүрлі кезеңдерінде түрлі терапиялық міндеттер қойылады:

- Жедел кезеңде – инфекция қоздырғышымен күресу, оның токсиндерін организмнен шығару, интоксикация синдромын жою.

- Қалпына келтіру кезеңінде – зақымдалған функцияларды қалыпқа келтіру және ағзаның толықтай оңалуына ықпал ету.

Емдеу барысында науқастың жасына және ауру ағымының ерекшеліктеріне байланысты терапияға түзетулер енгізілуі тиіс. Бұл ретте тек қажетті дәрілерді ғана тағайындау ұсынылады.

Ішек инфекцияларын емдеуде ең жиі қолданылатын әдістер: антибиотиктер мен вирусқа қарсы препараттар мен қолдаушы терапия.

Этиотропты терапия ЖІИ емдеудің негізгі элементі болып табылады. Көпжылдық клиникалық зерттеулердің нәтижелері бойынша, этиотропты терапияны тағайындауда сараланған ең тиімді тәсіл екені анықталған. Мұнда инфекция қоздырғышының түрі, патогенезі, аурудың ауырлығы, фазасы және науқастың иммундық реактивтілігі ескеріледі [51-54].

ЖІИ этиотропты терапиясы тек антибиотиктер мен химиотерапиялық препараттарды ғана емес, сонымен қатар келесі құралдарды да қамтиды: спецификалық бактериофагтар, энтеросорбенттер (Смекта), энтеральды иммуноглобулиндер (КИП, Кипферон, антиротавирустық иммуноглобулин), лактоглобулиндер (дизентериялық, коли-протейлі және т.б.).

ЖІИ кешенді және ғылыми негізделген емдеу әдістерін қолдану аурудың ағымын жеңілдетуге, асқынулардың алдын алуға және науқастардың тезірек сауығып кетуіне ықпал етеді.

Вакцинация ішек инфекцияларымен күресудің маңызды әдістерінің бірі болып табылады, әсіресе белгілі бір патогендерге қарсы күресуде. Алайда, қазіргі уақытта тиімділігі жоғары вакциналарда, соның ішінде полимерлі вакциналар, адамның асқазан-ішек инфекцияларынан толық қорғалуын қамтамасыз ете алмайды [55-57]. Бұл мәселенің негізгі себептері: патогенді бактериялардың түрге тән ерекшеліктері, антигендердің әлсіз иммуногендігі, вакцинаның асқазан-ішек жолдары арқылы енгізілуіне байланысты шектеулер.

Осы мәселелерді шешудің бір жолы – табиғи ресурстарды, соның ішінде дәрілік өсімдіктерді қолдану. Мысалы, Германияның Bionorica AG компаниясы шығарған Имупрет препараты өсімдік тектес кешенді дәрі ретінде қабынуға қарсы әсер етеді, шырышты қабықтың ісінуін азайтады, ауырсынуды жеңілдетуге көмектеседі [58]. Дегенмен, дәрілік өсімдіктерді пайдалану ішек ауруларын толықтай емдей алмайды, олар тек симптомдардың жеңілдеуіне ықпал етеді.

1.2 Антибиотиктердің рөлі және олардың қолданылуын шектеу

Көп жылдар бойы жедел диареяны емдеудің негізгі әдісі антибиотиктерді пайдалану болып саналды. Алайда, патогенді микроорганизмдердің антибиотиктерге төзімділігінің артуы, жанама әсерлердің жиілеуі және жалпы иммунитеттің төмендеуі салдарынан жедел ішек инфекцияларында (ЖІИ) антибактериялық терапияның тиімділігі төмендеп келеді. Осыған байланысты, көптеген елдерде ЖІИ кезінде антибиотиктерді тағайындауға шектеулер енгізілуде [59-62].

ЖІИ емдеуге арналған антибиотиктер үш негізгі топқа бөлінеді:

I қатар (бастапқы) – алғашқы диагноз қойылған кезде, амбулаториялық жағдайларда немесе аурудың алғашқы сағаттарында стационарға түскен кезде тағайындалады. Бұл топқа ішекте нашар сіңірілетін және бактерицидтік немесе бактериостатикалық әсер ететін препараттар жатады. Негізгі препараттар: Нитроуран туындылары, Триметоприм/Сульфаметоксазол, Аминогликозидтер

II қатар (альтернативті) – I қатар препараттары әсер етпеген жағдайда немесе орташа және ауыр инфекциялар кезінде стационарда тағайындалады. Сондай-ақ, аурудың кеш кезеңінде ауруханаға жатқызылған науқастарға бастапқы ем ретінде беріледі. Бұл топқа мыналар жатады: Налидикс қышқылы, II буын аминогликозидтері (Амикацин, Нетилмицин), II буын макролидтері (Азитромицин)

III қатар (резервтік) – тек ауыр немесе генерализацияланған ЖІИ жағдайларында, сондай-ақ қарқынды терапия бөлімшелерінде қолданылады. Бұл топқа ерте жастағы балаларда ауыр инфекциялар кезінде немесе иммун тапшылығы бар науқастарда қолданылатын препараттар кіреді [63,64] Бактериялар арасындағы бәсекелестік және антибиотикалық белсенділік.

Кейбір бактериялар табиғи антибиотиктерді өндіру арқылы басқа микроорганизмдерді басады. Мысалы:

- *Escherichia coli*, *Shigella* және *Salmonella* шығаратын колициндер
- *Pseudomonas aeruginosa* шығаратын пиоциндер [65]

Бұл заттар жоғары спецификалық қасиетке ие және тек бірнеше бактериялық штамдарды басады. Қызықты ерекшелік – колицин түзуші штамм өзі өндіретін колицинына сезімтал болмайды.

Бактериялардың өзара бәсекелестік механизмдері: Микроортаны өзгерту; рН деңгейі мен тотығу-тотықсыздану потенциалын өзгерту; токсикалық метаболиттерді, соның ішінде сутегі асқын тотығын өндіру.

Қалыпты ішек микрофлорасы тоқ ішектің тұрақтылығын сақтауға көмектеседі, ал оның тропикалық әсері бактериялардың көмірсуларды ыдыратуынан пайда болатын қысқа тізбекті май қышқылдарымен байланысты [66-69].

Антибиотиктердің микрофлораға тигізетін әсері олардың: спектрі мен белсенділігі, дозасы, қолдану жолы, енгізу ұзақтығы, ішек саңылауындағы концентрациясы сияқты факторларға байланысты.

Науқастың жасы мен тамақтану ерекшеліктері де маңызды рөл атқарады. Дегенмен, бұл факторларды ескергеннің өзінде антибиотиктердің микрофлораға әсерін нақты болжау қиын, себебі ішек бактерияларының өзара әрекеттесу механизмдері толық зерттелмеген.

Антибиотиктерді қолдану барысында ішек микрофлорасының бұзылуынан туындайтын ең жиі кездесетін асқынулардың бірі – мальабсорбция (қоректік заттардың сіңірілуінің бұзылуы). Кең спектрлі антибиотиктерді ұзақ қолдану нәтижесінде бұл синдром дамуы мүмкін. Неомицин сияқты препараттарды жоғары дозада қабылдау (3–12 г/тәулік) мальабсорбцияны тудыруы ықтимал [70].

Бұл синдромның физиологиялық белгілері: Ішек перистальтикасының күшеюі, майлардың нашар сіңірілуі (стеаторея), ақуыздардың нашар сіңірілуі (азоторея), қанттар мен минералдардың сіңірілуінің бұзылуы (глюкоза, темір, кальций және т.б.), дәрумендер тапшылығы, әсіресе В дәруменінің жетіспеушілігі.

Антибиотиктердің микрофлораға әсерінен ішек эпителийінің морфологиялық өзгерістері де байқалуы мүмкін: ішек бұрлерінің тегістелуі немесе қалыңдауы, шырышты қабаттың ісінуі, өт тұздарының шөгуі, лимфоциттер мен макрофагтардың жиналуы[71, 72].

Сонымен қатар, β -лактамы антибиотиктер қан ұю процесіне әсер етуі мүмкін. Кейбір жағдайларда протромбин уақытының ұзаруы байқалып, қан кету қаупі артады. Антибиотиктердің жоғары дозалары тромбоциттердің агрегациясын тежеп, фибрин түзілуін баяулатып, антитромбин III белсенділігін арттырады, бұл қан ұюының бұзылуына әкелуі мүмкін.

1.3Адамның ішек инфекцияларын емдеуге арналған экологиялық таза пробиотикалық препараттар

Инфекциялық ауруларды емдеудің қиындығы патогенді микроорганизмдердің антибиотиктерге төзімділігінің яғни полирезистенттілігінің артуына байланысты. Сонымен қатар, антибиотиктердің өздері адам ағзасына жанама әсерін тигізіп, ішек дисбактериозын тудыруы мүмкін, бұл негізгі аурудың ағымын қиындатады. Ішек ауруларын емдеу барысында клиникалық және бактериологиялық тиімділікті қамтамасыз ететін бактерияға қарсы препараттарды қолдану қажет.

Соңғы жылдары антибиотиктер мен антибактериялық химиялық препараттардың қолданылуы көбінесе қажетті клиникалық немесе сауықтыру әсерін бермейді. Бұған қоса, олардың дұрыс қолданылмауы токсикалық әсерлерге, ішек дисбактериозына, аурудың созылмалы түріне өтуіне және эндогенді инфекциялардың дамуына алып келуі мүмкін [73, 74].

Қазіргі фармацевтикалық саланың айтарлықтай жетістіктеріне қарамастан, тиімді әрі қауіпсіз дәрі-дәрмектерді іздеу мен әзірлеу өзекті мәселе болып қала береді. Бұл проблеманы шешудің жаңа жолдарын іздеуді қажет етеді.

Инфекциялық аурулармен күресудің бір әдісі – сүтқышқылды бактериялар мен олардың метаболиттерін емдеу және алдын алу мақсатында пайдалану. Бұл микроорганизмдер асқазан-ішек жолдарының симбионттары болып табылады және адам ағзасына зиянсыз. Олардың емдік әсері микробқа қарсы белсенділікке, иммундық жүйені (әсіресе спецификалық емес иммунитетті) белсендіруге және ішек микрофлорасын қалыпқа келтіруге негізделген.

Көптеген ішек инфекциялары мен қабыну процестері ішек микрофлорасының теңгерімсіздігімен қатар жүреді. Бұл бактериялық микрофлораға иммундық жүйенің шамадан тыс реакциясын тудырып, қабыну мен ішек тосқауылының дисфункциясын күшейтуі мүмкін. Пробиотикалық

бактериялар ішек микробтық ортасын тұрақтандырып, ішек тосқауылының өткізгіштігін реттеуге, энтеральді антигендердің ыдырауын жеделдетуге және олардың иммуногенділігін төмендетуге көмектеседі. Сонымен қатар, пробиотиктер ішектегі IgA реакцияларын жақсарту арқылы иммунологиялық тосқауылды күшейтуі мүмкін.

Осылайша, ішек микрофлорасын өзгерту арқылы белгілі бір патогенді емес бактериялардың басым болуын қамтамасыз ету және ішек ортасын өзгерту инфекциялық және қабыну ауруларының алдын алу немесе емдеудің баламалы тәсілі ретінде қарастырылады.

Пробиотиктер- адам денсаулығына оң әсер ететін бактериялық компоненттер [75, 76]. Бұрын пробиотикалық штамдарды таңдау негізінен тағам өндірісіндегі технологиялық сипаттамаларға байланысты жүргізілсе, қазір негізгі назар сау ішек немесе шырышты микрофлорадан алынған штамдарға аударылуда. Пробиотиктердің ішекте тіршілік ету қабілеті, қышқыл мен өтке төзімділігі, шырышты қабаттарға колонизациялану қасиеттері маңызды критерийлерге айналды. Бұл талаптарға көбінесе *Lactobacillus* және *Bifidobacterium* тұқымдастары сәйкес келеді.

Пробиотиктерді қолдану концепциясы пребиотиктермен толықтырылды. Пребиотиктер-ішек микрофлорасының пайдалы компоненттерінің өсуін ынталандыратын көмірсутекті субстраттар. Сонымен қатар, олар пробиотиктердің өсуін қолдайтын сіңірілмейтін субстраттар болуы мүмкін. Осы екі концепция бірлесіп қолданылғанда, олар синбиотиктер деп аталады.

Антибиотиктерден айырмашылығы, пробиотиктер ішектің қалыпты микрофлорасын тежемейді. Сондықтан олар дисбактериоздың алдын алу және емдеуге арналған перспективті препараттар ретінде қарастырылады. Биопрепараттар жедел ішек инфекцияларын емдеуде, сондай-ақ аурудан кейінгі оңалту кезеңінде кеңінен қолданылады. Антибиотиктерден негізгі айырмашылығы – пробиотиктер иммундық жүйені жақсартады, инфекцияларға төзімділікті арттырады, аллергияға қарсы әсер етеді және ас қорыту процесін реттейді [77, 78].

Қазіргі ғылымның жетістіктері арқасында дәрігерлер пробиотикалық препараттардың кең арсеналына ие болып, оларды жедел ішек инфекцияларын және антибиотикке төзімді дисбиоздарды емдеуде тиімді пайдалана алады [79].

Ішек микрофлорасы метаболиттік белсенді жүйе болып табылады. Оның тұрақты жұмысы ішектегі иммундық жүйенің дамуы мен жетілуінде маңызды рөл атқарады [80].

Бактериялар ішек бойымен біркелкі таралмаған. Ең жоғары концентрация тоқ ішекте байқалады – мұнда 10^{11} – 10^{12} КТБ/г бактериялар кездеседі. Ғылыми мәліметтерге сәйкес, адамның ішек микрофлорасында 500-ден астам түрлі микроорганизм түрлері анықталған. Олардың басым бөлігін *Bacteroides*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Escherichia* және *Veillonella* тұқымдастары құрайды [81].

Ең танымал пробиотикалық микроорганизмдер – бифидобактериялар мен лактобациллалар. Олардың көпшілігі қабынуға қарсы қасиеттерімен ерекшеленеді және иммундық жүйені ынталандырады. Сондай-ақ, олар патогендермен бәсекелесіп, ағзаның инфекцияларға қарсы тұрақтылығын күшейтеді.

2022 жылы пробиотиктер нарығының көлемі 40,6 миллиард АҚШ долларына жетті. Бұл сала қарқынды дамып, 2023 жылы 44,051 миллиард АҚШ долларынан 2032 жылға қарай 84,604 миллиард АҚШ долларына дейін өседі деп болжануда. Нарықтың жылдық өсу қарқыны 6-7%-дан кем болмайды (Primary Research, Secondary Research, MRFR Database және Analyst Review деректері бойынша).

Пандемиядан кейін пробиотиктерге деген сұраныс айтарлықтай өсті, өйткені көптеген дәрігерлер оларды дәрілік емге қосымша құрал ретінде ұсынды. Пробиотиктер ішек микрофлорасын сақтауға, иммунитетті нығайтуға және антибиотиктерді қабылдаумен байланысты кейбір жанама әсерлерді жеңілдетуге көмектесетіні белгілі.

Диареяны (жиі сұйық нәжіс) емдеуде көшбасшылардың қатарында *Saccharomyces boulardii* негізіндегі моноқұрамды «Энтерол» препараты және бифидобактериялар, лактобактериялар және энтерококктардан тұратын көпқұрамды «Линекс» препараты бар. Бұл екі құрал ішек микрофлорасын қалыпқа келтіруде және транзиттің дұрыс жұмыс істеуін қамтамасыз етуде тиімді, соның ішінде дисбактериоз және тамақтан улану жағдайларында қолданылады.

Жақсы антидиареялық препараттарға «Наринэ», «Пробифор», «ОптиБАК» жатады. Көпқұрамды пробиотиктер ішек жұмысын қалыпқа келтірумен қатар, иммунитетке оң әсер етіп, ағзадағы табиғи интерферон өндірісін ынталандырады.

Пробиотиктің құрамындағы бактериялар саны мен түріне байланысты оны әртүрлі санаттарға жатқызады. Көпқұрамды пробиотиктер кем дегенде екі немесе бір топтың тоғыз штамына дейінгі әртүрлі бактерияларды қамтиды. Терапиялық әсері жоғары және кеңінен қолданылатын комбинациялар асқазан-ішек жолдары ауруларында, гинекологиялық тәжірибеде, антибиотиктерден кейінгі емдеуде және иммунитетті нығайту үшін қолданылады.

Кейбір бифидобактериялар: «Бифидобактерин-Мульти 1, 2 және 3» (5 және 6 түрі), «Бифилонг» (2 түрі), «Трилакт» (3 түрі), «Бифидобак» (2 түрі). Кейбір лактобактериялар: «Ацидобак» (9 түрі). Бифидобактериялар мен лактобактериялар комбинациясы: «Бифидин», «Бифидум-БАГ», «Бонолакт Про плюс Биотик», «Примадофилус Бифидус» және т.б. пробиотикалық препараттар қолданылады.

Әлемге танымал пробиотиктердің бірі- «Лацидофил-WM» (World Medicine, Ұлыбритания). Бұл препарат Канаданың Россел институтында жасалған. «Лацидофил-WM» құрамында екі штамм: *Lactobacillus rhamnosus-Rosell 11* және *Lactobacillus acidophilus Rosell 52* бар. Бір капсулада кемінде 2 миллиард тірі бактерия бар. Бұл штамдар асқазан қышқылы мен он екі елі

ішектің сілтілі төзімді еңсеру қабілетінің жоғары болуымен ерекшеленеді. Сондай-ақ, олар ішек эпителийіне (энтероциттерге) жабысып, ұзақ уақыт тіршілік ете алады.

Bacillus тұқымдасының аэробты спора түзетін бактерияларын пайдалану пробиотикалық препараттарды жетілдірудің маңызды тәсілдерінің бірі болып табылады. Бұл топқа *Bacillus subtilis* және *Bacillus licheniformis* жатады.

Көптеген рандомизацияланған бақыланатын зерттеулер мен мета-анализдер пробиотиктердің бактерияға қарсы терапия кезінде алдын алу мақсатында тиімділігін растайды. Пробиотиктердің адам денсаулығына пайдасы туралы көптеген ғылыми дәлелдер жиналғанына қарамастан, клиникалық тәжірибеде олардың таңдауында әлі де бірізділік жоқ.

Қазақстан Республикасында ресми ұсыныстардың және ішек микробиотасының бұзылуын емдеу мен алдын алуға арналған біріздендірілген критерийлердің болмауы клиникалық тәжірибеде пробиотиктерді таңдауда қиындықтар туғызады. Сонымен қатар, пробиотикалық штамдардың, дәрілік формалардың және жарнаманың көптігі таңдауды одан әрі қиындатады. Пробиотиктер көбінесе биологиялық белсенді қоспалар (ББК) немесе дәрілік емес өнім ретінде шығарылады, олардың кейбіреулерінің тиімділігі рандомизацияланған клиникалық зерттеулермен расталмаған.

Қазақстанда пробиотиктердің нарығы шағын әрі бөлшектелген. Сонымен қатар, сапалы пробиотикалық қоспалардың қолжетімділігі шектеулі, ал олардың бағасы кейбір науқастар үшін қымбат болуы мүмкін. Пробиотиктердің тиімділігіне қатысты тағы бір мәселе - оларды сақтау және тасымалдау шарттарының талаптарға сәйкес келмеуі.

Пробиотиктердің жетіспеушілігі мынандай салдарға әкелуі мүмкін: ішек инфекцияларын тиімсіз емдеу, антибиотиктерге төзімділіктің артуы, ұзаққа созылған диарея және басқада асқынулар, денсаулық сақтау саласындағы экономикалық шығындардың көбеюі.

Қазақстанда пробиотиктер тапшылығын шешу үшін келесі шараларды қабылдау қажет:

- Сапалы пробиотикалық қоспалардың қолжетімділігін арттыру;
- Қатаң реттеу және сапаны бақылау стандарттарын енгізу;
- Пробиотиктердің ішек инфекцияларын емдеудегі рөлі туралы хабардарлықты арттыру;
- Ең тиімді штамдар мен дозаларды анықтау үшін зерттеулер жүргізу;
- Барлық пациенттер үшін пробиотиктердің қолжетімділігін қамтамасыз ету.

Пробиотиктердің жетіспеушілігін шешу арқылы Қазақстанда ішек инфекцияларын емдеу нәтижелерін жақсартып, антибиотиктерге төзімділіктің төмендеуіне ықпал етіп, халықтың жалпы денсаулығын жақсартуға болады.

1.4 Пробиотикалық препараттарды өндіру технологиясы

Пробиотикалық препараттарды өндіру - бұл көпсатылы күрделі процесс. Пробиотикалық микроорганизмдер емдік препараттың немесе биологиялық

белсенді қоспаның (ББК) құрамына енгізілмес бұрын бірнеше критерийлерге сәйкестігі тексерілуі керек [82]. Біріншіден, таңдалған штамдардың ғылыми дәлелденген тиімділігі мен қауіпсіздігі болуы, жақсы технологиялық қасиеттерге ие болуы, ауқымды өндіріске бейімделуі және центрифугалау, кептіру мен сақтау кезінде тіршілік ету қабілеті мен функционалдығын жоғалтпауы тиіс. Асқазан-ішек жолының жоғарғы бөлімдерінде жоғары тіршілік ету қабілеті және жіңішке мен тоқ ішекте белсенділік танытуы да маңызды талаптардың бірі болып табылады.

Патогендерге қарсы тиімділігі ғана емес, жоғарыда аталған критерийлерге сәйкес келетін микроорганизмдерді іріктеу – ұзақ әрі күрделі процесс [83]. Пробиотикалық штамдарды коммерциялық деңгейде сәтті өндіру үшін барлық өндірістік процестер мұқият пысықталуы қажет. Сүтқышқылды және пропионқышқылды бактерияларды қамтитын препараттарды өндіру барысында кездесетін негізгі мәселелердің бірі – қажетті мөлшерде тіршілікке қабілетті, шоғырланған және тұрақты микроб жасушаларын сақтау кезіндегі масштабтау проблемасы [84]. Өнеркәсіптік көлемде биомасса алу арнайы таңдалған микроорганизмдерді ферменттер жағдайында өсіру арқылы жүзеге асырылады.

Ферментация кезеңінде пробиотикалық бактерияларды жаппай өндіру кезінде ескерілуі және бақылануы тиіс көптеген көрсеткіштер бар [85]. Ең алдымен, қоректік орта құрамы, яғни көміртек көзі (мысалы, глюкоза) мен азот көзінің (мысалы, ашытқы экстракты) түрі мен мөлшері, сондай-ақ макро- және микроэлементтердің (мысалы, магний) қажетті мөлшері маңызды рөл атқарады [86].

Сонымен қатар, ферментация шарттарына ерекше назар аудару қажет. Оларға рН деңгейі, инкубация температурасы, араластыру жылдамдығы және оттегі деңгейі кіреді [87]. Оған қоса, өсу фазасы, инокулят көлемі және ферментация сатыларының саны да өндірілетін препараттың сапасына әсер етеді [88].

Ферментацияның оңтайлы шарттары сақталмаса, қолданылатын штамдардың морфофункционалдық қасиеттерінің өзгеруі, жасушалардың концентрациясының төмендеуі және олардың синтездейтін қышқылдарының азаюы мүмкін. Осылайша, коммерциялық өндіріс жағдайында ферментация – пробиотикалық препараттарды өндірудегі негізгі кезеңдердің бірі болып табылады.

Қазіргі уақытта пробиотикалық бактерияларды өсіру үшін бірнеше ферментация әдістері қолданылады. Негізгі әдістерге мерзімді, қоректік орта қосып жүретін мерзімді және үздіксіз ферментация жатады. Ферментация кезінде микроорганизмдер биомассаны алу үшін оңтайлы жағдайлар жасалған жабық жүйеде өсіріледі [89, 90].

Ферментация – кеңінен қолданылатын әдістердің бірі болып табылады. Бұл әдіс кезінде белгілі бір мөлшерде қоректік орта ферменттерге кезең-кезеңімен қосылады. Бұл процестің тағы бір атауы – жартылай үздіксіз ферментация [91]. Сонымен қатар, үздіксіз ферментация да кеңінен

қолданылады. Бұл әдіс мерзімді ферментацияға қарағанда неғұрлым бақыланатын процесс болып табылады және жасушалардың өсу жылдамдығын реттеуге мүмкіндік береді [92, 93].

Көптеген пробиотикалық штамдарды қамтитын препараттарды өндіру кезінде, әдетте, микроорганизмдер жеке-жеке өсіріліп, кейіннен белгілі бір қатынаста кептіріліп араластырылады [94].

Пробиотикалық препараттарды жасау барысында нақты клиникалық көрсеткіштерге сәйкес келетін микроорганизмдер штамдарының негізгі критерийлері сақталуы керек. Пробиотиктердің әсер ету тетіктеріне мыналар жатады: асқазан-ішек жолының белгілі бір аймақтарында тіршілік етуі және адгезияға қабілеттілік, сондай-ақ патогендер мен зиянды антигендерді бәсекелестік арқылы ығыстыру. Бұл процестер, ең алдымен, нақты штамның сипаттамаларына, сондай-ақ қабылдаушы ағзаның жасы мен иммунологиялық жағдайына байланысты болады. Кейбір пробиотикалық штамдар аш ішекке жақсырақ бекітілсе, ал кейбіреулері тоқ ішектің әртүрлі аймақтарына спецификалық түрде адгезияланады. Сонымен қатар, штамдардың сау және зақымдалған шырышты қабыққа әртүрлі дәрежеде жабысуы ықтимал [95].

Бұдан бөлек, тіпті жақын туыстас пробиотиктердің де *in vitro* жағдайында әртүрлі қасиеттерге ие екендігі анықталған, бұл олардың клиникалық әсерлерінің айырмашылықтарын да түсіндірілуі мүмкін. Алайда, соңғы зерттеулер *in vitro* жағдайында жалпы байланысу қабілеті төмен штамдардың да патогендер мен зиянды бактерияларды жоғары бәсекелестік арқылы ығыстыру мүмкіндігіне ие екенін көрсетті [96]. Бұл пробиотикалық штамм түрлерін клиникаға дейінгі іріктеу әдістерін әзірлеу үшін адгезиялық қасиеттерді тереңірек сипаттау қажеттігін көрсетеді.

Пробиотиктердің әсер ету механизмдерін анықтау кем дегенде үш негізгі артықшылық береді. Біріншіден, бұл белгілі бір микроорганизмдердің пайдалы әсерін ғылыми негізде дәлелдеуге мүмкіндік береді. Мұндай іргелі зерттеулер пробиотиктерді тағамдық қоспалардан терапевтік препараттар санатына көшіруге жол ашады.

Екіншіден, пробиоз механизмдерін және пробиотиктер өндіретін гендік өнімдерді зерттеу нәтижесінде неғұрлым күшті пробиотиктерді анықтауға немесе биоинженерлік терапиялық құралдарды жасауға мүмкіндік береді.

Үшіншіден, аурулардың алдын алу мен емдеуге ықпал ететін гендік өнімдерді анықтау арқылы ғалымдар, фармацевтикалық компаниялар және дәрігерлер бұл өнімдердің өндірісін маңызды биомаркерлер ретінде бақылауға алады. Пробиотиктердің физиологиялық жағдайы олардың қызметін анықтайтын негізгі фактор болуы мүмкін. Осыған байланысты пробиотиктерді өсіру және өңдеу кезінде маңызды биоактивті молекулалардың түзілуін бақылау мүмкіндігі аса қажет болады. Бұл әсіресе пробиотиктердің жануарлар мен адамдарға қолданылуында маңызды рөл атқарады.

Пробиотикалық микроорганизмдерді өндіру бірнеше маңызды кезеңдерден тұрады. Алдын ала дайындалған мұздатылған жасушалар қоры сапаны бақылау (QC) барысында мұқият тексеріліп, тек бір таза штамнан

тұратындығына және ластанусыз екеніне көз жеткізіледі. Бұл жасушалар шектеулі тізбекті ферментация процестері арқылы өсіріліп, қажетті инокулят көлеміне жеткеннен кейін негізгі ферментациялық резервуарға (ферментерге) енгізіледі.

Альтернативті тәсіл ретінде DVI (Direct Vat Inoculation – тікелей ферментерге инокуляциялау) әдісі қолданылады. Бұл әдісте жоғары концентрацияланған мұздатылған жасушалар тікелей негізгі ферментациялық резервуарға енгізіледі. Екі әдістің де мақсаты – тұқымдық қордан ақырғы өнімге дейінгі ұрпақ санын шектеу, осылайша генетикалық өзгерістер қаупін азайту [97].

Ферментацияға арналған қоректік орта су, азот көздері, көмірсулар, тұздар және микроэлементтердің белгілі бір пропорциясын қамтиды. Ферментация процесі қатаң бақыланады. Ферментация аяқталғаннан кейін жасушалар центрифугалау арқылы қоректік ортадан бөлініп, концентрленеді.

Пробиотикалық өнімнің қолдану саласына байланысты жасушаларға криопротекторлар (жасушаларды мұздату кезінде зақымданудан қорғау үшін) немесе лиопротекторлар (сублимациялық кептіру кезінде зақымданудан қорғау үшін) қосылады.

- Криопротекторлар мұздың өсу жылдамдығын бәсеңдетіп, ерітіндінің тұтқырлығын арттырады және жасуша айналасындағы мұздың құрылымын аморфты күйде сақтайды.
- Лيوпротекторлар жасуша мембранасының липидті биқабаттың құрылымдық тұрақтылығын су жоқ кезде қамтамасыз етеді [98, 99].

Әдетте, крио- және лиопротекторлар ретінде көмірсулар мен пептидтер қолданылады.

Пробиотикалық концентрат криопротектор ерітіндісімен араластырылғаннан кейін бірнеше мұздату әдістері қолданылады:

1. Кәдімгі мұздату – пробиотикалық суспензия науаларға орналастырылады, кейіннен мұздатылып, сақтауға жіберіледі.
2. Криогрануляция – жоғары өнімді әдіс. Бұл процесте пробиотикалық концентрат арнайы өлшемдегі тесіктерден өткізіліп, сұйық азотқа тамызу арқылы 4–5 мм диаметрлі сфералық түйіршіктер алынады. Бұл гранулалар сұйық азотта мұздатылады, содан кейін -45°C – -55°C аралығындағы температурада сақтауға жіберіледі.
3. Леофильді кептіру (сублимациялық кептіру) – мұздатылған жасушаларды төмен қысым жағдайында баяу кептіру әдісі. Бұл процесс вакуумдық камераларда жүргізіледі:
 - Науалар бастапқыда атмосфералық қысымда мұздатылады.
 - Содан кейін вакуум қолданылып, қабаттар біртіндеп қыздырылады.
 - Вакуум 100–1000 мТорр аралығында ұсталады, ал температура -40°C -тан $+40^{\circ}\text{C}$ -қа дейін өзгереді.
 - Леофильді кептіру бірнеше күнге созылады.

Сублимациялық кептірудің басты артықшылығы – төмен температурада пробиотикалық жасушалардың құрылымын және олардың метаболиттерін сақтауға мүмкіндік береді.

Осы технологиялар арқылы өндірілген пробиотиктер жоғары тіршілік ету қабілетіне ие болып, ұзақ мерзім сақтауға жарамды болады.

Бифидо- және лактобактерияларды өсіру үшін қолданылатын белгілі коректік орталардың бірі – Блаурокка ортасы [100].

Бұл орта сүт гидролизаты негізінде дайындалады және келесі компоненттерден тұрады (г/л):

- Пептон – 2,00, натрий хлориді (NaCl) – 5,00, агар-агар – 0,75, Лактоза – 10,00, тұз қышқылды цистеин – 0,10, сүт гидролизаты [101]

Бұл коректік орта бифидо- және лактобактериялардың өсуін қолдау үшін тағамдық қоспалар ретінде пайдаланылады.

Агар-агардың мөлшерін 0,70–0,80 г/л, ал аскорбин қышқылының мөлшерін 0,01–0,10 г/л деңгейінде енгізу оңтайлы өсім нәтижелерін қамтамасыз етеді. Егер агар-агар 0,7 г/л-ден аз, ал аскорбин қышқылы 0,01 г/л-ден аз болса, бактериялардың өсу тиімділігі төмендейді. Ал олардың мөлшерін 0,8 г/л және 0,1 г/л-ден асыру өсім тиімділігінің одан әрі артуына ықпал етпейді.

Пробиотикалық препараттардың көпшілігі лиофильді кептірілген бактериялық биомассадан тұрады. Ауыз қуысы арқылы қолдану кезінде пробиотиктердің асқазан сөлімен (рН-тың төмен болуы, гидролитикалық ферменттердің әсері және т.б.) инактивациялануының алдын алу қажет. Осыған байланысты, қазіргі заманғы пробиотиктер екі негізгі дәрілік формада шығарылады:

- Құрғақ бактериялық биомассасы бар желатинді капсулалар
- Ішекте еритін қабықшамен қапталған таблеткалар

Пробиотикалық штамдардың көпшілігі сыртқы ортадағы стресстік факторларға (жылу және суық өңдеу, оттегінің әсері, механикалық қысым) сезімтал келеді, бұл олардың тіршілік ету қабілеті мен белсенділігінің төмендеуіне әкеледі [102]. Сондықтан пробиотиктердің тұрақтылығын сақтау олардың рецептурасын әзірлеуде маңызды рөл атқарады.

Пробиотиктердің тұрақтылығын арттырудың бір әдісі - микрокапсуляция, яғни бактерияларды қорғаныс қабықшасына орналастыру [103, 104].

Микрокапсуляцияның бірнеше әдістері бар, соның ішінде: шашырату арқылы кептіру, сублимациялық кептіру, сұйытылған қабатта кептіру, экструзия, эмульгиялау. Бұл әдістер пробиотикалық жасушаларды сыртқы орта әсерінен қорғап, олардың тұрақтылығын және тіршілік етуін ұзақ уақыт сақтауға мүмкіндік береді.

Тозандату арқылы кептіру– пробиотиктердің сақтау мерзімін ұзартудың кеңінен қолданылатын әдісі. Бұл салыстырмалы түрде төмен пайдалану шығындары бар экономикалық процесс, оның көптеген артықшылықтары бар, соның ішінде сұйық ұнтақтар алу, кептіру жылдамдығының жоғары болуы,

масштабталуы және бөлшектердің өлшемін бақылау мүмкіндігі [105]. Тозандату арқылы кептіру әдісін микрокапсулалау үшін пайдалану мақсатында пробиотиктер эмульгирлеу немесе пленка түзуші қасиеттерге ие инкапсуляциялаушы агентте ериді. Пробиотиктерді инкапсуляциялау үшін ақуыздар мен көмірсулар немесе олардың туындылары сияқты әртүрлі табиғи полимерлер қолданылады [106-108].

Тозандату арқылы кептіру процесі сұйық тамшыларды ыстық ауа ағынында кептіру камерасына шашыратудан басталады, ал кептіру барысында су буға айналып, құрғақ ұнтақтар түзіледі. Термиялық және тотығу стрессі жасуша қабырғасына немесе жасуша компоненттеріне, соның ішінде цитоплазмалық мембрана мен ақуыздарға зақым келтіруі мүмкін, бұл пробиотиктердің тіршілікке қабілеттілігін төмендетеді. Сондықтан кептіру параметрлерін, соның ішінде кіру және шығу температураларын, ауа ағынының жылдамдығын және ылғалдылықты, жасушалардың тіршілігін жою үшін оңтайландыру қажет [109].

Кептіру кезінде бактериялардың инактивациясын азайту мақсатында қорғаныс агенттері қосылады. Кеңінен қолданылатын қорғаныс агенттеріне көмірсулар, ақуыздар, липидтер және камедтер жатады, мысалы, трегалоза, түйіршіктелген крахмал, майсыздандырылған құрғақ сүт [110]. Әртүрлі *Lactobacillus* және *Bifidobacterium* штамдары сәтті тозандату арқылы кептірілді. Мысалы, К.Фарахманди және оның әріптестері *L. rhamnosus* тіршілікке қабілеттілігін зерттеп, микрокапсулаланған жасушалардың 20 күндік сақтау мерзімінде инкапсуляцияланбаған пробиотикалық жасушаларға қарағанда 5 есе тұрақты екенін анықтады, бұл микрокапсулалаудың пробиотиктердің сақтау мерзіміне оң әсер ететінін көрсетті [111].

Жалпы, тозандату арқылы кептіру технологиясы салыстырмалы түрде төмен шығындармен жоғары өнімділікке ие тұрақты ұнтақ түріндегі пробиотиктерді өндіруді қамтамасыз етеді. Дегенмен, жоғары температура мен дегидратация стрессінің әсерін ескеру қажет.

Сублимациялық кептіру (лиофилизация) – термотұрақсыз пробиотиктерді кептіру үшін кеңінен қолданылатын әдіс. Бұл процесс үш кезеңнен тұрады: мұздату, бастапқы кептіру және қайталама кептіру. Тозандату арқылы кептіруге қарағанда қымбатырақ және ұзаққа созылатын бұл әдіс ыстыққа сезімтал пробиотиктерді инкапсуляциялау үшін тиімді болып табылады [112-114].

Алдымен пробиотиктер тасымалдаушы материалдармен бірге төмен температурада мұздатылады, содан кейін вакуумда қатты фазадан тікелей газ фазасына өту арқылы мұз сублимацияланады. Бұл әдіс термиялық стрессті азайтқанымен, мұздату кезінде мұз кристалдарының түзілуі механикалық стресске әкеліп, жасушалардың жойылуына себеп болуы мүмкін. Мұз кристалдарының түзілуі мұздату жылдамдығы мен температурасына байланысты болғандықтан, жоғары жылдамдықтағы мұздату артықшылыққа ие, себебі ол ұсақ кристалдардың түзілуін қамтамасыз етеді және жасушалардың зақымдануын болдырмайды [115].

Мұздың кристалдануы сондай-ақ химиялық және осмостық зақымдануларға әкелуі мүмкін. Сондықтан сублимациялық кептіру кезінде және кейінгі сақтау барысында пробиотиктердің тіршілікке қабілеттілігін арттыру үшін жасуша мембранасының тұтастығын сақтау мақсатында криопротекторлар (мысалы, қанттар мен полиолдар) тасымалдаушы материалдармен араластырылады [116].

Сублимацияланған пробиотиктер асқазан-ішек жолында тұрақтылықты арттыру және мақсатты босатуды реттеу үшін қосымша жабынмен қапталуы мүмкін. Сондай-ақ, пробиотиктерді инкапсуляциялау үшін сублимациялық кептіруге балама ретінде төмен температуралы вакуумдық кептіру қолданылуы мүмкін. Бұл әдіс сублимациялық кептіруге ұқсас, бірақ кептіру булану арқылы жүреді. Вакуумдық кептіру температурасы тозаңдату арқылы кептіруден төмен, бірақ сублимациялық кептіруден жоғары. Дегенмен, дегидратациялық стресс болуы мүмкін. Вакуумдық кептіру температуралық және тотығу стрессін төмендететін жұмсақ процесс болып табылады және жылу мен оттегіге сезімтал пробиотиктерге жарамды [117-119].

Қайнау қабатында кептіру- бұл жасуша суспензиясын инертті тасымалдаушыларға бүркіп, қайнау қабатында жабынмен кептіру әдісі. Бұл әдіс сублимациялық кептіруден жылдамырақ, бірақ тозаңдату арқылы кептіруден ұзағырақ. Сонымен қатар, ол тозаңдату арқылы кептіруге қарағанда төменірек кептіру температурасын қолданады, нәтижесінде жылулық инактивация деңгейі төмендейді [120].

Кәдімгі процесс бойынша тасымалдаушылар алдымен кептіргішке орналастырылады, содан кейін бактериялық суспензия казеин, мальтодекстрин, целлюлоза, лактоза немесе NaCl бөлшектері сияқты тасымалдаушыларға бүркіледі [121]. Бұл әдістің негізгі артықшылығы – үлкен бөлшектерді қолдану, бұл түпкілікті ұнтақтың ағыстық қасиеттерін жақсартады.

Альтернативті әдіс ретінде бактериялық гранулалар алдымен сублимациялық немесе тозаңдату арқылы кептірумен дайындалады, содан кейін кептірілген бөлшектер тұрақтылықты арттыру үшін қосымша жабынмен инкапсуляцияланады. Липидтер, ақуыздар және көмірсулар пробиотиктерді жабу үшін кеңінен қолданылады.

Л.Загари және оның әріптестері қайнау қабаты кептіру әдісімен қос қабатты микрокапсулалар дайындады: алдымен капсулалар натрий альгинатымен жабылды, содан кейін хитозан және араб камедімен қапталды. Бұл әдіспен алынған микрокапсулалар қышқыл ортаға және температураға төзімділігін арттырды [122,123].

Қайнау қабаты кептіру технологиясы жоғары өнімділік пен өндіріс қуатын қамтамасыз ететіндіктен, микрокапсулаланған пробиотиктерді өнеркәсіптік ауқымда өндіруге қолайлы [124].

Экструзия әдісі пробиотиктердің микробөлшектерін алудың кең таралған тәсілі болып табылады, себебі ол қарапайым, арзан және жұмсақ инкапсуляциялау шарттарын қамтамасыз етеді, бұл жасушалардың жоғары тіршілік ету қабілетін сақтауға мүмкіндік береді [125]. Экструзияға негізделген

инкапсуляция процесі екі негізгі кезеңнен тұрады. Алдымен пробиотиктерді қамтитын гидроколлоидты ерітінділер саптама арқылы экструдталып, гель түзуші ерітіндіге тамшылап түседі. Кейін бұл тамшылар гель түзілу немесе олардың бетінде мембрана қалыптасу арқылы қатайды, нәтижесінде кеуекті гидрогельдік түйіршіктер пайда болады. Инкапсуляцияланған пробиотикалық бактериялардың тіршілік ету қабілетін сақтау және арттыру үшін алынған гидрогельдік түйіршіктер көбінесе қосымша полимерлі қабықпен қапталады.

