

nal of General Physiology, 128 (3), 261–272. doi: 10.1085/jgp.200609547

88. Sheikh, F., Ouyang, K., Campbell, S. G., Lyon, R. C., Chuang, J., Fitzsimons, D. et. al (2012). Mouse and computational models link Mlc2v dephosphorylation to altered myosin kinetics in early cardiac disease. *Journal of Clinical Investigation*, 122 (4), 1209–1221. doi: 10.1172/jci61134

89. Zhu, S.-G., Kukreja, R. C., Das, A., Chen, Q., Lesnfsky, E. J., Xi, L. (2011). Dietary Nitrate Supplementation Protects Against Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy by Improving Mitochondrial Function. *Journal of the American College of Cardiology*, 57 (21), 2181–2189. doi: 10.1016/j.jacc.2011.01.024

90. Xi, L., Zhu, S.-G., Das, A., Chen, Q., Durrant, D., Hobbs, D. C. et. al (2012). Dietary inorganic nitrate alleviates doxorubicin cardiotoxicity: Mechanisms and implications. *Nitric Oxide*, 26 (4), 274–284. doi: 10.1016/j.niox.2012.03.006

91. Lipshultz, S. E. (1996). Dexrazoxane for protection against cardiotoxic effects of anthracyclines in children. *J Clin Oncol*, 14 (2), 328–331.

92. Lipshultz, S. E., Rifai, N., Dalton, V. M., Levy, D. E., Silverman, L. B., Lipsitz, S. R. et. al (2004). The Effect of Dexrazoxane on Myocardial Injury in Doxorubicin-Treated Children with Acute Lymphoblastic Leukemia. *New England Journal of Medicine*, 351 (2), 145–153. doi: 10.1056/nejmoa035153

93. Lipshultz, S. E., Scully, R. E., Lipsitz, S. R., Sallan, S. E., Silverman, L. B., Miller, T. L. et. al (2010). Assessment of dexrazoxane as a cardioprotectant in doxorubicin-treated children with high-risk acute lymphoblastic leukaemia: long-term follow-up of a prospective, randomised, multicentre trial. *The Lancet Oncology*, 11 (10), 950–961. doi: 10.1016/s1470-2045(10)70204-7

94. Lyu, Y. L., Kerrigan, J. E., Lin, C.-P., Azarova, A. M., Tsai, Y.-C., Ban, Y., Liu, L. F. (2007). Topoisomerase II Mediated DNA Double-Strand Breaks: Implications in Doxorubicin Cardiotoxicity and Prevention by Dexrazoxane. *Cancer Research*, 67 (18), 8839–8846. doi: 10.1158/0008-5472.can-07-1649

95. US Food and Drug Administration. Available at: <http://www.fda.gov/drugs/drugsafety/ucm263729.htm>

Дата надходження рукопису 22.03.2016

Ніженковська Ірина Володимирівна, доктор медичних наук, професор, завідувач кафедри, кафедра фармацевтичної, біологічної та токсикологічної хімії, Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, бул. Т. Шевченка, 13, м. Київ, Україна, 01601

Нароха Віолетта Петрівна, асистент, кафедра фармацевтичної, біологічної та токсикологічної хімії, Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, бул. Т. Шевченка, 13, м. Київ, Україна, 01601

Бакун Анастасія Віталіївна, лаборант, кафедра фармацевтичної, біологічної та токсикологічної хімії, Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, бул. Т. Шевченка, 13, м. Київ, Україна, 01601

УДК 579.61

DOI: 10.15587/2313-8416.2016.67577

ТЕХНОЛОГІЯ ОТРИМАННЯ БАКТЕРІАЛЬНОГО СИНБІОТИЧНОГО ПРЕПАРАТУ

© О. С. Хижняк

Мета: з метою розширення спектру вітчизняних синбіотичних препаратів, нами було розроблено технологію отримання комплексного бактеріального препарату та методики контролю його якості.

Методи: для створення препарату високої ефективності проведено визначення симбіотичного типу взаємодії бактерій, що входять до його складу. Враховуючи індивідуальність кожного штаму у вимогах до нутрієнтів поживного середовища обрано оптимальний склад останнього, який дозволяє проводити одночасне глибинне культивування штамів бактерій із збереженням морфологічних ознак та активності кожного штаму. Встановлення фізико-технологічних параметрів культивування враховує експоненційну фазу росту бактерій і дозволяє підтримувати активні показники росту. Для підвищення показників росту бактерій внесено пребіотичний компонент, що має однаково високий біфідо- і лактогенний ефекти.

