

АННОТАЦИЯ

Диссертации на соискание степени доктор философии (PhD) по Образовательной Программе
« 8D05105-Биотехнология »

Масирбаева Айгерим Дуйсенгалиевна на тему:
«Разработка технологии отечественного оригинального
лекарственного препарата против кишечных инфекций человека »

Общая характеристика работы. В ходе работы разработана технология производства активной фармацевтической субстанции пробиотического препарата и реализована технология производства готовой формы пробиотического препарата. Кроме того, были проведены доклинические исследования и успешно завершены 1 и 2 фаза клинических испытания.

Актуальность исследования. Острые кишечные инфекции (ОКИ) по-прежнему находятся на переднем крае в структуре инфекционных заболеваний во всем мире, в том числе в Казахстане. По оценкам экспертов ВОЗ, ежегодно 600 миллионов человек, то есть каждый десятый человек в мире, заболевают после употребления зараженной пищи, а 420 000 умирают в результате этой болезни. Особенностью ОКИ является высокий показатель передачи, этим заболеванием чаще болеют как взрослые, так и дети.

В Казахстане также растет заболеваемость кишечными инфекциями. Эпидемиологи НЦЗ зафиксировали увеличение числа больных кишечными инфекциями. За первые пять месяцев 2024 года по республике зарегистрировано 4986 случаев острых кишечных инфекций (в 2023 году – 4764 случая), также выявлено 316 случаев сальмонеллеза (в 2023 году – 405), дизентерии – 79 случаев (в 2023 году – 84), ротавирусного энтерита – 765 случаев (в 2023 году – 623). Проводимый в стране санитарно-эпидемиологический мониторинг острых кишечных инфекций показывает рост заболеваемости по сравнению с аналогичным периодом прошлого года.

Широкое распространение кишечных инфекций, частое появление среднетяжелых и тяжелых форм, а также наличие осложнений-все это требует поиска путей оптимизации тактики лечения данной группы заболеваний.

В настоящее время современная стратегия лечения ОКИ отдает приоритет лечебным мерам, направленным на коррекцию микробиоценоза кишечника с целью устранения инфекционного очага, расположенного в кишечнике.

В связи с этим в последнее время в мире все чаще используют пробиотики на основе симбионтных микроорганизмов желудочно-кишечного тракта вместо антибиотиков при лечении инфекций кишечника и мочеполового тракта. Наиболее распространенными являются молочнокислые и бифидобактерии, патогенный потенциал которых, по мнению экспертов, достаточно низок для перорального приема в общепринятых дозах. Эти препараты быстро подавляют патогенную микрофлору и повышают иммунную систему организма.

В настоящее время на рынке представлено большое количество пробиотических препаратов на основе живых микроорганизмов. Однако некоторые пробиотические средства от кишечных инфекций не всегда эффективны. Причина этого, недостаточный спектр антимикробного действия; связано с тем, что не отбираются штаммы-антагонисты специфических патогенов.

Кроме того, анализ пробиотиков, представленных на фармацевтическом рынке, показывает, что данные, указанные на их упаковке, не всегда соответствуют действительности.

Отечественные пробиотические препараты в Казахстане не производятся, в основном используется импортная продукция. В связи с этим отечественных данных относительно их производства очень мало.

Производство пробиотических препаратов-трудоемкий, сложный процесс, состоящий из нескольких этапов. Прежде чем пробиотические микроорганизмы будут включены в состав лечебного препарата или биологически активной добавки, они должны быть проверены на соответствие ряду требований.

Отбор микроорганизмов, обладающих всеми вышеперечисленными свойствами наряду с их эффективностью против патогенов, является длительным и сложным процессом.

Промышленное производство препаратов, содержащих состав молочнокислых бактерий, - сложный процесс. Одной из основных проблем при производстве пробиотических препаратов является накопление биомассы при сохранении исходных свойств выбранного штамма или сообщества штаммов. Поскольку масштабирование биомассы обычно осуществляется методом ферментации, этот процесс необходимо тщательно планировать и контролировать.

Производство отечественной технологии препаратов против кишечных инфекций имеет высокую научную и практическую значимость, поскольку требует подхода, включающего фармацевтическое развитие, микробиологические исследования, доклиническую и клиническую оценку эффективности и безопасности, способствует совершенствованию системы здравоохранения Казахстана, укреплению фармацевтической независимости и улучшению здоровья населения.