Тамшылардың өлшемі мен пішіні көптеген процестік параметрлерге, соның ішінде саптаманың диаметріне, оның гель түзуші ерітіндіге дейінгі қашықтығына және қолданылатын құрылғы түріне байланысты өзгереді [125]. Бұл әдісте көбінесе гель түзуші агенттер ретінде альгинат, каррагинан және сарысу ақуыздары қолданылады. Әсіресе, альгинат экструзия үшін ең танымал полимер болып табылады және ол жеке немесе басқа полимерлермен бірге пробиотикалық бактериялардың тіршілікке қабілеттілігін арттыру үшін пайдаланылады [126]. Н.Шах пен Р.Павула *Bifidobacterium* және *Lactobacillus acidophilus* бактерияларын кальций альгинатына инкапсуляциялап, олардың тіршілігін жақсарғанын көрсетті [127]. Инкапсуляцияланған пробиотикалық бактериялар бос пробиотикалық жасушаларға қарағанда асқазан-ішек жолында жоғары тіршілікке және жақсырақ адгезиялық қасиеттерге ие болды [126]. Жалпы, экструзия әдісі экономикалық тиімді, қарапайым және жұмсақ процесс болып табылады, өйткені ол зиянды еріткіштерді немесе жоғары температураны қажет етпейді. Дегенмен, баяу қатаю жылдамдығы және өндірістің ауқымын кеңейту кезіндегі тиімсіздігі бұл әдістің негізгі кемшіліктері болып табылады.

Эмульсия – бұл екі араласпайтын сұйықтықтың эмульгаторлар немесе беттік-белсенді заттар қатысуымен тұрақты түрде дисперсияланған қоспасы. Пробиотикалық жасушаларды эмульсияға инкапсуляциялау үшін пробиотиктері бар су ерітіндісі өсімдік майларының (мысалы, күнжіт немесе жүгері майы) үлкен көлеміне қосылады [128-130]. Кейін алынған қоспа эмульгаторлардың қатысуымен гомогенизацияланып, «су-майда» (w/o) типті эмульсия түзіледі. Бұл эмульгирлеу әдісі пробиотиктердің қолайсыз ортаға төзімділігін арттыруда тиімді екенін көрсетті. Мысалы, Хоу және оның әріптестері *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* бактерияларын күнжіт майына негізделген эмульсияға инкапсуляциялап, олардың жасанды асқазан және ішек сұйықтықтарында тіршілік қабілеттілігі 10 000 есеге артқанын анықтады [95]. Алынған эмульсия пробиотиктердің тіршілігін қамтамасыз ету үшін ішкі немесе сыртқы гель түзу процесіне ұшырауы мүмкін [131, 132].

Бұл процесте пробиотикалық жасушалар мен полимерлерден тұратын су суспензиясы қолданылады. Эмульсия түзілгеннен кейін, су фазасындағы полимерлер ерімейтін күйге ауысып, май фазасында кішкентай гель тәрізді түйіршіктер түзеді, олар кейіннен сүзу арқылы алынады [133]. Гель түзу әдісін таңдау инкапсуляция үшін қолданылатын полимерлердің қасиеттеріне байланысты, ал түйіршіктердің өлшемін араластыру жылдамдығы арқылы реттеуге болады.

Мысалы, эмульгирлеу/сыртқы гель түзу әдісінде альгинат ерітіндісі май фазасында дисперсияланып, «су-майда» эмульсиясын түзеді, кейін кальций хлориді ерітіндісі қосылып, гель түзіледі. Ал эмульгирлеу/ішкі гель түзу әдісінде кальцийдің ерімейтін тұзы бар альгинат ерітіндісі майға қосылып, эмульсия түзіледі, содан кейін қышқыл қосылып, ерімейтін тұздан Ca^{2+} иондары босап, альгинатпен байланысады [134].

Х.Сонг және әріптестері альгинат-хитозан негізінде ашытқы жасушалары бар микрокапсулаларды эмульгирлеу/сыртқы және эмульгирлеу/ішкі гель түзу әдістерімен дайындап, ішкі гель түзу әдісі арқылы алынған пробиотиктердің тіршілігі жоғары болғанын анықтады [135]. Жалпы, эмульгирлеу әдісі жасушалардың тіршілігін арттыруда тиімді болғандықтан, оны өнеркәсіптік ауқымда қолдану жолдары белсенді түрде зерттелуде.

Коацервация – бұл полимерлік микрокапсулаларды алуға арналған физика-химиялық әдіс [136-138]. Ол сұйық фазаны дегидратациялау арқылы бір немесе бірнеше гидроколлоидтардың фазалық бөлінуін қамтиды. Бұл процесте пробиотиктер қатты бөлшектерге немесе май тамшыларына енгізіледі, кейін олар жабынмен қапталып, микрокапсулаларға айналады. Коацервацияның екі негізгі әдісі бар: қарапайым және күрделі коацервация [139].

1. Қарапайым коацервация – полимерлерді тұздар немесе полярлы еріткіштер қосу арқылы тұнбаға түсіру әдісі. Бұл кезде қосылған заттардың суға деген жақындығы жоғары болғандықтан, полимерлер фазалық бөлінуге ұшырайды.
2. Күрделі коацервация – қарама-қарсы зарядталған екі полимер арасындағы электростатикалық әрекеттесулерге негізделген. Бұл процесс биополимерлерге бай фаза (күрделі коацерваттар) мен қатты бөлшектер немесе сұйық тамшылардың түзілуіне әкеледі [140].

Күрделі коацервация пробиотиктерді микрокапсуляциялау үшін қолайлы әдіс болып табылады. Оливейра және оның әріптестері казеин/пектин комбинациясын микрокапсулалардың қабырғалық материалы ретінде пайдаланып, пробиотиктерді күрделі коацервация әдісімен инкапсуляциялады [141]. Нәтижесінде, инкапсуляцияланған пробиотиктер қышқыл ортаға төзімділігі жоғары екенін көрсетті [141].

Коацервация әдісі бірқатар артықшылықтарға ие:

- Төмен өндірістік шығындар,
- Жоғары жүктеу қабілеті,
- Қоршаған орта факторларына (механикалық кернеу, температура, рН өзгерісі) жауап ретінде пробиотиктердің бақыланатын босап шығуын қамтамасыз ету,
- Жоғары температуралар мен органикалық еріткіштерді пайдаланбау [142,143].

Алайда, бұл коацерваттардың су ерітіндісінде периодты түзілуіне негізделген әдіс болғандықтан, өнімнің сақтау мерзімін ұзарту үшін қосымша кептіру процесі қажет.

Нанотехнологиялардың дамуымен наноматериалдар кеңінен қолданыла бастады, себебі олар биосәйкестікке ие және қоршаған орта әсерлеріне жауап ретінде белсенді компоненттердің бақыланатын босап шығуын қамтамасыз етеді. Наноматериалдар негізіндегі кейбір формулалар (наноталшықтар, нанобөлшектер, нанокомпозиттер) пробиотиктерді тасымалдау жүйесі ретінде бірнеше артықшылықтарды көрсетеді:

- Тиімді инкапсуляция,
- Белгілі бір мақсатты аймаққа бағытталған жеткізу,
- Қоршаған ортаға сезімталдық,
- Өндіріс, сақтау және қолдану кезінде пробиотикалық жасушалардың тұрақтылығының артуы [144].

Төменде пробиотиктерге қолданылатын наноинкапсуляцияның негізгі әдістері қарастырылады:

1. Наноталшықтар және олардың пробиотиктерді инкапсуляциялаудағы рөлі

Наноталшықтар жоғары электр өрісінде полимер ерітінділерін электроспиннинг әдісімен өңдеу арқылы алынады [145].

- Табиғи полимерлер жоғары биосәйкестікке және төмен иммуногендікке ие,
- Синтетикалық полимерлер физика-химиялық қасиеттерін оңай өзгертуге мүмкіндік береді.

Сондықтан, көбінесе полимер қоспалары қолданылады. Пробиотиктерді инкапсуляциялау үшін жиі қолданылатын полимерлер:

- Поливинил спирті, полиэтилен оксиді, целлюлоза, хитозан.

Наноталшықтардың ерекшеліктері: біркелкі морфология және құрам тұрақтылығы, нанометрлік диаметр, үлкен беткі аудан және жоғары кеуектілік, биологиялық белсенді заттарды тиімді жеткізу мүмкіндігі [146].

Осы қасиеттерінің арқасында, наноталшықтар микроорганизмдерді, жасушаларды, гендерді және ақуыздарды инкапсуляциялау үшін тиімді қолданылуы мүмкін [147]. Пробиотиктерді наноталшықтарға енгізу олардың тұрақтылығын жақсартып, мақсатты жеткізуді қамтамасыз етеді.

2. Наноконтейнерлер және нанобөлшектерді пробиотиктер үшін қолдану

Белсенді ингредиенттер наноконтейнерлерге инкапсуляцияланып, олардың тұрақтылық, ерігіштік, қауіпсіздік және мақсатты жеткізу мәселелерін шешуге көмектеседі [147]. Осыған байланысты пробиотиктер: полимерлі нанобөлшектер, липидті нанобөлшектер, бейорганикалық нанобөлшектер түрінде инкапсуляциялануы мүмкін.

Соңғы жылдары екі түрлі материалдарды біріктіретін гибриді нанобөлшектер (мысалы, органикалық/бейорганикалық немесе липидті/полимерлі нанобөлшектер) белсенді түрде зерттелуде. Сонымен қатар, нанобөлшектердің беті лигандтармен немесе функционалды материалдармен модификацияланып, мақсатты жеткізу немесе бақыланатын босап шығу қасиеттерін арттыруға болады [148].

Бұл нанобөлшек негізіндегі тасымалдау жүйелері: пробиотиктерді қолайсыз орта факторларынан қорғайды, нысана аймақта ұзақ уақыт тұрақтандыруға мүмкіндік береді, биожетімділікті арттырады.

Мысалдар:

- П.Эбрахимнежад және оның әріптестері *Lactobacillus acidophilus* бар хитозан негізіндегі нанобөлшектерді әзірледі. Олардың өлшемі 146 нм болды және асқазан-ішек сұйықтықтарында пробиотиктердің тіршілік ету қабілетін айтарлықтай жақсартты [149].
- Ф.Гибаудо және оның әріптестері темір мен пектин негізіндегі нанобөлшектерді жасап, олардың *L. plantarum* CIDCA 83114 пробиотигінің сублимациялық кептіру және сақтау кезіндегі тұрақтылығын арттырғанын көрсетті. Сонымен қатар, бұл нанобөлшектер пробиотиктерді асқазан қышқылынан қорғаған [150].

Көптеген наноматериалдар әртүрлі өлшемдерде, пішіндерде, текстураларда және құрамдарда болып, пробиотиктерді тиімді инкапсуляциялау мақсатында зерттелген. Материалдарға негізделген наноқұрылымды композициялар өздерінің ерекше физика-химиялық қасиеттеріне байланысты қоршаған ортаның қолайсыз факторларына төзімділікті арттырудың перспективті әдістері ретінде қарастырылады.

Соңғы жылдары гидрогельдер мен наноматериалдар біріктіріліп, нанокомпозиттік жүйелер жасалды. Мұндай жүйелер келесі артықшылықтарға ие: кішкентай өлшем, тұрақты кешен түзу қабілеті, жоғары жүктеу сыйымдылығы, төмендетілген уыттылық, жақсартылған механикалық беріктік [151].

1) Ж.Патарройо және оның әріптестері желатин-графен оксиді негізіндегі нанокомпозиттік гидрогельдерді әзірледі. Бұл гидрогельдер үлкенірек кеуек өлшеміне ие болды, бұл *Kluyveromyces lactis* жасушаларын ұстауға және олардың пролиферациясына қолайлы жағдай жасады. Сонымен қатар, рН-қа тәуелді ісіну дәрежесі, реттелетін деградация жылдамдығы және асқазан-ішек сұйықтықтарында жоғары механикалық тұрақтылық көрсетті [152].

2) В.Ли мен оның әріптестері өзара өтімді кеуекті құрылымы бар целлюлоза микрогельдерін дайындады. Бұл микрогельдер жоғары пробиотикалық жүктеме сыйымдылығымен және тұрақтылықпен ерекшеленді [153].

Құрылым ерекшеліктері: Микрогельдер өзара байланысқан целлюлоза наноталшықтарынан тұратын торлы құрылымға ие. Бұл «үй тәрізді» архитектурасы пробиотиктерді тиімді жүктеуге мүмкіндік береді. *L. plantarum* инкапсуляцияланғаннан кейін микрогельдер кальций альгинатымен қапталды, нәтижесінде «ядро-қабық» құрылымы қалыптасты. Бұл құрылым пробиотиктің асқазанда бөлінуін болдырмады, қатаң асқазан ортасынан қорғады, бірақ ішекте босап шығуын қамтамасыз етті. Осылайша, рН-қа сезімтал «ядро-қабық» композиттік гельдері пробиотиктердің бақыланатын босап шығуы мен жоғары жүктеу сыйымдылығына қол жеткізуге мүмкіндік береді [153].

Сүтқышқылды бактериялары бар препараттарды өнеркәсіптік өндіру-күрделі технологиялық процесс. Пробиотикалық препараттарды жасаудағы негізгі мәселелердің бірі-таңдалған штамның немесе штамдар қауымдастығының бастапқы қасиеттерін сақтай отырып, биомассаны көбейту.

Биомассаны үлкен масштабта өндіру көбінесе ферментация әдісі арқылы жүзеге асырылады. Сондықтан, процесті мұқият жоспарлау және өндіріс параметрлерін қатаң бақылау қажет.

1.5 Пробиотикалық препараттардың клиникаға дейінгі және клиникалық зерттеу мәселелері

Ішек микрофлорасының адам денсаулығына ықтимал әсері тиісті клиникаға дейінгі, клиникалық және диетологиялық зерттеулерде дәлелденуі тиіс. Фармацевтикалық препараттың қауіпсіздігі мен тиімділігі талаптарына сәйкес келетін өндіріс процесін бастау үшін негізгі кезең –клиникаға дейінгі сынақтар.

Клиникаға дейінгі сынақтар – *in vitro*, *in vivo*, *ex vivo* және *in silico* модельдерінде жүргізілетін зерттеулер, олар потенциалды дәрілік заттың қауіпсіздігі мен биологиялық тиімділігі туралы бастапқы ақпарат алуға бағытталған.

Бұл зерттеулер GLP/GSP (тиісті зертханалық практика және озық ғылыми практика) қағидаттарына сәйкес жүргізіледі, бұл нәтижелердің сенімділігі мен қайталануын қамтамасыз етуге мүмкіндік береді.

B. clausii штамдары антибиотикке төзімділігі және құрамы жағынан сапалы пробиотикалық формулаларға жататындықтан, олар антибиотиктермен бірге қолданылып, антибиотикотерапияның жағымсыз асқазан-ішек әсерлерін азайту үшін пайдаланылды [154, 155, 156]. *B. clausii*-дің негізгі механизмдері:

- Ішек тосқауылдық қызметін жақсарту,
- Гомеостазды реттеу,
- Антимикробтық белсенділік,
- Энтеротоксиндерді ингибирлеу,
- Имуномодуляторлық әсер.

B. clausii штамдары ротавирустық инфекциялардан қорғай алады [157].

Адам энтероциттік моделінде *B. clausii* (O/C, N/R, SIN, T) штамдары β -дефензин 2 және кателицидиннің синтезін индукциялайды – бұл табиғи антимикробтық пептидтер. *B. clausii* пробиотиктері адамдарға қауіпсіз және тиімді екені бірнеше онжылдықтар бойы дәлелденген. Олар асқазан-ішек ауруларында, аллергиялық ринитте және балалардағы жоғарғы тыныс жолдарының инфекцияларында оң әсер етеді [158-161].

Пробиотиктердің тиімділігі пайдаланылатын түрлер мен тіршілікке қабілетті жасушалар/споралар санына байланысты болғандықтан, коммерциялық пробиотиктердің таңбалану талаптарына сәйкес келуі өте маңызды. Әр түрлі елдерде сатылатын өнімдердегі штамдардың құрамы, олардың тіршілікке қабілеттілігі немесе мөлшері бойынша айырмашылықтар

болуы мүмкін, бұл пробиотиктердің тиімділігінің төмендеуіне немесе тіпті уыттылық қаупіне әкелуі мүмкін [162, 163].

Коммерциялық пробиотиктердің сапасы соңғы жылдары Enterogermina® препаратының *B. clausii* үшін біртекті екені көрсетілді, коммерциялық пробиотиктердің сапасы зерттелді.

Ал басқа пробиотиктердің кейбірінде: жапсырмасында көрсетілмеген бактериялар анықталды, жапсырмасындағы сандық көрсеткіштер мен нақты құрам арасында сәйкессіздік байқалды [164].

Италияда *Bacillus* спораларын қамтитын 10 өнім зерттелді, тек Biogermin® және Enterogermina этикеткадағы көрсеткіштерге сәйкес келді.

MALDI-TOF масс-спектрометриясы, биохимиялық талдау, 16S рРНҚ секвенирлеуі және бактериялық санақ әдістері қолданылды. Басқа өнімдерде бөгде бактериялар (*Bacillus cereus*, *B. licheniformis*, *B.adius*, *Brevibacillus choshinensis*, *Lysinibacillus fusiformis* және *Acinetobacter baumannii*) табылды. Кейбір пробиотикалық формулалардың тіршілікке қабілеттілігі таңбаланған мөлшерден төмен болды [165].

Қатаң сапа бақылауынан өткен пробиотиктер ғана клиникалық қолдануға жарамды, өйткені: пробиотиктердің пайдалы әсері нақты штамм мен дозасына тәуелді.

B. clausii (O/C, N/R, SIN, T) әртүрлі дәрілік формалары (флакон, капсула, суспензияға арналған ұнтақ және суспензиясыз ұнтақ) асқазан-ішек жолында тең кинетикалық профиль көрсеткен. Дозалау және қабылдау әдісі бірдей болған жағдайда, *B. clausii* негізіндегі әртүрлі пробиотикалық формалар бірдей әсер етуі мүмкін.

Қазіргі клиникалық зерттеулер негізінде пробиотиктер (негізінен лактобациллалар мен бифидобактериялар) асқазан-ішек инфекциялары мен қабыну ауруларын емдеуде және алдын алуда қолданылып келеді. Пробиотиктермен емдеудегі ең көп зерттелген ауру – балалардағы жедел диарея, *Lactobacillus GG* (ATCC 53103) және жедел ротавирустық диарея болып табылады.

Ауруханаға жатқызылған балаларға *Lactobacillus GG* ферменттелген сүт немесе лиофилизденген ұнтақ түрінде берілген. Диарея ұзақтығы айтарлықтай қысқарған [166]. Бұл нәтижелер әртүрлі популяцияларда және басқа зерттеулерде расталды. Пробиотиктердің әсер ету механизмі *Lactobacillus GG* әсері: Ішек микрофлорасының тұрақталуы; ротавирустың бөліну кезеңінің қысқаруы; ротавирустың ішек өткізгіштігін жоғарылату әсерін төмендету; IgA секрециялайтын жасушалардың көбеюі, иммундық жауаптың күшеюі [167].

Еуропалық балалар гастроэнтерологиясы, гепатологиясы және тамақтану қоғамының жұмыс тобының көп орталықты зерттеуі ротавирус немесе басқа қоздырғыштар тудыратын жедел диарея жағдайында пробиотиктердің клиникалық тиімділігін тексерді. Ротавирустық диареяда, диарея ұзақтығының айтарлықтай төмендеуі байқалды, ал спецификалық емес немесе бактериялық диареяда айқын әсер табылған жоқ. Зерттеу пробиотикті ауыз қуысының

регидратация ерітіндісіне енгізудің қауіпсіздігін және ұзақ уақыт бойы ротавирустық диареяның дамуын болдырмайтынын көрсетті..

Ж.Сааведра және оның әріптестері [168-170] ауруханаға жатқызылған нәрестелерге жүргізілген қос соқыр, плацебо-бақыланатын зерттеу өткізді. Нәрестелер стандартты нәресте қоспасын немесе сол қоспаға қосылған *Bifidobacterium bifidum* (кейін *Bifidobacterium lactis* деп өзгертілді) және *Streptococcus thermophilus* пробиотиктері бар қоспаны алу үшін рандомизацияланды. 17 айлық бақылау кезеңінде стандартты қоспаны алған пациенттердің 31%-ында диарея дамыған, ал пробиотик қосылған қоспаны алғандар арасында бұл көрсеткіш тек 7% болған; пробиотик қосылған қоспаны қабылдаған балаларда ротавирус бөлінуінің жиілігі айтарлықтай төмен болды [171-173].

Пробиотикалық қоспалар 15 ай бойы бақыланған тамақтануы нашар перуандық балаларының арасында диарея жиілігінің едәуір төмендеуіне әкелді. Алайда бұл әсер тек емшек сүтін алмаған балаларға ғана тән болды.

Жақында Х.Шаевская жетекшілігіндегі топ *Lactobacillus GG* пробиотигінің нозокомиальды (аурухана ішілік) диареяның алдын алудағы тиімділігін бағалады [174]. Диареядан басқа себептермен ауруханаға жатқызылған 1 айдан 36 айға дейінгі 81 бала рандомизацияланған қос соқыр зерттеуге қатысып, ауруханаға жатқызу кезінде пробиотиктер немесе плацебо қабылдады. *Lactobacillus GG* пробиотигі плацебомен салыстырғанда нозокомиальды диареяның жиілігін төмендетті (6,7% қарсы 33,3%; салыстырмалы қауіп 0,2, 95% СИ 0,06-0,6). Ротавирустық инфекцияның таралуы пробиотиктер мен плацебо қабылдаған топтарда бірдей болғанымен, пробиотиктерді қолдану ротавирустық гастроэнтерит қауіпін едәуір төмендетті. Бұл нәрестелердегі нозокомиальды диарея қауіпін азайтуда пробиотиктердің рөлін көрсетеді. Пробиотикалық бактерияларды қабылдау ішек шырышты қабығының иммунологиялық тосқауылын тұрақтандырып, жергілікті қабынуға қарсы цитокиндердің өндірісін төмендетуі мүмкін [175-177].

Алдын ала есептер Крон ауруына тән кейбір иммунологиялық бұзылуларды жоюда клиникалық пайда бар екенін көрсетті [178-180]. Дегенмен, ішектің қабыну ауруындағы бұзылған микрофлораның рөлі көбінесе эксперименталды жануар үлгілерінде зерттелді. Т-жасуша рецепторы (TCR α) мақсатты түрде жойылған трансгенді тышқандар ішек микрофлорасына жауап ретінде өздігінен колит дамытады. Егер жаңа туған кезде олардың ішекпен байланысты лимфоидты тіндері аппендэктомия арқылы алынса, кейінірек колит дамымайды, бұл бастапқы колонизацияның кейінгі иммунологиялық процестерді анықтайтынын көрсетеді. Көптеген эксперименттік зерттеулер ішек микрофлорасынан жетілу сигналдарының болмауы немесе жеткіліксіздігі мыналарға әкелетінін көрсетті:

- Ішек бетінің ауданының азаюы,
- Шырышты қабық ферменттерінің үлгілерінің өзгеруі,
- Ішек тосқауылының ақаулары,
- Қабыну реакцияларының төмендеуі,

- Шырышты қабықтың IgA жүйесіндегі ақаулар,
- Ауыз арқылы қабылданатын антигендерге төзімділіктің жоғалуы [181].

Адамдарда ішектің қабыну ауруларына қатысты бақыланатын деректердің шектеулі болуы нақты пробиотикалық штамдардың әртүрлі қабыну аурулары мен олардың асқынуларына әсерін қосымша зерттеуді талап етеді.

Ішек инфекциялары кезінде пробиотиктерді клиникаға дейінгі және клиникалық зерттеулерден өткізудің маңызы зор [182, 183]. Бұл бірнеше себептерге байланысты:

1. Ғылыми негіздеме: Клиникаға дейінгі зерттеулер (жасуша дақылдармен жануарлар үлгілеріне жүргізілген эксперименттер) пробиотиктердің әсер ету механизмдерін, патогендермен өзара әрекеттесуін және ішек микрофлорасына ықтимал пайдасын түсінуге мүмкіндік береді. Бұл пробиотиктерді қолдану бойынша ғылыми негізделген ұсыныстар жасауға көмектеседі.

2. Қауіпсіздік: Клиникалық зерттеулер пробиотиктердің адам денсаулығына қауіпсіздігін бағалауға мүмкіндік береді. Табиғи шығу тегіне қарамастан, пробиотиктер жанама әсерлер тудыруы немесе басқа дәрілік заттармен өзара әрекеттесуі мүмкін. Клиникалық сынақтар осы қауіптерді анықтап, қауіпсіздік деңгейлерін белгілеуге көмектеседі.

3. Тиімділік: Клиникалық сынақтар пробиотиктердің ішек инфекцияларын емдеуде немесе алдын алуда қаншалықты тиімді екенін бағалауға мүмкіндік береді. Бұл мәліметтер дәрігерлер мен пациенттер үшін дұрыс емдеу әдісін таңдауда маңызды.

4. Дозалау мен форманы стандарттау: Зерттеулер пробиотиктердің оңтайлы дозасын, қолдану ұзақтығын және препарат формаларын (капсулалар, ұнтақтар, тағамдық қоспалар) анықтауға көмектеседі, бұл олардың тиімділігін арттыру үшін өте маңызды.

5. Реттеу және лицензиялау: Ғылыми зерттеулер нәтижесінде пробиотиктерді емдік құрал ретінде қолдануға рұқсат алу мүмкіндігі туады. Бұл пробиотиктердің клиникалық тәжірибеде кеңінен қолданылуына ықпал етеді.

6. Әсер ету механизмдерін түсіну: Зерттеулер пробиотиктердің иммундық жауапқа, ішек микробиотасына және физиологиялық процестерге қалай әсер ететінін анықтауға көмектеседі. Бұл ішек инфекцияларын және басқа да ауруларды емдеуге арналған жаңа терапиялық әдістерді әзірлеуге жол ашады.

7. Жекелендірілген медицина: Зерттеу нәтижелері белгілі бір пациенттің микробиом ерекшеліктерін ескере отырып, емдеудің жекелендірілген әдістерін дамытуға ықпал етеді [184].

Осылайша, ішек инфекциялары контексінде пробиотиктерді жүйелі зерттеу олардың әсерін тереңірек түсінуге ғана емес, сонымен қатар медициналық тәжірибеде қауіпсіз және тиімді қолданылуын қамтамасыз етуге мүмкіндік береді [185-187].

Жедел ішек инфекцияларымен (ЖИИ) күресуде кең ауқымды антимикробтық белсенділігі бар, дұрыс таңдалған микробтық құрамы мен өндіріс технологиясы оңтайландырылған отандық пробиотикалық дәрілік

препараттарды енгізу жөніндегі зерттеулер өзекті болып табылады. Клиникалық зерттеулер жаңа дәрілік препараттарды әзірлеудің ажырамас бөлігі болып табылады, себебі олардың қауіпсіздігі мен тиімділігін дәлелдеуге мүмкіндік береді [188].

2 ЗЕРТТЕУ НЫСАНДАРЫ МЕН ӘДІСТЕРІ

2.1 Зерттеу объектілері

БФС жасау үшін ішек ауруларының қоздырғыштарына қарсы жоғары антагонистік белсенділікке ие сүтқышқылды бактериялар-*Lactobacillus fermentum* 30 және *Lactobacillus cellobiosus* 36 қолданылды.

Сүтқышқылды бактерияларының *Lactobacillus fermentum* 30 және *Lactobacillus cellobiosus* 36 негізіндегі «АС-Пробионорм» пробиотикалық дәрілік препараты болды.

БФС жасау үшін ішек ауруларының қоздырғыштарына қарсы жоғары антагонистік белсенділікке ие сүтқышқылды бактериялар-*Lactobacillus fermentum* 30 және *Lactobacillus cellobiosus* 36 қолданылды.

Зерттелген *L.fermentum* 30+*L.cellobiosus* 36 дақылдарының ассоциациясының антагонистік белсенділігі келесі тест-дақылдарға қатысты анықталды: *Escherichia coli* ATCC: 8739тм, *Escherichia coli* ATCC: 11229тм, *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovar *typhimurium* ATCC: 14028тм, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *typhimurium* ATCC: 29630тм, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-р, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* ATCC:10031тм, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC:9027тм.

«АС-Пробионорм» пробиотикалық дәрілік препаратының клиникаға дейінгі сынақтары зертханалық ақ тышқандарда, салмақтары 30-32 г (лат. *Mus musculus*) мен егеуқұйрықтарда, салмағы 180-200 г (лат. *Rattus*) жүргізілді.

«АС-Пробионорм» пробиотикалық дәрілік препаратының 1,2 клиникалық кезеңдерінде субъект ретінде адамдар қатысты.

2.2 Зерттеу материалдары

2.2.1 Микроорганизмдерді дақылдау үшін келесі қоректік орталар қолданылды

БФС дақылдарының микробиологиялық көрсеткішкерін анықтау үшін *L.fermentum* 30+ *L.cellobiosus* 36 MRS құрамындағы қоректік ортада өсірілді (г/л): глюкоза- 20,0; ашытқы экстракты- 5,0; ет экстракты- 10,0; пептон- 10,0; лимон қышқылды аммоний- 2,0; сірке қышқылды натрий –5,0; екі негізді фосфор қышқылды калий- 2,0; күкірт қышқылды магний- 0,1; күкірт қышқылды марганец- 0,05; твин 80-1,0; рН- 6.5-7,0;

Ет-пептонды агардың құрамы г/л: пептон- 5, натрий хлориді- 5, етті сығынды- 1,5, ашытқы сығындысы -1,5, агар- 15, рН- 6,5-7,0

Антагонистік белсенділікті анықтау үшін инкубацияланған қоректік агар (ТМ Media, Үндістан), ашытқылар үшін 30°C температурада 48 сағат бойы инкубацияланған декстрозасы бар Сабуро агары қолданылды.

Зең саңырауқұлақтарына (сахароза, 30 г/л; NaNO₃, 2 г / л; K₂HPO₄, 1 г/л; MgSO₄, 0,5 г/л; KCl, 0,5 г/л) 72-120 сағат ішінде 30°C температурада инкубацияланған Чапек 7 ортасы және антагонизмді тексеру үшін Чапек 7 агар (агар-агар,20г/ л) қолданылды.

2.3. Зерттеу әдістері

2.3.1 Лактобактериялардың морфологиялық, дақылдық, биохимиялық қасиеттерін зерттеу және идентификациялау әдісі.

- Лактобацилл өндірістік штамдарының морфологиялық, дақылдық және биохимиялық қасиеттерінің болуын анықтау.

- Сэнгер әдісімен 16S rRNA генін секвенирлеу арқылы олардың молекулалық-генетикалық идентификациясымен анықтау [189-193].

ДНҚ бөліп алу

Promega (АҚШ) компаниясының «DNA Purification Kit» жинағына енгізілген стандартты хаттамаға сәйкес жүргізілді.

ЕПА ортасында өсірілген тәуліктік бактерия дақылы 480 мкл 50 mM EDTA ерітіндісінде ресуспендирленді. Суспензияға 60 мкл лизоцим (10 мг/мл) қосылды. Үлгі 37°C температурада 30–60 минут бойы инкубацияланды. 13 000–16 000 айн/мин режимінде 2 минут бойы центрифугаланып, супернатант жойылды. 600 мкл Nuclei Lysis Solution ерітіндісі қосылды. Клеткалар толықтай ресуспендирленгенше абайлап жүргізілді.

Жасушаларды еріту үшін үлгі 80°C температурада 5 минут инкубацияланды; кейін бөлме температурасына дейін салқындатылды. Клеткалық лизатқа 3 мкл RNase Solution қосылып, пробирка 2–5 рет төңкеріліп араластырылды. 37°C температурада 15–60 минут бойы инкубацияланды. Үлгі бөлме температурасына дейін салқындатылды. RNase-пен өңделген жасушалық лизатқа 200 мкл Protein Precipitation Solution ерітіндісі қосылды.

Protein Precipitation Solution ерітіндісін клеткалық лизатпен араластыру үшін пробирка 20 секунд бойы қатты жүргізілді. Үлгі мұз үстінде 5 минут бойы инкубацияланды. Кейін 30–60 минут бойы минус 4°C температурада ұсталды. 13 000–16 000 айн/мин режимінде 3 минут бойы центрифугаланды. ДНҚ бар супернатант таза 1,5 мл микроцентрифуга пробиркасына ауыстырылып, оған бөлме температурасындағы 600 мкл изопропанол қосылды. ДНҚ жіпшелері көзге көрінетін массаға айналғанша абайлап төңкеріліп араластырылды, кейін 15–20 минут бойы минус 20°C температурада мұздатқышқа қойылды. 13 000–16 000 айн/мин режимінде 2 минут бойы центрифугаланды. Бөлме температурасындағы 600 мкл 70% этанол қосылып, ДНҚ қалдығын шаю үшін пробирка бірнеше рет төңкерілді. 13 000–16 000 айн/мин режимінде 2 минут бойы қайта центрифугаланды. 10–15 минут бойы кептірілді. Пробиркаға 100 мкл DNA Rehydration Solution ерітіндісі қосылып, 65°C температурада 1 сағат бойы инкубацияланды. ДНҚ минус 20°C температурада сақталды.

ДНҚ сандық және сапалық талдауы

NanoDrop ND 2000 спектрофотометрі арқылы 260 нм толқын ұзындығында жүргізілді, сондай-ақ ДНҚ-ның сапалық бағасы 1% агарозды геледе электрофорез әдісімен жүргізілді.

16S рРНҚ генінің нуклеотидтік тізбегін анықтау үшін әмбебап праймерлер қолданылды: тікелей 27F (5'-AGAGTTTGGATCCTGGCTCAG-3') және кері 1492R (5'-TAC GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3') [194].

ПТР реакциясы жалпы көлемі 20 мкл болатын қоспада жүргізілді. ПТР қоспасы құрамында 50 нг ДНҚ, 5 бірлік Taq DNA Polymerase, әр dNTP-тен 0,2 mM, Taq үшін 10x реакциялық буфер (ThermoFisher, АҚШ), 2,5 mM MgCl₂, әр праймерден 10 пмоль болды. ПТР амплификациясы ProFlex амплификаторы (Applied Biosystems, АҚШ) арқылы жүргізілді. ПТР температуралық режимі: 1-кезең – 95°C-та 5 мин – 1 цикл; 2-кезең – 95°C-та 30 с, 55°C-та 40 с, 72°C-та 50 с – 30 цикл; 3-кезең – 72°C-та 10 мин – 1 цикл. ПТР өнімдерінің тиімділігін бағалау үшін амплификация өнімдері 1% агарозды геле этидий бромидімен боялып, гель құжаттау жүйесімен (BioRad, АҚШ) талданды.

ПТР өнімдерін тазарту

Алынған өнім ферментативтік әдіспен тазартылды: IP өнімдерін тазартуға арналған экспресс-реагент қолданылды, ол модификацияланған экзонуклеаза I және креветкалы сілтілік фосфатазасынан (SAP) тұратын екі гидролитикалық ферменттен және арнайы буферден тұрады. Реагент ПТР өніміне тікелей қосылып, 37°C-та 4 минуттық тазалау және кейін 80°C-та 1 минуттық инактивация жүргізілді [195, 196].

Секвенирлеу

Секвенирлеу реакциясы BigDye® v 3.1 және праймерлер көмегімен жүргізілді. Реакциялық қоспадан байланыспаған компоненттерді ацетатты-спирттік қоспа арқылы тазартты. Ген фрагменттерінің бөлінуі автоматты генетикалық анализатор көмегімен жүзеге асырылды. Алынған нуклеотидтік тізбек GenBank халықаралық деректер базасындағы тізбектермен салыстырылды [197-199].

2.3.2 БФС лиофильді кептіру және микробиологиялық тазалықты анықтау әдісі.

- Лактобактериялардың өндірістік штамдарын алу. Биомассаны дақылдық сұйықтықпен және протекторлармен бірге сублимациялық кептіру арқылы алу.

- Өндірістік сызба-нұсқаларға сәйкес жүргізілді.

«АС-Пробионорм» дәрілік препараты құрамындағы сүтқышқылды бактериялардың БФС-ін (лиофилизатын) алу қоректік ортада өсіру, биомассаны протекторлармен бірге лиофильді кептіру арқылы жүзеге асырылды.

БФС-тің микробиологиялық көрсеткіштерін анықтау үшін *L. fermentum* 30 және *L. cellobiosus* 36 дақылдары әрқайсысы жеке-жеке 24 сағат бойы 35°C температурада келесі құрамдағы қоректік ортада өсірілді (г/л): глюкоза – 20,0; ашытқы экстракты – 5,0; ет экстракты – 10,0; пептон – 10,0; аммоний лимон қышқылы тұзы – 2,0; натрий сірке қышқылы тұзы – 5,0; калий фосфор қышқылының екі алмастырылған тұзы – 2,0; магний күкірт қышқылы тұзы – 0,1; марганец күкірт қышқылы тұзы – 0,05; твин-80 – 1,0. рН – 6,5-7,0; тазартылған су – 1 л дейін. *L.fermentum* 30 және *L.cellobiosus* 36 монодақылдарының ассоциациядағы қатынасы 1:1 құрады.

ҚР Фармакопеясы, Т.1, 2.6.12-бөлім және Т.2, 2.6.13-бөлім талаптарына сәйкес жүргізілді. Препараттың бір дозасында патогенді бактериялар, ішек таяқшасы тобы бактериялары, стафилококк пен ашытқылардың болуы жол берілмейді [200, 201].

2.3.3 Антагонистік белсенділікті анықтау әдісі

Арнайы белсенділік лактобактериялардың шартты және облигатты патогенді бактерияларға қатысты антагонистік белсенділігі, қышқыл түзу қабілеті және тірі лактобацилл жасушаларының саны арқылы анықталды. Препарат кем дегенде бір патогенді микроорганизм штамының дамуын тежеуі тиіс. Препараттың бір дозасында кем дегенде 2,0 миллиард тірі лактобацилл жасушасы болуы керек.

Препараттың антагонистік белсенділігі 0,9% натрий хлориді ерітіндісінде (1 мл – бір доза есебімен) суспензияланған күйде ҚР Фармакопеясы Т.1, 2.6.13-бөлім талаптарына сәйкес анықталды [200].

Тіршілікке қабілетті лактобацилл жасушаларының жалпы саны 0,9% натрий хлориді ерітіндісінде (1 мл – бір доза есебімен) суспензияланған күйде ҚР Фармакопеясы Т.1, 2.6.12-бөлім талаптарына сәйкес анықталды.

2.3.4 БФС және пробиотикалық препараттың сынамалық серияларын өндіру әдісі

- Құрғақ лиофилизаттың (БФС) қаптамасы мен орауы 2000 г $\pm 10\%$ мөлшерінде екі қабатты полиэтилен қалтаға салынып, қалтаның шеті дәнекерлену арқылы жүзеге асырылды. Қаптамаға БФС атауы, сериясы, шығарылған күні жазылып, $5 \pm 2^\circ\text{C}$ температурада тоңазытқышқа қойылады (НҚ талаптарына сәйкес).

- БФС мен дайын дәрілік препаратты тасымалдау ГОСТ 17768-90 сәйкес 8°C -тан аспайтын температурада жүргізілді. Препаратты 25°C -тан аспайтын температурада 10 тәуліктен аспайтын уақытқа тасымалдауға рұқсат етіледі. Төменгі температуралық шек шектелмеген.

- Пробиотикалық препараттың сынамалық сериялары «КФК «МЕДСЕРВИС ПЛЮС» ЖШС өндірістік алаңында (Алматы облысы) GMP стандарттарына және өндірісте қабылданған технологиялық регламентке сәйкес өндірілді. Құрғақ препараттың 1 г көлемін саше пакетке салу бастапқы орама – ALU/PE буфлен (150x100 мм, D-76 мм) арқылы, DXDK40VI (УС18) саше-орау машинасында жүзеге асырылды. Бір сашенің өлшемі – 58x58 мм, қос саше – 116x58 мм.

- БФС және пробиотикалық препараттың сынамалық серияларының сапасы Алматы қаласындағы «Инфекциялық ауруларға қарсы ғылыми орталығы» АҚ-да Қазақстан Республикасының Мемлекеттік Фармакопеясы Т.1, 2-бөлім (Астана, 2008 ж.), ОФС.1.7.2.0012.15 – Пробиотиктерді бақылауға арналған өндірістік штамдар талаптарына және НҚ талаптарына сәйкес бағаланды.

2.3.5 Клиникаға дейінгі зерттеулерді жүргізу әдісі

-Өндірістік пробиотикалық штамның асқазан сөлінің және өт әсеріне төзімділігін анықтау. Пробиотиктердің тіршілігі адам ағзасындағы ас қорыту жағдайларын имитациялайтын *in vitro* моделін қолдану арқылы зерттелді [202]. Модельдік орталар цитрат-фосфатты буфер ерітіндісі және ацидин-пепсин ферменттік препараттары (тіркеу нөмірі LS-001355; РУЕ Белмедпрепараты,

Беларусь) және панзинорм форте 20000 (тіркеу нөмірі Р № 014602/01; өндіруші Kloven, LLC) негізінде дайындалды.