Результати: розроблено технологію отримання комплексного пребіотичного препарату та методи контролю якості на препарат.

Висновки: результати проведених експериментів стосовно контролю якості розробленого препарату на дослідгах *in vitro* та *in vivo* підтверджують відповідність отриманого препарату вимогам якості та безпечності

Ключові слова: біфідобактерії, лактобацили, лактитол, консорціум, симбіоз, синбіотик, сумісне глибинне культивування, активність кислотоутворення, бактеріальний препарат

Aim. To increase the range of synbiotic drugs, technology for the complex bacterial drug production and methods for its quality control were developed.

Methods. For the high-effective remedy development, determination of type of bacteria symbiotic relationship in its composition was carried out. Considering the individuality of each strain in their requirements for nutrients in growth medium, its optimal composition was selected, which allows to carry out simultaneous deep cultivation of bacteria strains, maintaining both morphological features and activity of each strain. Determination of physical and technological cultivation parameters considers the bacteria exponential growth phase and allows maintaining active growth parameters. To improve the bacteria growth parameters, a prebiotic component, having equally high bifidobacteria and lactogenic effects, was included.

Results. Technology of the complex remedy production and its quality control methods were developed.

Conclusion. The obtained results in relation to the developed remedy quality control in experiments in vitro and in vivo confirm the compliance of the obtained drug to quality and safety requirements

Keywords: bifidobacteria, lactobacillus, lactitol, consortium, symbiosis, synbiotic, simultaneous deep cultivation, acid production activity, bacterial drug

1. Вступ

Організм людини та його природна мікрофлора – це єдина екологічна система, яка характеризується здатністю до саморегуляції та пов'язана складними механізмами безперервної взаємодії окремих компонентів всередині системи, а також цілісної системи з навколишнім середовищем. З метою покращення стану мікрофлори людини та розширення спектру вітчизняних лікарсько-профілактичних засобів бактеріального походження необхідно провести розробку нових форм та складів пробіотичних препаратів.

Активна пропаганда здорового способу життя та відсутність часу для раціонального харчування, застосування біологічно активних добавок (БАД) та неконтрольоване використання антибіотиків є передумовою зростання попиту на пробіотичні препарати лікувально-профілактичної дії, або БАД на їх основі.

2. Постановка проблеми в загальному вигляді, актуальність теми та її зв'язок з важливими науковими чи практичними питаннями

Проведення маркетингового дослідження ринку, аналіз літературних даних показав, що на сучасному етапі розвитку вітчизняного виробництва бактеріальних препаратів, препарати українського виробництва займають незначну нішу серед великої кількості закордонних продуктів лікувального чи профілактичного призначення. Для створення пробіотичних препаратів широко використовуються найпоширеніші групи мікроорганізмів – біфідобактерій (рід *Bifidobacterium*) та лактобацили (рід *Lactobacillus*), а особливо їх комбінації отримані змішуванням окремих штамів, оскільки вони впливають на різні ланки слизової кишечника. Однак, для створення бактеріального препарату недостатньо використання притаманних організму бактерій, необхідно встановити, що їх одночасне відновлення у ентеральному середовищі не призведе до конкуренції за поживні речовини, ланки адгезії та не матиме негативного впливу одне на одного. Нами запропоновано застосувати метод сумісного глибинного культивування, з метою проведення аналізу міжштамової взаємодії (симбіотичного ефекту) мікроорганізмів в умовах *in vitro* [1], оскільки ефективність бактеріальних препаратів визначається не лише сукупністю біологічних властивостей пробіотичних штамів, що входять до його складу, а й рівнем симбіотичної взаємодії.

Крім того, слід зазначити, що потрапляючи до ентерального середовища бактеріям для нормального функціонування потрібні поживні компоненти, що робить доцільним внесення пребіотичного компоненту. Створення синбіотичного препарату з високою активністю бактерій, що входять до його складу підвищить конкурентоспроможність вітчизняного ринку пробіотичних засобів профілактики і лікування захворювань шлунково-кишкового тракту (ШКТ) різної етіології.