Цель исследовательской работы: Разработка технологии лекарственного пробиотического препарата против кишечных инфекций человека.

Задачи исследования:

1. Исследование морфологических, культурологических и биохимических свойств лактобактерий с их последующей идентификацией.
2. Разработка технологии производства активной фармацевтической субстанции (АФС) пробиотического лекарственного препарата и его готовой формы.
3. Проведение доклинических испытаний препарата на экспериментальных моделях животных.
4. Проведение клинических испытаний препарата на людях (I и II фазы).

Объекты исследования: Для производства АФС использовались молочнокислые бактерии *Lactobacillus fermentum* 30 и *Lactobacillus cellobiosus* 36, обладающие высокой антагонистической активностью против возбудителей кишечных заболеваний.

Пробиотический лекарственный препарат «АС-Пробионорм» на основе молочнокислых бактерий *Lactobacillus fermentum* 30 и *Lactobacillus cellobiosus* 36. Антагонистическая активность ассоциации культур *L. fermentum* 30 + *L. cellobiosus* 36 была определена в отношении следующих тест-культур: *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 6538TM, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* ATCC 10031TM, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027TM.

Доклинические испытания пробиотического лекарственного препарата «АС-Пробионорм» проводились на лабораторных белых мышах массой 30-32 г (лат. *Mus musculus*) и крысах массой 180-200 г (лат. *Rattus*). В клинических испытаниях препарата «АС-Пробионорм» на I и II этапах в качестве субъектов участвовали люди.

Методы исследования. В ходе диссертационной работы проводились эксперименты в лабораторных условиях с использованием микробиологических методов. Антагонистическая активность определялась методами антагонизма: диффузионных лунок, перпендикулярных штрихов и метода двойного слоя агара. Морфологические, культуральные и биохимические свойства производственных штаммов лактобактерий были изучены, а их молекулярно-генетическая идентификация выполнена методом Сэнгера по последовательности гена 16s rRNA. Для выращивания микроорганизмов и получения биомассы применяли питательные среды и метод ферментации. Количественный анализ ДНК проводился с помощью спектрофотометра NanoDrop ND 2000 при длине волны 260 нм, а качественная оценка ДНК осуществлялась электрофоретическим методом в 1% агарозном геле. В клинических исследованиях применялись следующие статистические методы: t-критерий Стьюдента (t test Student), параметрический и непараметрический критерий Манна-Уитни (Mann Whitney U test), критерий Краскала-Уоллиса (Kruskal Wallis test H), а также критерий хи-квадрат (Chi-squared test).

Теоретическая значимость исследований. Повышение эффективности пробиотических препаратов в борьбе с кишечными инфекциями, расширение спектра их действия за счет правильно подобранного микробного состава и оптимальной технологии производства является актуальной задачей.

В ходе выполнения диссертационной работы были проведены следующие исследования:

1. Изучены морфологические, культуральные и биохимические свойства лактобактерий с последующей их идентификацией.
2. Впервые разработана технология производства активной фармацевтической субстанции (АФС) пробиотического лекарственного препарата «АС-Пробионорм» и его готовой формы.
3. Впервые проведены доклинические исследования препарата «АС-Пробионорм» на экспериментальных животных.
4. Впервые выполнены клинические исследования препарата «АС-Пробионорм» (I и II фазы) на людях.

Для повышения эффективности лечения кишечных инфекций была разработана отечественная технология производства пробиотического препарата.

Разработанная технология, доклинические и клинические исследования, а также организация производства способствуют развитию внутреннего фармацевтического рынка Казахстана.

Производство нового отечественного пробиотического препарата открывает возможности для обеспечения внутреннего рынка Казахстана и экспорта в другие страны.

Научная и практическая значимость работы

Для повышения эффективности лечения кишечных инфекций разработана новая отечественная технология производства лекарственного препарата «АС-Пробионорм». Разработанная технология, подтвержденная доклиническими и клиническими исследованиями, а также дальнейшая организация производства

будут способствовать развитию внутреннего фармацевтического рынка Казахстана. Производство данного препарата может быть организовано как для использования на территории Казахстана, так и для экспорта в другие страны.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Технология производства активной фармацевтической субстанции (АФС) пробиотического лекарственного препарата и его готовой формы обеспечивает выпуск качественного и эффективного препарата для лечения кишечных инфекций у человека.
2. Клинические испытания пробиотического препарата позволяют подтвердить его биологическую активность, безопасность и эффективность на экспериментальных животных.
3. Клинические исследования (I–II фазы) на людях подтверждают переносимость, безопасность и эффективность препарата.