Әдістің мәні микроорганизмдерді қышқылды ортада қышқылды-пепсинмен (рН 2,0) және панзинорм форте 20000 форте (рН 7,2) сілтілі ортада аралас тағамның асқазан мен ішекте орташа тұру уақытында дәйекті инкубациялаудан тұрады, содан кейін қатты қоректік ортаға егу арқылы тірі қалған микроорганизмдердің бастапқы және жалпы суспензия санын анықтау.

- Медициналық мақсаттағы пробиотиктерді өндіру үшін қолданылатын өндірістік штаммдарда фагтарды анықтау. Өндірістік штамм геномында фагтардың болуы екінші немесе үшінші өтудің зерттелетін культурасының суспензиясын ет-пептонды агарға 1 мл-ден аспайтын көлемде себу арқылы анықталды (1 мл-де 10^{-7} - 10^{-9} микроб жасушаларының концентрациясы). Егіс алдында қоректік ортасы бар Петри табақшалары конденсацияны кетіру үшін термостатта кептірілді. Үздіксіз көгал алу үшін шыныаяқтарды шайқау арқылы микробтық суспензия ортаның бетіне біркелкі таратылды. Қалған суспензия стерильді Пастер тамшуырымен жойылды. Дақылдары бар пластиналар $37+1^{\circ}\text{C}$ температурада 18-36 сағат бойы инкубацияланды. Өсірілген дақылдың үздіксіз өсуінде фаголиз аймақтары болмауы керек.

- Жануарларды ұстаудың негізгі әдістері мыналарға сәйкес жүзеге асырылды: SOP-PHT-001 Зертханалық жануарларды күту.

- Тәжірибе үшін жануарларды іріктеу және оларды бақылау мыналар бойынша жүргізілді: SOP-PHT-005 Зертханалық жануарларды тәжірибеге жіберу; SOP-PHT-011 Жануарларды ветеринариялық бақылау; SOP-PHT-021 Зертханалық жануарларды бақылау.

- Жануарларды таңбалау мыналарға сәйкес жүргізілді: SOP-PHT-004 Эксперименттік жануарларды таңбалау.

- Зерттелетін заттарды енгізу мыналар бойынша жүргізілді: SOP-PHT-009 Зерттелетін заттарды енгізу.

- Премедикация және эвтаназия келесідей орындалды: SOP-PHT-016 Ауырсынуды басу, анестезия және кеміргіштердің эвтаназиясы.

- Тазалау және дезинфекциялау келесі ережелерге сәйкес жүргізілді: SOP-PHT-002 Зертханалық үй-жайларды және зертханалық жануарларды ұстауға арналған үй-жайларды тазалау және санитарлық өңдеу; SOP-PHT-007 Торлар мен жабдықтарды жуу, өңдеу және зарарсыздандыру; SOP-GE-021 Қалдық кластары. Жинау және жою ережелері.

- Емдік пробиотикалық заттың жедел және өткір уыттылығын *in vivo* тәжірибелерінде анықтау. Өткір уыттылық Қазақстан Республикасының Тиісті зертханалық тәжірибе стандартының талаптарына сәйкес және жаңа фармакологиялық заттарды тәжірибелік (клиникаға дейінгі) зерттеу бойынша әдістемелік нұсқаулар негізінде жүзеге асырылды. Зерттелетін препараттарды жануарларға аш қарынға асқазанға бірнеше рет, салмағы 180-200 г егеуқұйрықтар үшін максималды рұқсат етілген 3,0 мл көлемінде зәйтүн ұшымен дәнекерленген қисық инъекциялық инесі бар металл зондты пайдалана

отырып енгізді. Бақылау тобындағы жануарларға эквивалентті көлемде су берілді.

- Емдік пробиотикалық заттың ішке қабылдағанда *in vivo* экспериментінде созылмалы (субхроникалық, хроникалық) уыттылықтарын анықтау

- Зерттелетін пробиотикалық дәрілік препараттың сенсibilизаторлық әсерін анықтау

2.3.6 Клиникалық зерттеулерді жүргізу әдісі

- Клиникалық зерттеулер жүргізуге рұқсат алу үшін құжаттаманы әзірлеу және дайындау. Қазақстан Республикасының заңнамалық және нормативтік құжаттарына сәйкес жүргізілді: ҚР ДСМ 2020 жылғы 11 желтоқсандағы № ҚР ДСМ-248/2020 бұйрығы – дәрілік заттар мен медициналық бұйымдарды клиникалық зерттеу, зертханалық сынақтар жүргізу ережелері және клиникалық базаларға қойылатын талаптар туралы; ҚР ДСМ 2021 жылғы 4 ақпандағы №ҚР ДСМ-15 бұйрығы – тиісті фармацевтикалық тәжірибелерді бекіту туралы; ҚР 2020 жылғы 7 шілдедегі №360-VI Кодексі – халық денсаулығы және денсаулық сақтау жүйесі туралы (2022 жылғы 24 қарашадағы жағдай бойынша өзгерістермен); ҚР ДСМ 2021 жылғы 16 ақпандағы №ҚР ДСМ-19 бұйрығы – дәрілік заттар мен медициналық бұйымдарды сақтау және тасымалдау ережелерін бекіту туралы; ҚР ДСМ 2022 жылғы 30 мамырдағы №ҚР ДСМ-49 бұйрығы – дәрілік заттар мен медициналық бұйымдарды таңбалау ережелерін бекіту туралы бұйрыққа өзгерістер енгізу.

- Дүниежүзілік медициналық қауымдастықтың 18-ші Бас Ассамблеясында қабылданған Хельсинки декларациясына негізделген этикалық қағидаларға сәйкес жүргізілді. Сақтандыру қамтамасыз ету шеңберінде клиникалық зерттеуге қатысқан еріктілерге ұлттық заңнама талаптарына сәйкес медициналық сақтандыру рәсімделді; «NOMAD Insurance» компаниясымен сақтандыру шарттары жасалды: зерттеудің 1-фазасы – В-МЕД №002-23-11342229/656588ДС сақтандыру шарты, 2023 жылғы 2 маусым; зерттеудің 2-фазасы – В-МЕД №002-23-12009501/710939 ДС сақтандыру шарты, 2023 жылғы 22 желтоқсан.

-1-кезең. Пробиотикалық препараттың клиникалық зерттеуінің 1-кезеңін ұйымдастыру және жүргізу «Халықаралық кейінгі білім беру институты клиникасы» ЖШС (Алматы қ.) медициналық мекемесінің (клиникалық база) негізінде, ПМ-001-23ж бекітілген хаттамаға сәйкес жүзеге асырылды: «Ішек инфекцияларына қарсы кең спектрлі әсер ететін «АС-Пробионорм» пробиотикалық препаратының қауіпсіздігі мен жағымдылығын зерттеу, өндіруші – «Өнеркәсіптік микробиология» ЖШС, сау еріктілерде» (1-кезең). Зерттеу дизайны – ашық, бір орталықты, клиникалық зерттеу, 1-кезең.

Зерттеу жоспары келесі кезеңдерді қамтыды:

1-кезең (кіріспе кезең) – зерттеуге қатысатын сау еріктілерді іріктеу-скрининг, ақпараттандырылған келісімге қол қою, дәрігерлік тексеру және зертханалық зерттеулер жүргізу.

2-кезең (бастапқы жағдайды бақылау кезеңі) – зерттеуге дейін әрбір қатысушының бастапқы жағдайын анықтау мақсатында клиникалық өлшемдер жүргізілді. Бұл бастапқы деректер кейін зерттеу аяқталғаннан кейін алынған нәтижелермен салыстырылды.

3-кезең (емдеу әсерін және зерттеу аяқталғаннан кейінгі қауіпсіздікті динамикалық бақылау кезеңі) – зерттеу кезеңінде және соңғы қолданудан кейінгі бір апта бойы әрбір қатысушыға күнделікті клиникалық бақылау жүргізілді.

Клиникалық зерттеу барысында зерттелген параметрлер: «АС-Пробионорм» препаратының жағымдылығы мен қауіпсіздігі, зерттеу субъектілерінің жалпы соматикалық жағдайының өзгеруі, дене қызуы, асқазан-ішек жолдарының реакциясы, қан формуласының реакциясы, АҚ, ЖЖЖ, аминотрансфераза деңгейі (АЛТ, АСТ), сарысу альбумині, қан глюкозасы, билирубин, зәр анализі, нәжістің микробиологиясы.

Зерттеуге 18–50 жас аралығындағы екі жынысты 20 сау субъект енгізілді. Препаратты қабылдау ұзақтығы – 7 күн, күнделікті. Субъектілердің клиникалық зерттеуге жалпы қатысу ұзақтығы – 21 ± 1 күн.

Клиникалық зерттеулерде қолданылған статистикалық әдістер – зерттеуге қосу кезеңінде анамнездік, клиникалық, зертханалық және аспаптық зерттеулердің деректері жиналды. Сонымен қатар, кеңестер көлемі, тексерулер және зерттеуге дейінгі қатар жүретін ем тіркелді. Деректер жинағы бекітілген нысан – Жеке тіркеу картасы және өзіндік бақылау күнделіктері арқылы жүргізілді.

ПМ-001-23г хаттамасына сәйкес клиникалық зерттеу келесі құжаттар негізінде жүргізілді: «Қазақ онкология және радиология ғылыми-зерттеу институты» АҚ жанындағы Жергілікті этикалық комитеттің №6-2023 хаттамасынан үзінді, 2023 ж. 21 тамыз; ҚР ДСМ МФК және КМ «Дәрілік заттар мен медициналық бұйымдарды сараптау ұлттық орталығы» ШЖҚ РМК қорытындысы, шығыс №19-04-11062/ОЗ-И, 2023 ж. 27 шілде; ҚР ДСМ Медициналық және фармацевтикалық қызметті бақылау комитетінің рұқсаты №KZ59VMX00000262, берілген күні: 2023 ж. 28 тамыз.

- «АС-Пробионорм» препаратының төзімділігі, қауіпсіздігі (ұнтақ 1 г пакетте); сонымен қатар зерттелушілердің зерттеу кезеңінде жалпы соматикалық жағдайының өзгеруі, дене температурасы, асқазан-ішек жолдарынан реакциялар, қан формуласынан реакциялар, қан қысымы, жүрек соғу жиілігі, аминотрансферазалар деңгейін анықтау (АЛТ, АСТ), қан сарысуындағы альбумин, қант, қан билирубині, зәр анализі, нәжіс микробиологиясы.

- 2-кезең клиникалық зерттеуін ұйымдастыру және жүргізу «Халықаралық кейінгі білім беру институты клиникасы» ЖШС (Алматы қ.) медициналық мекемесінде ПМ-003-23г хаттамасына сәйкес жүргізілді: «АС-Пробионорм» пробиотикалық препаратының тиімділігі мен қауіпсіздігін дисбактериозы бар пациенттердің қатысуымен зерттеу (2-кезең). Зерттеу дизайны – ашық, бірорталықты, 2-кезең клиникалық зерттеуі.

Зерттеу жоспары келесі кезеңдерден тұрды:

1-кезең – пациентті клиникалық тексеру, ақпараттандырылған келісімге қол қою, зертханалық зерттеулер, рандомизация.

2-кезең – пробиотикалық препаратпен емдеу, пациенттердің жағдайын және жағымсыз құбылыстарды бағалау, зертханалық зерттеулер және статистикалық өңдеу.

3-кезең – препаратты соңғы қолданудан кейін емнің тиімділігі мен жағымдылығын бағалау мақсатында бақылау тексерісі, визуалды бағалау, жалпы клиникалық және биохимиялық зерттеулер.

Клиникалық зерттеу параметрлері: «АС-Пробионорм» препаратының тиімділігі мен қауіпсіздігі, жалпы соматикалық жағдай өзгерістері, дене температурасы, асқазан-ішек жолының реакциясы, қан формуласының реакциясы, АҚ, ЖЖЖ, аминотрансферазалар деңгейі (АЛТ, АСТ), сарысу альбумині, қант, билирубин, зәр анализі, нәжіс микробиологиясы, жағымсыз реакциялар болмауы.

Дисбактериозы бар 18–50 жас аралығындағы екі жынысты 210 зерттеу субъектісі енгізілді. Емдеу ұзақтығы – 28 күн. Клиникалық зерттеуге жалпы қатысу ұзақтығы – 42 ± 1 күннен аспайды.

Қолданылған статистикалық әдістер: t-критерий Стьюдента (Student t test), параметрлік емес әдістер – Манн-Уитни U-критерийі, Красскел-Уоллис H-критерийі, хи-квадрат критерийі (Chi-squared test). Іріктеме көлемі 2-кезең жүргізуге және негізгі нәтижені объективті бағалауға жеткілікті субъектілер санына қарай анықталды. Негізгі талдау популяциясы – зерттеуге енгізілген барлық субъектілер. Қауіпсіздік бойынша талдау ем басталғаннан кейін пайда болған жағымсыз құбылыстардың саны мен пайыздық үлесін жүйелік органдар сыныптамасы, терминология, ауырлық дәрежесі және еммен себеп-салдар байланысы бойынша обобщалау арқылы жүргізілді. Деректер бекітілген Жеке тіркеу картасы және өзіндік бақылау күнделіктері арқылы жиналды. Сипаттамалық талдау нақты іріктеме бойынша жүргізілді[203].

ПМ-003-23г хаттамасы бойынша клиникалық зерттеу келесі құжаттар негізінде жүргізілді: «Қазақ онкология және радиология ғылыми-зерттеу институты» АҚ жанындағы Жергілікті этикалық комитеттің №14-2023 хаттамасынан үзінді, 2023 ж. 27 желтоқсан; ҚР ДСМ МФК және КМ «Дәрілік заттар мен медициналық бұйымдарды сараптау ұлттық орталығы» ШЖҚ РМК қорытындысы, шығыс №19-04-5450/ОЗ-И, 2024 ж. 28 мамыр; ҚР ДСМ Медициналық және фармацевтикалық қызметті бақылау комитетінің рұқсаты №KZ04VMX00000282, берілген күні: 2024 ж. 04 маусым.

- «АС-Пробионорм» препаратының бактерияға қарсы белсенділігін анықтау ішек таяқшасы, алтын стафилококк, *Salmonella enteritidis* штаммдарында агар диффузиялық әдіспен жүргізілді.

- Қан мен нәжіс үлгілерінен биохимиялық көрсеткіштерді және қанның жалпы анализінің параметрлерін бағалау үшін лейкоциттер санын және нәжіс талдау.

3 ЗЕРТТЕУ НӘТИЖЕЛЕРІ ЖӘНЕ ТАЛҚЫЛАУ

3.1 Пробиотикалық дәрілік препараттың белсенді фармацевтикалық субстанциясын (БФС) жасау

3.1.1 БФС құрамындағы сүтқышқылды бактериялардың антагонистік белсенділігін анықтау

Дәрілік препараттарды өндіру технологиясын дамытудың алғашқы кезеңдерінің бірі-жоғары биологиялық белсенділігі расталған пробиотикалық микроорганизмдердің ассоциациясы негізінде белсенді фармацевтикалық субстанцияны құру.

Зерттелетін дәрілік препаратты жасау үшін жалпы және атап айтқанда БФС жасау үшін ішек ауруларының қоздырғыштарына қарсы жоғары антагонистік белсенділікке ие сүтқышқылды бактериялар-*Lactobacillus fermentum* 30 және *Lactobacillus cellobiosus* 36 қолданылды.

Пробиотикалық сүтқышқылды бактериялардың морфологиялық және физиологиялық-биохимиялық қасиеттерін зерттеу кезінде олардың туыстық және түрлік сәйкестігі расталды.

L. fermentum 30 штаммы *L. fermentum* 29 лиофилизацияланған дақыл популяциясынан алынған, бұл штамм сау адамның ішегінен бөлініп алынған. Бактериялар грамоң, спора түзбейтін, қозғалмайтын, ұштары доғал, өлшемі 0,5-0,7x1,0–3,0 мкм, көбінесе дара, кейде қысқа тізбектер түрінде орналасқан таяқшалар түрінде көрінеді. Қатты қоректік ортада - жалпақ, дөңгелек, кедір-бұдырлы колониялар; сұйық ортада-біркелкі лайлану байқалады. Галактоза, лактоза, мальтоза, манноза, мелибиоза, раффиноза, сахарозаны ашытады. Целлобиоза, маннит, рамноза, ксилозаны пайдаланбайды немесе әлсіз ашытады. Нитраттарды тотықсыздандырады, аргининнен аммиак түзеді. Сүтті әлсіз қышқылдандырады. Крахмалды гидролиздейді. Өсуге оңтайлы температура-37°C, жақсы өседі 45°C-та, ал 15°C-та өсу шектеулі. Азоттың органикалық көздерін (пептон, ашытқы автолизаты, ет экстракты, жүгері экстракты, солод өсінділерінің экстракты) пайдаланады. H₂S және индол түзбейді. Каталаза белсенділігі жоқ. Патогенді емес. Жоғары антагонистік белсенділікке және құрғақтыққа, төзімділікке ие.

L. cellobiosus 36 штамы *L. cellobiosus* 35 лиофилизацияланған дақыл популяциясынан бөлініп алынған. Бұл штамм ұштары дөңгеленген, әртүрлі өлшемді (0,5-0,7x1,5-5,5 мкм) қозғалмайтын, спора түзбейтін, грамоң таяқшалардан тұрады. Таяқшалар дара немесе қысқа тізбектер (3-5 жасуша), кейде ұзын тізбектер түрінде орналасады. Сұйық ортада біркелкі лайлы суспензия және жоғарғы қабатта мөлдір сақина түзіледі. Қатты ортада беткі колониялар-жалпақ, ризоидты; терең колониялар -ашық сары, жасымық тәрізді. Арабиноза, рибоза, целлобиоза, галактоза, глюкоза, глюконат, раффиноза, мальтоза, мелибиоза, сахароза, ксилозаны ашытады. Лактоза, манноза, ксилозада әлсіз реакция байқалады. Глюкоза мен глюконатты ашытқанда CO₂ түзеді. Маннит пен рамнозаны ашытпайды. Аргининнен аммиак түзеді. Екі

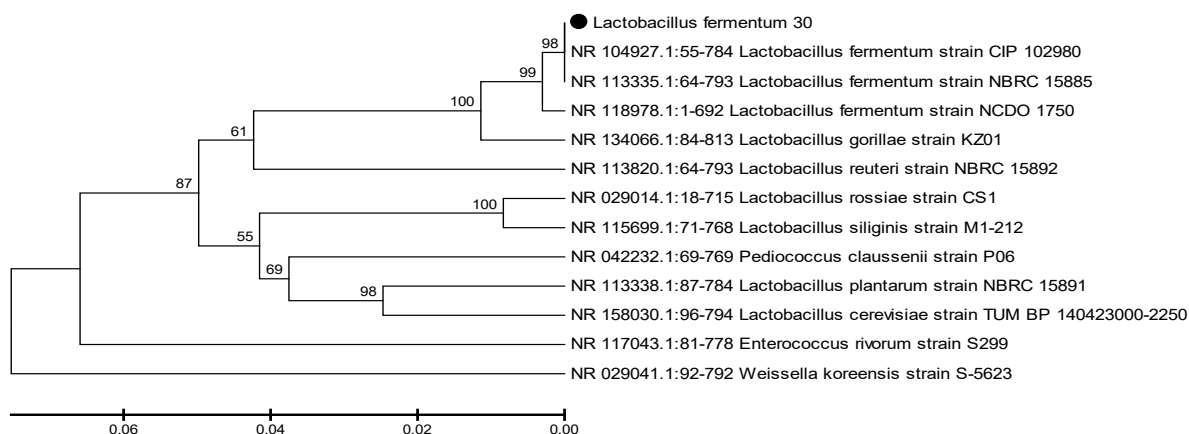
тәулік ішінде сүтті ашытпайды. 15°C-та өседі, бірақ 45°C-та өспейді. Өсуге оңтайлы температура-35°C. Органикалық азот көздерін (пептон, ашытқы автолизаты немесе экстракты, ет экстракты) пайдаланады. Индол және H₂S түзбейді. Патогенді емес. Антагонистік белсенділікке ие.

Пробиотикалық микроорганизм штамдарының молекулалық-генетикалық сәйкестендіруі жүргізілді. Осы зерттеу нәтижесінде Сэнгер әдісімен 16S rRNA генінің учаскесін секвенирлеу негізінде келесі бактерия штамдарының таксономиялық сәйкестігі расталды:

1. №30 үлгі — *Lactobacillus fermentum*
2. №36 үлгі — *Lactobacillus cellobiosus* (*Lactobacillus fermentum* Beijerinck 1901 синонимі)

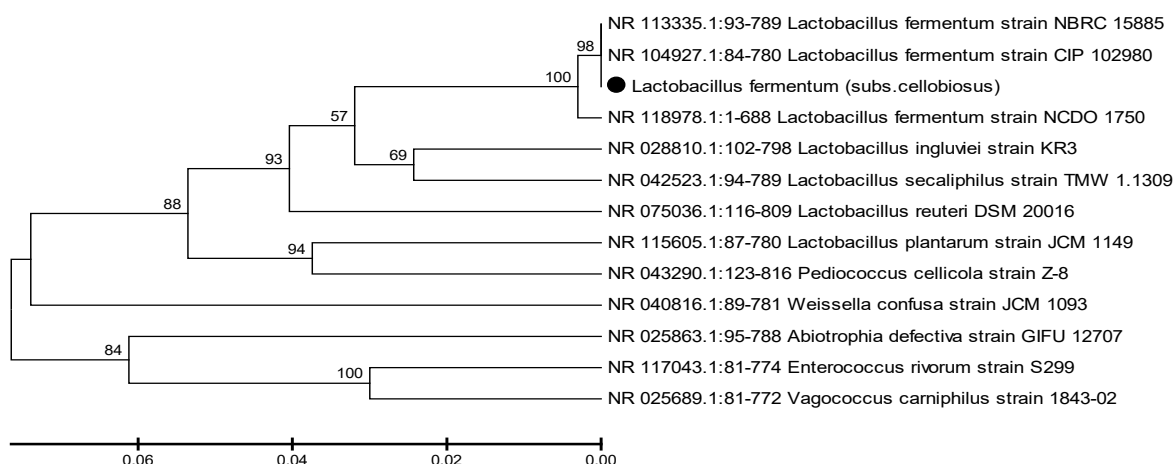
NCBI халықаралық дерекқорындағы ең жақын штамдармен гомология дәрежесі 98,6%-дан 100,0%-ға дейін болды. 16S rRNA генінің учаскесін секвенирлеу арқылы алынған нуклеотидтік тізбек және №30 үлгі (*Lactobacillus fermentum*) мен №36 үлгінің (*Lactobacillus cellobiosus*) 16S rRNA генінің учаскелерін NCBI халықаралық дерекқорындағы референттік штамдармен салыстыру арқылы құрылған филогенетикалық ағаш төменде көрсетілген.

Филогенетикалық ағаш зерттеліп отырған үлгінің 16S rRNA генінің учаскесін Халықаралық дерекқор (NCBI) базасындағы референттік штамдардың нуклеотидтік тізбектерімен салыстыру арқылы құрылған (Сурет 1).



Сурет 1. 16SrRNA генінің аймағын NCBI халықаралық дерекқорында орналасқан анықтамалық штамдар тізбегімен салыстыру арқылы құрылған филогенетикалық ағаш

Жақын штаммен- *Lactobacillus fermentum* CIP 102980 (NR 104927.1:55-784) - гомология дәрежесі 100,00% құрады. Бұл зерттелген үлгіні *Lactobacillus fermentum* түріне жатқызуға мүмкіндік береді.



Сурет 2. 16SrRNA ген аймағын NCBI халықаралық дерекқорында сақталған анықтамалық штамдар тізбегімен салыстыру арқылы құрылған филогенетикалық ағаш

Филогенетикалық ағаш, 16S rRNA генінің учаскесін Халықаралық NCBI деректер базасында орналастырылған референттік штамдардың тізбектерімен салыстыру арқылы құрылды (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Ең жақын штамм NR 104927.1:84-780 *Lactobacillus fermentum* CIP 102980 16S рибосомалық РНҚ-ның жартылай тізбегінің гомология дәрежесі 99,86% құрады, бұл зерттелетін үлгіні *Lactobacillus cellobiosus* түріне жатқызуға мүмкіндік береді (*Lactobacillus fermentum* Beijerinck 1901 синонимі) [204].

БФС-бұл *Lactobacillus fermentum* 30 және *Lactobacillus cellobiosus* 36 сүтқышқылды бактерияларының лиофилизаттары, құрғату қорғаныш ортасының компоненттерімен бірге. БФС-тің органолептикалық, физика-химиялық қасиеттері және микробиологиялық көрсеткіштері зерттелді. Мәліметтер 1-кестелерде берілген.

Кесте 1- БФС-тің органолептикалық және физико-химиялық көрсеткіштері

Көрсеткіштің атауы	Сипаттамасы
1	2
Сыртқы түрі мен консистенциясы	Кристалды ұнтақ немесе кеуекті масса
Иісі	Ашыған сүт
Түсі	Кремді
Құрғақ заттардың массалық үлесі, %	90
Ылғалдың массалық үлесі, %	10%
Бөгде қоспалар	жоқ

Кесте-1 БФС түсі кремді, иісі ашыған сүтке ұқсайды, кристалды ұнтақ немесе кеуекті масса болып келеді. Құрғақ заттардың массалық үлесі 90 %, ылғалдылық массалық үлесі 10% және бөгде қоспалар жоқ.

L. fermentum 30 + *L. cellobiosus* 36 дақылдарының ассоциациясының антагонистік белсенділігі келесі тест-дақылдарға қатысты анықталды: *Escherichia coli* ATCC: 8739TM, *Escherichia coli* ATCC: 11229TM, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *typhimurium* ATCC: 14028TM, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *typhimurium* ATCC: 29630TM, *Staphylococcus aureus* ATCC

6538-р, *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae* ATCC:10031™, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC:9027™. Сүтқышқылды бактериялардың *Lactobacillus fermentum* 30 + *Lactobacillus cellobiosus* 36 моно және ассоциациясы негізінде антогонистік қасиеттері анықталды.

Ассоциация: *L.fermentum* 30+ *L.cellobiosus* 36 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC: 9027™ тест штамында антогонистік қасиеттері 25,0±0,2 мм ең жоғары көрсеткіш көрсетті. *Escherichia coli* ATCC: 8739™ штамында 24,0±1,0 мм нәтиже көрсетті.

Моно штамдарға қарағанда зерттеулер ассоциация негізіндегі штамдар жоғары антогонистік көрсеткіш көрсетті. Нәтижелер кесте 2-те берілген.

Кесте 2- *Lactobacillus fermentum* 30+*Lactobacillus cellobiosus* 36 ассоциациясының және оның моно штамдарының антагонистік белсенділігі

Микроорганизм дер	Тест дақылдарының тежелу аймақтары, мм						
	1	2	3	4	5	6	7
	<i>Escherichia coli</i> ATCC: 8739™	<i>Escherichia coli</i> ATCC: 11229™	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium ATCC: 14028™	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium ATCC: 29630™	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538-р	<i>Klebsiellapneumoniae</i> sub	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC: 9027™
	1	2	3	4	5	6	7
<i>L. fermentum</i> 30	14,0±0,5	15,0±0,5	17±0,5	14,0±0,5	15,0±0,5	15,0±0,5	18,0±0,6
<i>L. cellobiosus</i> 36	16,0±0,5	16,0±0,5	18,0±0,6	18,0±0,6	18,0±0,6	18,0±0,6	20,0±0,3
Ассоциация: <i>L.fermentum</i> 30+ <i>L.cellobiosus</i> 3 6	24,0±1,0	22,0±0,3	24,0±1,0	23,0±0,3	23,0±0,3	22,0±0,3	25,0±0,2

Осы ассоциация мен жеке бактерия штамдары 24 сағат бойы 35°C температурада MRS сұйық қоректік ортада өсірілді. Содан кейін антагонистік белсенділік келесі тест-дақылдарға қатысты анықталды:

Escherichia coli ATCC 8739™, *Escherichia coli* ATCC 11229™, *Salmonella enterica subsp. enterica serovar typhimurium* ATCC 14028™, *Salmonella enterica subsp. enterica serovar typhimurium* ATCC 29630™,

Staphylococcus aureus ATCC 6538-p, *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae* ATCC 10031тм, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027тм, агардағы диффузия әдісімен.

Тест-дақылдарының өсуін тежейтін аймақтардың өлшемдерін зерттеу нәтижесінде зерттелген ассоциация мен жеке бактерия штамдарының жоғарыда аталған барлық тест-дақылдарға белсенді екені анықталды. Өсуін тежейтін аймақтардың диаметрі 14,0±0,5 мм-ден 25,0±0,2 мм-ге дейін болды.

L. fermentum 30 штамының тежелу аймақтарының диаметрі (мм):

Escherichia coli ATCC 8739тм – 14,0±0,5; *Escherichia coli* ATCC 11229тм – 15,0±0,5; *Salmonella enterica subsp. enterica serovar typhimurium* ATCC 14028тм – 17±0,5; *Salmonella enterica subsp. enterica serovar typhimurium* ATCC 29630тм – 14,0±0,5; *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-p – 15,0±0,5; *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae* ATCC 10031тм – 15,0±0,5; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027тм – 18,0±0,6.

L. cellobiosus 36 штамының тежелу аймақтарының диаметрі (мм):

Escherichia coli ATCC 8739тм – 16,0±0,5; *Escherichia coli* ATCC 11229тм – 16,0±0,5;

Salmonella enterica subsp. enterica serovar, Typhimurium ATCC 14028тм – 18,0±0,6; *Salmonella enterica subsp. enterica serovar, Typhimurium* ATCC 29630тм – 18,0±0,6; *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-p – 18,0±0,6; *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae* ATCC 10031тм – 18,0±0,6; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027тм – 20,0±0,3.

Ассоциацияның тежелу аймақтарының диаметрі (мм):

Escherichia coli ATCC 8739тм – 24,0±1,0; *Escherichia coli* ATCC 11229тм – 22,0±0,3; *Salmonella enterica subsp. enterica serovar typhimurium* ATCC14028тм – 24,0±1,0; *Salmonella enterica subsp. enterica serovar typhimurium* ATCC29630тм – 23,0±0,3; *Staphylococcus aureus* ATCC6538-p -23,0±0,3; *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae* ATCC10031тм -22,0±0,3; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027тм -25,0±0,2.

Жеке алынған *L. fermentum* 30 және *L.Cellobiosus* 36 бактерия штамдары жоғары антагонистік белсенділікке ие болды. *L.fermentum* 30 және *L.cellobiosus* 36 микроорганизмдерінің ассоциациясы-белсенді фармацевтикалық субстанция құрамына кіретін-жеке штамдарына қарағанда жоғары антагонистік белсенділік көрсетті.

Одан әрі лиофильді кептіру әдісімен құрғатылған сүтқышқылды бактериялардың шартты және міндетті патогенді микроорганизмдерге қарсы антагонистік белсенділігі анықталды. Сүтқышқылды бактерия штамдары

Escherichia coli ATCC 8739, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P, *Salmonella enterica* ATCC 14028 қатарына жататын патогенді микроорганизмдердің өсуін кемінде 10 мм диаметрлі аймақтарда тежеуі тиіс.

Сүтқышқылды бактериялардың антагонистік белсенділігі Қазақстан Республикасының Фармакопеясының (ГФ РК), Т1 бөлімінің 2.6.13 тармағына сәйкес анықталды.

Көрсетілген деректерден көрініп тұрғандай, пробиотикалық микроорганизмдерді тең қатынаста енгізгенде, моно штамдарға қарағанда антагонистік белсенділік пен тірі жасушалардың саны артады, бұл зерттелген штамдардың үйлесімділігін көрсетеді, сондықтан препараттағы әрбір штамның құрамын анықтау қажет емес.

Бактериялық жасушалардың жиналуы сәйкес сұйылтылған дақылдарды Петри табақшаларына қатты қоректік ортаға егу арқылы анықталды, ал антагонистік белсенділік тест-дақылдарға қатысты агардағы диффузия әдісімен анықталды: *Escherichia coli* ATCC 8739™, *Escherichia coli* ATCC 11229™, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *typhimurium* ATCC 14028™, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *typhimurium* ATCC 29630™, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-p, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* ATCC 10031™, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027™. Нәтижелер 3-кестеде берілген.

Кесте 3- Лиофилизацияланған *Lactobacillus fermentum* 30 + *Lactobacillus cellobiosus* 36 ассоциациясының және оның моно штамдарының антагонистік белсенділігі

Микроорганизмдер	Тест-дақылдарының тежелу аймақтары, мм						
	1	2	3	4	5	6	7
	<i>Escherichia coli</i> ATCC: 8739™	<i>Escherichia coli</i> ATCC: 11229™	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>typhimurium</i> ATCC: 14028™	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>typhimurium</i> ATCC: 29630™	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538-p	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> ATCC: 10031™	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC: 9027™
<i>L.fermentum</i> 30	13±0,5	15,0±0,5	16±0,5	14,0±0,7	17±0,5	15±0,5	19±0,5
<i>L.cellobiosus</i> 36	15±0,5	16,0±0,5	15,0±0,6	18,0±0,6	18±0,6	19±0,5	21±0,5
Ассоциация: <i>L.fermentum</i> 30+ <i>L. cellobiosus</i> 36	21,0±1,0	18±0,6	17,7±0,6	19,0±0,5	20,0±1,7	22±0,3	24±0,3

Зерттеу нысаны ретінде лиофильді кептірілген микроорганизмдер ассоциациясы қызмет етті, ол «АС-Пробионорм» пробиотикалық препаратының лиофилизаты құрамына кіретін, сүтқышқылды бактериялар *Lactobacillus fermentum* 30 және *Lactobacillus cellobiosus* 36 штамдарынан және кептіру компоненттерінен (желатин – 1,5%, сахароза – 7%, майы алынған құрғақ сүт – 7%) тұрады.

Аталған ассоциация мен жеке бактерия штамдары MRS сұйық қоректік ортада 24 сағат бойы 35°C температурада өсірілді. Содан кейін оларды тұрақтандырғыш орта компоненттерімен кептіру процесі жүргізілді. Одан әрі антагонистік белсенділік келесі тест-дақылдарына қатысты агардағы диффузия әдісімен анықталды: *Escherichia coli* ATCC 8739TM, *Escherichia coli* ATCC 11229TM, *Salmonella enterica subsp. Enterica serovar typhimurium* ATCC 14028TM, *Salmonella enterica subsp. enterica serovar typhimurium* ATCC 29630TM, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-p, *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae* ATCC 10031TM, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027TM.

Тест-дақылдарының өсуін тежеу аймақтарын өлшеу нәтижесінде зерттелген ассоциация мен жеке бактерия штамдарының жоғарыда аталған барлық тест-дақылдарға белсенді екені анықталды. Өсуін тежеу аймақтарының диаметрі 13±0,5 мм-ден 24±0,3 мм-ге дейін болды.

L.fermentum 30 штамы ең жоғарғы антагонистік көрсеткішті *Pseudomonas aeruginosa* ATCC: 9027TM 19±0,5 мм көрсетті, *L.cellobiosus* 36 ең жоғары көрсеткіші *Pseudomonas aeruginosa* ATCC: 9027TM тежелу аймағы 21±0,5 мм болды. Ассоциация: *L.fermentum* 30+*L. cellobiosus* 36 штамдарының жоғарғы көрсеткіші *Pseudomonas aeruginosa* ATCC: 9027TM 24±0,3мм нәтиже көрсетті.

Lactobacillus fermentum 30 штамының өсуін тежеу аймақтарының диаметрі (мм): *Escherichia coli* ATCC 8739TM -13±0,5; *Escherichia coli* ATCC 11229TM -15,0±0,5; *Salmonella enterica subsp. Enterica serovar typhimurium* ATCC 14028TM -16±0,5; *Salmonella enterica subsp. Enterica serovar typhimurium* ATCC 29630TM -14,0±0,7; *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-p-17±0,5; *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae* ATCC 10031TM -15±0,5; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027TM -19±0,5.

Lactobacillus cellobiosus 36 штамының өсуін тежеу аймақтарының диаметрі (мм): *Escherichia coli* ATCC 8739TM -15±0,5; *Escherichia coli* ATCC 11229TM -15,0±0,6; *Salmonella enterica subsp. Enterica serovar Typhimurium* ATCC 29630TM -18,0±0,6; *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-p -18,0±0,6; *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae* ATCC 10031TM -19±0,5; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027TM -21±0,5.

Ассоциацияның өсуін тежеу аймақтарының диаметрі (мм): *Escherichia coli* ATCC 8739TM -21,0±1,0; *Escherichia coli* ATCC 11229TM -18±0,6; *Salmonella enterica subsp. enterica serovar typhimurium* ATCC14028TM -17,7±0,6; *Salmonella enterica subsp. Enterica serovar typhimurium* ATCC29630TM -19,0±0,5; *Staphylococcus aureus* ATCC6538-p -20,0±1,7; *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae* ATCC10031TM -22±0,3; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027TM -24±0,3.

Жеке алынған *Lactobacillus fermentum* 30 және *Lactobacillus cellobiosus* 36 штамдары жоғары антагонистік белсенділікке ие болды.«АС-Пробионорм» пробиотикалық препаратының лиофилизаты құрамына кіретін *L. fermentum* 30 және *L. cellobiosus* 36 микроорганизмдер ассоциациясы құрамындағы жеке штамдарға қарағанда жоғары антагонистік белсенділікке ие болды. Тірі жасушалардың санын сериялы сұйылтулар әдісімен және кейіннен қатты

қоректік ортаға егу арқылы анықтады. Орташа есеппен бұл көрсеткіш $2,0 \times 10^9$ КТБ/г болды.

Осылайша, жоғары антагонистік белсенділік және расталған таксономиялық байланысы бар пробиотикалық бактериялардың тіршілік етуі жасушаларының қажетті саны сияқты тиісті өндірістік құндылықтары бар белсенді фармацевтикалық субстанция құрылды.

3.1.2 Белсенді фармацевтикалық субстанцияны өндіру технологиясын әзірлеу

Жалпы алғанда, БФС препаратын өндіру технологиясын пысықтаудың қажетті шарты, кейіннен технологиялық өндіріс кезеңдерін әзірлей отырып, қоректік ортаны және кептіру режимдерін таңдау болып табылады.

Препаратты өндіру технологиясын әзірлеудің қажетті шарты – қоректік ортаны және кептіру режимдерін дұрыс таңдау болып табылады. Бактериялар ассоциацияларын өсіру үшін екі түрлі қоректік орта қолданылды: №1 (MRS ортасы + CoCl_2) және №2 (ашытқы экстракты – 5,0 г/л + глюкоза – 10,0 г/л + CoCl_2 – 0,01 г/л).

Бактерияларды сұйық қоректік орталарда 37°C температурада 24 сағат бойы өсірді. Ассоциацияларды алу үшін құрамындағы дақылдарды бірлесіп 5% мөлшерде, 37°C температурада 24 сағат бойы өсірді. Культивациядан кейін сұйық дәрілік формаға сақтау кезінде тұрақтылығын арттыру үшін қорғаныс компоненттері: 7% сахароза, 1,5% желатин және 7% ҚМС (құрғақ майсыздандырылған сүт) қосылды. Осыдан кейін препарат науаларға құйылып, Liobeta-35 лиофильді кептіргішінде кептірілді.

Кептіру режимі №1:

Дайындық: Сөре температурасын теңестіру: $+20^\circ\text{C}$ (5 минут).

Мұздату:

1-ші мұздату: -30°C (10 сағат).

2-ші мұздату: -60°C (5 сағат).

Вакуум: 0,2 мБар.

Кептіру:

1-ші кептіру: -26°C (6 сағат).

2-ші кептіру: $+20^\circ\text{C}$ (18 сағат).

3-ші кептіру: $+30^\circ\text{C}$ (2 сағат).

Жалпы ұзақтығы: Кемінде 26 сағат.

Соңғы температура: $+(25-27)^\circ\text{C}$.

Кептіру режимі №2:

Дайындық: Сөре температурасын теңестіру: $+20^\circ\text{C}$ (5 минут).

Мұздату:

1-ші мұздату: -30°C (12 сағат).

2-ші мұздату: -60°C (6 сағат).

Вакуум: 0,5 мБар.

Кептіру:

1-ші кептіру: 0°C (12 сағат).

2-ші кептіру: +20°C (12 сағат).

3-ші кептіру: +30°C (6 сағат).

Жалпы ұзақтығы: Кемінде 30 сағат.

Соңғы температура: +(25–27)°C.

Кептіру режимі №3:

Дайындық: Сөре температурасын теңестіру: +20°C (5 минут).

Мұздату:

1-ші мұздату: -25°C (3 сағат).

2-ші мұздату: -60°C (5 сағат).

Вакуум: 0,5 мБар.

Кептіру:

1-ші кептіру: -30°C (7 сағат).

2-ші кептіру: 0°C (10 сағат).

3-ші кептіру: +20°C (15 сағат).

4-ші кептіру: +30°C (5 сағат).

Жалпы ұзақтығы: Кемінде 37 сағат.

Соңғы температура: +(25–27)°C.