Нами розроблено і запропоновано технологію отримання комплексного синбіотичного препарату лікувально-профілактичної дії на основі пробіотичних штамів біфідобактерій *Bifidobacterium bifidum* ЛВА-3 та лактобацил *Lactobacillus plantarum* 8R-A3 з додаванням пребіотичного компоненту лактитолу.

3. Аналіз останніх досліджень і публікацій, в яких почато рішення вказаної проблеми і на які посилається автор

При розробці бактеріальних препаратів авторами застосовується багато шляхів для їх вдосконалення. Так, розробники одним із шляхів підвищення ефективності обирають багатовидовий склад препарату, не враховуючи того, що раціональний підхід до створення ефективного бактеріального препарату повинен бути заснований на максимальній спорідненості до біоценозу людини, який включає і лактобацили також. Бактерійні препарати отримують також шляхом окремого культивування та висушування кожного штамів, з подальшим змішуванням сухих біомас бактерій та допоміжних речовин [2]. Таке технологічне рішення не дає можливості отримання ефективного консорціуму бактерій з високими показниками активності, а лише містить різні штами бактеріальних культур, які притаманні організму людини.

Тому, вдосконалення технології бактерійних препаратів для створення продукту максимальної ефективності є важливим і необхідним завданням.

4. Виділення не вирішених раніше частин загальної проблеми, яким присвячена стаття

Для розробки ефективного лікарсько-профілактичного засобу необхідно визначити штами бактерій, що входять до його складу, довести симбіотичний тип їх взаємодії; розробити поживне середовище, що відповідає всім ростовим вимогам використаних

штамів і довести можливість сумісного глибинного культивування бактерій на розробленому поживному середовищі. Підтвердити ефективність препарату на дослідах *in vitro* та розробити методики контролю.

5. Формування цілей (задач) статті

Для вирішення зазначеної проблеми необхідно провести дослідження за такими напрямками:

- 1) розробка складу поживного середовища для сумісного глибинного культивування пробіотичних штамів бактерій;
- 2) визначення штамів бактерій для формування складу бактеріального препарату;
- 3) аналіз морфологічних характеристик та біологічних властивостей використаних штамів при сумісному культивуванні на запропонованому середовищі;
- 4) визначення оптимального складу пробіотичних штамів для сумісного культивування (співвідношення та кількість генерацій);
- 5) дослідження технологічних параметрів культивування (рН, час, температура, та ін.);
- 6) дослідження та вибір пребіотичного компоненту, його оптимальної концентрації;
- 7) дослідження *in vitro* та *in vivo* ефективності отриманого комплексного синбіотичного препарату;
- 8) розробка та опрацювання методик контролю якості препарату.

6. Вклад матеріалу дослідження (методів та об'єктів) із обґрунтуванням отриманих результатів

Одним з основних факторів, які визначають якість препаратів, є стандартність поживної цінності їх виробничих середовищ культивування. Для культивування пробіотичних штамів регламентовані складні поживні середовища: гідролізати та екстракти молока, казеїну, печінки, пекарських дріжджів та м'язів. Результати літературних даних свідчать, що вказані середовища містять повний набір із 19 амінокислот. Відповідно літературним даним [3–5], джерелом амінокислот, факторів росту, вітамінів є дріжджі; джерелом пептонів, мінеральних речовин є гідролізат казеїну. В літературі, у якості дріжджового компоненту використовується дріжджовий екстракт, дріжджова вода, автолізат дріжджів або кислотний чи ферментативний гідролізат дріжджів. Казеїн у склад поживного середовища входить у вигляді гідролізу, отриманих кислотним чи ферментативним гідролізом.

Вміст амінного азоту ($N_{ам}$) у середовищі у різних авторів відрізняється і знаходиться у межах 90–200 мг %, що свідчить про нестандартність отриманих компонентів; їх використання у складі поживного середовища у різних співвідношеннях; необхідність розробки складу поживного середовища в кожному конкретному випадку [4]. Стандартизація поживного середовища відповідно ростовим вимогам бактерій – завдання кожного дослідника, особливо враховуючи той факт, що проведені нами дослідження спрямовані на розробку технології для культивування сумісної культури (консорціуму).

Нами запропоновано використовувати компоненти поживного середовища, що пройшли ультрафільтраційну обробку через мембрани (30–50 кДа).