Основные результаты и выводы

1. Подтверждена таксономическая принадлежность пробиотических молочнокислых бактерий. Биологическая активность лекарственного средства подтверждена по производственно-оценочным показателям (зоны подавления роста возбудителей кишечных заболеваний достигали 24 мм, количество жизнеспособных клеток — не менее $2,0 \times 10^9$ КОЕ/г). Моноштаммы *L. fermentum* 30 и *L. cellobiosus* 36 проявили высокую антагонистическую активность. Ассоциация микроорганизмов *L. fermentum* 30 и *L. cellobiosus* 36, входящая в состав активной фармацевтической субстанции, показала более высокую антагонистическую активность по сравнению с моноштаммами.
2. Разработана технология производства активной фармацевтической субстанции (АФС), состоящей из микробной массы пробиотических бактерий *Lactobacillus fermentum* 30 и *Lactobacillus cellobiosus* 36 с компонентами лиофилизирующей среды (7% сахара, 1,5% желатин, 7% КМС), а также технология производства готовой лекарственной формы на основе АФС с добавлением стеарата магния — пробиотического препарата «АС-Пробионорм».
При разработке технологии производства АФС был выбран оптимальный питательный субстрат (среда MRS) и режим замораживания-сушения №1. Созданы технологическая схема производства АФС и готовой формы препарата. На производстве изготовлено пять опытных партий пробиотического препарата «АС-Пробионорм». Оценено качество партий по антагонистической активности против патогенных микроорганизмов *Escherichia coli* ATCC 8739, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P, *Salmonella enterica* ATCC 14028. В препаратах не выявлено колиформных бактерий, стафилококков, дрожжей и фагов.
3. Биологическая активность, безопасность и эффективность пробиотического препарата подтверждены на доклиническом этапе *in vivo* на моделях экспериментальных животных и сопоставлены с коммерческими препаратами Ферталь® и Лацидофил-WM. Препарат активен, не токсичен, устойчив в кислой среде (рН 3) и желчи.
4. Проведены клинические исследования (фазы I и II). Данные первой фазы исследования на 20 здоровых добровольцах показали хорошую переносимость и безопасность препарата «АС-Пробионорм». Во второй фазе

с участием 210 пациентов с дисбактериозом подтверждена эффективность препарата. Отмечено значительное снижение роста энтерококков (на 25%) и грибов рода *Candida* (на 27%), а также повышение количества лактобактерий (до 80%) и бифидобактерий (до 76%), что свидетельствует о потенциале препарата улучшать состояние микробиоты. Эффект препарата сохранялся в течение всего периода наблюдения (до 42 дней).

Связь с планом основных научных работ. Диссертационная работа была выполнена в рамках проекта AP14870162 «Клинические испытания отечественного пробиотического лекарственного препарат «АС-Пробионорм» широкого спектра действия против кишечных инфекций человека (2022-2024 гг).

Апробация работы. Материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на следующих конференциях:

- X Международные фарабиевские чтения. Материалы междунар. науч. конференции студентов и молодых ученых «Фараби элемеі» (6-8 апреля 2023, Алматы).
- Международной научной конференции молодых ученых, посвященной 40-летию со дня основания Института молекулярной биологии и биохимии имени М.А. Айтхожина. Алматы 2023.

Публикации. Основное содержание диссертации отражено в 12 печатных работах, включая 4 статьи в журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus (Процентиль 56, Q2), 6 статьи в республиканских научных журналах, включенных в перечень КОКСНВО МНВО РК, 2 тезиса в материалах международных конференций.

Личный вклад автора заключается в выполнении основного объема теоретических и экспериментальных исследований, анализе, интерпретации оформлении полученных результатов, подготовке рукописей публикаций.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 100 страницах компьютерного текста и состоит из следующих разделов: обозначения, сокращения, введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и их обсуждение, заключение, список использованных источников из 203 наименований. Работа включает 17 таблицы, 13 рисунков и 5 приложения.