Кесте 4- *Lactobacillus fermentum* 30 + *Lactobacillus cellobiosus* 36 ассоциациясының антагонистік белсенділік сипаттамасы (сұйық қоректік ортада 24 сағат бойы өсірілгеннен кейінгі)

Тест-штамдар	Тест-штамдардың өсуін тежеу аймақтары, мм	
	№1 бактерияларды өсіру ортасы	№2 бактерияларды өсіру ортасы
<i>E. coli</i> ATCC 8739	18,0±0,3	16,0±0,3
<i>E. coli</i>	22,0±0,3	20,0±0,3
<i>S. gallinarum</i>	21,0±0,4	20,0±0,4
<i>S. interitidis</i> ATCC 35389	17,0±0,5	15,0±0,5
<i>S. aureus</i> ATCC 6538- <i>p</i>	15,0±0,4	13,0±0,4
<i>C. albicans</i>	25,0±0,3	20,0±0,3
<i>P. multocida</i>	25,0±0,5	19,0±0,5

Кесте 4-тен көрініп тұрғандай, *L. fermentum* 30 және *L. cellobiosus* 36 штамдарынан тұратын ассоциация №1 ортада өсірілген кезде, сол ассоциацияның №2 ортада өсірілген түрімен салыстырғанда жоғары антимикробтық белсенділікке ие. Атап айтқанда, №1 ортада өсірілген ассоциация барлық зерттелген тест-дақылдарына, әсіресе *C.albicans*, *P.multocida* қарсы антагонистік әсерінің жоғарылағаны байқалды.

Зерттелген ассоциациялардағы бактериялардың тіршілікке қабілетті жасушаларының мөлшері сублимациялық кептірілген препараттарда, сондай-ақ тоңазытқышта 4, 7 және 12 ай сақталғаннан кейін анықталды (Кесте 5).

Кесте 5 –Пробиотикалық бактериялардың тіршілікке қабілетті жасушаларының саны (сублимациялық жолмен кептірілген және тоңазытқышта сақталған)

Ассоциация	Сұйық дақыл титрі, КТБ/ мл	Құрғақ препараттардағы бактериялық жасушалардың құрамы, КТБ /г
------------	-------------------------------	---

Кесте 5 –Пробиотикалық бактериялардың тіршілікке қабілетті жасушаларының саны (сублимациялық жолмен кептірілген және тоңазытқышта сақталған) жалғасы

<i>L. fermentum</i> 30 + <i>L. cellobiosus</i> 36		Бастапқы кептіруден кейінгі нұсқа	3 айдан соң сақтау	6 айдан соң сақтау
	№1 бактерияларды өсіру ортасы			
	Кептіру режимі №1			
	7,5±0,4x10 ⁹	6,8±0,3x10 ⁹	6,5±0,3x10 ⁹	6,3±0,3x10 ⁹
	Кептіру режимі №2			
	7,3±0,4x10 ⁹	6,5±0,3x10 ⁹	6,2±0,3x10 ⁹	6,1±0,3x10 ⁹
	Кептіру режимі №3			
	7,2±0,4x10 ⁹	6,7±0,3x10 ⁹	6,4±0,3x10 ⁹	6,0±0,3x10 ⁹
Ассоциация	Сұйық дақыл титрі, КТБ/ мл	Құрғақ препараттардағы бактериялық жасушалардың құрамы, КТБ /г		
	№2 бактерияларды өсіру ортасы			
	Кептіру режимі №1			
	6,4±0,4x10 ⁹	5,7±0,3x10 ⁹	5,4±0,3x10 ⁹	5,3±0,3x10 ⁹
	Кептіру режимі №2			
	6,1±0,4x10 ⁹	5,0±0,3x10 ⁹	5,0±0,3x10 ⁹	5,0±0,3x10 ⁹
	Кептіру режимі №3			
	6,2±0,4x10 ⁹	5,3±0,3x10 ⁹	5,2±0,3x10 ⁹	4,9±0,3x10 ⁹

Кесте 5- нәтижелері бойынша, құрғақ препараттарда 3 ай бақылау мерзімі ішінде пробиотикалық бактериялардың тіршілікке қабілеттілігі жақсы сақталғаны байқалды. Бұл екі түрлі өсіру ортасында және үш кептіру режимінің барлығында да расталды. Бактерия титрі 5,2–6,5±0,3×10⁹ КТБ/г шегінде болды, бұл бастапқы көрсеткіштермен салыстырғанда (5,3–6,8±0,3×10⁹ КТБ/г) шамалас. Сонымен қатар, №1 өсіру ортасы мен №1 кептіру режимі қолданылған жағдайда тірі жасушалардың саны анағұрлым жақсы сақталғаны анықталды. Құрғақ препараттарды 6 ай бойы сақтаған кезде де екі орта мен барлық үш кептіру режимі жағдайында бактериялық жасушалардың тіршілікке қабілеттілігі жоғары деңгейде сақталған.

Бактерия титрі 4,9–6,3±0,3×10⁹ КТБ/г шегінде, бастапқы көрсеткіштермен салыстырғанда (5,3–6,8±0,3×10⁹ КТБ/г) онша төмендеген жоқ. Пробиотикалық бактерияларды №1 ортада өсіріп, №1 кептіру режимін қолдану кезінде тірі жасушалардың ең жақсы сақталуы байқалды. Пробиотикалық бактериялардың тіршілікке қабілеттілігі, әрі бастапқы, әрі сақтау кезіндегі жағдайларда №1 ортада жоғары болды, сондықтан антагонистік белсенділік те, бастапқы және сақтау жағдайларындағы, тек №1 ортада тексерілді.

Кесте 6 – Құрғақ ассоциациялардың бастапқы және 3, 6 ай сақталғаннан кейінгі антагонистік белсенділігі

Ассоциация	Тест-дақылдар	Тест дақылдарының өсуін тежеу аймақтары, мм
------------	---------------	--

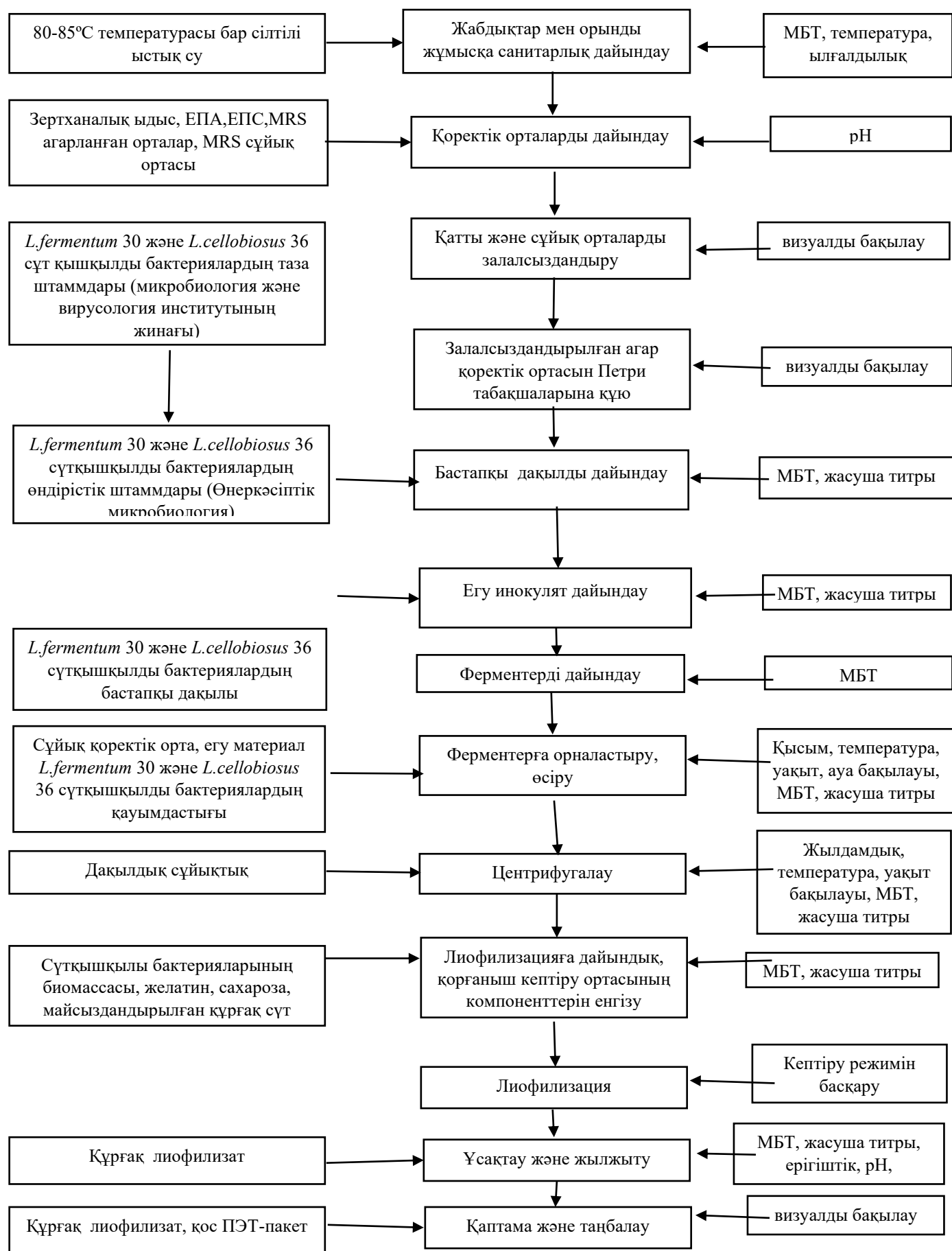
Кесте 6 – Құрғақ ассоциациялардың бастапқы және 3, 6 ай сақталғаннан кейінгі антагонистік белсенділігі-жалғасы

<i>L. fermentum</i> 30 + <i>L. cellobiosus</i> 36		Бастапқы кептіруден кейінгі нұсқа	3 айдан соң сақталу	6 айдан соң сақталу
	Кептіру режимі №1			
	<i>E. coli</i> ATCC 8739	12,0±0,5	11,0±0,5	10,0±0,6
	<i>E. coli</i>	18,0±0,5	16,0±0,4	14,0±0,5
	<i>S. gallinarum</i>	15,0±0,5	13,5±0,5	12,0±0,5
	<i>S. interitidis</i> ATCC 35389	17,0±0,7	15,5±0,3	15,0±0,5
	<i>S. aureus</i> ATCC 6538-p	14,0±0,5	13,5±0,5	12,5±0,6
	<i>C. albicans</i>	20,0±0,5	20,0±0,5	19,0±0,5
	<i>P. multocida</i>	20,0±0,5	20,0±0,5	18,0±0,5
	Кептіру режимі №2			
	<i>E. coli</i> ATCC 8739	10,0±0,6	10,0±0,6	10,0±0,6
Ассоциация	Тест-дақылдар	Тест дақылдарының өсуін тежеу аймақтары, мм		
	<i>E. coli</i>	14,0±0,5	14,0±0,5	12,0±0,6
	<i>S. gallinarum</i>	11,0±0,5	10,5±0,6	10,0±0,6
	<i>S. interitidis</i> ATCC 35389	12,0±0,5	12,0±0,5	10,0±0,4
	<i>S. aureus</i> ATCC 6538-p	12,0±0,5	12,0±0,5	12,0±0,5
	<i>C. albicans</i>	19,0±0,5	18,0±0,5	17,5±0,7
	<i>P. multocida</i>	18,0±0,5	17,5±0,7	16,5±0,5
	Кептіру режимі №3			
	<i>E. coli</i> ATCC 8739	12,0±0,5	11,0±0,5	9,0±0,4
Ассоциация	Тест-дақылдар	Тест дақылдарының өсуін тежеу аймақтары, мм		
		Бастапқы кептіруден кейінгі нұсқа	3 айдан соң сақталу	6 айдан соң сақталу
<i>L. fermentum</i> 30 + <i>L. cellobiosus</i> 36	<i>E. coli</i>	17,0±0,7	14,0±0,4	12,0±0,6
	<i>S. gallinarum</i>	13,0±0,5	11,0±0,5	10,0±0,6
	<i>S. interitidis</i> ATCC 35389	15,0±0,5	15,5±0,6	14,0±0,5
	<i>S. aureus</i> ATCC 6538-p	14,0±0,5	13,0±0,5	12,0±0,5
	<i>C. albicans</i>	19,0±0,5	19,0±0,5	17,0±0,7
	<i>P. multocida</i>	20,0±0,5	19,0±0,5	18,0±0,5

Кесте 6-дан көрініп тұрғандай, лиофильді кептіруден кейін пробиотикалық ассоциацияның антагонистік белсенділігін зерттеу барысында, барлық зерттеуге алынған тест-штамдарға (*Escherichia coli* ATCC 8739, *Escherichia coli*, *Salmonella gallinarum*, *Salmonella enteritidis* ATCC 35389, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P, *Candida albicans*, *Pasteurella multocida*) қатысты белсенділік барлық үш кептіру режимінде де жоғары деңгейде сақталғаны анықталды. Алынған мәліметтерді салыстыру нәтижесінде, пробиотикалық ассоциацияның антагонистік белсенділігі

L. fermentum 30 + *L. cellobiosus* 36 штамдарының ассоциациясы ең жоғары деңгейде кептіру режимі №1 кезінде байқалғаны анықталды. *S. Albicans* бастапқыда 20,0±0,5 мм, 3 айдан соң 20,0±0,5 мм, 6 айдан соң зер 19,0±0,5 мм көрсеткіш көрсетті. *P. Multocida* бастапқыда 20,0±0,5 мм, 3 айдан соң 20,0±0,5 мм, 6 айдан соң 18,0±0,5 мм жоғары көрсеткіш көрсетті.

Лиофильді кептірудің №1 режимі артықшылыққа ие, себебі оның ұзақтығы 26 сағат, ал №2 және №3 режимдерінің ұзақтығы тиісінше 30 және 37 сағатты құрайды. Осылайша, «АС-Пробионорм» пробиотикалық препаратының құрамына кіретін *Lactobacillus fermentum* 30 және *Lactobacillus cellobiosus* 36 сүтқышқылды бактериялар ассоциациясынан лиофилизат алу үшін ең тиімді нұсқа: Өсіру ортасы – MRS ортасы (№1); Оңтайлы лиофильді кептіру режимі: Сөре температурасын теңестіру (+20°C) - 5 мин; Мұздату (-30°C) -10 сағ; Мұздату (-60°C) -5 сағ; Вакуум -0,2 мБар; Кептіру 1 (-26°C) - 6 сағ; Кептіру 2 (+20°C) - 18 сағ; Кептіру 3 (+30°C) -2 сағ; Жалпы кептіру ұзақтығы- кемінде 26 сағат; Дайын өнімнің соңғы температурасы -(25–27)°C.



Сурет 1. Белсенді фармацевтикалық затты өндіру сызба-нұсқасы

Белсенді фармацевтикалық субстанцияны өндірудің технологиялық процесі және оның бақылау шаралары арнайы әзірленген өндірістік сызба-нұсқаға (Сурет 3) сәйкес жүргізілді.

Сыни кезеңдерді бақылау технологиялық процесте қолданылатын микробиологиялық әдістермен жүзеге асырылды.

Кесте 7-Технологиялық процестің маңызды кезеңдері

Атауы	Кезең		Өндіріс процесіндегі бақылау нүктелері
<i>БФС (лиофилизат сүтқышқылды бактериялары- ның қорғаныс орта компоненттері- мен кептірілген)</i>	Жабдықтар мен ғимараттарды жұмысқа санитарлық дайындау	→	МБТ-бөтен микрофлораның болмауы; Температура – $20 \pm 2^\circ\text{C}$; Ылғалдылық – $60 \pm 5\%$.
	Қоректік ортаны дайындау	→	pH -6,5-7,0
	Агаризденген және сұйық қоректік орталарды стерилизациялау	→	Көрнекі бақылау – қоректік орталардың бұлдырауы мен бөтен қоспалардың болмауы
	Стерилизацияланған агаризденген қоректік орталарды Петри табақшаларына құю	→	Көрнекі бақылау- Петри табақшаларына агаризденген ортаның аз немесе артық құйылуына жол берілмейді
	Бастапқы дақылдық қоректік ортаның дайындалуы	→	МБТ– клеткалардың дақылы бар және бөгде микрофлораның жоқ болуы (микроскопия кезінде). Клеткалар титрі – клеткалардың мазмұны $n \times 10^8$ КТБ /мл (n кем дегенде 10 болуы тиіс).
	Егу материал дайындау	→	МБТ– клеткалардың дақылы бар және бөгде микрофлораның жоқ болуы (микроскопия кезінде). Клеткалар титрі – клеткалардың мазмұны $n \times 10^8$ КТБ /мл (n кем дегенде 10 болуы тиіс).
	Ферментердың дайындығы	→	МБТ– ферментерде бөтен микрофлораның болмауы.
	Ферментерге құйылу . Ферментерде культивирлеу	→	Ферментердегі стерильді қоректік ортаның температурасы – $36 \pm 10^\circ\text{C}$; Егу материал мөлшері қоректік орта көлемінің 5-6%-ы. Қысым 0,3-0,5 атм. Температура $30-32^\circ\text{C}$. Дақылдың өсіру уақыты 20-24 сағат. Ауа -азрациясыз. МБТ дақыл сұйықтықта – бөтен микрофлораның болмауы. Дақыл сұйықтықтағы жасушалардың титрі – 5×10^8 КТБ/мл-ден кем емес.

Кесте 7-технологиялық процестің маңызды кезеңдері – жалғасы

Атауы	Кезең		Өндіріс процесіндегі бақылау нүктелері
	Центрифугаға дейінгі ферменттердегі дақылдың МБТ мен титрі.	→	МБТ– бөгде микрофлораның болмауы; Клетканың титрі –кем дегенде 5×10^8 КТБ/мл; рН – 4,0-6,0
	Центрифугирлеу	→	Жылдамдық – 3200 айн/мин. Центрифуга роторының салқындату температурасы 80°C-тан жоғары болмауы тиіс. Жалпы уақыт – 6,5 сағат. МБТ– дақыл жасушалардың болуы және бөтен микрофлораның болмауы (микроскоппен қарау кезінде). Жасушалардың титрі – жасушалардың мөлшері $n \times 10^8$ КТБ /мл (n кем дегенде 10-ға тең).
	Лиофилизацияға дайындау, кептірудің қорғаушы ортасының компоненттерін енгізу	→	МБТ– дақыл жасушаларының болуы және бөтен микрофлораның болмауы (микроскоппен қарау кезінде). Жасушалардың титрі – жасушалардың мөлшері $n \times 10^8$ КТБ/мл (n кем дегенде 10-ға тең).
	Лиофилизация	→	Кептіру режимі: Мұздату (-30°C) – 10 сағат. Мұздату (-60°C) – 5 сағат. Вакуум – 0,9 мПа. Кептіру 1 (-26°C) – 6 сағат. Вакуум – 1,0 мПа. Кептіру 2 (+20°C) – 18 сағат. Кептіру 3 (+30°C) – 2 сағат. Кептіру процесінің ұзақтығы кем дегенде 26 сағат және өнімнің соңғы температурасы +(25-27)°C.
	Ұнтақтау және араластыру	→	МБТ– дақыл жасушалардың болуы және бөтен микрофлораның болмауы (микроскоппен қарау кезінде). Жасушалардың титрі – жасушалардың мөлшері $n \times 10^8$ КТБ/мл (n кем дегенде 10). Ерітінділігі – 5 минуттан аспауы тиіс. рН – 4,0-6,0.
	Қаптама және таңбалау	→	Көрнекілікбақылау – қаптама ыдысының тұтастығы бұзылмауы керек, ақпараттық деректерге сәйкестігі.

1. Жабдықтар мен зертханалық жұмысқа санитарлық дайындау

Техникалық тексеруден, профилактикалық байқаудан және бақылау-өлшеу аспаптарының жарамдылығын тексеруден өткен жабдықтар санитарлық өңдеуден өткізілді.

Жабдықтар мен аппараттарды жуу және дезинфекциялау әр өндірістік циклден кейін жүргізілді.

Жуу және зарарсыздандыру үшін қолданылатын дезинфекциялық құралдар аз концентрацияда да күшті бактерицидтік әсер көрсетеді.

Микрофлораны ішінара жою және жуу үшін 80–85°C температурадағы сілтілендірілген ыстық су пайдаланылды.

Одан кейін аппаратура мен зертханалық жалпы санитарлық өңдеу жүргізілді.

2. Қоректік орталарды дайындау

Дайындық кезеңі:

- Қоректік орталарды дайындауға арналған зертханалық ыдыстарды дайындау.
- Қоректік орталардың құрамдас бөліктерін (агар, пептон, ет сығындысы, MRS компоненттері және т.б.) дайындау және өлшеу.

Қоректік орталарды дайындау:

- ЕПА (ет-пептонды агар) агарланған ортасын дайындау (микробиологиялық тазалықты тексеру үшін);
- ЕПС (ет-пептонды сорпа) ортасын дайындау (микробиологиялық тазалықты тексеру үшін);
- MRS агарланған ортасын сүтқышқылды бактериялардың дақылдарын өсіру үшін дайындау;

Стерилдеу:

- Агарлы және сұйық қоректік орталарды стерилдеу.

Құю және бақылау:

- Стерилденген орталарды Петри табақшаларына құю (микробиологиялық тазалықты бақылау үшін).

3. Микроорганизмдердің бастапқы дақылын және егу материалды дайындау

Бастапқы дақылды дайындау үшін *Lactobacillus fermentum* 30 және *Lactobacillus cellobiosus* 36 сүтқышқылды микроорганизмдерінің өндірістік штамдары пайдаланылды.

Бұл штамдар MRS коммерциялық қоректік ортасындағы көлбеу агарда пробиркаларда сақталып, «Өнеркәсіптік микробиология» ЖСШ мекемесінде +2–+8°C температурада тоңазытқышта сақталды.

Сонымен қатар, аталған штамдар «Микробиология және вирусология ғылыми-өндірістік орталығы» ЖСШ микроорганизмдер коллекциясында дәл осындай жағдайда сақталады. Бастапқы дақылды дайындау үшін агарсыз сұйық MRS қоректік ортасы қолданылды.

Қоректік ортаны дайындау кезінде жоғарыдағы рецептураға сәйкес әрекет етілді. рН көрсеткіші (22,5±2,5)°C температурада реттелді. Орталар автоклавта 121°C температурада 15 минут бойы стерилденді.

Lactobacillus fermentum 30 және *Lactobacillus cellobiosus* 36 штамдарының таза дақылдары (көлбеу агарда) 6–8 мл тазартылған сумен немесе физиологиялық ерітіндімен жабылды. Микробиологиялық ілмекпен дақылды

бастапқы дақыл агар бетінен қырып алып, біркелкі суспензия түзілгенше шайқап, пробиркадан 250 мл қоректік орта құйылған колбаға құйды.

Дақылды 28-30°C температурада 24 сағат бойы термостатта ұстады.

Бастапқы дақыл келесі талаптарға сай болуы тиіс:

- Колбада тыныш күйде біркелкі суспензия және үстіңгі қабатта мөлдір сақина болуы тиіс;
- Микроскоппен тексергенде – бөгде микрофлораның болмауы және мақсатты жасушалардың болуы;
- Сүтқышқылының түзілуі;
- Каталаза белсенділігінің болмауы;
- 1 мл дақылда кемінде $n \times 10^8$ КТБ/мл жасуша (мұндағы $n \geq 10$).

Жасуша концентрациясы титрді анықтау арқылы есептелді.

Егу материалдың микробиологиялық тазалығын микроскопиялық әдіспен анықтады. Ол үшін стерильді бокс ішінде, от алауына жақын жерде, стерильді пипеткамен микробты масса алынып, таза заттық әйнекке тамызылды. Тамшы жабын әйнекпен жабылып, ауа көпіршігі түспейтіндей етіп жабылды. Артық сұйықтық сүзгі қағазымен алынды. Содан кейін микроскоппен жасуша пішіндері бақыланды.

Штамдардың морфологиялық сипаттамалары:

- *Lactobacillus fermentum* 30 – грамоң, спора түзбейтін, қозғалмайтын, өлшемі 0,5–0,7×1,0–3,0 мкм, ұштары доғал таяқшалар; көбіне дара, кейде қысқа тізбектер түрінде орналасқан.
- *Lactobacillus cellobiosus* 36 – грамоң, қозғалмайтын, спора түзбейтін, 0,5–0,7×1,5–5,5 мкм өлшеміндегі дөңгеленген ұшты таяқшалар; дара, қысқа тізбектер (3–5 жасуша), кейде ұзындау тізбектер түрінде кездеседі.

Чашка әдісімен жасушалардың титрін анықтау. Тазартылған суда ондық ретпен дақыл сұйықтықтың сұйылтуларын (1:10, 1:100, 1:1000 және т.б.) дайындады. Осы кезде колбадағы суспензияны 3-5 минут бойы мұқият шайқап, стерильді пипетканың көмегімен алынған суспензиядан 1 мл алып, 9 мл тазартылған суы бар пробиркаға ауыстырды. Бұл бірінші сұйылту 1:101. Осылайша келесі сұйылтулар дайындалды.

Сынақтарды жүргізу үшін жетінші (10^{-7}) және сегізінші (10^{-8}) сұйылтулар қолданылды. Суспензияны беткейлік әдіспен егу өткізілді. Егуден бұрын, ерітілген агарланған қоректік ортаны стерильді Петри ыдыстарына 15-20 мл көлемінде құйып, орта қатайғанша горизонтальды беткейде қалдырылды. Егуден бұрын агарланған ортаның беттері конденсациялық суды жою үшін құрғатылды, мысалы, ыдыстарды термостатқа 2-3 күн ішінде қақпағы төмен қаратып орналастыру арқылы.

Құрғақ ортадағы Петри ыдысына тиісті сұйылтудан 0,1 мл енгізіліп, металл шпателмен орта бетіне таралды. Егуден кейін Петри ыдыстары 28-30°C температурада 72 сағат бойы термостатқа орналастырылды. *L. fermentum* 30 штамы тығыз қоректік ортада өскенде жалпақ, дөңгелек, кедір-бұдыры бар колониялар түзеді. *L. cellobiosus* 36 штамы тығыз қоректік ортада өскенде жалпақ, ризоидты, терең колониялар - ашық-сары колониялар түзеді.

Бірдей сұйылтудан параллельді егулердің нәтижелері жиналып, бір Петри ыдысынан егу кезінде өскен колониялардың орташа саны анықталды.

L. fermentum 30 және *L. cellobiosus* 36 бактерияларының дақылын алу үшін оларды төмендегі құрамды қоректік ортада бірге өсірді, г/л:

Ашытқы экстракты – 5,0; ет экстракты – 10,0; пептон – 10,0; глюкоза – 20,0; аммоний лимон қышқылы – 2,0; натрий ацетаты – 5,0; KH_2PO_4 – 2,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,05; pH – 6,5-7,0. Тазартылған су, көлемін 1 литрге жеткізу үшін.

Егу материалын дайындау үшін 250 мл қоректік ортаға сүтқышқылды бактериялардың аналығын 3-5% мөлшерінде енгізді. Егуден кейін колбаларды термостатқа қойып, 28-30°C температурада 24 сағат бойы өсірді.

Егу материал мынадай талаптарға сәйкес келді:

Дақыл жасушаларының болуы және бөгде микрофлораның жоқтығы (микроскопия кезінде); pH – 4,5-5,0; титр, кемінде – 5×10^8 КТБ /мл;

Егудің тазалығын бақылау үшін сынамалар алынып, ЕПА, ЕПС пробиркаларына егу жүргізілді. Егулер 37±2°C температурасында 72 сағат бойы термостатта өсірілді;

Өсірілген дақылдың микробиологиялық тазалығын бақылау және титрін анықтау үшін микроскопия және ЕПА, ЕПС ағарланған орталарға егу әдістерімен сынамалар алынды. Егілген ортасы бар Петри ыдыстары 37±2°C температурада 72 сағат бойы инкубацияланды.

4. Ферментерлерді дайындау

Сүтқышқылды бактериялардың дақылдарын өсіру кезінде инокуляторлар (кіші көлемді ферментерлер) және өндірістік ферментерлер қолданылды. Ферментерде микробиологиялық тазалықты бақылау жүргізілді. Индикаторлық орталарда бөтен микрофлораның өсуінің жоқтығына қарап, жабдықтың тазалығы анықталды.

5. Сүтқышқылды бактерияларды ферментерде өсіру

Ферментер үшін сұйық қоректік орта дайындау егу материалы үшін қолданылатын әдіспен жүзеге асырылды. 116°C температурада 30 минут бойы стерилизацияланды. Ферментерді стерильді қоректік ортамен, температурасы (36±1)°C дейін салқындатылған, 5-6% көлемінде егу материалының колбалардан ауыстырылуымен бастады.

Дақылды өсіру режимі: қысым 0,3-0,5 атм., температура 30-32°C, культивацияның ұзақтығы 20-24 сағат аэрациясыз.

Культивациялау процесі аяқталған соң, микробиологиялық тазалықты бақылау үшін және өсірілген дақылдың титрін анықтау үшін жасушалардың тіршілік етуін талдаушы анализаторда сынама алынды.

Дақылдық сұйықтықтың сапасын бақылау микроскоптау әдісімен және ЕПА мен ЕПС ағарлы орталарға егу арқылы жүзеге асырылды, термостатта (37±2)°C температурада 72 сағат бойы өсірілді. Бұл жағдайда бактериялардың титрі $5,0 \times 10^8$ КТБ/мл болды; бөтен микрофлораның бар-жоғы анықталған жоқ.

Центрифугалау үздіксіз түрде дақылдық сұйықтықты ағынды центрифугаға беру арқылы жүргізілді, нәтижесінде биомасса алынып, оған стерильді қорғау орта компоненттері, кептіру үшін қосылды.

Центрифугалау режимі: дақылдық сұйықтықтың роторға берілу жылдамдығы-0,25 л/мин., центрифугалау жылдамдығы -3200 айн./мин., ротордың салқындау температуралық режимі 80°C-тан жоғары болмауы тиіс. Жиынтық уақыт – 6,5 сағат.

6. Лиофилизацияға дайындық

Қорғаныс компоненттерімен кептіруге енгізу арқылы биомассаны қорғау Биомассаға стерильді қорғаныс орта енгізілді, оның құрамында соңғы концентрация бойынша 1,5% тағамдық желатин, 7% сахароза және майсыздандырылған құрғақ сүт болды.

Содан кейін лиофилизация ыдысқа полировкаланған тот баспайтын болаттан жасалған науаларға құйылып, құрғақ ұнтақ алу үшін лиофильді кептіруге қойылды.

7. Биомассаны қорғау орта енгізілген күйде лиофилизациялау және құрғақ ұнтақ алу

Биомассаны қорғау орта енгізілген күйде сублимациялық кептіргіште (Liobeta-35) кептіру жүргізілді.

Кептіру режимі: Мұздату (-30°C) – 10 сағат; қатыру (-60°C) – 5 сағат; вакуум – 0,9 мПа; кептіру 1 (-26°C) – 6 сағат; вакуум – 1,0 мПа; кептіру 2 (+20°C) – 18 сағат; кептіру 3 (+30°C) – 2 сағат.

Барлық кептіру процесінің ұзақтығы кемінде 26 сағат, өнімнің соңғы температурасы +(25-27)°C.

Кептіру процесі аяқталған соң вакуумды насостар өшірілді. Қысым тепе-теңдігі орнағаннан кейін аппараттың люкін ашып, кептірілген материалды шығарып алды. Кептірілген ұнтақ келесі кезеңге – ұнтақтау және орау процесіне өткізілді. Шығарылғаннан кейін кептіру қондырғысын келесі кептіру цикліне дайындады. Ол үшін десублиматордағы мұзды ерітті, суды ағызып, десублиматорды жұмсақ құрғақ шүберекпен сүртті. Сонымен қатар, бөлмені дымқыл тазалау жүргізілді.

8. Құрғақ ингредиенттерді ұнтақтау және араластыру

Ұнтақтау құрғақ өнімдерді ұнтақтау құралында (ұнтақтау аппараты) араластыру арқылы біртекті ұнтақ алу үшін жүргізілді, оған қосымша ингредиенттер қосылды. Ұнтақталған және араластырылған препаратты 2000 г көлемінде екі қабатты ПЭТ-қапқа салып, орап, таңбалау жүргізілді.

Қаптамалау кезеңінде орауыш ыдыстың бүтіндігі мен ақпараттық деректердің сәйкестігі көрнекі түрде тексерілді. Содан кейін, оралған және таңбаланған лиофилизат дайын препарат жасау кезеңіне өткізіліп, дайындалды.

9. Құрғақ лиофилизаттың сапасын бақылау

Препараттың сапасын микробиологиялық әдістермен бақылау жүргізілді.

- Сипаттама
- Идентификация
- Ерітіндінің рН

- Өтімділігі
- Микробиологиялық тазалық
- Сандық анықтау: - сүтқышқылды бактериялар
- Қаптама

10. БФС сериясының мөлшері

Серияның мөлшері – 10000 г ± 10%. Жалпы саны *L.fermentum* 30 және *L.cellobiosus* 36 кемінде 2 млрд. КТБ/г

Серия құрамында – 10000 г ± 10%. Жалпы саны *L.fermentum* 30 және *L.cellobiosus* 36 кемінде 2 млрд. КТБ/г

Дайындалған тәжірибелік сериялар лиофилизаты АҚ «Инфекцияға қарсы препараттар ғылыми орталығында» (Алматы қ.) зерттеулеріне жіберілді, сондай-ақ зерттеулер «Өнеркәсіптік микробиология» ЖСШ (Алматы қ.) мекемесінде жүргізілді. Зерттеулер Қазақстан Республикасы Мемлекеттік Фармакопөясын негізге ала отырып жүргізілді. Т. 1, 2. Астана 2008 ж., ОФС.1.7.2.0012.15 Өндірістік пробиотикалық штамдар және пробиотиктерді бақылау штамдарыжәне НҚ-ға сәйкес жүргізілді.

Зерттеу нысаны – Сүтқышқылды бактериялардың лиофилизаты.

Серия №1-2023

Серия №2-2023

Серия №3-2023

Қосымша заттар: қорғаныс орта компоненттері: желатин (24,75 г); сахароза (115,5 г); құрғақ майсыз сүт (1650 г дейін жеткілікті мөлшерде).

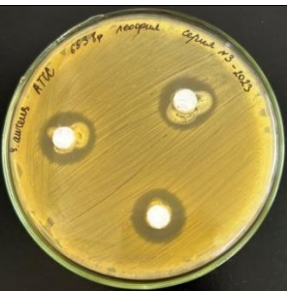
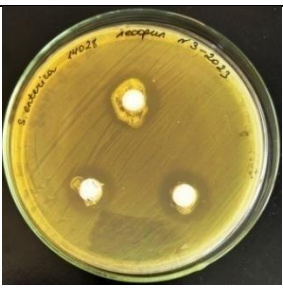
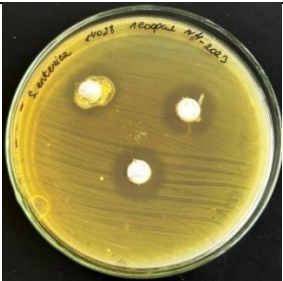
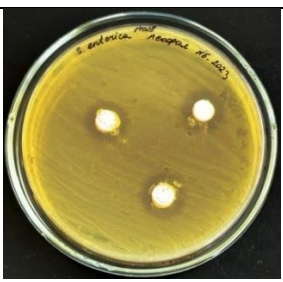
Серия №4-2023

Серия №5-2023

Антагонистік белсенділік *Escherichia coli* ATCC 8739, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P, *Salmonella enterica* ATCC 14028 штамдарына агардағы диффузия әдісімен жүргізілді. Нәтижелер 9- кесте мен 4- суретте көрсетілген.

Кесте 8 – Сүтқышқылды бактериялардың 5 (бес) сериялы лиофилизатының антагонистік белсенділігі

Зерттеу Объектісі	Тест-штамдар		
	Өсу тежелу аймағының диаметрі, мм (M±StD)		
	<i>E. coli</i> ATCC 8739	<i>S. aureus</i> ATCC 6538-p	<i>Sal.enterica</i> ATCC 14028
Серия №1-2023	17,67±1,15	19,33±1,15	18,0±0,00
Серия №2-2023	21,00±1,00	20,00±1,73	17,67±0,58
Серия №3-2023	16,67±1,15	19,33±0,58	19,33±1,15
Серия №4-2023	16,67±0,58	19,33±1,15	18,0±0,00
Серия №5-2023	17,00±1,00	20,33±0,58	17,00±1,00
Физиологиялық ерітінді	6,0±0,00	6,0±0,00	6,0±0,00

Тест-штамдар	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538-P	<i>Salmonella enterica</i> ATCC 14028
Серия			
Серия №1-2023			
Серия №2-2023			
Серия №3-2023			
Серия №4-2023			
Серия №5-2023			

Сурет 2–Сүтқышқылды бактериялардың лиофилизаттарының антагонистік белсенділігі

Кесте 8 бен сурет 2 деректерінен сүтқышқылды бактериялардың лиофилизаты тест-штамдарға қарсы антагонистік белсенділікке ие екені

көрінеді. Осылайша, *E. coli* ATCC 8739 өсу тежелу аймақтарының диаметрі $16,33 \pm 0,58$ -ден $20,67 \pm 0,58$ мм аралығында болды; *S. aureus* ATCC 6538-p – $19,33 \pm 1,15$ -тен $20,0 \pm 1,00$ мм-ге дейін; *S. enterica* ATCC 14028 – $17,33 \pm 0,58$ -ден $21,67 \pm 1,53$ мм-ге дейін.

Микробиологиялық тазалықты сынау Қазақстан Республикасының Мемлекеттік Фармакопеясының талаптарына сәйкес, 1-том, 2.6.12, 2.6.13 бөлімдеріне сәйкес жүргізілді.

Жалпы тіршілік ету анаэробты микроорганизмдердің саны триптон-соя агарына егу әдісімен анықталды ($37 \pm 1^\circ\text{C}$ температурада 5 күн бойы), жалпы саңырауқұлақтар мен зеңдер саны (барлығы) Сабуро агарлы қоректік ортасына егу арқылы анықталды ($22 \pm 1^\circ\text{C}$ температурада 5 күн бойы), энтеробактериялар мен басқа да грамтеріс микроорганизмдер Мак-Конки агарында, Моссель агары ($37 \pm 1^\circ\text{C}$ температурада 24 сағат бойы) себілді. Байерд-Паркер агарлы қоректік ортасында *Staphylococcus* туыстығы микроорганизмдерінің болуы анықталды.

Сүтқышқылды бактериялардың лиофилизатының 5 (бес) сериясының микробиологиялық бақылау нәтижелері Кесте 9-да көрсетілген.

Кесте 9- Сүтқышқылды бактериялардың лиофилизатының 5 (бес) сериясының микробиологиялық бақылау нәтижелері

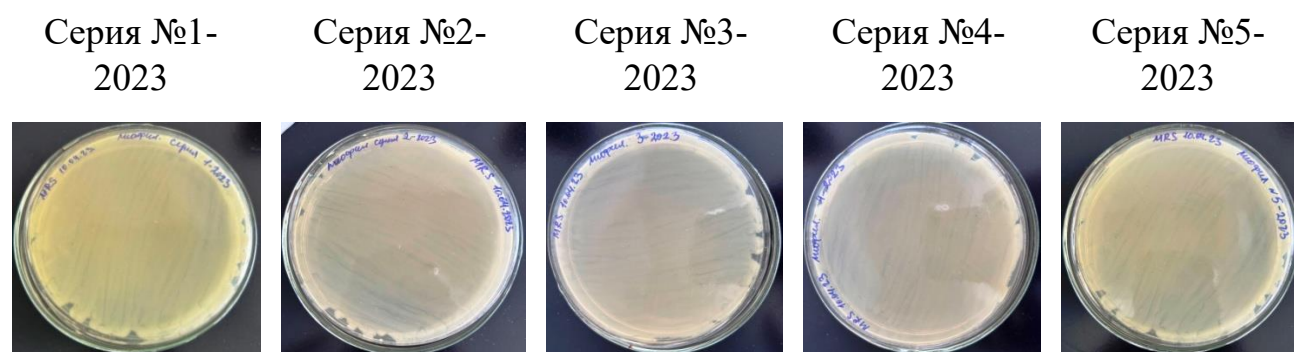
Көрсеткіштердің атауы	НҚ әдістері бойынша сынақтар	НҚ талаптары	Нәтиже
Жалпы микробты сан (басқа тірі аэробты микроорганизмдер).	ГФ РК, т. 1, бөлім 2.6.12	-	-
Жалпы ашытқы тәрізді және зең саңырауқұлақтарының саны (барлығы).	ГФ РК, т. 1, бөлім 2.6.12	-	-
- <i>Enterobacteriaceae</i>	ГФ РК, т. 1, бөлім 2.6.13	-	-
- <i>E.coli</i> ATCC 8739	ГФ РК, т. 1, бөлім 2.6.13	-	-
- <i>S.aureus</i> ATCC 6538-p	ГФ РК, т. 1, бөлім 2.6.13	-	-
- <i>Pseudomonas spp.</i>	ГФ РК, т. 1, бөлім 2.6.13	-	-
Ескерту – НҚ талаптарына сәйкес жалпы микробты сан (басқа тірі аэробты микроорганизмдер), ашытқы тәрізді және зең саңырауқұлақтарының саны, <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>E.coli</i> , <i>S.aureus</i> , <i>Pseudomonas</i> анықталған жоқ.			

9-Кестеде көрсетілгендей препараттың бір дозасында жалпы микробты сан (басқа тірі аэробты микроорганизмдер), ашытқы тәрізді және зең саңырауқұлақтарының саны, *Enterobacteriaceae*, *E.coli*, *S.aureus*, *Pseudomonas* болған жоқ.

Зерттеу нәтижелері зерттелетін лиофилизаттың микробиологиялық тазалығы бойынша Қазақстан Республикасы Мемлекеттік Фармакопеясының нормативтік талаптарына сәйкестігін анықтады.