Проведення вказаного процесу дозволить очистити поживне середовище від високомолекулярних пептидів та білків. Ультрафільтрація дозволяє розділити суміш речовин з різною молекулярною масою. Процес проводиться під тиском через мембрани, що мають певні розміри пор. Ми пропонуємо технологічний процес проведення ультрафільтрації дріжджового компоненту і гідролізату казеїну. Перевагами цього методу є можливість фільтрації промислових об'ємів компонентів поживних середовищ. При проведенні процесу необхідно контролювати швидкість фільтрації, температуру – для збереження факторів росту в дріжджових компонентах, необхідну концентрацію компонента.

Фільтрацію дріжджових компонентів ми пропонуємо проводити при температурі (8–15) °С, необхідну концентрацію підтримували протягом всього процесу ультрафільтрації. Зниження температури нижче 8 °С приводить до зменшення швидкості фільтрації, а температура вище 15 °С супроводжується інтенсивним утворенням пограничного шару, що приводить до необхідності частого застосування «реверсу» і регенерації мембран. Беззаперечно, важливою є можливість додаткової стерилізуючої фільтрації розчинів через ультрафільтраційні мембрани, так як розмір пор мембрани дозволяє відокремити мікробну контамінацію. Далі дріжджовий компонент середовища проходить стерилізуючу фільтрацію через мембрани з розміром пор 0.45 та 0.22 мкм. При такій обробці, фактори росту поживного середовища не проходять теплову обробку. Необхідно додати, що зазначені мембрани мають мінімальну адсорбційну активність, досить легко регенеруються і можуть бути використані багаторазово, а процес має не значну енергоємність.

Проте, ефективність фракціонування ультрафільтрацією може знижуватися за рахунок впливу ряду факторів: взаємодія макромолекул з утворенням пограничного шару підвищеної концентрації на межі розділу між мембраною та розчином, що фільтрують; взаємодія системи «мембрана – розчинена речовина». Утворення пограничного шару обумовлене концентраційною поляризацією, яка утворюється за рахунок значної втрати розчинника з розчину на межі його розділу з мембраною. Внаслідок взаємодії системи «розчинена речовина – мембрана» цей пограничний шар, у випадку високої концентрації дріжджового компоненту, може бути незворотнім і утворити шар гелю, який змінює поверхню мембрани. Завдяки тангенціальному потоку і його «змиваючій» силі, молекули білка та інші речовини, що осіли на мембрані, можуть мати приблизно однакову орієнтацію. Саме тангенціальний потік нівелює трансмембранний потік молекул розчиненої речовини. Під час роботи апаратів, максимальний робочий тиск не повинен перевищувати 0.2 мПа. Для попередження утворення пограничного шару і зниження швидкості фільтрації, пропонуємо відокремлювати дебрис клітин центрифугуванням чи декантацією. Очищений таким чином гідролізат казеїну стерилізували в автоклаві.

Нами проведено дослідження по визначенню оптимального складу поживного середовища. Стан-

дартизовано значення амінного азоту, вміст основних ростових компонентів – джерел азоту амінокислот, вітамінів, факторів росту – дріжджового автолізу із значенням амінного азоту – 130±20 мг % та ферментативного гідролізату казеїну із значення амінного азоту 600±40 мг %.

Продуктивність поживних середовищ перевіряли по активності кислотоутворення біфідобактерій, культивованих на експериментальних варіантах при температурі (38±0.5) °С протягом 72 годин [6]. Доведено можливість культивування лактобацил на запро-

понованому варіанті поживного середовища за умови внесення необхідних мікро- та макроелементів [6].

З метою визначення пробіотичних штамів бактерій для створення лікарсько-профілактичного засобу, було проведено глибинне культивування на розробленому казеїново-дріжджовому середовищі (КД) наступних штамів бактерій: *Bifidobacterium bifidum* ЛВА-3, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Lactobacillus plantarum* 8R-A3, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*. Значення показників активності культури представлені в табл. 1.

Таблиця 1

Характеристика біологічної активності різних консорціумів бактерій

№ зразку	Штами <i>Bifidobacterium</i>	Штами <i>Lactobacillus</i>	Активність кислото-утворення, °Т
1	<i>B. bifidum</i> ЛВА-3	<i>L.casei</i>	318±44
2	<i>B. longum</i>	<i>L.casei</i>	315±30
3	<i>B.adolescentis</i>	<i>L.casei</i>	293±22
4	<i>B. bifidum</i> ЛВА-3	<i>L.plantarum</i> 8R-A3	383±45
5	<i>B. longum</i>	<i>L.plantarum</i> 8R-A3	320±30
6	<i>B.adolescentis</i>	<i>L.plantarum</i> 8R-A3	307±24
7	<i>B. bifidum</i> ЛВА-3	<i>L.acidophilus</i>	278±18
8	<i>B. longum</i>	<i>L.acidophilus</i>	295±25
9	<i>B.adolescentis</i>	<i>L.acidophilus</i>	248±20

*Примітка N=3

Як видно з табл. 1, найбільш високі показники активності культури спостерігалися при сумісному культивуванні біфідобактерій штаму *B. bifidum* ЛВА-3 з лактобацилами штамів *L.plantarum* 8R-A3 та *L. casei*. На основі проведеного експерименту, для подальшої роботи обираємо культури біфідобактерій штаму *Bifidobacterium bifidum* ЛВА-3 та лактобацил штаму *Lactobacillus plantarum* 8R-A3.

З технологічної точки зору важливим є те, що бактерії штаму *B. bifidum* ЛВА-3 є строгими анаеробами, ростуть при відсутності кисню; бактерії штаму *L.Plantarum* 8P-A3 – факультативний анаероб, бактерії ростуть в атмосфері вуглекислого газу, азоту, а також в присутності кисню. Можливість продуктивного сумісного культивування біфідобактерій та лактоба-

цил зумовлена: по-перше, тим, що у процесі метаболізму лактобацили поглинають кисень, розчинений у поживному середовищі, створюючи тим самим сприятливі умови для росту біфідобактерій; по-друге, у процесі метаболізму біфідобактерій синтезують вільні амінокислоти, які стимулюють ріст лактобацил. Завдяки різному відношенню до кисню, бактерії препарату можуть займати різні локуси у ентєральному середовищі. Враховуючи зазначені факти, робимо припущення про ефективний симбіоз обраних штамів. Для визначення оптимального рівня генерацій (досягнення експоненційної фази росту) обраних штамів *B. bifidum* ЛВА-3 і *L.Plantarum* 8P-A3 та співвідношення посівного матеріалу у інокуляті було проведено посів культур за наступною схемою (табл. 2).

Таблиця 2

Співвідношення посівного матеріалу у інокуляті

№ зразку	Біфідобактерії			Лактобацили			Співвідношення
	Об'єм, мл	К-сть бактерій КУО/мл	№ генерації	Об'єм, мл	К-сть бактерій КУО/мл	№ генерації	
1	2.5	10 ⁷	2	2.5	10 ⁷	5	1 : 1
2	1.25	10 ⁷	2	3.75	10 ⁷	5	1 : 3
3	3.75	10 ⁷	2	1.25	10 ⁷	5	3 : 1
4	–	–	–	2.5	10 ⁷	5	–
5	2.5	10 ⁷	2	–	–	–	–
6	2.5	10 ⁷	2	2.5	10 ⁷	6	1 : 1
7	1.25	10 ⁷	2	3.75	10 ⁷	6	1 : 3
8	3.75	10 ⁷	2	1.25	10 ⁷	6	3 : 1
9	–	–	–	2.5	10 ⁷	6	–
10	2.5	10 ⁷	2	–	–	–	–

Для підтвердження можливості сумісного культивування біфідобактерій та лактобацил на визначеному поживному середовищі та симбіотичного типу взаємодії необхідно дослідити інтенсивність накопичення біомаси: визначити кількість живих бактерій, активність кислотоутворення, оптичну густину зразків та провести мікроскопію отриманих зразків. Результати дослідження, отримані у трикратній повторності мають високі показники і підтверджують припущення симбіотичного типу взаємодії [6].