Фагтардың бар-жоғын анықтау үшін сынақ дақылдарының екінші немесе үшінші сұйықтығын етпептонды агарға 1 мл-ден аспайтын көлемде егу әдісімен жүргізілді (1 мл-де 10^7 - 10^9 микробтық жасушалардың концентрациясы). Егуден бұрын Петри табақшаларындағы қоректік орта конденсатты жою үшін термостатта кептірілді. Микробтық суспензияны орта бетіне біркелкі тарату үшін табақшаларды шайқап, тығыз көгал алу мақсатында егу жүргізілді. Суспензияның қалдықтары стерильді Пастер пипеткасы арқылы алынып тасталды. Егілгенген табақшалар $37 \pm 1^\circ\text{C}$ температурада 18-36 сағат бойы инкубацияланды. Егілгенген дақылға фаголизис аймақтары болмауы керек.

Инкубация уақыты аяқталғаннан кейін 5 (бес) партиядағы лиофилизатталған сүтқышқылды бактерияларының егулері бар Петри табақшаларында фаголизис аймақтары жоқ екені анықталды (Сурет 3).



Сурет 3 –Леофильді кептірілген сүтқышқылды бактерияларының 5 (бес) партиясында микробиологиялық тазалығы

Сүтқышқылды бактерияларының 1 г лиофилизатының тіршілік ету жасушаларының саны микробиологиялық әдіспен анықталды.

Жүргізілген талдау нәтижесінде, зерттеуге ұсынылған үлгілер сүтқышқылды бактерияларының тіршілік ету жасушаларының құрамына байланысты НҚ талаптарына сәйкес келетінін және олардың саны 2×10^9 КТБ/г екенін көрсетті.

БФС микробиологиялық, идентификациясы, антогонистік және физико-химиялық көрсеткіштері.

БФС-тің түрі, түсі - Кристалды ұнтақ немесе кремді түсті кеуекті масса.

Штамм *L. fermentum* 30 – Грам оң, аспорогенді, қозғалмайтын таяқшалар, ұштары тікелей, жеке таяқшалар немесе қысқа тізбектер түрінде (граммен бояу). Қатты қоректік ортада өскенде жалпақ, дөңгелек, кедір-бұдыр колониялар түзеді. Сұйық қоректік ортада өскенде біркелкі суспензия түзеді, үстіңгі қабатта айқын сақина пайда болады. Сахароза ашытады. Ксилозаны ашытпайды немесе әлсіз ашытады.

Штамм *L. cellobiosus* 36 – Грам оң, аспорогенді, қозғалмайтын таяқшалар, ұштары дөңгеленген, жеке таяқшалар немесе 3-5 таяқшалардан тұратын қысқа тізбектер түрінде (Грамммен бояу). Қатты қоректік ортада өскенде жалпақ, ризоидты колониялар түзеді. Сұйық қоректік ортада өскенде біркелкі суспензия

түзеді, үстіңгі қабатта айқын сақина пайда болады. Сахарозаны ашытады. Ксилозаны әлсіз ашытады. Ерітіндінің рН (4,0 - 6,0 аралығы), кептіру кезінде массаның жоғалуы, артық емес 5%, антагонистік белсенділік: диаметрі №1 серияда кемінде 10 мм аймақтарда *E. coli*, *S. aureus*, *S. enterica* патогендік микроорганизмдерінің дамуын тежеу *E.coli* – $17,67 \pm 1,15$, *S.aureus* – $19,33 \pm 1,15$, *Sal. enterica* – $18,0 \pm 0,00$, №2 серияда *E.coli* – $21,00 \pm 1,00$, *S.aureus* – $20,00 \pm 1,73$, *Sal. enterica* – $17,67 \pm 0,58$, №3 *E.coli* – $16,67 \pm 1,15$, *S.aureus* – $19,33 \pm 0,58$, *Sal. enterica* – $19,33 \pm 1,15$, №4 *E.coli* – $16,67 \pm 0,58$, *S.aureus* $19,33 \pm 1,15$, *Sal. enterica* – $18,0 \pm 0,00$, №5 *E.coli* – $17,00 \pm 1,00$, *S.aureus* – $20,33 \pm 0,58$, *Sal. enterica* – $17,00 \pm 1,00$ көрсеткіштер көрсетті. Микробиологиялық тазалық (1 глиофилизатта басқа Тіршілік ету аэробты микроорганизмдердің болуына жол берілмейді)- барлық серияларда бөгде микрофлора анықталған жоқ, Қышқыл түзуші белсенділік, барлық бес серияда 150°T . МКТ (кем дегенде 2×10^9 КТБ/ г) барлық серияларда кем емес 2×10^9 , салмақтары №1, 2, 3 сериялары-1650 г, №4, 5- 9800 г

Лиофилизат $2000 \text{ г} \pm 10\%$ мөлшерде қос қабатты полиэтилен қаптамаға салынып, қаптың жиегі дәнекерленді. Лиофилизат салынған қаптамаға БФС атауы, сериясы және шығарылған күні көрсетілді. Дайындалған лиофилизат қаптамалары тоңазытқышқа $5 \pm 2^{\circ}\text{C}$ температурада сақтауға қойылды.

Осылайша, *L.fermentum* 30 және *L.cellobiosus* 36 пробиотикалық бактериялар қауымдастығынан тұратын, дәлелденген биологиялық белсенділігі бар қорғаныш кептіру ортасының компоненттері бар белсенді фармацевтикалық субстанцияны (лиофилизат) өндіру технологиясы әзірленді.

3.2 «АС-Пробионорм» пробиотикалық дәрілік препаратын өндіру технологиясын әзірлеу

БФС технологиясын әзірлегеннен кейін дәрілік препаратты өндіру технологиясын әзірлеудің негізгі кезеңі оның дайын нысанын пысықтау болып табылады.

Пробиотикалық препараттың дәрілік дайын түрі болып табылады ұнтақ (пакетте 1 г) ішуге арналған ерітінді дайындауға арналған. Пробиотикалық препараттың дәрілік түрі дайындалды. Қапшыққа орау үшін белсенді фармацевтикалық субстанцияның ағымдылығын арттыру үшін БФС-ға магний стеараты қосылды.

Дәрілік түрі – ішке қабылдауға арналған ерітінді дайындауға арналған ұнтақ (1 г сашеде).

Пробиотикалық препараттың дәрілік түрі дайындалды. БФС құрамына магний стеараты қосылды.

«АС-Пробионорм» дәрілік пробиотикалық препаратының бір сашесінің (1 г препарат) құрамы: Белсенді заттар сүтқышқылды бактериялар *Lactobacillus fermentum* 30 және *Lactobacillus cellobiosus* 36 түрінде ұсынылған. Жалпы мөлшері – 2 млрд. КТБ/г. Қосымша заттар ретінде кептіру қорғаныш ортасының компоненттері қолданылады: желатин (0,015 г); сахароза (0,07 г); құрғақ майсыз сүт (1 г дейін жеткілікті мөлшерде); магний стеараты (0,012 г).

«АС-Пробионорм» зерттелетін дәрілік препаратын алу және оның бақылау өндіріс процесі келесі реттілікте жүргізілді: Дайын препаратты қаптауға және орауға дайындық;

Дайын препаратты алғашқы қаптамаға салу (әр сашеде 1 г);

Қапталған препаратты екінші қаптамаға салу (әр қорапта 14 саше және қолдану жөніндегі нұсқаулық).



Сурет 4. Дәрілік препарат «АС-Пробионорм» өндірісінің технологиялық процесінің сызба-нұсқасы

Кейін дайын препаратты қаптауға және орауға дайындық барысында өндірістік бөлменің жұмыс аймақтарының беттерінен жуынды алынып, микробиологиялық тазалық анықталды. Дайын препаратты қаптау-қаптау қондырғысына енгізбес бұрын өндірістік бөлменің жұмыс аймақтарының беттерінің тазалығы алдын ала тексерілді. Өндірістік ортаға микробиологиялық бақылау жүргізілді (өндірістік бөлменің объектілерінен жуынды алу). Егер бөгде микрофлора анықталмаса, жұмыс аймақтарының тазалығы туралы қорытынды жасалды. Жұмыс аймақтарының тазалығы расталғаннан кейін препаратты алғашқы қаптамаға қаптауға жіберілді. Қаптау алдында сүтқышқылды бактериялардың лиофилизаты мен кептіру қорғаныш ортасының компоненттеріне магний стеаратының есептелген мөлшері қосылды, бұл ұнтақтың ағысын сақтауға, сырғуын жақсартуға және ұнтақтың топтасуын болдырмауға мүмкіндік береді (өндірістік бақылау). Дайын препаратты 1 г-нан ламинирленген қағаздан жасалған сашеге (алюминий фольга/полиэтилен) қаптады. Өлшемдері – бір саше 58x58 мм, қос саше 116x58 мм. Егер екі жеке массаның ешқайсысы орташа массадан $1,0 \pm 0,00$ г/саше мәнінен артық ауытқымаса, препарат сынақтан өткен деп есептеледі. Қапталған препарат 14 сашеден тұратын картон қорапқа оралды, өлшемі 120x80x15 мм, қолдану жөніндегі нұсқаулықпен бірге, қазақ және орыс тілдерінде.

Кейін препараттың таңбалануын жүргізді. Қаптамасында міндетті түрде келесі ақпарат орналастырылды:

- Тауардың негізгі тұтынушылық сипаттамалары туралы мәліметтер;
- Өнімнің шығарылған күні;
- Егер өндіруші тарапынан белгіленген болса, кепілдік мерзімі көрсетіледі. Егер белгіленбеген болса, рұқсат етілген пайдаланудың ең ұзақ мерзімі көрсетіледі;
- Қолданудың (сақтаудың, пайдаланудың) негізгі ережелері, оларды сақтау өнімді ең тиімді және қауіпсіз қолдануға мүмкіндік береді;
- Өндірушінің (сатушының, қаптаушының, жеткізушінің) заңды атауы және оның нақты мекенжайы;
- Өндірушінің ресми өкілінің байланыс ақпараттары, ол тауар сапасы бойынша мүмкін болатын шағымдарды қабылдауға уәкілетті.

Препаратты құрғақ, жарықтан қорғалған жерде 8°C-тан жоғары емес температурада сақталады.

Дәрілік заттың сақтау мерзімі – 24 ай, температурасы 8°C-тан жоғары емес.

Препаратты өндіру процесінде ГФ РК, Т. 1-ге сәйкес микробиологиялық әдістермен критикалық кезеңдерге бақылау жүргізілді.

Кесте 10- «АС-Пробионорм» дәрілік пробиотикалық препаратты өндіру кезеңдері

Атауы	Кезең		Өндіріс процесіндегі бақылау нүктелері
Зерттелетін дәрілік препарат (ішке қабылдау үшін ерітінді дайындауға арналған ұнтақ)	Дайын препаратты қаптауға және орауға дайындық	→	МБТ
	БФС-ті қосымша құрғақ ингредиентпен араластыру	→	МБТ, тірі клеткалардың саны, ағындылық
	Дайын препаратты алғашқы қаптамаға қаптау (әр сашеде 1 г)	→	Массаның біртектілігі
	Қапталған препаратты екінші қаптамаға салу (әр қорапта 14 саше, қолдану жөніндегі нұсқаулықпен бірге)	→	Қаптама

Содан кейін зерттелетін пробиотикалық препараттың дайындалған сериялары АҚ «Ғылыми орталық инфекциялық ауруларға қарсы препараттар» (Алматы қаласы) зерттеулеріне жіберілді, сондай-ақ зерттеулер «Өнеркәсіптік микробиология» ЖСШ (Алматы қаласы) жүргізілді. Зерттеулер Қазақстан Республикасының Мемлекеттік Фармакопеясына сәйкес жүргізіледі. Т. 1, 2.

Астана 2008 ж., ОФС.1.7.2.0012.15 Өндірістік пробиотикалық штамдар және пробиотиктерді бақылау штамдары, сондай-ақ НҚсәйкес.

Сынақ объектісі – «АС-Пробионорм» дәрілік препараты.

Серия №1-2023; өндірілген күні 27.03.2023 ж.

Серия №2-2023; өндірілген күні 29.03.2023 ж.

Серия №3-2023; өндірілген күні 31.03.2023 ж.

Клиникалық сынақтарға арналған серия мөлшері – 1650 г (әрқайсысы 1 г-дан 1650 дана). Жалпы саны *Lactobacillus fermentum* 30 және *Lactobacillus cellobiosus* 36 кемінде 2 млрд. КТБ/г. Қосымша заттар: кептіру қорғаныш ортасының компоненттері: желатин (24,75 г); сахароза (115,5 г); құрғақ майсыз сүт (1650 г дейін жеткілікті мөлшерде). Ұнтақтың ағынын сақтау, сырғуын жақсарту және топтасуын болдырмау үшін лиофилизатқа 4 және 5 серияларда магний стеараты қосымша компоненті енгізілді.

Серия №4-2023; өндірілген күні 03.04.2023 ж.

Серия №5-2023; өндірілген күні 05.04.2023 ж.

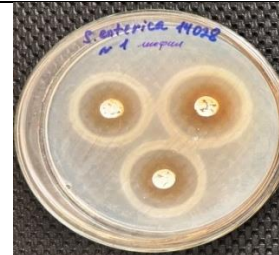
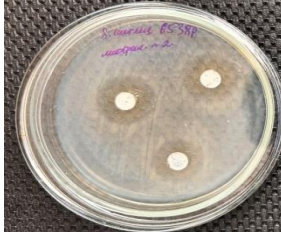
Әрбір серия №4-2023 және №5-2023 клиникалық сынақтар үшін мөлшері – 9800 г (әрқайсысы 1 г-дан 9800 дана). Жалпы саны *Lactobacillus fermentum* 30 және *Lactobacillus cellobiosus* 36 кемінде 2 млрд. КТБ/г.

Қосымша заттар: желатин (147 г); магний стеараты (117,6 г); сахароза (686 г); құрғақ майсыз сүт (9800 г дейін жеткілікті мөлшерде). Зерттелетін дәрілік препараттың антагонистік белсенділігі *Escherichia coli* ATCC 8739, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P, *Salmonella enterica* ATCC 14028 штамдарына қарсы агардағы диффузия әдісімен анықталды.

Пробиотикалық препараттың антагонистік белсенділігі 11-кестеде және 5-суретте көрсетілген.

Кесте 11 – Зерттелетін дәрілік препараттың 5 (бес) сериясының антагонистік белсенділігі

Зерттеу объектісі	Тест-штамдар		
	Өсу тежелу аймағының диаметрі, мм ($M \pm StD$)		
	<i>E. coli</i> ATCC 8739	<i>S. aureus</i> ATCC 6538-p	<i>Sal. enterica</i> ATCC 14028
Серия №1-2023	18,67±0,58	19,33±1,15	19,67±0,58
Серия №2-2023	23,33±1,15	22,67±0,58	25,33±1,15
Серия №3-2023	20,67±1,15	21,67±0,58	20,0±0,00
Серия №4-2023	18,0±0,00	19,33±1,15	18,33±0,58
Серия №5-2023	20,67±2,31	20,0±0,00	21,67±1,53
Физиологиялық ерітінді	6,0±0,00	6,0±0,00	6,0±0,00

Тест-штамдар	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538-P	<i>Salmonella enterica</i> ATCC 14028
Серия			
Серия №1-2023			
Серия №2-2023			
Серия №3-2023			
Серия №4-2023			
Серия №5-2023			

Сурет 5 –Пробиотикалық препараттың 5 (бес) сериясының антагонистік белсенділігі

Кесте 11 пен сурет 5-де көріп тұрғанымыздай, зерттелетін дәрілік препарат тест-штамдарға қарсы антагонистік белсенділікке ие. Микробиологиялық тазалықты сынақтан өткізу Қазақстан Республикасының Мемлекеттік Фармакопеясының талаптарына сәйкес жүргізілді, т.1, 2.6.12, 2.6.13 бөлімдері. Тірі анаэробты микроорганизмдердің жалпы саны триптон-соя агарға егу әдісімен анықталды ($37\pm 10^{\circ}\text{C}$ температурада 5 күн бойы), ашытқы тәрізді және зең саңырауқұлақтарының жалпы саны (барлығы) Сабуро агарлы

коректік ортада анықталды ($22\pm 10^{\circ}\text{C}$ температурада 5 күн бойы), энтеробактериялар мен басқа да грамтеріс микроорганизмдер Мак-Конки агарында, Моссель агарында ($37\pm 10^{\circ}\text{C}$ температурада 24 сағат бойы), *Staphylococcus* туысына жататын микроорганизмдер Байерд-Паркер агарланған ортада анықталды. Зерттелетін дәрілік препараттың сериялары бойынша микробиологиялық бақылау нәтижелері кестеде көрсетілген.

Кесте 12 - Пробиотикалық препараттың партиялар бойынша микробиологиялық бақылау

Көрсеткіштердің атауы	НҚ сынақ әдістері бойынша талаптар	НҚ талаптары	Нәтиже
Жалпы микробтық сан (басқа тірі аэробты микроорганизмдер)	ГФ РК, т. 1, бөлімі 2.6.12	-	-
Жалпы ашытқы тәрізді және зенді саңырауқұлақтар саны (қосындысы)	ГФ РК, т. 1, бөлімі 2.6.12	-	-
- <i>Enterobacteriaceae</i>	ГФ РК, т. 1, бөлімі 2.6.13	-	-
- <i>E.coli</i> ATCC 8739	ГФ РК, т. 1, бөлімі 2.6.13	-	-
- <i>S.aureus</i> ATCC 6538-P	ГФ РК, т. 1, бөлімі 2.6.13	-	-
- <i>Pseudomonas spp</i>	ГФ РК, т. 1, бөлімі 2.6.13	-	-

Зерттеу нәтижелері бойынша зерттелген пробиотикалық препараттың партиялары микробиологиялық тазалық бойынша Қазақстан Республикасының Мемлекеттік фармакопөясымен қойылатын нормативтік талаптарға сәйкес келеді. Фагтардың барын анықтау үшін сынақ дақылының екінші немесе үшінші етпептонды агарға 1 мл-ден аспайтын көлемде егу әдісі қолданылды (10^{-7} - 10^{-9} микробтық клеткалар концентрациясы 1 мл-де). Егуден бұрын Петри табақшалары термостатта конденсатты кетіру үшін кептірілді. Микробтық суспензияны Петри табақшасының бетіне біркелкі тарату үшін табақшаларды шайқап, үздіксіз газон алынды. Қалған суспензия стерильді Пастер пипеткамен алынды. Егу жүргізілген табақшалар $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ температурада 18-36 сағат инкубацияланды. Егілген дақылдың үздіксіз өсуінде фаголизис аймақтары болмауы тиіс.



Сурет 6–Пробиотикалық препараттың 5 (бес) партиясы микробиологиялық тазалағы

Инкубация уақыты аяқталғаннан кейін зерттелген дәрілік препараттың барлық партияларында себілген Петри табақшаларында фаголизис аймақтары жоқ екені анықталды .

Пробиотикалық препараттың дайын нұсқасының партияларына арналған көрсеткіштер

Препараттың түрі, түсі - кристалды ұнтақ немесе кремді түсті кеуекті масса.

Штамм *L. fermentum* 30 - Грам оң, аспорогенді, қозғалмайтын таяқшалар, ұштары тікелей, жеке таяқшалар немесе қысқа тізбектер түрінде (граммен бояу). Қатты қоректік ортада өскенде жалпақ, дөңгелек, кедір-бұдыр колониялар түзеді. Сұйық қоректік ортада өскенде біркелкі суспензия түзеді, үстіңгі қабатта айқын сақина пайда болады. Сахароза ашытады. Ксилозаны ашытпайды немесе әлсіз ашытады.

Штамм *L. cellobiosus* 36 - Грам оң, аспорогенді, қозғалмайтын таяқшалар, ұштары дөңгеленген, жеке таяқшалар немесе 3-5 таяқшалардан тұратын қысқа тізбектер түрінде (Грамммен бояу). Қатты қоректік ортада өскенде жалпақ, ризоидты колониялар түзеді. Сұйық қоректік ортада өскенде біркелкі суспензия түзеді, үстіңгі қабатта айқын сақина пайда болады. Сахарозаны ашытады. Ксилозаны әлсіз ашытады. Ерітіндінің рН (4,0 - 6,0 аралығы), кептіру кезінде массаның жоғалуы, артық емес 5%, антагонистік белсенділік: диаметрі №1 серияда кемінде 10 мм аймақтарда *E. coli*, *S. aureus*, *S. enterica* патогендік микроорганизмдерінің дамуын тежеу *E.coli* – 17,67±1,15, *S.aureus* – 19,33±1,15, *Sal. enterica* – 18,0±0,00, №2 серияда *E.coli* – 21,00 ± 1,00, *S. aureus* – 20,00±1,73, *Sal. enterica* – 17,67±0,58, №3 *E.coli* – 16,67±1,15, *S. aureus* – 19,33±0,58, *Sal. enterica* – 19,33±1,15, №4 *E.coli* – 16,67±0,58, *S.aureus* 19,33±1,15, *Sal. enterica* – 18,0±0,00, №5 *E.coli* – 17,00±1,00, *S.aureus* – 20,33±0,58, *Sal. enterica* – 17,00±1,00 көрсеткіштер көрсетті. Микробиологиялық тазалық (1 глиофилизатта басқа Тіршілік ету аэробты микроорганизмдердің болуына жол берілмейді)- барлық серияларда бөгде микрофлора анықталған жоқ, Қышқыл түзуші белсенділік, барлық бес серияда 150 °Т. МКТ (кем дегенде 2×10⁹ КТБ/ г) барлық серияларда кем емес 2×10⁹, массаның біртектілігі (жеке сашедегі ішіндегі массаның орташа мәннен ауытқуы 20 сашенің 18-інде ±7,5%-дан, ал 2 сашеде ±15%-дан аспауы тиіс)- кем дегенде ± 7.5%. Дайын пробиотикалық препараттың сапа көрсеткіштері ғылыми-техникалық құжаттамаға сәйкес келеді.

Осылайша, зерттеу барысында пробиотикалық препаратты өндіру технологиясы әзірленді, ол белсенді фармацевтикалық субстанцияны өндіру технологиясын, сүтқышқылды бактериялардың микробтық массасын, лиофильді кептіру ортасының компоненттерімен қоса және БФС негізінде магний стеараты қосылған дайын препарат нысанды өндіру технологиясын қамтиды, ол сашеде оралған.

Осылайша, дәлелденген биологиялық белсенділігі бар БФС және магний стеаратынан тұратын дәрілік препараттың дайын нысанын өндіру технологиясы әзірленді.

Зерттеу барысында белсенді фармацевтикалық субстанцияны өндіру технологиясын, оның ішінде лиофильді кептіру ортасының компоненттері бар пробиотикалық бактериялардың микробтық массасын және пакетке оралған магний стеараты қосылған БФС негізіндегі дәрілік препараттың дайын нысанын өндіру технологиясын қамтитын пробиотикалық дәрілік препаратты өндіру технологиясы пысықталды.

3.3 «АС-Пробионорм» пробиотикалық препаратының клиникаға дейінгі сынақтары

Пробиотикалық препараттардың клиникалық сынақтарын жүргізу және өндіру технологиясын әзірлеу үшін міндетті шарт- клиникаға дейінгі сынақтарды жүргізу болып табылады.

Жаңа «АС-Пробионорм» дәрілік препаратының клиникаға дейінгі сынақтары жүргізілді, ол сүтқышқылды бактериялардың мақсатты әсер ететін ассоциациясы негізінде жасалған - *Lactobacillus fermentum* 30 және *Lactobacillus cellobiosus* 36, ішек ауруларының қоздырғыштарына қарсы жоғары антимикробтық белсенділікке ие. «АС-Пробионорм» пробиотикалық дәрілік препаратының клиникаға дейінгі сынақтары келесі негізгі кезеңдерді қамтыды:

1) *Escherichia coli* ATCC 8739 , *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-Р және *Salmonella enteritidis* ATCC 14028 штамдарына антибактериалдық белсенділікті агарда диффузия әдісімен анықтау;

2) Ферталь® дәрілік препаратымен салыстырғанда эксперименттік жануарларда жіті уыттылықты анықтау (ESI srl, Италия);

3) 50 ақ зертханалық тышқандарда энтерит (колибактериоз) моделінде емдеу және алдын алу тиімділігін «Лацидофил-WM» коммерциялық дәрілік препаратымен салыстыру (Канада);

4) *in vivo* өткір уыттылық классын және орташа өлімге әкелетін дозаны (ЛД₅₀) анықтау;

5) *in vivo* созылмалы уыттылықты анықтау;

6) Фагтардың бар-жоғын және асқазан сөлінің және өттің әсеріне төзімділікті анықтау.

«АС-Пробионорм» дәрілік препаратының антибактериалдық белсенділігін зерттеу *Escherichia coli* ATCC 8739 , *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-Р және *Salmonella enteritidis* ATCC 14028 штамдарына агарда диффузия әдісімен жүргізілді.

Жүргізілген зерттеулердің нәтижесінде «АС-Пробионорм» пробиотикалық препаратының жарнамаланған әсер ету спектріне сәйкес антибактериалдық белсенділігі бар екені анықталды. «АС-Пробионорм» дәрілік препаратының қауіпсіздігін жедел уыттылық көрсеткіштері бойынша Ферталь® дәрілік препаратымен салыстыра отырып эксперименттік жануарларда бағалау жүргізілді (ESI srl, Италия). Бұл зерттеудің негізгі мақсаты- зерттеліп отырған дәрілік препараттарға қатысты ең сезімтал мүшелер мен мүшелер жүйелерін, сондай-ақ патологиялық өзгерістердің сипатын және дәрежесін анықтау болды. Жіті уыттылықты анықтау Қазақстан Республикасының стандарттарына сәйкес

келетін зертхана және жаңа фармакологиялық заттарды эксперименттік (клиникаға дейінгі) зерттеу бойынша нұсқаулыққа сәйкес жүргізілді. «АС-Пробионорм» және Ферталь® дәрілік препараттарының бірнеше рет ішке енгізілгенде жануарлардың жалпы күйі, қозғалыс белсенділігі және эмоциялық статусы өзгеріссіз қалғандығы байқалды, бұл барлық эксперимент барысында бақылау және тәжірибелік топтардағы дене массасының оң динамикасымен расталады. Эксперименттік жануарлар арасында өлім-жітім байқалған жоқ. Некропсия деректері көрсеткендей, зерттелетін дәрілік препараттар ішкі органдардың патологиялық өзгерістерін туғызбайды.

Алынған деректерге сүйене отырып, «АС-Пробионорм» дәрілік препаратының Ферталь® дәрілік препаратымен салыстырылған жедел уыттылық зерттегенде олардың қауіпсіздігі салыстырмалы екені анықталды. «АС-Пробионорм» препаратының емдік және алдын алу тиімділігін зерттеу коммерциялық «Лацидофил-WM» дәрілік препаратымен салыстырылды (Канада).

Зерттеу барысында дәрілерді беріп, зертханалық жануарлардың физиологиялық жағдайын бақылау, бактериологиялық зерттеулер жүргізу және *Escherichia coli* O15 штамын жұқтырылған тышқандарда әртүрлі микроорганизмдердің төзімділігін және элиминациясын зерттеу жүргізілді. Эксперимент басталмас бұрын 3 айлық жасында, бір жынысты (еркек), салмағы 30-32 г болатын 50 сау, аралас тұқымды ақ тышқаннан топтар қалыптастырылды. Барлық тышқандар 10 күн бойы бірдей карантин режимінде ұсталды. Әрбір тышқанды өлшеп, термометрленді және ветеринарлық клиникалық тексеруден өткізілді.

«АС-Пробионорм» дәрілік препаратының тәуліктік бір реттік енгізуі 10 күн бойы 5% дозада дене салмағына қатысты, нәтижесінде лактобактериялардың өсуі 247 есеге артты және ішек микрофлорасындағы шартты-патогенді микроорганизмдердің саны 16 есеге азайды. Коммерциялық «Лацидофил-WM» препараты да лактобактериялардың өсуін 32 есеге арттырды және *Escherichia coli*-дің мөлшерін 6 есеге төмендетті. Алынған мәліметтер «АС-Пробионорм» препаратының коммерциялық «Лацидофил-WM» препаратымен салыстырғанда әлдеқайда күшті қалпына келтіруші қасиеттерін көрсетеді.

«АС-Пробионорм» дәрілік препаратының антибактериалдық белсенділігі *Escherichia coli* ATCC 8739 , *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P және *Salmonella enteritidis* ATCC 14028 штамдарына агарда диффузия әдісімен зерттелді. Жүргізілген зерттеулердің нәтижесінде «АС-Пробионорм» дәрілік препаратының жарнамаланған әсер ету спектріне сәйкес антибактериалдық белсенділігі бар екені анықталды. «АС-Пробионорм» дәрілік препаратының қауіпсіздігін жедел уыттылық көрсеткіштері бойынша Ферталь® дәрілік препаратымен салыстыра отырып эксперименттік жануарларда бағалау жүргізілді.

Бұл зерттеудің негізгі мақсаты- зерттеліп отырған дәрілік препараттарға қатысты ең сезімтал ағзалар мен ағзалар жүйелерін, сондай-ақ патологиялық өзгерістердің сипатын және дәрежесін анықтау болды.

«АС-Пробионорм» дәрілік препаратының емдік мақсатта дене салмағынан 5% дозада 15 минут бұрын тәулігіне 3 рет азықтандыруға дейін қолданылуы эксперименттік тышқандарды септикалық инфекцияның дамуынан 100% қорғады. 4-5-күндері жануарлардың жалпы жағдайында жақсару байқалды, диарея тоқтады. Лабораториялық жануарлардың өлімі тіркелмеді. Коммерциялық «Лацидофил-WM» дәрілік препаратының емдік мақсатта дене салмағынан 5% дозада 15 минут бұрын тәулігіне 3 рет азықтандыруға дейін қолданылуы жануарларды ауыр ауру түрінен 90% қорғады. Осы топта 4-күні бір тышқан өлді. Өлген жануардан алынған патологиялық материалды бактериологиялық зерттеу кезінде *E. coli* O15 дақылы бөліп алынды. Қалған жануарларда (9 бас) 6-күні жалпы жағдайдың жақсаруы байқалды, диарея тоқтады. Эксперименттік түрде жұқтырылған ақ тышқандардың тәжірибелік тобы, «АС-Пробионорм» дәрілік препаратын профилактикалық мақсатта 10 күн бойы дене салмағынан 5% дозада 15 минут бұрын тәулігіне 1 рет азықтандыруға дейін және жұқтырғаннан кейін үздіксіз 3 рет азықтандыруға дейін қабылдаған, колибактериозды жеңіл түрде өткерді. Жұқтырғаннан кейін алғашқы 2 күнде жеңіл әлсіздік пен жиі жүрек соғысы байқалды. 3-күні жалпы жағдайдың жақсаруы байқалды. Барлық тәжірибелік тышқандарда диарея жұқтырғаннан кейін 3-4-күні тоқтады. Эксперименттік түрде жұқтырылған ақ тышқандардың тәжірибелік тобы, «Лацидофил-WM» препаратын профилактикалық мақсатта 10 күн бойы дене салмағынан 5% дозада 15 минут бұрын тәулігіне 1 рет азықтандыруға дейін және жұқтырғаннан кейін үздіксіз 3 рет азықтандыруға дейін қабылдаған, колибактериозды жеңіл түрде өткерді. Жануарларда жұқтырған материалды енгізген жерінде температураның көтерілуі, ісіну мен гиперемияның байқалуы, диарея мен жиі жүрек соғысы екі күн бойы болды. Аурудың белгілері 6-күні тоқтады.

24 күн бойы жүргізілген экспериментте «АС-Пробионорм» және «Лацидофил-WM» препараттарын қабылдаған лабораториялық тышқандарда салмақ қосу байқалды. Бұл көрсеткіш «АС-Пробионорм» препаратын қабылдаған топта орта есеппен 4 грамм, ал «Лацидофил-WM» препаратын қабылдаған топта 2 грамм болды.

Ақ тышқандарда жүргізілген эксперименттің нәтижесінде «АС-Пробионорм» дәрілік препаратының терапевтік және профилактикалық тиімділігі ең жоғары 4-ші тәжірибелік топта байқалды, онда жануарлар 10 күн бойы жұқтырғанға дейін және тәжірибе барысында 14 күн бойы препаратты қабылдады (барлығы 24 күн). «АС-Пробионорм» препараты 10 күн бойы қолданылғаннан кейін лабораториялық жануарлардың ішек микробиотасының құрамында оң динамика байқалды. Микроорганизмдердің жалпы саны, әсіресе лактобактериялардың саны 247 есеге артты, ал шартты-патогенді микрофлора 16 есеге азайды. «АС-Пробионорм» препаратының қолданылуы эксперименттік тышқандарды септикалық инфекциялардан қорғады. Препарат қабылдаған

жануарлар ауруды жеңіл түрде өткерді, қоздырғыш қанға өтпеді. *E. coli* O15 жұқтырған бақылау тышқандарында ішек зақымдалуы және геморрагиялар пайда болды.

Эксперименталды түрде жұқтырылған ақ тышқандар, «АС-Пробионорм» дәрілік препаратымен емделген тәжірибелік топтар, колибактериоз ауруын тек алғашқы үш-төрт күн ішінде жеңіл түрде өткерді. Тәжірибелік ақ тышқандарда жеңіл тежелу, жергілікті температуралық реакция және жұқтырған материалды енгізу орнында ісіну байқалды. Үш-төрт күннен кейін тәжірибелік ақ тышқандардың жағдайы тез жақсарды. «АС-Пробионорм» дәрілік препаратын эксперименттік инфекциядан ақ тышқандарды емдеу үшін қолдану қоздырғыштарды жою уақытын айтарлықтай қысқартты (орта есеппен 4 күнге дейін). Препаратты тәжірибелік топтардағы жануарларға енгізу оларды микроорганизмдердің жасушаға жабысып енуінен қорғады, осылайша қоздырғыштардың қан айналымына енуін және инфекциялық процестің септикалық дамуын болдырмады. Дәрілік препаратты үнемі алған ақ тышқандардың тірі салмағының айтарлықтай артуы (орта есеппен 3-5 г) пробиотиктің жоғары иммундық стимуляциялық әсерін көрсетеді. Препараттың қолданылуы зертханалық жануарларға инфекцияны жеңіл түрде өткізіп, қысқа мерзімде сауығуға мүмкіндік берді. Осылайша, жүргізілген эксперимент нәтижесінде ақ тышқандарда «АС-Пробионорм» дәрілік препаратының жоғары терапевтік және профилактикалық тиімділігі анықталды.

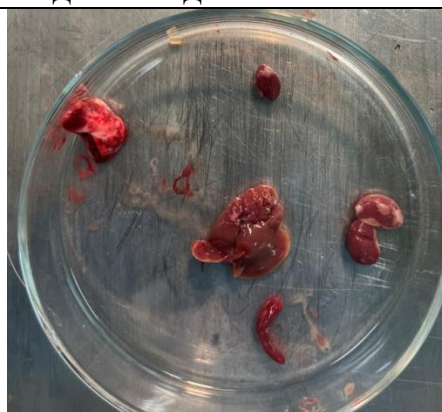
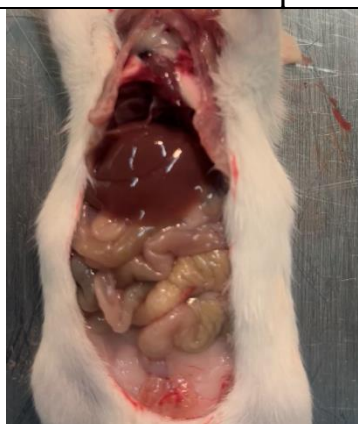
Зерттеу барысында зерттелген қосылыстың уыттылық класы мен LD₅₀ орташа өлім дозасы *in vivo* жағдайында анықталды.

Жіті уыттылықты зерттеу үшін 30 бас дені сау жыныстық жетілуге жеткен аутбредті тышқандар (22 г ± 10%) қолданылды. Зерттелетін препарат бір рет пероральді түрде келесі дозаларда енгізілді: 300,0 мг/кг; 1000,0 мг/кг; 2000,0 мг/кг; 4000,0 мг/кг және 5001,0 мг/кг салмаққа. Байқау кезеңі 14 күнді құрады, бұл уақыт ішінде күн сайын зертханалық тышқандардың салмағы, термостаттау және ветеринариялық клиникалық тексеру жүргізілді. Байқау кезеңі аяқталғаннан кейін жануарлар эвтаназияға ұшырап, ішкі органдардың жағдайы бағаланды. Байқау кезеңі барысында зерттелген ерітінділер әртүрлі дозаларда енгізілгеннен кейін жануарлардың өлімі және соматикалық көрсеткіштерде өзгерістер байқалмады. Тышқандардың дене салмағының динамикасын зерттегенде, тәжірибелік топтар арасында статистикалық тұрғыда маңызды өзгерістер анықталмады.

7-суретте келесі дозаларды алған 1-4 топтағы жануарлардың аутопсия фотосуреттері көрсетілген:



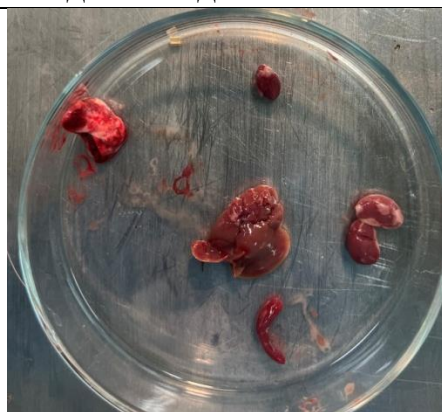
АС-Пробионорм 300,0 мг/кг дозасында



АС-Пробионорм 2000,0 мг/кг дозасында



АС-Пробионорм 4000,0 мг/кг дозасында



АС-Пробионорм 5001,0 мг/кг дозасында

Сурет –7 «АС-Пробионорм» препаратын әртүрлі дозада қабылдаған жануарлардың макроскопиясы

300,0 мг/кг; 2000,0 мг/кг; 4000,0 мг/кг және 5001,0 мг/кг дозада емдік пробиотикалық заттың сүт қышқылының лиофилизатының және пропион қышқылы бактерияларының зерттелген ерітінділерін бір рет ішке қабылдағаннан кейін тәжірибелік топтағы жануарлардың макроскопиясы жануарлардың ішкі мүшелерін тексеруде ауытқулар анықталмағандығын көрсетеді..

Кесте 13– Емдік пробиотикалық агент лиофилизатының ерітінділерін әр түрлі дозаларда бір рет ішке қабылдағаннан кейінгі тышқандардың ішкі ағзаларының салмағы, (M ± m)

№ гр	Пробиотикалық терапияның дозасы, мг/кг салмақ		Тышқандардың сою кезіндегі ішкі мүшелерінің салмағы (14 күн бақылаудан кейін), г				
			Бауыр	Бүйрек	Көкбауыр	Жүрек	Өкпе
1	300,0	M	1,2099	0,3044	0,1315	0,0979	0,2072
		m	0,1278	0,0324	0,0243	0,0066	0,0192
2	2000,0	M	1,3410	0,2768	0,1643	0,1153	0,2299
		m	0,1738	0,0364	0,0286	0,0137	0,0180
3	4000,0	M	1,2965	0,2613	0,1714	0,1230	0,2219
		m	0,1703	0,0396	0,0130	0,0144	0,0252
4	5001,0	M	1,2172	0,2912	0,1325	0,0997	0,2199
		m	0,0253	0,0199	0,0251	0,0011	0,0196

Абсолютті салмақ көрсеткіштері мен тәжірибелік топтардағы жануарлардың ішкі ағзаларының салыстырмалы салмақ коэффициенттері арасында статистикалық тұрғыда маңызды айырмашылықтар анықталған жоқ. Ішкі ағзалардың орналасуы, сыртқы түрі және басқа параметрлері ешқандай ауытқусыз, жануарлардың түрлік ерекшеліктеріне сәйкес болды. Макроскопиялық көрініс эксперименттік топтардағы жануарлардың ішкі ағзаларында патологиялық өзгерістерді анықтаған жоқ. LD₅₀ орташа өлім дозасын есептеу мүмкін болмады, себебі барлық қолданылған дозаларда жануарлардың өлімі байқалған жоқ.

Осылайша, уыттылық класы уытты емес зат ретінде анықталды.

Емдік пробиотикалық агенттің ауызша қабылдағанда *in vivo* экспериментінде өткір уыттылығын анықтау.

Зерттеуге салмағы 22 г ± 10% болатын 40 ақ тұқымды жыныстық жетілген зертханалық тышқандар (әр доза үшін және теріс бақылау тобы үшін екі жыныстағы 10 тышқандар) пайдаланылды.

Жануарлар Қазақстан Республикасы Денсаулық сақтау министрлігінің «Қоғамдық денсаулық сақтау ұлттық орталығы» шаруашылық жүргізу

құқығындағы мемлекеттік қазыналық кәсіпорны Санитарлық-эпидемиологиялық сараптама және мониторинг ғылыми-практикалық орталығы филиалының виварийінен алынған.

Зерттелетін дәрілік пробиотикалық агенттің жұмыс ерітінділері таңдалған дозаларға сәйкес физиологиялық ерітіндіде құрамында 2×10^9 КТБ бар құтының (сүт қышқылының лиофилизаты және пропион қышқылы бактерияларының) мазмұнын еріту арқылы дайындалды: $5,0 \times 10^6$ КТБ; $10,0 \times 10^6$ КТБ; $15,0 \times 10^6$ КТБ:

- 1-топ: 1 құтыдан алынған препарат 200 мл физиологиялық ерітіндіде ерітілді, $10,0 \times 10^6$ КТБ /мл бактериалды титр алынды. Әр жануарға күніне 0,5 мл берілді. ($5,0 \times 10^6$ КТБ);

- 2-топ: 1 құтыдан алынған препарат 100 мл физиологиялық ерітіндіде ерітілді, $20,0 \times 10^6$ КТБ /мл бактериалды титр алынды. Әр жануарға күніне 0,5 мл берілді. ($10,0 \times 10^6$ КТБ),

- 3-топ: 1 флакондағы препарат 66,5 мл физиологиялық ерітіндіде ерітілді, бактериалды титр $30,0 \times 10^6$ КТБ /мл алынды. Әр жануарға күніне 0,5 мл берілді. ($15,0 \times 10^6$ КТБ).