Велике значення для продуктивного культивування та максимального накопичення біомаси має комплекс фізичних і фізико-хімічних факторів (рівень рН, температура, концентрація кисню). Відомо, що оптимальними умовами для росту і накопичення біомаси біфідобактерій є рН середовища (6.5±0.1), температура культивування (38±0.5) °С, а для лак-

тобацил – рН середовища (7.0±0.1), температура культивування (37±0.5) °С. Також слід прийняти до уваги той факт, що біфідобактерії у процесі росту виділяють невелику кількість кисню, яка необхідна для росту лактобацил. Тому, для максимального накопичення біомаси під час культивування комбінованої бактеріальної культури на розробленому поживному середовищі нами запропоновано на першу добу росту створити умови, характерні для біфідобактерій, а по досягненню ними експоненційної фази росту (на другу добу), оптимальні параметри росту для лактобацил: рН середовища на початковому етапі (6.5±0.1); впродовж культивування (48 годин) рН перевіряли і корегували 10 % розчином аміаку до рН (7.0±0.1). Температура культивування протягом першої доби становила (38±0.5) °С, протягом другої доби (37±0.5) °С (табл. 3).

Таблиця 3

Оптимальні умови росту біфідобактерій та лактобацил при окремому і глибинному культивуванні

Фактори	Bifidobacterium bifidum ЛВА-3	Lactobacillus plantarum 8R-A3	Сумісна бактеріальна культура	
			1-ша доба	2-га доба
рН	6.5±0.1	7.0±0.1	6.5±0.1	7.0±0.1
Температура, °С	38±0.5	37±0.5	38±0.5	37±0.5

Нами експериментально встановлено, що запропонований режим культивування і склад поживного середовища дозволяють одночасно в одному об'ємі культивувати біфідобактерії та лактобацили зі збереженням основних морфологічних та біологічних показників. Зміна температури і корегування рН протягом двох діб культивування дозволило збільшити рівень кислотоутворення на 5–7 %; кількість живих бактерій залишилась незмінною; морфологічні характеристики культур стабільні та відповідають встановленим характеристикам.

Для визначення пребіотичного компоненту, що одночасно має високу лактогенну і біфідогенну дію було проведено ряд експериментів використовуючи різні джерела цукрів – фруктозу, інулін, лактулозу і лактитол [7]. В результаті проведених дослідів встановлено, що культивування штамів біфідобактерій *B. bifidum* ЛВА-3 та лактобацил *L. Plantarum* 8R-A3 в умовах *in vitro*, з додаванням у якості пребіотичного компоненту лактитолу, має відмінні показники росту і рівень накопичення біомаси, та по своїм основним показникам не поступається найбільш поширеному пребіотичному компоненту – лактулозі. Також доведена можливість використання лактитолу у якості пребіотичного компоненту при сумісному культивуванні штамів біфідобактерій *B. bifidum* ЛВА-3 та лактобацил *L. Plantarum* 8R-A3 в умовах *in vitro*, та встановлена його необхідна і достатня концентрація, що становить (1±0.1) %. Вибір лактитолу в якості пребіотичного компоненту засновано на рівномірній біфідо- і лактогенній дії [7].

Дослідження умов сумісного культивування вказаних штамів дозволяє запропонувати таку технологію виготовлення препарату:

1) підготовка поживних середовищ, основних та допоміжних розчинів;

2) отримання маточної культури біфідобактерій штаму *B. bifidum* ЛВА-3 II генерації та лактобацил штаму *L. Plantarum* 8P-A3 V генерації;

3) виробничий посів вказаних культур на поживне середовище для сумісного культивування у встановленому співвідношенні;

4) сумісне глибинне культивування біфідобактерій та лактобацил;

5) додавання середовища стабілізації;

6) розлив;

7) контроль рідкого симбіотичного консорціуму;

8) маркування;

9) контроль готового препарату перед випуском.

Відповідно розробленій технології, отримано препарат наступного складу: не менше 10¹¹ біфідобактерій штаму *Bifidobacterium bifidum* ЛВА-3, не менше 10¹⁰ лактобацил штаму *Lactobacillus plantarum* 8P-A3, лактитол 1±0.1 %.

Посів кожної генерації контролюють на чистоту шляхом висіву 1 мл культури на пробірки зі скошеним поживним агаром з 9 % натрію хлориду та середовища Сабуро. На пробірках не повинно бути росту сторонньої мікрофлори та грибів.

У контрольній пробі рідкого препарату визначають: стерильність (відсутність росту сторонньої мікрофлори і грибів на агарових середовищах); рН; каламутність мікробної зависі (40–80 од. мутності по ОСО).