- 4-топ: Әр жануарға күніне 0,5 мл дайындалған тұз ерітіндісі берілді.

Тәжірибе соңында барлық топтарда гематологиялық зерттеулер жүргізілді. Гематологиялық зерттеу кезінде келесі көрсеткіштер зерттелді: гемоглобин, гематокрит, эритроциттер саны, эритроциттердің шөгу жылдамдығы, дененің орташа көлемі, лейкоциттер саны, лейкограмма, тромбоциттер. Зерттеу нәтижелері 18-кестеде берілген.

Кесте 14. Әртүрлі дозаларда емдік пробиотикалық препаратты және бақылау тобындағы жануарларды пероральды 28 күндік енгізу кезіндегі тышқандар қанының гематологиялық көрсеткіштері, $m \pm m$

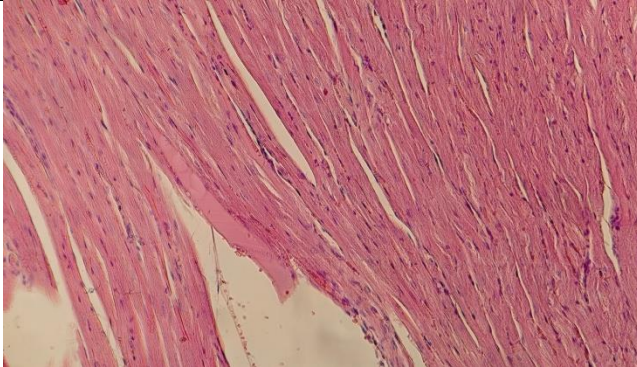
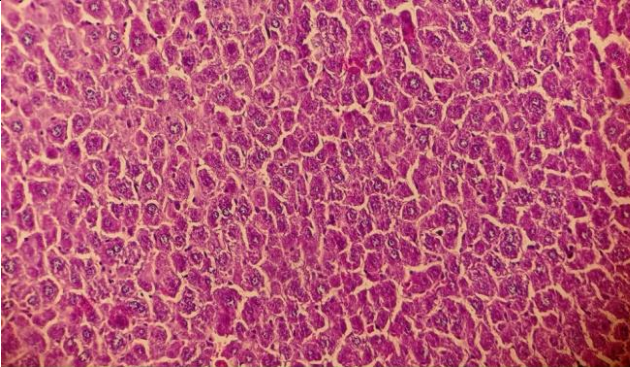
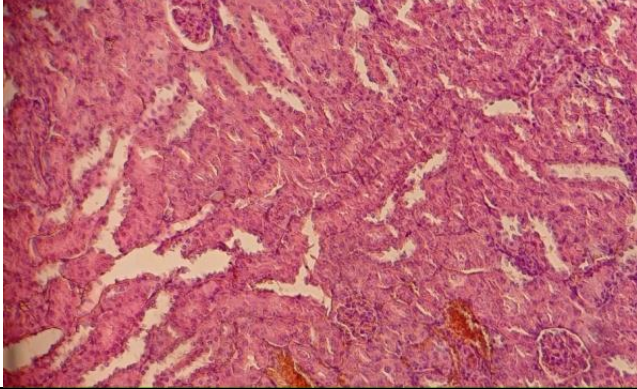
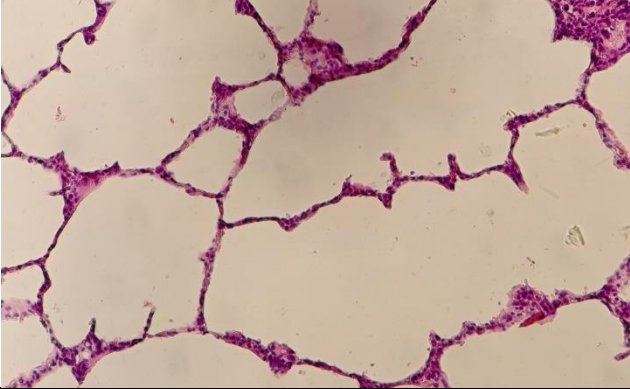
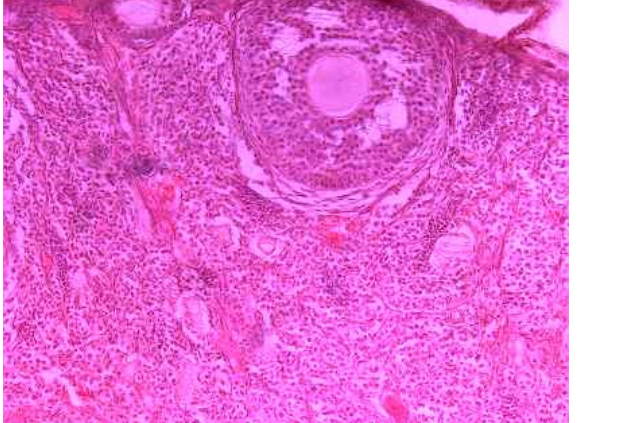
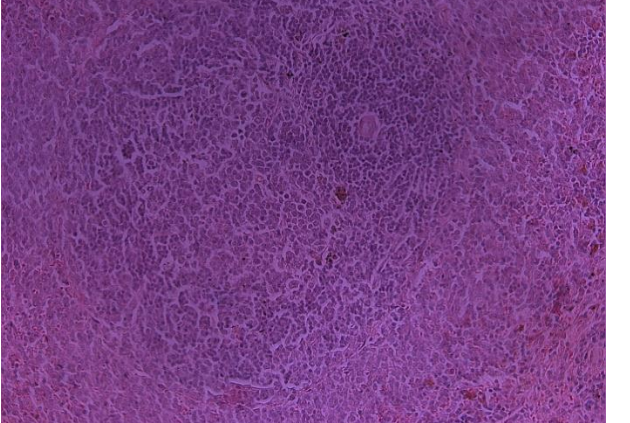
Сынақ атауы			Топ №, доза (КТБ)			
			1 топ $5,0 \times 10^6$	2 топ $10,0 \times 10^6$	3 топ $15,0 \times 10^6$	4 топ – бақылау. (тұзды ерітінді)
Гемоглобин HGB, g/L	♀	M	140,60	144,20	139,80	139,60
		m	2,4083	4,6583	2,9496	12,8374
	♂	M	132,60	132,00	133,60	129,40
		m	6,6558	8,0932	9,4499	6,9498
Гематокрит НСТ, %	♀	M	47,32	47,22	47,34	45,84
		m	3,9940	2,2687	3,7534	4,6436
	♂	M	43,30	42,62	44,04	41,94
		m	5,3726	3,5273	2,8263	3,0013
Эритроциттер RBC, $10^{12}/L$	♀	M	11,66	11,96	12,12	12,14
		m	1,5726	2,0659	0,2490	3,2292
	♂	M	11,76	11,28	11,94	10,96
		m	0,9965	0,5848	1,2198	0,6465

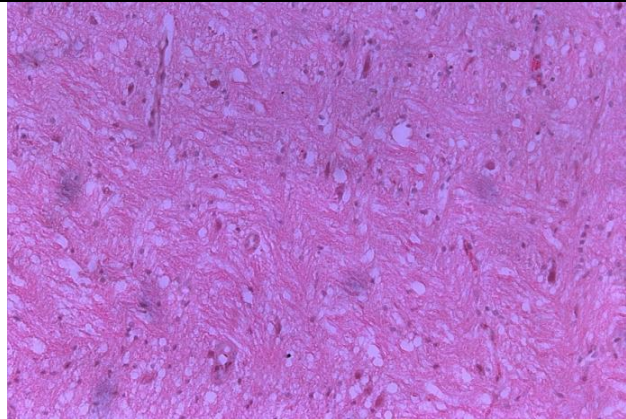
Кесте 14. Әртүрлі дозаларда емдік пробиотикалық препаратты және бақылау тобындағы жануарларды пероральді 28 күндік енгізу кезіндегі тышқандар қанының гематологиялық көрсеткіштері, $m \pm t$ - жалғасы

Эритроциттердің орташа көлемі. MCV, fL	♀	M	41,00	40,60	39,00	39,20
		m	6,0415	7,5366	3,9370	7,9183
	♂	M	36,80	37,60	37,00	38,00
		m	2,1679	1,6733	1,8708	2,5495
Лейкоциттер WBC, 10 ⁹ /L	♀	M	8,55	9,61	8,98	9,36
		m	3,1748	2,5549	0,7506	2,9953
	♂	M	7,45	6,90	8,84	8,08
		m	2,2944	2,4717	1,8015	3,4651
Лимфоциттер LYM, %	♀	M	59,08	54,42	55,90	62,74
		m	12,0070	14,1981	11,8802	9,5704
	♂	M	53,26	62,66	50,92	56,26
		m	7,5623	7,7603	17,5151	2,8884
Моноциттер Mi, %	♀	M	14,90	19,48	17,64	17,92
		m	9,3920	3,8441	2,9022	4,6203
	♂	M	17,88	18,16	17,64	19,48
		m	1,7326	8,7165	3,4093	7,7238
Гранулоциттер GRA, %	♀	M	25,96	26,08	26,46	19,28
		m	6,1056	13,3397	10,7937	10,7544
	♂	M	28,86	19,18	31,42	24,26
		m	6,3046	5,1154	14,8589	7,0476
<i>Кесте</i> Тромбоциттер PLT, 10 ⁹ /L	♀	M	1055,60	793,40	811,40	997,60
		m	211,7140	181,0050	137,7472	340,6293
	♂	M	803,00	844,20	619,20	791,60
		m	219,0023	361,2585	39,4297	106,2535
ЭТЖ, мм/сағат	♀	M	1,60	1,20	1,60	1,80
		m	0,5477	0,4472	0,5477	0,8367
	♂	M	1,20	1,60	1,60	1,40
		m	0,4472	0,5477	0,5477	0,5477

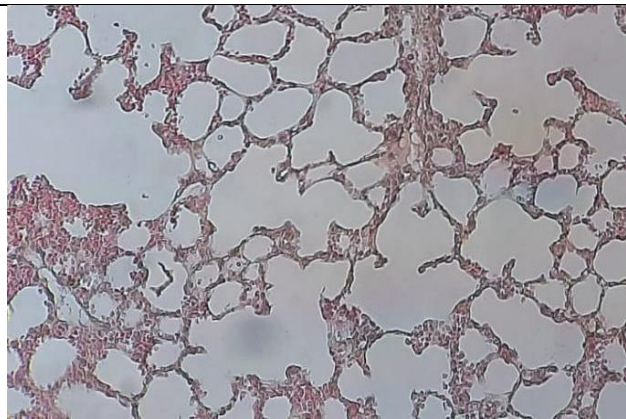
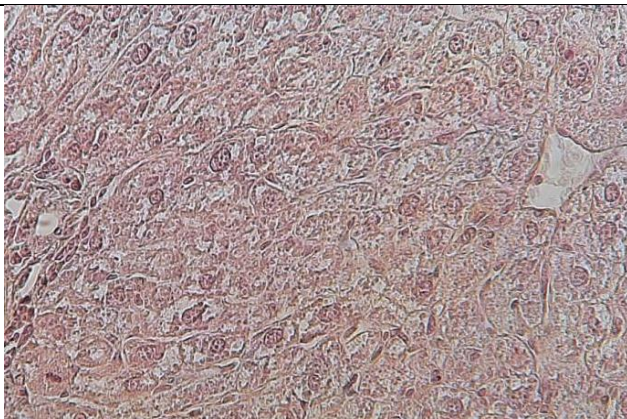
28 күн емдік пробиотикалық препаратты $5,0 \times 10^6$ КТБ, $10,0 \times 10^6$ КТБ және $15,0 \times 10^6$ КТБ дозаларында қабылдаған Жануарлар топтарында қанның гематологиялық көрсеткіштерін зерттеу кезінде тұзды қабылдаған бақылау Жануарлар тобымен салыстырғанда айтарлықтай айырмашылықтар байқалмады.

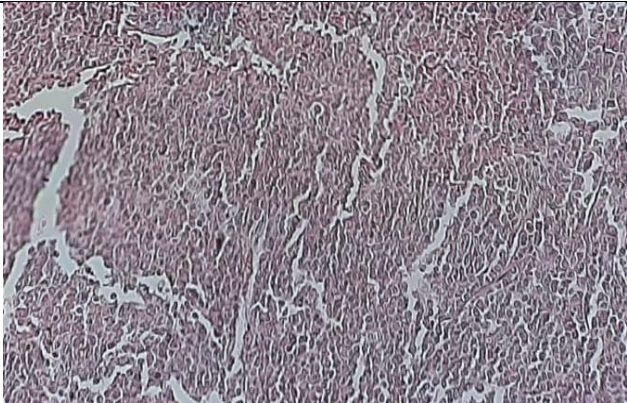
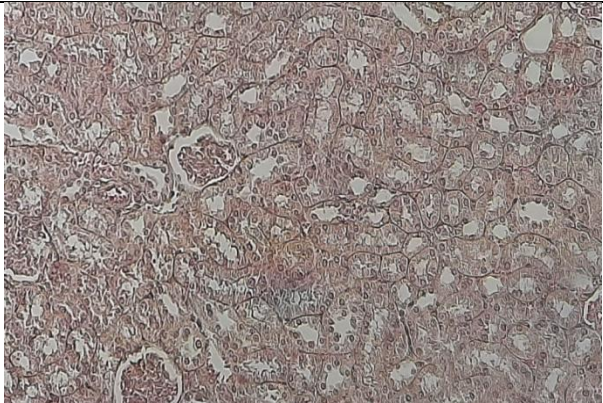
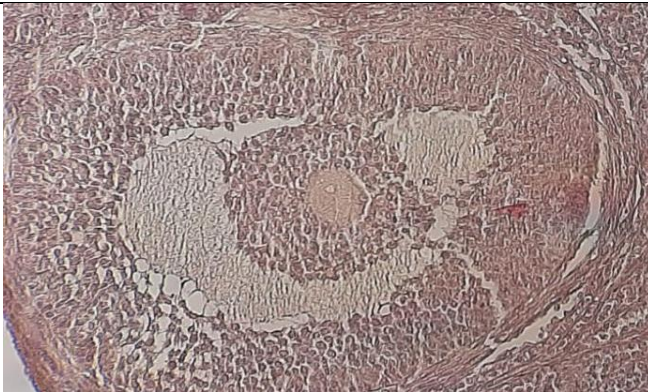
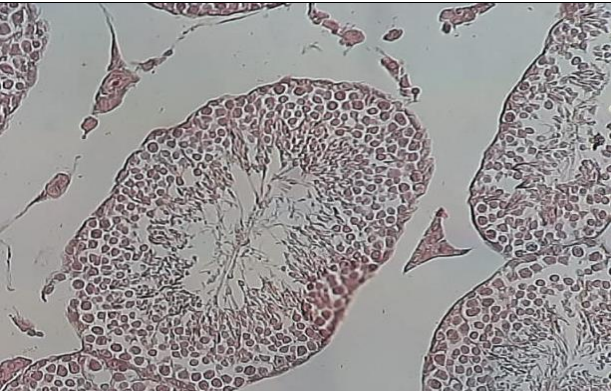
Максималды дозада $15,0 \times 10^6$ КТБ терапевтік пробиотикалық препарат қабылдаған тышқандардың ішкі ағзалардың гистологиялық зерттеулерінің өкілдік деректері.

	
Тышқан жүрегінің гистоқұрылымы. Ұлғайтылған×20, ок.×10; бояу: гематоксилин-эозин.	Тышқан бауырының гистоқұрылымы. Ұлғайту об. ×40, ок. ×10; бояу: гематоксилин-эозин."
Көлденең жолақты құрылым сақталған. Кардиомиоциттердің ядролары гиперхромды. Бұлшықет пен дәнекер тін арасындағы қатынас өзгермеген.	Бауырдың бөлікшелі құрылысы бұзылмаған. Гепатоциттердің цитоплазмасы түйіршікті, жекелеген жасушаларда ұсақтамшылы майлы дистрофия байқалады. Лимфогистиоцитарлық инфильтрация құбылыстары анықталған жоқ.
	
Тышқан бүйрегінің гистоқұрылымы. Ұлғайтылған×20, ок.×10;бояу: гематоксилин-эозин."	Тышқан өкпесінің гистоқұрылымы. Ұлғайтылған ×20, ок ×10; бояу: гематоксилин-эозин
Проксимальды түтікшелердің жекелеген эпителиоциттерінің қабатталуы (десквамациясы) байқалады. Барлық типтегі түтікшелердің ядролары базальды орналасқан. Шағыл тәрізді денелердің (гломерулалардың) зәр кеңістігі көрінеді."	Өкпе тінінің барлық құрылымдық компоненттері ажыратылады: альвеолалар, альвеолярлық қапшықтар, альвеолярлық өтпелер және бронхиолалар. Негізінен бронхиолалар айналасындағы аймақта альвеолалардың қабырғалары қалыңдап, ірі макрофагтар байқалады.
	

Тышқан аналық безінің гистокұрылымы. Ұлғайтылған×20, ок.×10; бояу: гематоксилин-эозин."	Тышқан көкбауырдың гистокұрылымы. Ұлғайтылған: ×20, ок. ×10; бояу: гематоксилин-эозин."
Тышқан көкбауырдың гистокұрылымы. Ұлғайтылған: об. ×20, ок. ×10; бояу: гематоксилин-эозин.	Барлық лимфoidты тін аймақтары көрсетілген: шеткі аймақ, мантиялық аймақ, жарық орталық, периартериальды аймақ. Ақ пульпадағы лимфoidты түйіншектер типтік күйде. Реактивті орталықтар өзгеріссіз.
	
Ми бақылау тобының гистокұрылымы. Ұлғайтылған×20, ок.×10; бояу -гематоксилин-эозин.	Бақылау тобындағы.Ұлғайтылған×20, ок.×10; бояу — гематоксилин-эозин.

Сурет 8 - Терапевтік пробиотикалық заттың $15,0 \times 10^6$ КТБ дозасы

Соңғы мидың құрылымында: кантамырлардың толыққандығы (гиперемия).	Көлденең жолақтығы айқын байқалады. Кардиомиоциттердің ядролары сопақша, ұзынша пішінді. Кардиомиоциттер әлсіз білінетін гипертрофия жағдайында. Қан тамырлары қанға толы.
	
Бақылау тобындағы тышқанның өкпесінің гистокұрылымы. Ұлғайтылған×20, ок×10; бояу: гематоксилин-эозин.	Бақылау тобындағы бауырдың гистокұрылымы. Ұлғайтылған ×40, ок×10; бояу: гематоксилин-эозин
Жекелеген альвеолалардың қабырғалары қалыңдаған. Респираторлық эпителиоциттер қатты жалпақталған. Ірі макрофагтар кездеседі. Жекелеген шекаралық пластинкалар қалыңдаған.	Көптеген гепатоциттердің цитоплазмасы түйіршікті, вакуолизация белгілері жоқ. Купфер жасушаларында белсенділену белгілері байқалмайды. Гепатоциттердің ядросы ірі және орталықта орналасқан.

	
Бақылау тобындағы тышқанның көкбауыр гистокұрылымы. Ұлғайтылғано×20, ок.×10; бояу: гематоксилін-эозин."	Бақылау тобындағы тышқанның бүйрек гистокұрылымы. Ұлғайтылған об. ×20, ок. ×10; бояу: гематоксилін-эозин."
Фолликулдің шеткі аймақтарында орташа деңгейде делимфаза байқалады. Реактивті орталықтар өзгеріссіз.	Бүйрек қыртыс затының негізгі бөлігін базальды орналасқан ядросы бар призмалық эпителиоциттерден тұратын проксимальды түтіктер құрайды. Дистальды түтіктер әлдеқайда ашық боялған және кеңірек жарығы бар. Бүйрек түйіршіктерінде зәрлік кеңістік байқалады.
	
Бақылау тобындағы аналық бездердің гистокұрылымы. Ұлғайтылған ×40, ок. ×10; бояу: гематоксилін-эозин.	Бақылау тобындағы тышқанның ұрық бездерінің гистокұрылымы. Ұлғайтылған ×40, ок. ×10; бояу: гематоксилін-эозин."
Қыртыс заты ми затынан басым. Фолликулдар әртүрлі даму сатысында орналасқан.	Барлық клеткалар түрлері ерекшеленеді: базальды мембранада ірі, дұрыс емес пішінді Сертоли жасушалары орналасқан, одан кейін кішірек сперматогониялар, оларға бірінші реттік сперматоциттер жабысып тұр. Жарықтықта кішкентай сперматозоидтар ерекшеленеді.

Сурет 9 - Физиологиялық ерітінді алған бақылау тобының жануарларының ішкі ағзаларының микроскопиялық зерттеуі.

«АС-Пробионорм» препаратының созылмалы уыттылығын анықтау үшін 100 ақ аутбредті жетілген зертханалық тышқанға (әр дозада 10 бастан, теріс бақылау тобында және интактті бақылау тобында) жүргізілген зерттеу жүргізілді, жануарлардың орташа массасы $20 \text{ г} \pm 10\%$. Зерттелген препарат бір рет ауыз қуысы арқылы келесі дозаларда енгізілді: $5,0 \times 10^6$ КТБ/г; $10,0 \times 10^6$

КТБ/г; $15,0 \times 10^6$ КТБ /г. Байқау кезеңі 60 күнді құрады, бұл уақыт ішінде күн сайын зертханалық тышқандардың салмағы, термостаттау және ветеринариялық клиникалық тексеру жүргізілді. Байқау кезеңі аяқталғаннан кейін жануарлар эвтаназияға ұшырап, ішкі ағзалардың гистологиялық зерттеуі жүргізілді.

Емдік пробиотикалық заттың созылмалы уыттылығын ішке қабылдау кезінде *in vivo* эксперименттерінде анықтау.

Бүйректің секреторлық қызметін бағалау проксимальды өзекшелердің секреторлық қызметін бағалаудың сапалық көрсеткіші ретінде қауіпсіз бояғыш фенол қызыл (PSP) көмегімен орындалды.

Бақылау тобындағы (5♀ және 5♂) жануарларға PSP интраперитонеальді инъекциядан кейін 1-топ – $5,0 \times 10^6$, (5♀ және 5♂), 2 топ – $10,0 \times 10^6$ (5♀ және 5♂) және 3 топ – $15,0 \times 10^6$ (5♀ және 5♂) зәрдің түсіне қарады. Барлық топтағы жануарларда 0,3 мл көлеміндегі фенол қызылының 1% стерильді сулы ерітіндісін бір рет құрсақ ішіне енгізгеннен кейін зәрдің бірінші бөлігінің түсі таңқурай-қызыл түсті болды. Барлық жануарларда 3-4 рет зәр шығарудан кейін әдеттегі зәр түсі қалпына келді.

Зерттелетін дәрілік пробиотикалық заттың сенсibilизаторлық әсерін және жануарлар ағзасында аллерген-антидене кешенінің түзілуін анықтау үшін екі күн аралығымен 3 рет көктамыр ішіне енгізу және 7-ші күні зерттелетін препаратпен бір рет көктамыр ішіне арандату жүргізілді.

Тінді жасушалардың дегрануляция реакциясы – аллерген-антиденелер кешенінің әсерінен мастикалық жасушалардың дегрануляциялану қабілетіне байланысты «жедел» (бірінші) типті аллергиялық реакцияны анықтау әдісі.

Терапевтік пробиотикалық агент (сүт қышқылы және пропион қышқылы бактерияларының лиофилизаты) $0,5$ мл көлемінде $10,0 \times 10^6$ КТБ дозасында. Сыналатын препараттың перитонеальді мастикалық жасушалардың суспензияларына аллергендік әсері (тінді жасушаларды жанама дегрануляциялау әдісімен) теріс деп бағаланады, өйткені тінді жасушалардың дегрануляция көрсеткіш мәні $< 0,2$.

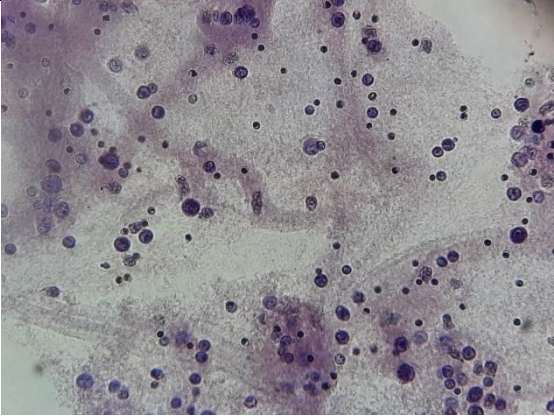
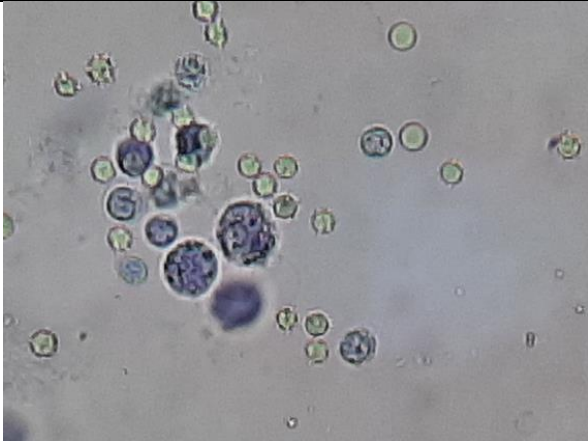
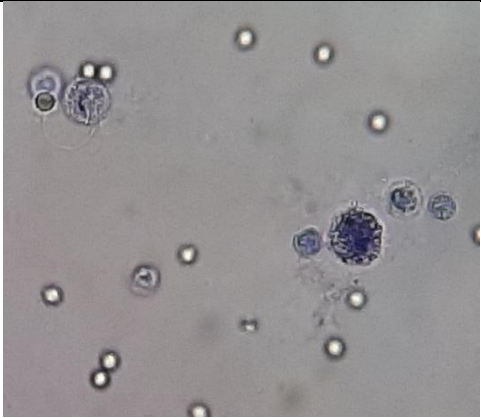
Көрсеткіш = $(1a + 2b + 3c + 3d) / 100$,

a - әлсіз дегрануляциясы бар тінді жасушалардың саны;

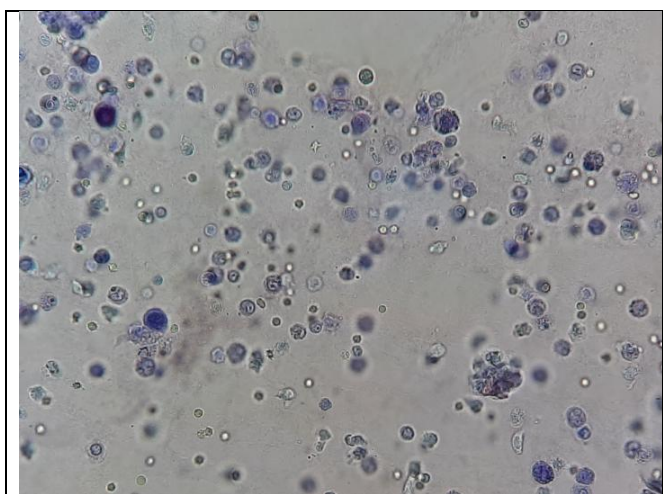
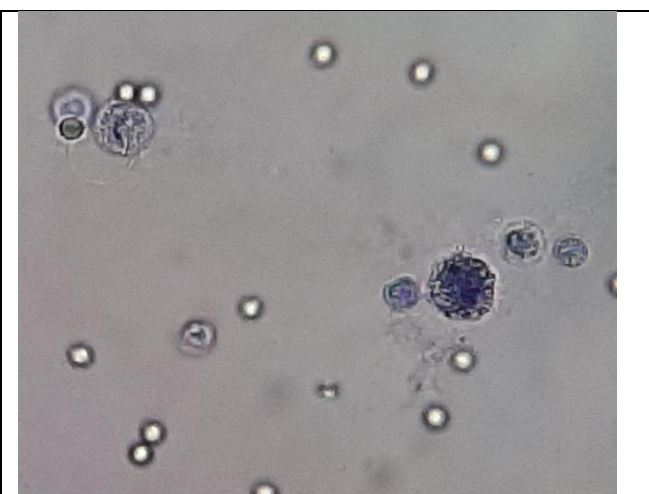
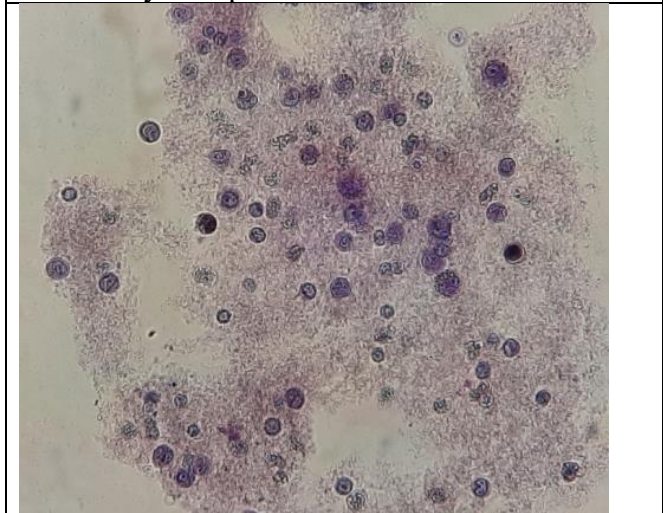
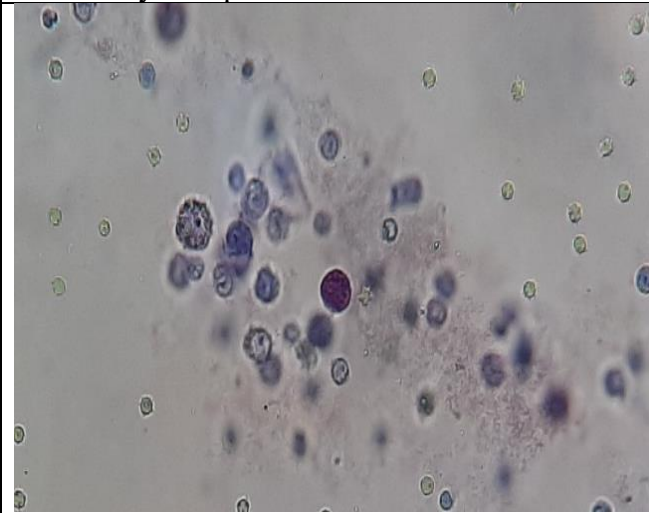
b - орташа дегрануляция дәрежесі бар тінді жасушалар саны;

c-өткір дегрануляциясы бар тінді жасушалар саны;

d-толық дегрануляциясы бар тінді жасушалардың саны.

	
ұлғайтылған $\times 200$ 0,5 мл көлемінде интраперитонеальді физиологиялық ерітіндімен және $10,0 \times 10^6$ КТБ дозада емдік пробиотикалық агентпен сенсбилизацияланған егеуқұйрықтардың перитонеальді тінді жасушалары 0,5 мл көлемінде	ұлғайтылған $\times 400$ 0,5 мл көлемінде құрсақішілік физиологиялық ерітіндімен $10,0 \times 10^6$ КТБ дозада емдік пробиотикалық агентпен сенсбилизацияланған егеуқұйрықтардың перитонеальді тінді жасушалары 0,5 мл көлемінде
	
ұлғайтылған $\times 400$ 0,5 мл көлемінде интраперитонеальді физиологиялық ерітіндімен және $10,0 \times 10^6$ КТБ дозада емдік пробиотикалық агентпен сенсбилизацияланған егеуқұйрықтардың перитонеальді тінді жасушалары 0,5 мл көлемінде	ұлғайтылған $\times 400$ 0,5 мл көлемінде интраперитонеальді физиологиялық ерітіндімен және $10,0 \times 10^6$ КТБ дозада емдік пробиотикалық агентпен сенсбилизацияланған егеуқұйрықтардың перитонеальді тінді жасушалары 0,5 мл көлемінде

Сурет-10 Физиологиялық ерітіндімен өңделген және емдік пробиотикалық агентпен сенсбилизацияланған егеуқұйрықтардың перитонеальді тінді жасушаларының цитоструктурасы

	
Ұлғайтылған: $\times 200$ Іш қуысына терапевтік пробиотикалық затты $10,0 \times 10^6$ КТБ мөлшерінде 0,5 мл көлемде енгізіп, сезімталдандырылған және қабылдаған тышқандардың перитонеальды тінді жасушалары.	Ұлғайтылған: $\times 400$ Іш қуысына терапевтік пробиотикалық затты $10,0 \times 10^6$ КТБ мөлшерінде 0,5 мл көлемде енгізіп, сезімталдандырылған және қабылдаған тышқандардың перитонеальды тінді жасушалары.
	
Ұлғайтылған: $\times 200$ Іш қуысына терапевтік пробиотикалық затты $10,0 \times 10^6$ КТБ мөлшерінде 0,5 мл көлемде енгізіп, сезімталдандырылған және қабылдаған тышқандардың перитонеальды тінді жасушалары.	Ұлғайтылған: $\times 400$ Іш қуысына терапевтік пробиотикалық затты $10,0 \times 10^6$ КТБ мөлшерінде 0,5 мл көлемде енгізіп, сезімталдандырылған және қабылдаған тышқандардың перитонеальды тінді жасушалары.

Сурет 11- Терапевтік пробиотикалық препаратты қабылдап, тышқандардың перитонеальды тінді жасушаларының цитоқұрылымы."

1 күн аралығымен егеуқұйрықтарды алдын-ала ішілік 3 есе сенсibilизациялау және зерттелетін емдік пробиотикалық агентпен мастикалық жасушалардың *in vitro* арандатуы мастикалық жасушалардың дегрануляциясы түрінде "дереу" типтегі организмнің айқын аллергиялық реакциясын қалыптастырмайды. Механизмге тіндердегі және сұйық тіндік ортадағы антиген – антидене реакциясы қатысады (мастикалық жасушалардың жасуша мембранасында түзілген аллерген – антидене кешенінің әсерінен дегрануляция қабілетінен тұрады). Егеуқұйрықтардың тінді жасушаларының

дегрануляция көрсеткіші 0,043 ($< 0,2$) және тінді жасушалардың дегрануляция индексі (IMCD) 1,057 ($< 1,1$) құрайды, бұл аллергиялық реакцияның болмауы деп бағаланады.

Осылайша, емдік пробиотикалық агент (сүт қышқылы лиофилизаты (*Lactobacillus plantarum* 2V/a-6, *Lactobacillus brevis* B-3/A-26, *Lactobacillus acidophilus* 27w/60) және пропион қышқылы бактериялары (*Propionibacterium shermanii* 8) егеуқұйрықтардың перитонеальді тінді жасушаларына потенциалды сенсбилизациялық (аллергиялық) әсер етпейді.

Зерттеу барысында «АС-Пробионорм» препаратының зерттелген дозаларда ұзақ мерзімді қолданған кезде токсикалық әсері байқалмады. Тәжірибелік топтардағы тышқандардың өлімі тіркелмеді, жануарлардың сыртқы түрінде және жем қабылдау деңгейінде ауытқулар байқалмады.

Физиологиялық зерттеулер нәтижесінде «ашық алаң» тестінде және зерттеу рефлексінде қозғалыс белсенділігінің бұзылуы/өзгерістері анықталған жоқ, барлық тәжірибелік топтардың жануарлары біртектес мінез-құлық көрсетті. Салмақ көрсеткіштері мен салмақтың өсуі физиологиялық нормаға сәйкес болды. Бүйректердің секреторлық функциясын бағалау эпителиоциттердің проксимальды каналыцалардағы реабсорбциялық белсенділігінде өзгерістер анықтамады. Ректальды температура, гематологиялық және биохимиялық қан мен зәр көрсеткіштері осы түрдегі жануарларға сәйкес болды.

Макроскопиялық зерттеу нәтижесінде зерттеліп отырған пробиотикалық препарат тышқандардың ішкі ағзаларында көзге көрінетін патологиялық өзгерістер мен барлық тәжірибелік топтарда ішкі ағзалардың салыстырмалы салмақ коэффициенттерінің статистикалық тұрғыда маңызды өзгерістерін тудырмайтыны анықталды. Теріс бақылау тобындағы тышқандар мен «АС-Пробионорм» пробиотикалық препаратын ең жоғары доза — $15,0 \times 10^6$ КТБ/г мөлшерінде алған топтағы тышқандардың ішкі ағзаларына жүргізілген гистологиялық зерттеу ағзалар құрылымында өзгерістер мен топтар арасында айырмашылықтар анықталмады. Сонымен қатар, «АС-Пробионорм» препараты құрамындағы фагтардың бар-жоғы және оның асқазан сөлі мен өтке төзімділігі анықталды. Зерттеу нәтижелері фаголизис аймақтарының жоқтығын, сондай-ақ тіршілікке қабілетті жасушалар санының жеткілікті деңгейде сақталғанын көрсетті. Ацидин-пепсин әсерінен сүтқышқылды бактериялардың жасуша титрі бір-екі есеге төмендеді, ал сілтілі ортада (Панзинорм форте 20000 препаратымен) бастапқы көрсеткішпен салыстырғанда тағы 4,5 есеге азайды.

Жедел уыттылықты зерттеудің негізгі мақсаты — фармакологиялық заттың төзімді, токсикалық және өлімге әкелетін дозаларын анықтау, сондай-ақ жануарлардың өлім себебін анықтау. Жедел токсиктіліктің параметрі — ДЛ50, яғни бақылау тобының 50% жануарларының өліміне себеп болатын заттың дозасы.

Зерттелетін препараттың уыттылық класы ҚР Денсаулық сақтау министрлігінің 2021 жылғы 4 ақпандағы № ҚР ДСМ-15 бұйрығына сәйкес, орташа өлімдік дозаны есептеген жағдайда, экономикалық ынтымақтастық

және даму ұйымының (OECD) модификацияланған классификациясына сай анықталады.

Кесте 14- Сынақ нәтижелерін интерпретациялануы

№	Дәрежесі	Уыттылық дәрежесі	ЛД50 (Асқазанға енгізу арқылы)
1	I	Өте уытты	<5
2	II	Жоғары уытты	5-50
3	III	Орташа уытты	51-300
4	IV	Аз уытты	301-2000
5	V	Уытты емес	2001-5000
6	VI	Салыстырмалы түрде зиянсыз	>5000

Төрт топ жануарларға (әр топта 5 бас) Емдік пробиотикалық препараттың лиофилизатының әртүрлі зерттелетін дозалары енгізілді. Жануарларды өлім-жітім немесе уыттылық белгілерге бақылау алғашқы тәулікте жұмыс күні ішінде әр 2 сағат сайын жүргізілді, ал келесі күндері — әр 24 сағат сайын жүргізілді. Барлық жануарлар зерттелетін заттың ерітіндісі енгізілгеннен кейін 14 күн бойы бақылауда болды. Бақылау кезінде зерттелетін препаратының әсерінен туындайтын жедел уыттылық белгілердің болуы бағаланды. Жедел клиникалық белгілері бақылау барысында құжаттамаға алынды, соның ішінде олардың басталуы, дәрежесі және ұзақтығы көрсетілді. Бұл белгілерге үйлеспеген қозғалыстар, көзден жас ағу, сілекей бөліну, сұйық нәжіс, құсу, жүннің үркенуі (пилоэрекция), жануарлардың топтасуы, әлсіздік жағдайы (прострация), діріл, тыныс алудың қиындауы, қисайған қалып, сыртқы әсерлерге баяу жауап беру, тамақ ішуден бас тарту, шырышты қабықтардың бозаруы, ұстамалар, жатып қалу, бұлшық еттердің тонусының төмендеуі сияқты жағдайлар жатады. Жануарлардың мінез-құлқындағы және жалпы жағдайындағы барлық ауытқулар тіркелуге тиіс болды.

Зерттелетін жануарлардың каннибализм және тіндердің автолизі салдарынан өлу жағдайларын болдырмау үшін жануарларға тұрақты бақылау жүргізілді.

Жануарлардың дене салмағы дозаны енгізуден бұрын және бақылау кезеңінде аптасына бір рет өлшенді. 14 күндік бақылаудан кейін жануарларға эвтаназия жасалып, аутопсия және макроскопиялық зерттеу жүргізілді.

Ішкі ағзалардың — бауыр, өкпе, көкбауыр, бүйрек және жүрек — салмағы өлшеніп, олардың салыстырмалы салмақ коэффициенттері есептеліп, сандық деректер статистикалық өңдеуден өткізілді.

Кесте - 14 Терапевтік пробиотикалық зат ерітінділерін әртүрлі дозада бір реттік пероральды енгізгеннен кейінгі тышқандардың дене массасының өзгерісі, ($M \pm m$)

№ топтар	Емдік-пробиотикалық препараттың дозасы, мг/кг салмаққа	Жануарлардың орташа салмақтары, г		
		Зерттеуге дейінгі	7 күннен соң	14 күннен соң

Кесте - 14 Терапевтік пробиотикалық зат ерітінділерін әртүрлі дозада бір реттік пероральды енгізгеннен кейінгі тышқандардың дене массасының өзгерісі, ($M \pm m$) жалғасы

1	300,0	$21,98 \pm 0,75$	$22,52 \pm 0,67$	$23,34 \pm 0,58$
2	2000,0	$22,70 \pm 0,75$	$23,40 \pm 0,64$	$24,30 \pm 0,77$
3	4000,0	$22,92 \pm 0,54$	$23,64 \pm 0,38$	$24,70 \pm 0,32$
4	5001,0	$22,92 \pm 0,64$	$23,52 \pm 0,59$	$24,10 \pm 0,45$
Ескерту: * – "Эксперимент басталғанға дейінгі дене салмағының мәндерімен салыстырғанда айырмашылық статистикалық тұрғыдан маңызды ($p < 0,05$).				

Осылайша, «АС-Пробионорм» пробиотикалық препаратының клиникаға дейінгі сынақтары бұл дәрілік заттың қауіпсіздігі мен биологиялық тиімділігін растады. Препарат адамның асқазан-ішек жолдарының кең таралған патогендеріне қарсы айтарлықтай антагонистік белсенділік, асқазан сөлі мен өтке төзімділік, сондай-ақ бөгде микрофлораның болмауын көрсетті. Бұдан бөлек, зерттеліп отырған дәрілік заттың ESI srl (Италия) компаниясының коммерциялық «Ферталь®» препаратымен салыстырғанда қауіпсіз екені дәлелденді. Сонымен қатар, «АС-Пробионорм» дәрілік пробиотикалық препараты халықаралық фармацевтикалық нарықтағы «Лацидофил-WM» препаратына қарағанда айқын емдік-профилактикалық әсер көрсетті. Препараттың қауіпсіздігі мен тиімділігі зертханалық жануарлардың *in vivo* үлгісінде дәлелденгендіктен, келесі кезең ретінде оның адам ағзасына емдік-профилактикалық әсерін бағалау мүмкіндігі туындайды. Осылайша, «АС-Пробионорм» препаратының клиникаға дейінгі зерттеулері барысында алынған оң нәтижелер бұл дәрілік затқа клиникалық сынақтардың бірінші кезеңін жүргізуге мүмкіндік бар екенін көрсетеді.

«АС-Пробионорм» пробиотикалық препаратының клиникаға дейінгі сынақтары барысында зерттеліп отырған дәрілік заттың қауіпсіздігі мен биологиялық тиімділігі расталды. Бұл препарат адамның асқазан-ішек жолдарының ең кең таралған патогендеріне қарсы айтарлықтай антагонистік белсенділікті, асқазан сөлі мен өтке төзімділікті, сондай-ақ бөгде микрофлораның болмауын көрсетті. Сонымен қатар, зерттеліп отырған дәрілік заттың Италияда өндірілетін, нарықта қолжетімді Ферталь® (ESI srl) препаратынан қауіпсіз екені дәлелденді. Бұдан бөлек, «АС-Пробионорм» дәрілік пробиотикалық препараты халықаралық фармацевтикалық нарықтағы «Лацидофил-WM» препаратына қарағанда анағұрлым айқын емдік-профилактикалық әсер көрсетті. Пробиотикалық препараттың қауіпсіздігі мен тиімділігі жануарларға жүргізілген *in vivo* эксперименттік үлгілерде дәлелденгендіктен, келесі кезең ретінде оның адам ағзасына емдік-профилактикалық әсерін бағалау мүмкіндігі туындайды. Осылайша, «АС-Пробионорм» препаратына жүргізілген клиникаға дейінгі зерттеулер нәтижесінде алынған оң деректер бұл дәрілік зат бойынша клиникалық сынақтардың бірінші кезеңін бастауға мүмкіндік бар екенін айғақтайды.

Пробиотикалық препараттың қауіпсіздігі мен тиімділігі жануарлардың *in vivo* эксперименттік модельдерінде дәлелденгендіктен, келесі қадам адам ағзасына емдік-профилактикалық әсерді бағалауға мүмкіндік береді.

3.4 Дәрілік пробиотикалық препараттың клиникалық сынақтары (1-ші және 2-ші кезеңдері)

3.4.1 Клиникалық зерттеулердің 1-ші кезеңін өткізу

Қауіпсіздік пен тиімділікті растай отырып, «АС-Пробионорм» препаратын клиникаға дейінгі зерттеу барысында алынған оң нәтижелер осы препараттың клиникалық сынақтарының бірінші кезеңін жүргізу мүмкіндігін көрсетеді.

1-ші кезеңін клиникалық зерттеулерін өткізу барысында скринингке қатысқан 40 еріктінің 20-сы (50%) зерттеуге енгізілді. Қабылданған еріктілердің негізгі мәліметтерімен бірге тізімі 1-кестеде көрсетілген.

Зерттеуге 12 (60%) әйелдер мен 8 ер адам (40%) қатысты. Орташа жас $32,75 \pm 8,12$ жас болды, еріктілердің орташа бойы $169,45 \pm 9,10$ см, орташа салмағы $66,6 \pm 11,72$ кг құрады. Физикалық тексеру кезінде зерттеуге қатысқан барлық еріктілерде ішкі органдар мен жүйелердің патологиялары анықталған жоқ. Физикалық тексерудің жинақталған деректері 19-кестеде көрсетілген.

Кесте 15 – Физикалық тексерудің жинақталған деректері

Физикалық деректер	Норма/Ауытқулар	«АС-Пробионорм»препараты (N=20) n (%)
Денсаулықтың жалпы күйі	қалыпты жағдай	20 (100.0)
	Патология	0 (0.0)
Бас мүшелері (ЛОР-мүшелерінен басқа)	қалыпты жағдай	20 (100.0)
	Патология	0 (0.0)
Құлақ-мұрын мүшелері	қалыпты жағдай	20 (100.0)
	Патология	0 (0.0)
Кеуде мүшелері	қалыпты жағдай	20 (100.0)
	Патология	0 (0.0)
Іш және жамбас мүшелері	қалыпты жағдай	20 (100.0)
	Патология	0 (0.0)
Аяқ-қолдың жағдайы	қалыпты жағдай	20 (100.0)
	Патология	0 (0.0)
Неврологиялық мәртебе	қалыпты жағдай	20 (100.0)
	Патология	0 (0.0)
Лимфа түйіндері	қалыпты жағдай	20 (100.0)
	Патология	0 (0.0)
Дерматологиялық жағдайы	қалыпты жағдай	20 (100.0)
	Патология	0 (0.0)

Еріктілердің медициналық орталыққа келген кезіндегі дәрігерлік тексеру деректері мен өзін-өзі бақылау күнделіктері бойынша зерттеу барысында ешқандай шағымдар тіркелген жоқ, бұл препараттың жақсы көтерімділігін көрсетеді.

«АС-Пробионорм» дәрілік препаратының тиімділігін бағалау үшін оны қабылдау ұзақтығын кемінде 21 күнге және дозасын арттыру қажет. «АС-Пробионорм» пробиотикалық дәрілік препаратының клиникалық зерттеулерінің 1-кезеңі нәтижесінде, препаратты қабылдау кезінде және одан кейін ешқандай жағымсыз сезімдер мен жағымсыз жанама әсерлер болмағаны анықталды, бұл оның жақсы көтерімділігі мен қолдануға қауіпсіз екенін көрсетеді. Сауалнама барысында бір еріктінің препаратты қабылдаудың 2-ші және 3-ші күндері іштің сәл кебуі мен «кұрсылдау» түріндегі қысқа мерзімді реакциялар байқалғаны анықталды. Бұл жағдай ешқандай айтарлықтай жайсыздық тудырмаған және 2–3 күн ішінде өздігінен өткен, бұл препаратты қабылдауға тән қалыпты реакция ретінде бағаланды. Барлық еріктілерде дисбиотикалық бұзылыстар, аллергиялық көріністер, қан формуласы, аминотрансфераздар деңгейі (АЛТ, АСТ), сарысулық альбумин, қандағы қант пен билирубин деңгейі, асқазан-ішек жолы реакциялары, жалпы соматикалық жағдай (дене қызуы, АҚҚ, ЖЖЖ) бойынша клиникалық тұрғыда маңызы бар өзгерістер анықталған жоқ. Осылайша, клиникалық зерттеудің 1-кезеңінде алынған деректер «АС-Пробионорм» пробиотикалық дәрілік препаратының жеңіл көтерілетінін және қауіпсіз екенін дәлелдейді.

3.4.2 Клиникалық зерттеулердің 2-кезеңін жүргізу

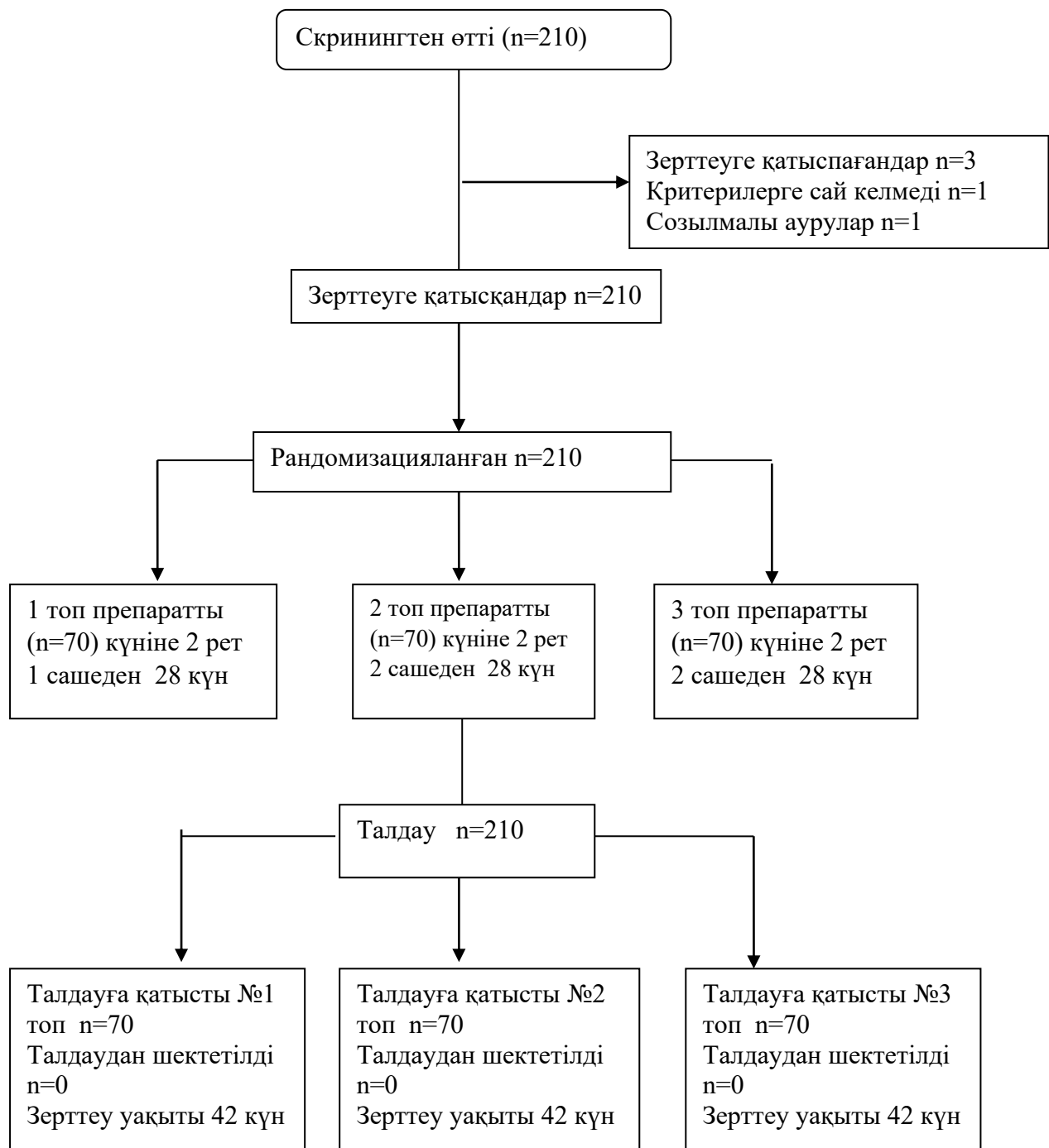
Дәрілік препаратты клиникалық зерттеуді жүргізудің келесі кезеңі-зерттеуді еріктілерге жүргізу.

«АС-Пробионорм» препаратын (1 г ұнтақ, саше түрінде) клиникалық зерттеудің II кезеңіне 18 бен 50 жас аралығындағы екі жыныстағы 210 адам қатыстырылды.

Зерттеу субъектілері 42 ± 1 күн бойы бақылауда болды.

Кесте 16 – Физикалық тексерудің жинақталған деректері

Физикалық деректер	Норма/Ауытқулар	«АС-Пробионорм» Препараты (N=210) n (%)
1	2	3
Денсаулықтың жалпы күйі	қалыпты жағдай	210 (100.0)
	Патология	0 (0.0)
Бас мүшелері (ЛОР-мүшелерінен басқа)	қалыпты жағдай	210 (100.0)
	Патология	0 (0.0)
Құлақ, мұрын-мүшелері	қалыпты жағдай	210 (100.0)
	Патология	0 (0.0)
Кеуде мүшелері	қалыпты жағдай	210 (100.0)
	Патология	0 (0.0)
Іш және жамбас мүшелері	қалыпты жағдай	210 (100.0)
	Патология	0 (0.0)
Аяқ-қолдың жағдайы	қалыпты жағдай	210 (100.0)
	Патология	0 (0.0)
Неврологиялық мәртебе	қалыпты жағдай	210 (100.0)
	Патология	0 (0.0)
Лимфа түйіндері	қалыпты жағдай	210 (100.0)
	Патология	0 (0.0)
Дерматологиялық жағдайы	қалыпты жағдай	210 (100.0)



Сурет - 12 Скрининг нәтижелері және зерттеу субъектілерінің бөлінуі

Зерттеу дизайны 2-кезең зерттеулерінің талаптарымен анықталады, оның мақсаты дисбиозы бар науқастарда зерттеліп жатқан дәрілік құралдың тиімділігі мен қауіпсіздігін бағалау, сондай-ақ дәрілік құралдың клиникалық тиімділігін дәлелдеу және пациенттер тобында дозалаудың терапевтік деңгейін анықтау.

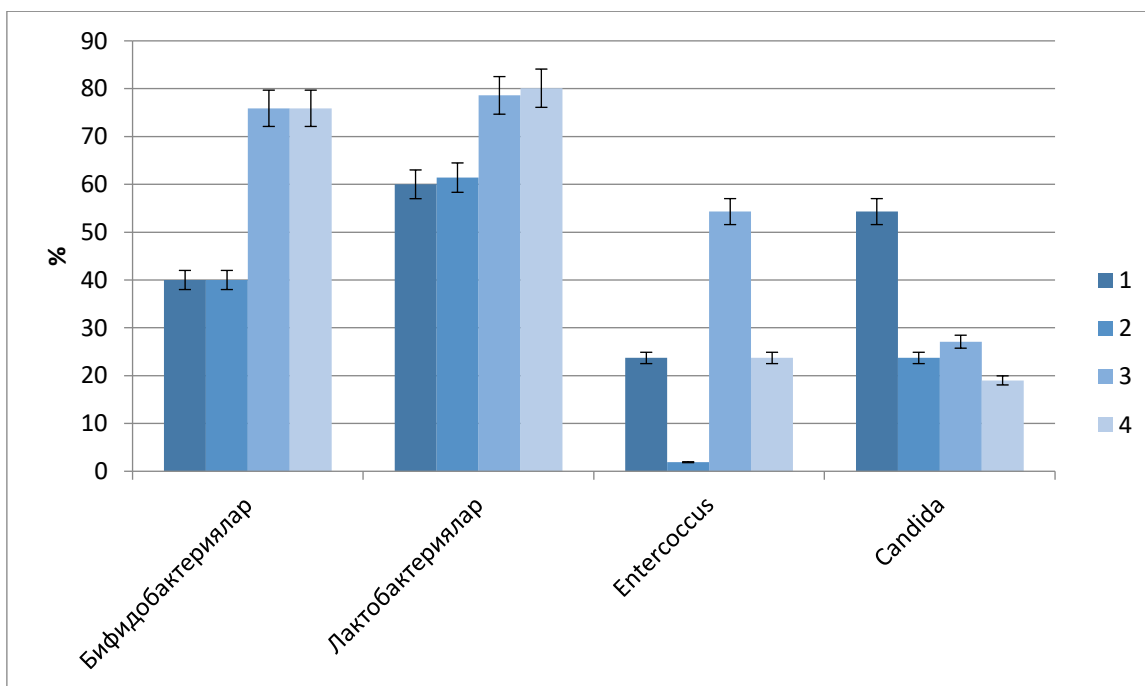
Зерттелетін дәрілік препарат – АС-Пробионорм, 1 г ұнтақ, саше түрінде, ішке қабылдау үшін ерітінді дайындауға арналған. Фармакологиялық тобы –

диареяға қарсы дәрілер. Антидиареялық микроорганизмдер. Сүтқышқылы өндіретін микроорганизмдер.

Емдеудің тиімділігі препараттың тәуліктік дозасымен анықталады, бұл зерттеуде екі түрлі дозалаудың сызбасы қолданылатын болады:

1 топ – 1 саше (1 г) күніне 2 рет 12 сағаттық аралықпен қабылдау;
2 және 3 топтар – 2 саше (2 г) күніне 2 рет 12 сағаттық аралықпен қабылдау.
Зерттеу барысында барлық зерттелушілер 42 күн бойы бақыланды. Нәжіс үлгілері зерттеудің 0, 14, 28 және 42-ші күндері капрологиялық талдаулар жүргізілді. Сондай-ақ стандартты қан химиясы мен гематологиялық сынақтар үшін қан үлгілері жиналды және зәр үлгілері алынды. Скринингке қатысқан зерттелетін субъектілердің саны және зерттеуді жүргізу және аяқтау кезінде зерттелетін субъектілерді бөлу 12-суретте жинақталған.

Зерттеуге, скринингке қатысқан 213 субъектінің 210-ы (98,6%) қатысты. Олардың барлығы ішек микрофлорасының дисбактериозы бойынша копрология нәтижелері бойынша зерттеуге қосу үшін қанағаттанарлық деректерге ие болды, электрокардиограммада патологиялық өзгерістер жоқ, жүктілік сынағы оң (әйелдер үшін) және ИФА деректері бойынша АИТВ, В және С гепатиттеріне серонегативті болды.



Сурет - 13 «АС-Пробионорм» дәрілік пробиотикалық препаратының ішек микрофлорасына әсері: 210 субъект мысалында клиникалық бағалау

Осылайша, препаратты әртүрлі емдеу сызбаларында қолдану бірдей болады, яғни зерттеліп жатқан дәрілік құралдың қолдану нұсқаулығына сәйкес: препаратты таңертең және кешке тамақтан 15-20 минут бұрын қабылдау қажет. Препаратты қабылдау ұзақтығы – 28 күн. Әрбір зерттеу субъектісінің жалпы зерттеуге қатысу ұзақтығы 42 ± 1 күнді құрайды.

Зерттеу бастапқы скринингті және 4 келуді қамтиды. 1-ші мен 13-ші күндер аралығында (Өзін-өзі бақылау күнделігі №1), 15-ші мен 27-ші күндер аралығында (Өзін-өзі бақылау күнделігі №2) және 29-шы мен 41-ші күндер аралығында (Өзін-өзі бақылау күнделігі №3) өзін-өзі бақылау жүргізіліп, өзін-өзі бақылау күнделігі толтырылады.

Микробиологиялық зерттеу қалда дисбиоз белгілерінің бар-жоғын зерттеу 1-ші, 14-ші, 28-ші және 42-ші күндерде жүргізілді. Микробиологиялық зерттеу нәтижелеріне сәйкес, зерттеу басталған күні барлық қатысушыларда бифидобактериялар мен лактобактериялардың саны төмен болғаны байқалды, сондай-ақ стафилококктар (*S. epidermidis*, *S. saprophyticus*), энтерококктар, *Candida* тұқымдастығы саңырауқұлақтары және грамтеріс бактериялардан *Proteus mirabilis* түрі байқалған. Одан кейін алынған деректер бойынша барлық қатысушылар 3 топқа бөлініп, клиникалық зерттеу хаттамасына сәйкес емдеу сызбасы бойынша емдеуге алынды.

Зерттеу нәтижесінде, зерттелген препарат бифидобактериялар мен лактобактериялардың көбеюіне тиімді екені анықталды, әсіресе препаратты күніне 2 рет 2 саше (4 грамм) қабылдау кезінде. Бұл препараттың жиі қолданылуы ішек микробиотасының жақсаруына әкелетінін көрсетуі мүмкін. Препарат сондай-ақ энтерококктар мен *Candida* тұқымдастығы саңырауқұлақтарының өсуін төмендетеді, бұл оның микробиота жағдайын жақсартудағы әлеуетін көрсетеді.

Препараттың әсері зерттеу кезеңі бойы тұрақты болып, препараттың ұзақ уақыт әсер ететінін дәлелдеді (42 күнге дейін). Препарат бірінші және екінші қолданудан кейін барлық белгілер бойынша жақсару көрсетті, бірақ ең жоғары тиімділік екі қолданудан кейін байқалды. Диарея мен іштің кебуі екі қолданудан кейін байқалмады. Іш қату, ауырлық сезімі және кекіру жағдайында да екі қолданудан кейін елеулі жақсару байқалды, бірінші қолданудан кейін тиімділік деңгейі байқалды.

Зерттелетін препараттың тиімділігі сонымен қатар клиникалық белгілердің жазылуы, зерттелетін субъектілердің медициналық орталыққа баруы кезіндегі медициналық тексерулер және өзін-өзі бақылау күнделіктері: диарея, іш қату, іштің кебуі, тамақтанғаннан кейін іште ауырлық сезімі, кекіру, бақылау кезіндегі уақыт бойынша клиникалық деректер негізінде бағаланды. Зерттелетін препаратты қолдану саны бойынша клиникалық параметрлердің қысқаша мазмұны 17-кестеде берілген.

Кесте -17 Зерттелетін препаратты қолдану саны бойынша клиникалық параметрлердің қысқаша мазмұны

№	Симптомдардың атауы	Препаратты енгізгенге дейін симптомдары бар субъектілер саны	Тәулігіне 2 саше препаратты қолданғаннан кейін симптомдары бар субъектілер саны	Зерттелетін препараттың тиімділігі тәулігіне препараттың 2 саше қолданғаннан кейін
		n	n (%)	%
1	Диарея	8	3 (37,5)	62,5

Кесте -17 Зерттелетін препаратты қолдану саны бойынша клиникалық параметрлердің қысқаша мазмұны жалғасы

№	Симптомдардың атауы	Препаратты енгізгенге дейін симптомдары бар субъектілер саны	Тәулігіне 2 саше препаратты қолданғаннан кейін симптомдары бар субъектілер саны	Зерттелетін препараттың тиімділігі тәулігіне препараттың 2 саше қолданғаннан кейін
2	Іш қату	12	5 (41,7)	58,3
3	Ішектің ісінуі	16	4 (25,0)	75,0
4	Тамақтанғаннан кейін асқазанда ауырлық сезімі	27	15 (55,6)	44,4
5	Кекіру	6	3 (50,0)	50,0

Зерттелген препараттың қауіпсіздігі 210 зерттеу субъектісінде медициналық орталыққа келу және 2-ші мен 13-ші, 15-ші мен 27-ші, 29-шы мен 41-ші күндер аралығында жүргізілген өзін-өзі бақылау күнделіктерінің деректері бойынша бағаланды. Зерттеуші дәрігерлер әрбір медициналық орталыққа келу кезінде зерттеу субъектілерінің толық клиникалық тексеруін жүргізді. Алынған деректер бойынша ешқандай шағымдар тіркелген жоқ, бұл зерттелген препараттың қауіпсіздігін көрсетеді. Зерттеу барысында ауыр жағымсыз құбылыстар байқалмады. Клиникалық-зертханалық зерттеулер нәтижесінде жалпы қан анализі, жалпы зәр анализі, қанның биохимиялық зерттеуі нормалар шегінде болды, маңызды өзгерістер байқалған жоқ. Объективті клиникалық тексерулердің нәтижесінде өмірлік маңызды ағзалардың, мысалы, жүрек, бауыр, көкбауыр, бүйрек, өкпе патологиялары анықталмады.

Сонымен, «АС-Пробионорм» дәрілік пробиотикалық препаратының 2-фаза клиникалық зерттеулері нәтижесінде препараттың қауіпсіз екені, жағымсыз жанама әсерлерді тудырмайтыны дәлелденді.

Осылайша, жүргізілген клиникалық зерттеудің (2-кезең) нәтижесінде «АС-Пробионорм» дәрілік пробиотикалық препаратының қауіпсіз екені, жағымсыз жанама әсерлер тудырмайтыны анықталды. Зерттеу субъектілерінің барлығында дисбиотикалық бұзылыстар жоқ, аллергиялық көріністер анықталмаған, қан формуласы, аминотрансфераздардың (АЛТ, АСТ) деңгейі, сарысулық альбумин, қанның қант және билирубин деңгейі, асқазан-ішек жолдары, жалпы соматикалық жағдай (дене қызуы, АҚҚ, ЖЖЖ) бойынша клиникалық тұрғыда маңызды өзгерістер жоқ.

Зерттеу субъектілерінің 42 күн бойы жүргізілген объективті клиникалық тексерулерінің нәтижесінде, қауіпсіздік көрсеткіштерін бағалау бойынша жүрек, бауыр, көкбауыр, бүйрек, өкпе сияқты өмірлік маңызды органдардың патологиялары анықталмады. Зерттеуші дәрігерлер әрбір медициналық орталыққа келу кезінде зерттеу субъектілерінің толық клиникалық тексеруін жүргізіп, сондай-ақ зерттелген препараттың өмірлік маңызды органдардың параметрлеріне әсерін анықтау үшін зерттеу субъектілерінің зертханалық

анализдерінің интерпретациясын жасады. Алынған деректер бойынша зерттеу субъектілерінен өмірлік маңызды функциялар параметрлері бойынша ешқандай шағымдар түспегені, бұл зерттелген препараттың қауіпсіздігін көрсетеді. Осылайша, «АС-Пробионорм» дәрілік препаратының тиімділігін клиникалық зерттеу нәтижесінде препарат дисбиоздармен емдеуде жеткілікті әлеуетке ие екені анықталды. Препарат бифидобактериялар мен лактобактериялардың өсуін арттыруда тиімді, әсіресе 2 саше (4 грамм) күніне 2 рет қабылдау кезінде. Бұл препараттың жиі қолданылуы ішек микробиотасының жақсаруына әкелетінін көрсетуі мүмкін. Препарат сондай-ақ энтерококктар мен *Candida* тұқымдасына жататын саңырауқұлақтарының өсуін төмендетеді, бұл оның микробиота жағдайын жақсартудағы әлеуетін көрсетеді. Препараттың әсері зерттеу кезеңі бойы тұрақты болып, препараттың ұзақ уақыт әсер ететінін дәлелдеді (42 күнге дейін). Зерттелген дәрілік препарат бірінші және екінші қолданудан кейін барлық белгілер бойынша жақсару көрсетті, бірақ ең жоғары тиімділік екі қолданудан кейін байқалды. Диарея мен іштің кебуі екі қолданудан кейін толықтай жойылды. Іш қату, ауырлық сезімі және кекіру сияқты белгілерде де екі қолданудан кейін елеулі жақсару байқалды, ал бірінші қолданудан кейін тиімділік деңгейі байқалды.

Осылайша, "АС-Пробионорм" дәрілік препаратының тиімділігін клиникалық зерттеу нәтижесінде препараттың дисбиоздарды емдеуде жеткілікті әлеуеті бар екендігі анықталды. Препарат бифидобактериялар мен лактобактериялардың өсуін арттыруда тиімді, әсіресе күніне 2 рет 2 пакет (4 грамм) қабылдағанда. Бұл препаратты жиі қолдану ішек микробиотасының жақсаруына әкелетінін көрсетуі мүмкін. Препарат сонымен қатар *candida* тектес энтерококктар мен саңырауқұлақтардың өсуін төмендетеді, бұл оның микробиотаны жақсартудағы әлеуетін көрсетеді. Препараттың әсері бүкіл зерттеу кезеңінде тұрақты (42 күнге дейін), бұл препараттың ұзақ әсер етуін көрсетеді. Зерттелетін препарат бірінші және екінші қолданғаннан кейін барлық белгілердің жақсарғанын көрсетті, бірақ ең жоғары тиімділікке екі қолданғаннан кейін қол жеткізілді. Препаратты екі рет қолданғаннан кейін диарея мен ішектің ісіну белгілері толығымен жойылды. Іш қату, ауырлық сезімі және кекіру сияқты белгілерде екі қолданғаннан кейін айтарлықтай жақсару байқалады, бірінші қолданғаннан кейін тиімділік деңгейі байқалады.

ҚОРЫТЫНДЫ

1 Пробиотикалық сүтқышқылды бактериялардың таксономиялық тиістілігі расталды. Дәрілік заттың биологиялық белсенділігі өндірістік-бағалы көрсеткіштер бойынша расталды (ішек ауруларының қоздырғыштарының өсуін тежеу аймақтары 24 мм-ге жетті және тіршілік ету жасушалар саны $2,0 \times 10^9$ КТБ/г кем емес). Моно түрінде алынған *L. fermentum* 30 және *L. Cellobiosus* 36 бактерия штамдары жоғары антагонистік белсенділікке ие болды. *L. fermentum* 30 және *L. cellobiosus* 36 микроорганизмдерінің ассоциациясы- белсенді фармацевтикалық субстанция құрамына кіретін-моно штамдарына қарағанда жоғары антагонистік белсенділік көрсетті.

2 .7% сахароза, 1,5% желатин, 7% ҚМС лиофильді кептіру ортасының компоненттері бар *Lactobacillus fermentum* 30 және *Lactobacillus cellobiosus* 36 пробиотикалық бактерияларының микробтық массасынан тұратын белсенді фармацевтикалық субстанцияны (БФС) өндіру технологиясы және магний стеараты қосылған БФС негізіндегі дәрілік заттың дайын түрін өндіру технологиясы кіретін «АС-Пробионорм» пробиотикалық дәрілік препаратын өндіру технологиясы әзірленді.

БФС өндіру технологиясын әзірлеу барысында оңтайлы қоректік орта (MRS ортасы) және мұздату-кептіру №1 режимі тандалды. БФС өндірісінің сызба-нұсқасы және препараттың дайын формасы әзірленді. «АС-Пробионорм» бес тәжірибелік пробиотикалық дәрілік препарат өндірушінің өндіріс орнында шығарылды. *Escherichia coli* ATCC 8739, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P, *Salmonella enterica* ATCC 14028 туысына жататын патогендік микроорганизмдерге қарсы антагонистік белсенділігі бар дәрілік партиялардың сапасына баға берілді. Препараттардың құрамында колиформды бактериялар, стафилококктар, ашытқылар немесе фагтар болған жоқ.

3. Пробиотикалық препараттың биологиялық белсенділігі, қауіпсіздігі және тиімділігі Ферталь® және Лацидофил-WM коммерциялық препараттарымен салыстырғанда клиникаға дейінгі кезеңдері кезінде *in vivo* тәжірибелік жануарлар үлгілерінде дәлелденді. Препарат белсенді, уытты емес, қышқыл ортада (рН 3) және өтте тұрақты.

4. Препараттың клиникалық кезеңдері жүргізілді (1 және 2 кезеңдері). Клиникалық кезеңнің бірінші кезеңінде алынған деректер 20 сау еріктіде «АС-Пробионорм» дәрілік пробиотикалық препаратының жеңіл төзімділігі мен қауіпсіздігін көрсетті. Дисбактериозбен ауыратын 210 науқасты қамтитын 2 кезеңі зерттеуінде оның тиімділігі дәлелденді. Энтерококктардың (25%) және *Candida* саңырауқұлақтарының (27%) өсуінің айтарлықтай төмендеуі, лактобактериялардың (80%-ға дейін) және бифидобактериялардың (76%-ға дейін) өсуінің жоғарылауы атап өтілді, бұл оның микробиотаның күйін жақсарту әлеуетін көрсетеді. Препараттың әсері бүкіл зерттеу кезеңінде тұрақты (42 күнге дейін).

ПАЙДАЛАНЫЛҒАН ӘДЕБИЕТТЕР ТІЗІМІ:

- 1 Профилактика острых кишечных инфекций – 9. 06. 2021. – [Электронный ресурс] // URL: <https://bmcudp.kz/ru/patients/prevention/hls-center-news/profilaktika-ostrykh-kishechnykh-infektsiy.html>
- 2 Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. // *Nat Rev Microbiol*. 2004 Feb;2(2):123-40.
- 3 Croxen MA, Finlay BB. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. // *Nat Rev Microbiol*. 2010 Jan;8(1):26-38.
- 4 Lan R, Reeves PR. Gene transfer is a major factor in the evolution of bacterial pathogens. // *Mol Biol Evol*. 2000 Sep;17(8):1089-93.
- 5 Servin AL. Pathogenesis of *Escherichia coli* strains associated with diarrhoea. // *Nature*. 2005 Aug 25;436(7053):1042-8.
- 6 Belotserkovsky, P.J. Sansonetti. / *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* / *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 416 (2018), pp. 1-26, 10.1007/82_2018_104
- 7 Макалкина Л.Г. Устойчивость к антибиотикам - серьезная угроза здоровью Лекарственный информационный аналитический центр https://online.zakon.kz/Document/?doc_id=31635643&pos=1;-16#pos=1;-16
- 8 А.А. Новокшенов, Н.В. Соколова Физиологические функции лактобактерий в организме и эффективность их применения в составе пробиотиков в педиатрической практике Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва https://umedp.ru/articles/fiziologicheskie_funktsii_laktobakteriy_v_organizme_i_effektivnost_ikh_primeneniya_v_sostave_probiot_.html
- 9 *Citrobacter* (цитробактер) [Электронный ресурс] // URL: <https://www.gastroscan.ru/handbook/118/3342>.
- 10 *Proteus* (протей, род бактерий) [Электронный ресурс] // URL: <https://www.gastroscan.ru/handbook/118/3333>
- 11 Калина Г. П. *Edwardsiella tarda*, // Журн. микр., эпид. и иммун., № 5, с. 25, 1980
- 12 Кандидоз кишечника [Электронный ресурс] // URL: <https://gemotest.ru/info/spravochnik/zabolevaniya/kandidoz-kishechnika/> (дата обращения: 28.08.2022).
- 13 B.H. Minshew, J. Jorgensen, M. Swanstrum, Some characteristics of *Escherichia coli* strains isolated from extraintestinal infections of humans // *J Infect Dis*, 137 (1978), pp. 648-654
- 14 B. Rothfield, D. Osborne. Malabsorption syndrome produced by neomycin // *Am J Dig Dis*, 8 (1963), p. 763
- 15 M.H. Cohen, P.J. Creaven, B.E. Fossieck, et al., Effect of oral prophylactic broad spectrum nonabsorbable antibiotics on the gastrointestinal absorption of nutrients and methotrexate in small cell bronchogenic carcinoma patients // *Cancer*, 38 (1976), pp. 1556-1559

16 Salminen S, Bouley C, Boutron-Ruault MC, et al. Gastrointestinal physiology and function—targets for functional food development. *Br J Nutr* 1998;80(suppl):147–71.

17 Можина Т.Л. Роль и место пробиотических препаратов в современной медицине (по материалам руководства *Probiotics and prebiotics*, 2008) / Т.Л. Можина // Суч. гастроентерол. — 2009. — № 1. — С. 5-13.

18 Fenster K. және басқалар. Пробиотиктерді өндіру және жеткізу: практикалық тәсілге шолу // *Microorganisms*. – 2019. – Т. 7. – № 3. – 83-б.

19 Gavrilova N.N. және басқалар. Ішек инфекцияларына қарсы емдік пробиотиктің терапиялық-профилактикалық тиімділігін арттыру мақсатында пробиотикалық бактериялардың белсенді қауымдастығы мен қоректік ортаның оңтайлы құрамын іріктеу // *Research Journal of Pharmacy and Technology*. – 2023. – Т. 16. – № 5. – Б. 2427–2435;

20 Gavrilova N. N. және т.б. Пробиотикалық дәрілік препараттардың дайын түрлерін өндіру технологиясын әзірлеу // *Research Journal of Pharmacy and Technology*. – 2023. – Т. 16. – № 9. – Б. 4093–4104

21 Guerrant RL, Van Gilder T, Steiner TS, et al. Practice guidelines for the management of infectious diarrhea. // *Clin Infect Dis*. 2001 Feb 1;32(3):331-51.

22 Thielman NM, Guerrant RL. Acute infectious diarrhea. // *N Engl J Med*. 2004 Jul 22;351(4):356-64.

23 Fischer Walker CL, Guerrant RL. Estimating the burden of diarrheal illness and deaths in low- and middle-income countries. // *Bull World Health Organ*. 2003;81(3):197-204.

24 Ashbolt NJ, Unicomb L, Kirk MD. Enteric viruses and bacteria in human-impacted environments: detection, occurrence, and survival in sewage, irrigation water, and crops. // *Front Microbiol*. 2014 Feb 27;5:71.

25 Hodges K., Gill R. Infectious diarrhea: Cellular and molecular mechanisms // *Gut Microbes*. 2010; 1 (1): 4–21.

26 Organization WH. Prevention and control of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis: report of a WHO expert committee: World Health Organization; 2002. [Электронный ресурс] // URL: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-TRS-912>

27 Abdel-Aziz MA, Afifi AA, Malik EM, Adam I. Intestinal protozoa and intestinal helminthic infections among schoolchildren in Central Sudan. // *Asian Pac J Trop Med*. 2010;3(4):292–3.

28 Speich B, Marti H, Ame SM, Ali SM, Bogoch II, Utzinger J, et al. Prevalence of intestinal protozoa infection among school-aged children on Pemba Island, Tanzania, and effect of single-dose albendazole, nitazoxanide and albendazole-nitazoxanide. // *Paras Vect*. 2013;6:3. doi: 10.1186/1756-3305-6-3

29 Erismann S, Diagbouga S, Odermatt P, Knoblauch AM, Gerold J, Shrestha A, et al. Prevalence of intestinal parasitic infections and associated risk factors among schoolchildren in the Plateau Central and Centre-Ouest regions of Burkina Faso. *Paras Vect*. 2016;9(1):554. doi: 10.1186/s13071-016-1835-4

30 Niyizurugero E, Ndayanze JB, Bernard K. Prevalence of intestinal parasitic infections and associated risk factors among Kigali Institute of Education students in Kigali, Rwanda.// Trop Biomed. 2013;30(4):718–26.

31 Jemaneh L. The epidemiology of schistosomiasis mansoni and soil-transmitted helminths in elementary school children from the South Gondar Zone of the Amhara National Regional State, Ethiopia.// Ethiop Med J. 2000;38(2):105–18.

32 Tefera E, Mohammed J, Mitiku H. Intestinal helminthic infections among elementary students of Babile town, eastern Ethiopia. // Pan Afri Med J. 2015;20:50. doi: 10.11604/pamj.2015.20.50.5251

33 Jemaneh L. Comparative prevalences of some common intestinal helminth infections in different altitudinal regions in Ethiopia. // EthiopMedJ. 1998;36(1):1–8.

34 Вероника Догузова, Заболеваемость острыми кишечными инфекциями в России увеличилась в 2021 году в 2,5 раза [Электронный ресурс] // URL: <https://medvestnik.ru/content/news/Zabolevaemost-ostryimi-kishechnymi-infekciyami-v-Rossii-uvelichilas-v-2021-godu-v-2-5-raza.html> (дата обращения: 25.07.2022).

35 Заболеваемость кишечными инфекциями выросла в Казахстане [Электронный ресурс] // URL: <https://kaztag.kz/ru/news/zabolevaemost-kishechnymi-infektsiyami-vyroslo-v-kazakhstane> (дата обращения: 11.06.2024).

36 Куттыкужанова Г. Г., Оспанова З.М., Султанова Т.А. Курмангалиева А.А. Современные принципы ведения детей с синдромом диареи. // Методические рекомендации. Казахский Национальный медицинский университет имени С.Д.Асфендиярова. - Алматы. - 2007. - 24 с.

37 Бегайдарова Р.Х., Кошерова Б.Н., Абилкасымов З.Е., с соавт. Современные подходы к терапии острых кишечных инфекций у детей с синдромом инвазивной диареи. // Актуальные вопросы детских инфекционных болезней. Сб. науч. трудов. - Алматы. - 2007. - С.29-40.

38 J.P. Nataro, J.B. Kaper. Diarrheagenic Escherichia coli // Clin. Microbiol. Rev., 11 (1998), pp. 142-201, 10.1128/cmr.11.1.142

39 Croxen MA, Finlay BB. Molecular mechanisms of Escherichia coli pathogenicity.// Nat Rev Microbiol. 2010 Jan;8(1):26-38.

40 Blount ZD. The unexhausted potential of E. coli. // Elife. 2015 Oct 29;4:e05826. doi: 10.7554/eLife.05826.

41 David LA, Maurice CF, Carmody RN, et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. // Nature. 2014 Jan 23;505(7484):559-63.

42 L.A. Barel, L.A. Mulard. Classical and novel strategies to develop a Shigella glycoconjugate vaccine: From concept to efficacy in human // Hum. Vaccin. Immunother., 15 (2019), pp. 1338-1356, 10.1080/21645515.2019.1606972

43 Сальмонелла (небрюшнотифозная) [Электронный ресурс] // URL: [https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal)) (дата обращения: 20.02.2018).

44 Большое количество энтеробактерий в кишечнике связали с повышенным риском смерти [Электронный ресурс] //

URL:<https://nplus1.ru/news/2021/05/17/microbiome-health> (дата обращения: 17.05.2021).

45 Lai CH, Chen YH, Chang HL, et al. Clinical and microbiological characteristics of *Citrobacter* bacteremia: analysis of a 3-year experience. // J Microbiol Immunol Infect. 2012 Jun;45(3):190-6.