Препарат до та після розливу підлягає контролю за всіма зазначеними фізичними та біологічними показниками – мікробіологічна чистота [8], бактеріоскопічний контроль (відповідно технології забарвлення мазків за Грамом), кількість живих бактерій кожного штаму, активність кислотоутворення [8], антагоністична активність [9], специфічна нешкідливість [8], адгезивна активність [10–12], безпечність [13].

Проведено дослідження стабільності рідкої форми, яка визначена на рівні 4–5 місяців. Тривале збереження рідкої форми бактеріального синбіотичного консорціуму, за межами визначеного терміну придатності, призводить до поступових втрат активності і, як наслідок, лікарського потенціалу рідкої форми препарату. Таким чином, наші подальші дослідження спрямовані на розробку технології ліофілізації з метою стабілізації бактеріального препарату. Ліофілізований препарат дозволив нам розробити нову капсульну форму бактеріального консорціуму [14].

7. Висновки з проведеного дослідження та перспективи подальшого розвитку вказаного напрямку

Проведено дослідження по визначенню оптимального складу та технології одержання поживного середовища для сумісного глибинного культивування відібраних штамів бактерій.

Досліджено основні показники росту комбінацій різних штамів пробіотичних бактерій, обрано штами для створення пробіотичного препарату.

Визначено технологічні умови культивування (кількість генерацій, співвідношення бактерій у инокуляті, температура, рН, тривалість культивування).

Експериментально обґрунтовано вибір лактитолу, як пребіотичного компоненту, що має біфідота лактогенну дію.

Розроблено технологію отримання синбіотичного препарату. Досліджено стабільність та визначено методи контролю якості готової лікарської форми.

Література

1. Глушанова, Н. А. Взаимоотношения пробиотических и индигенных лактобацилл в условиях совместного культивирования *in vitro* [Текст] / Н. А. Глушанова, Б. А. Шендеров // Журнал микроб., эпидемиол., и иммунобиол. – 2005. – № 2. – С. 56–61.
2. Пат. РФ 2257408. «Лечебно-профилактический биопрепарат на основе сухой биомассы бифидо- и лактобактерий, биологически активная добавка к пище на основе сухой биомассы бифидо- и лактобактерий, сухая биомасса бифидо- и лактобактерий и способ ее получения» [Текст]. – 2003136785/13; заявл. 22.12.2003 г.; опубл. 27.07.2005 г.
3. Зубарева, И. М. Разработка глубинных питательных сред в производстве биоспорина [Текст] / И. М. Зубарева, И. С. Федорова, А. В. Зубова // Вопросы химии и химической технологии. – 2004. – № 1. – С. 85–88.
4. Краснополяский, Ю. М. Пробиотики в составе биологических диетических добавок [Текст] / Ю. М. Краснополяский // БАД-эксперт. – 2009. – № 1. – С. 18–22.
5. Семченко, А. В. Совершенствование способа получения пробиотических препаратов [Текст] / А. В. Семченко, А. В. Казьянин, Е. В. Орлова, В. А. Несчислаев // Фундаментальные исследования. – 2007. – № 12. – С. 350–351.
6. Хижняк, О. С. Біотехнологічні аспекти отримання комплексного препарату, який містить різні штами пробіотичних культур [Текст] / О. С. Хижняк, Ю. М. Краснополяський // Вісник Національного технічного університету «Харківський політехнічний інститут». Технологія органічних і неорганічних речовин і екологія. – Харків: НТУ «ХПІ». – 2013. – № 4. – С. 113–120.
7. Хижняк, О. С. Визначення пробіотичних властивостей замітника цукру лактитолу в умовах *in vitro* [Текст] / О. С. Хижняк // Вісник НТУ «ХПІ». Серія: Нові рішення в

сучасних технологіях. – Х.: НТУ «ХПІ», 2014. – № 26 (1069). – С. 140–148.

8. Краснополяский, Ю. М. Фармацевтическая биотехнология. Технология производства иммунобиологических препаратов [Текст]: учеб. пособие / Ю. М. Краснополяский, М. И. Борщевская. – Харьков: НТУ «ХПИ», 2009. – 352 с.

9. Ашмарин, В. П. Статистичні методи в мікробіологічних дослідженнях [Текст] / В. П. Ашмарин, А. А. Воробйов. – Л.: Медгиз, 1962. – 85 с.