46 Samonis G, Vouloumanou E. K, Christofidou M, et al. *Citrobacter* infections in humans: a review. // Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2009 Jul;28(7):777-85.

47 Drzewiecka D. Significance of *Proteus* spp. in infections. // Clin Microbiol Infect. 2016 Sep;22(9):770-80.

48 Armbruster CE, Mobley HL. Staying alive: *Proteus mirabilis* survival and adaptation in the urinary tract environment. // Nat Rev Microbiol. 2012 Oct;10(10):745-57.

49 Almazán R, Gavián C, Clavel A, et al. *Edwardsiella tarda* infection in humans: a systematic review. // J Travel Med. 2017 Sep 1;24(5).

50 Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, et al. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. // Clin Infect Dis. 2016 Feb 15;62(4):e1-e50.

51 Милютин Л.Н., Горелов А.В., Воротынцева Н.В. Диагностика и лечение острых кишечных инфекций у детей. М., 1998; 86.

52 Горелов А.В., Милютин Л.Н., Воротынцева Н.В., Каншина О.А. Комплексная терапия острых кишечных инфекций в условиях поликлиники: Методические рекомендации. М., 1999; 34.

53 Горелов А.В., Малеев В.В., Милютин Л.Н. Эмпирическая антибактериальная терапия острых кишечных инфекций у детей. Антибиотики и химиотерапия 2001; 3(2): 19-24.

54 Горелов А.В., Милютин Л.Н., Воротынцева Н.В. Изучение острых кишечных инфекций у детей. Эпидемиология и инфекционные болезни 1999; (2): 41-5.

55 M. O’Ryan, R. Vidal, F. delCanto, J. CarlosSalazar, D. Montero./ Vaccines for viral and bacterial pathogens causing acute gastroenteritis: Part II: Vaccines for Shigella, Salmonella, enterotoxigenic E. coli (ETEC) enterohemorrhagic E. coli (EHEC) and campylobacter jejuni / Hum. Vaccin. Immunother., 11 (2015), pp. 601-619, 10.1080/21645515.2015.1011578

56 F. Gilavand, A. Marzban, G. Ebrahimipour, N. Soleimani, M. Goudarzi. Designation of chitosan nano-vaccine based on MxiH antigen of Shigella flexneri with increased immunization capacity // Carbohydr. Polym., 232 (2020), Article 115813, 10.1016/j.carbpol.2019.115813

57 M.R. Akbari, M. Saadati, H. Honari, H.M. Ghorbani. IpaD-loaded N-trimethyl chitosan nanoparticles can efficiently protect guinea pigs against Shigella flexneri // Iran. J. Immunol., 16 (2019), pp. 212-224, 10.22034/iji.2019.80272

58 А.К. Катарбаев, Ш.К. Батырханов, Г.Т. Берденова. Результаты клинического применения растительного препарата Имупрета в комплексной

терапии при острых кишечных инфекциях у детей // Вестник Казахского Национального медицинского университета, 2013.

59 Горелов А.В., Милютин Л.Н., Воротынцева Н.В. Изучение острых кишечных инфекций у детей. // Эпидемиология и инфекционные болезни 1999; (2): 41-5.

60 Воротынцева Н.В., Мазанкова Л.Н. Острые кишечные инфекции у детей. М. // Медицина, 2001; 476.

61 И.Учайкин В.Ф., Гаспарян М.О., Новокшенов А.А. Пробиотики в комплексном лечении кишечных инфекций у детей. // Биопрепараты 2001; (1): 4-6.

62 Новокшенов А.А., Соколова Н.В. Новое в лечении кишечных инфекций у детей. // Лечащий врач 2002; (6): 9.

63 Bush K, Courvalin P, Dantas G, et al. Tackling antibiotic resistance. // Nat Rev Microbiol. 2011 Dec 22;9(12):894-896.

64 Clardy J, Fischbach MA, Currie CR. The natural history of antibiotics. // Curr Biol. 2009 Jul 14;19(15):R437-41.

65 S.N. Afrasiabi, N.S. Waleh, Production of colicin E5 by epidemic strains of *Salmonella typhimurium* var // Copenhagen. Microbios, 45 (1986), pp. 209-212

66 Sender R, Fuchs S, Milo R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. PLoS Biol. 2016 Aug 19;14(8):e1002533.

67 Qin J, Li R, Raes J, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. Nature. 2010 Mar 25;464(7285):59-65.

68 Falony G, Vlachou A, Lavelle A, et al. Cross-talk between gut microbes and individuals depending on age, diet and life style. // Front Microbiol. 2018 Nov 2;9:2372.

69 M.U. Koruda, R.H. Rolandelli, R.G. Settle, The effect of a pectin supplemental elemental diet on intestinal adaptation to massive small bowel resection. // J Parenter Enter Nutr, 10 (1986), pp. 343-350

70 Guandalini S, Dhawan A, Branski D. Textbook of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. Springer; 2016.

71 Wax RS, Popiolek BL, Payne DJ. Are we running out of effective antibacterial agents? // Chem Biol. 2010 Mar 26;17(3):237-48.

72 Bush K, Bradford PA. β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: Recent Developments and Future Strategies. // Cold Spring Harb Perspect Med. 2016 Jul 1;6(7):a025247.

73 Крамарев С.А. Защитные функции микрофлоры кишечника / С.А. Крамарев, О. В. Выговская, Д. С. Янковский, Г.С. Дымент // Здоровье ребенка. — 2008. — № 2. — С. 11.

74 Смирнов В.В. Антибиотики и/или пробиотики: размышления и факты / В.В. Смирнов // Лікування та діагно-стика. — 2001. — № 3. — С. 8-16.

75 Guarner F, Sanders ME, Eliakim R, et al. World Gastroenterology Organisation Global Guidelines: Probiotics and prebiotics. // J Clin Gastroenterol. 2015 Nov;49(8):687-96.

76 Sanders ME, Merenstein DJ, Reid G, et al. Probiotics and prebiotics for human health: a review of the evidence. // Gut. 2016 Aug;65(8):1397-403.

77 Шендеров Б.А. Современное состояние и перспективы развития концепции «Пробиотики, пребиотики и синбиотики Варшова 1.Б., Мочалова А.А., Осипова Т.Ф., Рещков В.А., Козина С.Ю.ДУ «Луганський державний медичний університет»

78 Boyle RJ, Bath-Hextall FJ, Leonardi-Bee J, et al. Probiotic use in early life for the prevention of atopic dermatitis: a systematic review. // Am J Clin Nutr. 2018 Jan 1;107(1):124-136

79 Копча В.С. Пробиотики: роздуми з позицій їх якості, ефективності, антибіотикорезистентності й безпеки /В.С. Копча//Вкн. наук. дощдженъ. — 2011. — № 1 (62). —С. 4-8.

80 Grönlund MM, Arvilommi H, Kero P, et al. Importance of intestinal colonisation in the maturation of humoral immunity in early infancy: a prospective follow up study of healthy infants aged 0–6 months. ArchDisChildFetalNeonatalEd 2000;83:F186–92.

81 Современные представления о механизма хлечебно-профилактическогодействия пробиотиков из бактерий рода *Bacillus*/ Смирнов В.В., РезникС.Р., Вьюницкая В.А. [идр.]// Микробиол. журн. — 2003. — Т. 55, № 4. — С. 92-112.

82 FensterK. etal. The production and delivery of probiotics: A review of a practical approach //Microorganisms. – 2019. – Т. 7. – №. 3. – P. 83

83 GavriloVA N. N. et al. Selection of an active association of Probiotic bacteria and the Optimal composition of the Nutrient medium for Cultivation to increase the Therapeutic and Prophylactic effectiveness of a Medicinal probiotic preparation against Intestinal infections //Research Journal of Pharmacy and Technology. – 2023. – Т. 16. – №. 5. – P. 2427-2435; GavriloVA N. N. et al. Development of Technology for the production of finished forms of Medicinal probiotics //Research Journal of Pharmacy and Technology. – 2023. – Т. 16. – №. 9. – P. 4093-4104

84GrumetL., TrompY., StiegelbauerV. Thedevelopmentofhigh-qualitymultispeciesprobioticformulations: frombenchtomarket //Nutrients. – 2020. – Т. 12. – №. 8. – P. 2453

85 Mekaiel A., ElteGANI s. E. A. Evolution of the use and Manufacturing of lactic acid bacteria probiotic and its effect on human health. – 2022

86KumarV. etal. Probiotics media: Significance, challenges, and future perspective-a mini review //Food Production, Processing and Nutrition. – 2022. – Т. 4. – №. 1. – P. 1-13

87WangT. etal. Fermentation optimization and kinetic model for high cell density Culture of a probiotic microorganism: Lactobacillus rhamnosus LS-8 //Bioprocess and biosystems engineering. – 2020. – Т. 43. – С. 515-528;

88 Bolivar-Jacobo N. A. et al. Culture Age, Growth Medium, Ultrasound Amplitude, and Time of Exposure Influence the Kinetic Growth of Lactobacillus acidophilus //Fermentation. – 2023. – Т. 9. – №. 1. – С. 63;

89 Rawoof S. A. A. et al. Production of optically pure lactic acid by microbial fermentation: A review //Environmental Chemistry Letters. – 2021. – T. 19. – C. 539-556

90 Marco ML, Heeney D, Binda S, et al. Health benefits of fermented foods: microbes and metabolites. Curr Opin Biotechnol. 2017 Apr;44:94-102.

91 de Oliveira P. M. et al. Production of L (+) Lactic Acid by Lactobacillus casei Ke11: Fed batch fermentation strategies //Fermentation. – 2021. – T. 7. – №. 3. – C. 151

92 Evdokimova S.A. et al. A study and modeling of bifidobacterium and Bacillus coculture continuous fermentation under distal intestine simulated conditions //Microorganisms. – 2022. – T. 10. – №. 5. – C. 929

93 A.K. Sadanov, N.N. Gavrilova, I.A. Ratnikova, S.E. Orazymbet, L.E. Protasiuk., A.D. Massirbayeva. Technology for the production of Lyophilizate of an association of Lactic acid bacteria included in the Medicinal product AS-Probionorm // Research Journal of Pharmacy and Technology //Volume - 16, Issue - 11, Year - 2023. doi: 10.52711/0974-360X.2023.00864 (Scopus Процентиль – 56; Web of science – Q2)

94 Hathi Z. et al. Methodological advances and challenges in probiotic bacteria production: Ongoing strategies and future perspectives //Biochemical Engineering Journal. – 2021. – T. 176. – P. 108199

95 Mao Y, Nobaek S, Kasravi B, et al. Effects of Lactobacillus strains and oat bran on methotrexate-induced enterocolitis in rats // Gastroenterology 1996;111:334–44.

96 Lee YK, Lim CY, Teng WL, et al. Qualitative approach in the study of adhesion of lactic acid bacteria on intestinal cells and their competition with enterobacteria. // Appl Environ Microbiol 2000;66:3692–7.

97 Anal AK. Direct-to-vat starter cultures: Current status and future perspectives. // Food Science and Technology. 2016;36(3):405-416.

98 Santivarangkna, C.; Kulozik, U.; Foerst, P. Inactivation mechanisms of lactic acid starter cultures preserved by drying processes. // J. Appl. Microbiol. 2008, 105, 1–13.

99 Fonseca, F.; Cenard, S.; Passot, S. Freeze-Drying of Lactic Acid Bacteria. In Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols; Wolkers, W.F., Oldenhof, H., Eds.; Springer: New York, NY, USA, 2014; pp. 477–488.

100 Применение вредных биологических препаратов при лечении больных кишечными инфекциями, диагностике и лечении дисбактериоза кишечника (Методические рекомендации). -М.: МЗ СССР, 1986, -23 с.

101 Инструкция по приготовлению кисломолочного бифидумбактерина на молочных кухнях.- М.: МЗРСФСР, 1987, -11 с.

102 Šipailienė A, Petraitytė S. Encapsulation of probiotics: proper selection of the probiotic strain and the influence of encapsulation technology and materials on the viability of encapsulated microorganisms. Probiotics Antimicrob Proteins. 2018;10 (1):1–10. doi:10.1007/s12602-017-9347-x

- 103 Chávarri M, Marañón I, Villarán MC. Encapsulation technology to protect probiotic bacteria. In: Rigobeleo EC, editor. Probiotics. London: IntechOpen; 2012.
- 104 Gharsallaoui A, Roudaut G, Chambin O, Voilley A, Saurel R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. // Food Research International. 2007;40(9):1107-1121.
- 105 Fazilah NF, Hamidon NH, Ariff AB, Khayat ME, Wasoh H, Halim M. Microencapsulation of *Lactococcus lactis* Gh1 with gum arabic and synsepalum dulcificum via spray drying for potential inclusion in functional yogurt. // Molecules. 2019;24 (7):1422. doi:10.3390/molecules24071422
- 106 Zheng X, Fu N, Duan M, Woo MW, Selomulya C, Chen XD. The mechanisms of the protective effects of reconstituted skim milk during convective droplet drying of lactic acid bacteria. // Food Res Int. 2015;76(Pt 3):478–488. doi:10.1016/j.foodres.2015.07.045
- 107 Khem S, Woo MW, Small DM, Chen XD, May BK. Agent selection and protective effects during single droplet drying of bacteria. Food Chem. 2015;166:206–214. doi:10.1016/j. foodchem.2014.06.010
108. e Silva JPS, Sousa SC, Costa P, et al. Development of probiotic tablets using microparticles: viability studies and stability studies. // AAPS PharmSciTech. 2013;14(1):121–127. doi:10.1208/s12249- 012-9898-9
- 109 Perdana J, Bereschenko L, Fox MB, et al. Dehydration and thermal inactivation of *Lactobacillus plantarum* WCFS1: comparing single droplet drying to spray and freeze drying. // Food Res Int. 2013;54(2):1351–1359. doi:10.1016/j.foodres.2013.09.043
- 110 Ré I. Microencapsulation by spray drying. Dry Technol. 1998;16 (6):1195–1236. doi:10.1080/07373939808917460
- 111 Farahmandi K, Rajab S, Tabandeh F, Shahraky MK, Maghsoudi A, Ashengroph M. Efficient spray-drying of *Lactobacillus rhamnosus* PTCC 1637 using total CFU yield as the decision factor. Food Biosci. 2021;40:100816. doi:10.1016/j.fbio.2020.100816
- 112 Strasser S, Neureiter M, Geppl M, Braun R, Danner H. Influence of lyophilization, fluidized bed drying, addition of protectants, and storage on the viability of lactic acid bacteria. // J Appl Microbiol. 2009;107 (1):167–177. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04192.x
- 113 Fellows PJ. Food Processing Technology: Principles and Practice. 4th ed. Woodhead Publishing; 2016.
- 114 Carvalho AS, Silva J, Ho P, Teixeira P, Malcata FX. Survival of freeze-dried probiotic bacteria: Protecting agents and encapsulation. // Innovative Food Science & Emerging Technologies. 2004;5(4):405-409.
- 115 Fowler A, Toner M. Cryo-injury and biopreservation. Ann N Y Acad Sci. 2005;1066:119–135. doi:10.1196/annals.1363.010
- 116 Goderska K. Different methods of probiotics stabilization. In: Rigobelo EC, editor. Probiotics. London: IntechOpen; 2012.
- 117 Broeckx G, Vandenheuvel D, Claes IJJ, Lebeer S, Kiekens F. Drying techniques of probiotic bacteria as an important step towards the development of

novel pharmabiotics. *Int J Pharm.* 2016;505(1):303–318. doi:10.1016/j.ijpharm.2016.04.002

118 Anal AK, Singh H. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. // *Trends Food Sci Technol.* 2007 Sep;18(5):240-251.

119 Peles F, et al. Effect of drying method on viability and stability of probiotic bacteria. *APTEFF.* 2018;49(1):69-78.

120 Martín MJ, Lara-Villoslada F, Ruiz MA, Morales ME. Microencapsulation of bacteria: a review of different technologies and their impact on the probiotic effects. // *Innov Food Sci Emerg Technol.* 2015;27:15–25. doi:10.1016/j.ifset.2014.09.010

121 Santivarangkna C, Kulozik U, Foerst P. Alternative drying processes for the industrial preservation of lactic acid starter cultures. // *Biotechnol Prog.* 2007;23(2):302–315. doi:10.1021/bp060268f

122 Zaghari L, Basiri A, Rahimi S. Preparation and characterization of double-coated probiotic bacteria via a fluid-bed process: a case study on *Lactobacillus reuteri*. *Int J Food Eng.* 2020;16(9). doi:10.1515/ijfe-2019-0384

123 Wu W-H, Roe WS, Gimino VG, Seriburi V, Martin DE, Knapp SE. Low melt encapsulation with high laurate canola oil. United States Patent US 6153256; 2000.

124 Burgain J, Gaiani C, Linder M, Scher J. Encapsulation of probiotic living cells: from laboratory scale to industrial applications. *J Food Eng.* 2011;104(4):467–483. doi:10.1016/j.jfoodeng.2010.12.031

125 Rokka S, Rantamäki P. Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: challenges for industrial applications. *Eur Food Res Technol.* 2010;231(1):1–12. doi:10.1007/s00217-010-1246-2

126 Lee Y, Ji YR, Lee S, Choi MJ, Cho Y. Microencapsulation of probiotic *Lactobacillus acidophilus* KBL409 by extrusion technology to enhance survival under simulated intestinal and freeze-drying conditions. *J Microbiol Biotechnol.* 2019;29 (5):721–730. doi:10.4014/jmb.1903.03018

127 Shah NP, Ravula RR. Microencapsulation of probiotic bacteria and their survival in frozen fermented desserts. // *Aust J Dairy Technol.* 2000;55:139–144.

128 Krasaekoopt W, Bhandari B, Deeth H. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *Int Dairy J.* 2003;13 (1):3–13. doi:10.1016/S0958-6946(02)00155-3

129 Tadros TF. Emulsions Formation, Stability, and Rheology. // Wiley-VCH; 2013

130 McClements DJ. Food Emulsions: Principles, Practices, and Techniques. 3rd ed. // CRC Press; 2015.

131 Hou RC, Lin MY, Wang MM, Tzen JT. Increase of viability of entrapped cells of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* in artificial sesame oil emulsions. *J Dairy Sci.* 2003;86 (2):424–428. doi:10.3168/jds.S0022-0302(03)73620-0

132 Qi W, Liang X, Yun T, Guo W. Growth and survival of microencapsulated probiotics prepared by emulsion and internal gelation. // *J Food Sci Technol*. 2019;56(3):1398–1404.

133 Dickinson E. Milk gels and cheese. *Curr Opin Colloid Interface Sci*. 2006 Oct;11(4):244-252.

134 Poncelet D, Lencki R, Beaulieu C, Halle JP, Neufeld RJ, Fournier A. Production of alginate beads by emulsification/internal gelation. I. Methodology. // *Appl Microbiol Biotechnol*. 1992;38 (1):39–45. doi:10.1007/BF00169416

135 Song H, Yu W, Gao M, Liu X, Ma X. Microencapsulated probiotics using emulsification technique coupled with internal or external gelation process. *Carbohydr Polym*. 2013;96(1):181–189. doi:10.1016/j.carbpol.2013.03.068 doi:10.1007/s13197-019-03616-w

136 de Kruif CG, Weinbreck F, de Vries R. Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides. *Curr Opin Colloid Interface Sci*. 2004;9(5):340–349. doi:10.1016/j.cocis.2004.09.006

137 Goin S. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies. // *Food Sci Technol*. 2004;15:330–347. doi:10.1016/j.tifs.2003.10.005

138 Bhusari SN, Kulkarni PK, Shankarwar SG. Coacervation: A review. // *Int J Pharm Pharm Sci*. 2010;2(1):12-21.

139 Bosnea LA, Moschakis T, Biliaderis CG. Complex coacervation as a novel microencapsulation technique to improve viability of probiotics under different stresses. // *Food Bioprocess Technol*. 2014;7(10):2767–2781. doi:10.1007/s11947-014-1317-7

140 Schmitt C, Sanchez C, Desobry-Banon S, Hardy J. Structure and technofunctional properties of protein-polysaccharide complexes: a review. // *Crit Rev Food Sci Nutr*. 1998;38(8):689–753. doi:10.1080/10408699891274354

141 Oliveira AC, Moretti TS, Boschini C, Baliero JC, Freitas O, Favaro-Trindade CS. Stability of microencapsulated *B. Lactis* (BI 01) and *L. acidophilus* (LAC 4) by complex coacervation followed by spray drying. // *J Microencapsul*. 2007;24(7):673–681. doi:10.1080/02652040701532908

142 Zhao M, Huang X, Zhang H, et al. Probiotic encapsulation in water-in-water emulsion via heteroprotein complex coacervation of type-A gelatin/sodium caseinate. *Food Hydrocoll*. 2020;105:105790. doi:10.1016/j.foodhyd.2020.105790

143 Sinha VR, Bansal K, Kaushik R, et al. Colloid drug carriers: coacervation. // *International Journal of Pharmaceutics*. 2003;259(1-2):243-254.

144 Razavi S, Janfaza S, Tasnim N, Gibson DL, Hoorfar M. Nanomaterial-based encapsulation for controlled gastrointestinal delivery of viable probiotic bacteria. // *Nanoscale Adv*. 2021;3 (10):2699–2709. doi:10.1039/D0NA00952K

145 Stojanov S, Berlec A. Electrospun nanofibers as carriers of microorganisms, stem cells, proteins, and nucleic acids in therapeutic and other applications. // *Front Bioeng Biotechnol*. 2020;8:130.doi:10.3389/fbioe.2020.00130

146 Silva JA, De Gregorio PR, Rivero G, Abraham GA, NaderMacías MEF. Immobilization of vaginal *Lactobacillus* in polymeric nanofibers for its incorporation

in vaginal probiotic products. // Eur J Pharm Sci. 2021;156:105563. doi:10.1016/j.ejps.2020.105563

147 Yang J, Jia C, Yang J. Designing nanoparticle-based drug delivery systems for precision medicine. // Int J Med Sci. 2021;18(13):2943–2949. doi:10.7150/ijms.60874

148 Kashapov R, Ibragimova A, Pavlov R, et al. Nanocarriers for biomedicine: from lipid formulations to inorganic and hybrid nanoparticles. // Int J Mol Sci. 2021;22(13):7055. doi:10.3390/ijms22137055

149 Ebrahimnezhad P, Khavarpour M, Khalili S. Survival of *Lactobacillus acidophilus* as probiotic bacteria using chitosan nanoparticles. // Int J Eng. 2017;30(4):456–463.

150 Ghibaud F, Gerbino E, Copello GJ, Campo Dall'Orto V, Gómez-Zavaglia A. Pectin-decorated magnetite nanoparticles as both iron delivery systems and protective matrices for probiotic bacteria. // Colloids Surf B Biointerfaces. 2019;180:193–201. doi:10.1016/j.colsurfb.2019.04.049

151 Andretto V, Rosso A, Briançon S, Lollo G. Nanocomposite systems for precise oral delivery of drugs and biologics. // Drug Deliv Transl Res. 2021;11(2):445–470. doi:10.1007/s13346-021-00905-w

152 Patarroyo JL, Fonseca E, Cifuentes J, Salcedo F, Cruz JC, Reyes LH. Gelatin-graphene oxide nanocomposite hydrogels for *Kluyveromyces lactis* encapsulation: potential applications in probiotics and bioreactor packings. // Biomolecules. 2021;11(7):922. doi:10.3390/biom11070922

153 Li W, Zhu Y, Ye F, Li B, Luo X, Liu S. Probiotics in cellulose houses: enhanced viability and targeted delivery of *Lactobacillus plantarum*. // Food Hydrocoll. 2017;62:66–72. doi:10.1016/j.foodhyd.2016.07.019

154 A.K. Sadanov, I.A. Ratnikova, S.E. Orazymbet, Ye.Zh. Shorabayev, B.B. Baymakhanova, L.Ye. Protasyuk, A.D. Massirbayeva. Developing Safe Probiotic Solutions for the treatment of human intestinal infections / Разработка безопасных пробиотических решений для лечения кишечных инфекций // Research J. Pharm. And Tech. – принята к публикации. Редактор сообщил, что статья принята к публикации в номере vol: 17 issue: 12 журнала Research Journal of Pharmacy and Technology (ISSN: 0974-360X). Имеется справка о принятии статьи в приложении. Scopus Процентиль – 56; Web of Science – Q2

155 Senesi S., Celandroni F., Tavanti A., Ghelardi E. Молекулярная характеристика и идентификация штаммов *Bacillus clausii*, продаваемых для использования в оральной бактериотерапии. // Appl. Environ. Microbiol. 2001;67:834–839. doi: 10.1128/AEM.67.2.834-839.2001.

156 Plomer M., Perez MI, Greifenberg DM Эффект капсул *Bacillus clausii* в снижении побочных эффектов, связанных с терапией эрадикации *Helicobacter pylori*: рандомизированное, двойное слепое, контролируемое исследование. // Infect. Dis. Ther. 2020;9:867–878. doi: 10.1007/s40121-020-00333-2.

157 Ricci V, Canducci F, Khanna S, et al. Systematic review of *Bacillus clausii* as a treatment option for acute diarrhoea. // J Gastrointest Liver Dis. 2012 Dec;21(4):339-48.

158 Duysburgh C., Van den Abbeele P., Krishnan K., Bayne TF, Marzorati M. Синбиотическая концепция, содержащая спорообразующие штаммы *Bacillus* и смеси пребиотических волокон, последовательно усиливали метаболическую активность путем модуляции микробиома кишечника in vitro. // Int. J. Pharm. X. 2019;1:100021. doi: 10.1016/j.ijpx.2019.100021.

159 Rochin-Medina JJ, Ramirez-Medina HK, Rangel-Peraza JG, Pineda-Hidalgo KV, Iribe-Arellano P. Использование сыворотки в качестве питательной среды для *Bacillus clausii* для производства белковых гидролизатов с антимикробной и антиоксидантной активностью. // Food Sci. Technol. Int. 2018;24:35–42. doi: 10.1177/1082013217724705.

160 Ghelardi E., Celandroni F., Salvetti S., Gueye SA, Lupetti A., Senesi S. Выживание и персистенция *Bacillus clausii* в желудочно-кишечном тракте человека после перорального введения в виде пробиотической формулы на основе спор. // J. Appl. Microbiol. 2015;119:552–559. doi: 10.1111/jam.12848.

161 Navarra P., Milleri S., Perez IM, Uboldi MC, Pellegrino P., De Fer BB, Morelli L. Кинетика кишечного присутствия спор после перорального введения составов *Bacillus clausii*: три одноцентровых, перекрестных, рандомизированных, открытых исследования. // Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet. 2021;46:375–384. doi: 10.1007/s13318-021-00676-2.

162 Goldenberg JZ, Yap C, Lytvyn L, Lo CK, Beardsley J, Mertz D, Johnston BC. Probiotics for the prevention of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults and children. // Cochrane Database Syst Rev. 2017 Dec 6;12(12):CD006095. doi: 10.1002/14651858.CD006095.pub4.

163 Mazzantini D., Calvigioni M., Celandroni F., Lupetti A., Ghelardi E. В центре внимания качества составов пробиотических формул, продаваемых во всем мире. // Front. Microbiol. 2021;12:693973. doi: 10.3389/fmicb.2021.693973.

164 Patrone V., Molinari P., Morelli L. Микробиологическая молекулярная характеристика коммерчески доступных пробиотиков, содержащих *Bacillus clausii* из Индии и Пакистана. // Int. J. Food Microbiol. 2016;237:92–97. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.012.

165 Celandroni F., Vecchione A., Cara A., Mazzantini D., Lupetti A., Ghelardi E. Идентификация видов *Bacillus*: влияние на качество пробиотических составов. // PLoS ONE. 2019;14:e0217021. doi: 10.1371/journal.pone.0217021.

166 Isolauri E, Juntunen M, Rautanen T, et al. A human *Lactobacillus* strain (*Lactobacillus* GG) promotes recovery from acute diarrhea in children. // Pediatrics 1991;88:90–7.

- 167Majamaa H, Isolauri E, Saxelin M, et al. Lactic acid bacteria in the treatment of acute rotavirus gastroenteritis. // J Pediatr Gastroenterol Nutr 1995;20:333–9.
- 168 Saavedra JM, Bauman NA, Oung I, et al. Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus. // Lancet 1994;344:1046–9.
- 169 Farthing MJ. Acute diarrhea: current and emerging challenges. // Gastroenterology. 2013 May;144(6):1206-17. doi: 10.1053/j.gastro.2013.01.047
- 170 Guerrant RL, Van Gilder T, Steiner TS, Thielman NM, Slutsker L, Tauxe RV, Hennessy TW, Moore M, Griffin PM. Practice guidelines for the management of infectious diarrhea. Clin Infect Dis. 2001 Feb 1;32(3):331-51.
- 171 O’Callaghan A, van Sinderen D. Bifidobacteria and their role as members of the human gut microbiota. // Front Microbiol. 2016;7:925. Published 2016 Jun 14. doi:10.3389/fmicb.2016.00925
- 172 Ventura M, Turróni F, Canchaya C, et al. Genomics of Bifidobacteria. // Microbiol Mol Biol Rev. 2009;73(3):383-412. doi:10.1128/MMBR.00001-09
- 173 Vitetta L, Briskey D, Hayes E, Sholler D, Palumbo E, Agostino M, Du J, Tran C, Jones D, Davison G. The efficacy of a probiotic dietary supplement containing *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus acidophilus*, and *Lactobacillus rhamnosus* on antibiotic-associated diarrhoea in adults: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. // Nutrients. 2014 Nov 12;6(11):5851-63. doi: 10.3390/nu6115851.
- 174SzajewskaH, KotowskaM, MrukowiczJZ, et al. Efficacy of *Lactobacillus GG* in prevention of nosocomial diarrhea in infants. // J Pediatr 2001;138:361–5
- 175 Segal I, Walker WA. *Lactobacillus rhamnosus GG* in pediatrics. // Nutrients. 2017 May 20;9(5):547. doi: 10.3390/nu9050547.
- 176 Goldin BR, Gorbach SL. Clinical indications for probiotics: an overview. Clin Infect Dis. 2008 Feb 1;46 Suppl 2:S96-100; discussion S144-51. doi: 10.1086/523333. (
- 177 Saxelin M, Rautonen N, Heikkilä M, Saris PE, Salminen S. Safety of *Lactobacillus rhamnosus GG* - a 10 year review. // Aliment Pharmacol Ther. 2003 Dec;18 Suppl 2:5-27.
- 178Torres J, Mehandru S, Colombel JF, Ungaro R. Crohn’s disease. Lancet. 2017 Oct 21;389(10080):1741-1755. doi: 10.1016/S0140-6736(17)30042-9.
- 179 Cosnes J, Gower-Rousseau C, Seksik P, Cortot A. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. // Gastroenterology. 2011 May;140(6):1785-94. doi: 10.1053/j.gastro.2011.01.055.
- 180 Malin M, Suomalainen H, Saxelin M, et al. Promotion of IgA immune response in patients with Crohn’s disease by oral bacteriotherapy with *Lactobacillus GG*. // Ann Nutr Metab 1996;40:137–45.
- 181 Gaskins HR. Immunological aspects of host/microbiota interactions at the intestinal epithelium. In: Mackie RI, White BA, Isaacson RE, eds. // Gastrointestinal microbiology. New York: International Thomson Publishing; 1997:537–87.

182 Groschwitz KR, Hogan SP. Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. // J Allergy Clin Immunol. 2009 Jul;124(1):3-20; quiz 21-2.

183 MacDonald TT, Monteleone G. Animal models of inflammatory bowel disease. Curr Opin Gastroenterol. 2005 Jan;21(1):37-41.

184 CONSORT (Consolidated Standards of Reporting Trials): (Рекомендации по отчетности о рандомизированных контролируемых исследованиях). <http://www.consort-statement.org/>

185 Hill C, Guarner F, Reid G, et al. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. // Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2014 Aug;11(8):506-14.

186 David LA, Maurice CF, Carmody RN, et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. // Nature. 2014 Jan 23;505(7484):559-63.

187 Goldenberg JZ, Yap C, Lytvyn L, et al. Probiotics for the prevention of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults and children. // Cochrane Database Syst Rev. 2017 Dec 6;12:CD006095.

188 A.K. Sadanov, I.R. Kulmagambetov, F.N. Nurmanbetova, G. Zh. Sarsenbayeva, I.A. Ratnikova, S. Orazymbet, Ye. Zh. Shorabayev, B.B. Baimakhanova, L. Ye. Protasyuk, A.D. Massirbayeva // First Phase of the Clinical trial of the AS-Probionorm Probiotic Medication for the treatment of Human Intestinal Infections // Research Journal of Pharmacy and Technology // Volume-17, Issue - 8, Year - 2024. doi: 10.52711/0974-360X.2024.00613 ; Scopus Процентиль – 56; Web of science – Q2

189 Clayton R. A., Sutton G., Hinkle P. S., Bult Jr. C., Fields C. 1995. Intraspecific variation in small-subunit rRNA sequences in GenBank: why single sequences may not adequately represent prokaryotic taxa // International Journal of Systematic Bacteriology. – 1995. – Vol. 45. – P. 595–599.

190 Zhang Q., Kennon R., Koza M. A., Hulten K., Clarridge III J. E. 2002. Pseudoepidemic due to a unique strain of *Mycobacterium szulqai*: genotypic, phenotypic, and epidemiological analysis // Journal of Clinical Microbiology. – 2002. – Vol. 40. – P. 1134–1139.

191 Clarridge III J. E. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases // Clinical Microbiology Reviews. – 2004. - Vol. 17. - P. 840–862.

192 Kumar S., Tamura K., Nei M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment // Briefings in bioinformatics. – 2004. – Vol. 5, №2. – P. 150–163.

193 Metzker ML. Sanger sequencing: past, present, and future. // Nat Rev Genet. 2005 Jan;6(1):16-26.

194 Bessetti J. An introduction to PCR inhibitors // Promega Corporation. Profiles in DNA. 2007. Vol. 10, is. 1. P. 9-10. URL: <https://www.promega.es/-/media/files/resources/profiles-in-dna/1001/an-introduction-to-pcr-inhibitors.pdf?la=es-es>

195 Whitehurst RJ, van Oort M, eds. *Enzymes in Food Technology*. 2nded. // Wiley-Blackwell; 2010.

196 Способы очистки ПЦР продуктов [Электронный ресурс]. – URL: https://dzen.ru/a/ZOCxMC_JJR5zWbjR

197 Секвенирование методом Сэнгера. [Электронный ресурс]. – URL: https://www.dia-m.ru/blog/sekvenirovanie-metodom-sengera-chast-3-reaktivy-materialy-i-programmnoe-obespechenie-dlya-kapillyarn/?srsltid=AfmBOooTdJbRxOFHeon-mzI6bO04z6y9uxxJJOmWFmqTxfoa6Nzkd5_0

198 Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. // *Nat Rev Genet*. 2016 Jun;17(6):333-51.

199 Metzker ML. DNA sequencing technologies: from Sanger to “next-generation”. // *Nat Rev Genet*. 2010 Jan;11(1):31-46.

200 Государственная фармакопея Республики Казахстан. Т. 1. – Алматы: Издательский дом «Жибек Жолы», - 2008. – С. 592. – ISBN 9965-759-97-9

201 Государственная фармакопея Республики Казахстан. Т. 2. – Алматы: Издательский дом «Жибек Жолы», - 2009. – С. 804. – ISBN 978-601-7152-43-7

202 И.В. Даримов, И.Ю. Чичерин, И.П. Погорельский, И.А. Лундовских. Выживаемость микроорганизмов пробиотиков в условиях *in vitro*, имитирующих процесс пищеварения человека // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. — 2011. - № 3. – С.6-11.

203 Жукова А.А. Биометрия: пособие. В 3 ч. Ч.2. Основные техники анализа данных // А.А. Жукова, М.Л. Минец. – Минск: БГУ, 2020. – 151 с. ISBN 978-985-566-955-6.

204 Dellaglio F., Torriani S. and Felis G.E. Reclassification of *Lactobacillus cellobiosus* Rogosa et al. 1953 as a later synonym of *Lactobacillus fermentum* Beijerinck 1901 // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54 (PT 3), 809-812 (2004).

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ ДЕНСАУЛЫҚ САҚТАУ
МИНИСТРЛІГІ МЕДИЦИНАЛЫҚ ЖӘНЕ
ФАРМАЦЕВТИКАЛЫҚ БАҚЫЛАУ
КОМИТЕТІНІҢ
«ДӨРЛІК ЗАТТАР МЕН МЕДИЦИНАЛЫҚ
БҰЙЫМДАРДЫ САРАПТАУ ҰЛТТЫҚ ОРТАЛЫҒЫ»
ШАРУАШЫЛЫҚ ЖҮРГІЗУ ҚҰҚЫҒЫНДАҒЫ
РЕСПУБЛИКАЛЫҚ
МЕМЛЕКЕТТІК КӘСІПОРНЫ

Қазақстан Республикасы, 010000, Астана қаласы,
Амангелді Иманов көшесі, 13-үй, 4-қабат,
тел.: 8(7172) 235-135
e-mail: farm@dari.kz



РЕСПУБЛИКАНСКОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ
ПРЕДПРИЯТИЕ НА ПРАВЕ ХОЗЯЙСТВЕННОГО ВЕДЕНИЯ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ЭКСПЕРТИЗЫ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ И МЕДИЦИНСКИХ
ИЗДЕЛИЙ» КОМИТЕТА МЕДИЦИНСКОГО И
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

Республика Казахстан, 010000, город Астана,
Улица Амангельды Иманова, дом 13, 4-этаж
тел.: 8 (7172) 235-135
e-mail: farm@dari.kz

№ _____

№ исх: 19-04-16492/ОЗ-И от: 23.11.2023
ТОО «Промышленная микробиология»

на исх. № 134
от 07.11.2023 г.

РГП на ПХВ «Национальный центр экспертизы лекарственных средств и медицинских изделий» КМ и ФК МЗ РК сообщает, что предоставленная Вами краткая информация о клиническом исследовании по протоколу ПМ-001-23г «Исследование безопасности, переносимости пробиотического лекарственного препарата «АС-Пробионорм» широкого спектра действия против кишечных инфекций человека производства ТОО «Промышленная микробиология» у здоровых добровольцев (1 фаза)» рассмотрена на заседании Комиссии по оценке материалов клинических исследований и принята к сведению (Протокол № 18-23 от 23.11.2023 года).

**И.о. заместителя Генерального директора
по лекарственным средствам – Члена Правления**

Д. Войнован

исп.: Э. Нурашева
тел.: +77172-23-51-35 (вн.362)

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ ДЕНСАУЛЫҚ САҚТАУ
МИНИСТРЛІГІ МЕДИЦИНАЛЫҚ ЖӘНЕ
ФАРМАЦЕВТИКАЛЫҚ БАҚЫЛАУ
КОМИТЕТІНІҢ
«ДӨРЛІК ЗАТТАР МЕН МЕДИЦИНАЛЫҚ
БҰЙЫМДАРДЫ САРАПТАУ ҰЛТТЫҚ ОРТАЛЫҒЫ»
ШАРУАШЫЛЫҚ ЖҮРГІЗУ ҚҰҚЫҒЫНДАҒЫ
РЕСПУБЛИКАЛЫҚ
МЕМЛЕКЕТТІК КӘСІПОРНЫ

Қазақстан Республикасы, 010000, Астана қаласы,
Амангелді Иманов көшесі, 13-үй, 4-қабат,
тел.: 8(7172) 235-135
e-mail: farm@dari.kz



РЕСПУБЛИКАНСКОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ
ПРЕДПРИЯТИЕ НА ПРАВЕ ХОЗЯЙСТВЕННОГО ВЕДЕНИЯ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ЭКСПЕРТИЗЫ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ И МЕДИЦИНСКИХ
ИЗДЕЛИЙ» КОМИТЕТА МЕДИЦИНСКОГО И
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

Республика Казахстан, 010000, город Астана,
Улица Амангелды Иманова, дом 13, 4-этаж
тел.: 8 (7172) 235-135
e-mail: farm@dari.kz

№

№ исх: 19-04-11345/ОЗ-И от: 15.10.2024
ТОО «Промышленная микробиология»

на исх. № 96
от 30.09.2024 г.

РГП на ПХВ «Национальный центр экспертизы лекарственных средств и медицинских изделий» КМ и ФК МЗ РК сообщает, что предоставленная Вами информация о завершении КИ II фазы (11.08.2024 г.) и краткая информация о проведении КИ по протоколу ПМ-003-23г «Исследование эффективности и безопасности лекарственного препарата «АС-Пробионорм» с участием пациентов с дисбактериозом» рассмотрена на заседании Комиссии по оценке материалов клинических исследований (Протокол № 25-24 от 11.10.2024 года) и принята к сведению.

Дополнительно сообщаем, что отчет клинического исследования составляется согласно требованиям к структуре и содержанию отчета о клиническом исследовании согласно приложению 2 к Стандарту GCP, Приказа и.о. Министра здравоохранения Республики Казахстан от 4 февраля 2021 года № ҚР ДСМ-15 «Об утверждении надлежащих фармацевтических практик».

Также доводим до вашего сведения, что все отчеты завершенных клинических исследований лекарственных средств первой, второй, третьей фазы включаются в регистрационное досье при заявлении их на государственную регистрацию согласно п. 78 Приказа Министра здравоохранения Республики Казахстан от 11 декабря 2020 года №ҚР ДСМ-248/2020.

**Заместитель Генерального директора
по лекарственным средствам – Член Правления**

Б. Молдахметова

исп.: Э. Нурашева

Документ подписан ЭЦП.

15.10.2024 ЭҚА