10. Пименов, Е. В. Оценка адгезивных свойств спор вакцинных штаммов *Vacillus Anthracis* на эритроцитах млекопитающих с помощью фотокolorиметрии [Текст] / Е. В. Пименов, В. А. Оборин, А. Г. Ивонин // Проблемы особо опасных инфекций. – 2011. – № 110. – С. 41–43.

11. Махрова, Т. В. Влияние метаболитов стафилококков на адгезивные реакции в системе «*Candida albicans* – буккальные эпителиоциты» [Текст] / Т. В. Махрова, М. И. Заславская, А. Н. Маянский // ЖМЭИ. – 2004. – № 5. – С. 4–7.

12. Хижняк, О. С. Вивчення адгезивних властивостей біфідобактерій та лактобацил при сумісному культивуванні [Текст] / О. С. Хижняк // Фармаком. – 2015. – № 1. – С. 71–74.

13. Анисимов, Т. И. Руководящий документ по стандартизации. рД 42-28-8-89 / Доклинические испытания новых медицинских иммунобиологических препаратов [Текст] / Т. И. Анисимов, С. Н. Буковская и др. – М., 1989. – 31 с.

14. Хижняк, О. С. Розробка складу капсульної маси профілактичного засобу на основі пробіотичних бактерій [Текст] / О. С. Хижняк // Фармаком. – 2015. – № 3-4. – С. 43–48.

References

1. Glushanova, N. A., Shenderov, B. A. (2005). *Vzaimootnosheniya probioticheskikh i indigennykh laktobacill v usloviyakh sovmestnogo kultivirovaniya in vitro* [The relationship of probiotic lactobacilli and indigenous bacteria in the condition of cocultivation *in vitro*]. *Zhurnal mikrob., epidemiol., i immunobiol.*, 2, 56–61.
2. Patent RF 2257408. *Lechebno-profilakticheskiy biopreparat na osnove sukhoy biomassy bifido- i laktobakteriy, biologicheskii aktivnaya dobavka k pishche na osnove sukhoy biomassy bifido- i laktobakteriy, sukhaya biomassa bifido- i laktobakteriy i sposob ee polucheniya* [Therapeutic and prophylactic biological drug on the basis of the dry biomass of bifidobacteria and lactobacilli, biology active food supplement based on dry biomass of bifidobacteria and lactobacilli, dry biomass of bifidobacteria and lactobacilli and method there of this production] (2003). 2003136785/13; *zajavl.* 22.12.2003 g.; *opubl.* 27.07.2005 g.
3. Zubareva, I. M., Fedorova, I. S., Zубova, A. V. (2004). *Razrabotka glubinykh pitatel'nykh sred v proizvodstve biosporina* [Development of the deep culture media in the production of biosporin]. *Voprosy khimii i khimicheskoyologii*, 1, 85–88.
4. Krasnopol'skiy, Yu. M. (2009). *Probiotiki v sostave biologicheskikh dieticheskikh dobavok* [Probiotics in the consist of biological dietary supplements]. *BAD-ekspert*, 1, 18–22.
5. Semchenko, A. V., Kaz'janin, A. V., Orlova, E. V., Neschisljaev, V. A. (2007). *Sovershenstvovanie sposoba polucheniya probioticheskikh preparatov* [Improving the process for the preparation of probiotic drugs]. *Fundamental'nye issledovaniya*, 12, 350–351.
6. Khyzhnyak, O. S., Krasnopol'skiy, Yu. M. (2013). *Biotekhnologichni aspekti otrymannya kompleksnogo preparatu, yakyy mistyt' rizni shtamy probiotichnykh kul'tur* [Biotechnological aspects of obtaining the complex drug, which consist of different strains of probiotic culture]. *Visnyk NTU «KhPI»*. Kharkiv, 4, 113–120.

7. Khyzhnyak, O. S. (2014). Vyznachennya prebiotychnykh vlastyvostry zaminnyka tsukru laktytolu v umovakh in vitro [Determination of prebiotic properties of sugar substitute lactitol in vitro]. Visnyk NTU "HPI". Serija: Novi rishennja v suchasnyh tehnologijah. Kharkiv: NTU "HPI", 26 (1069), 140–148.

8. Krasnopol's'kyu, Yu. M., Borshchevskaya, M. I. (2009). Farmatsevticheskaya biotekhnologiya. Tekhnologiya proizvodstva immunobiologicheskikh preparatov [Pharmaceutical biotechnology]. Khar'kov: NTU «KhPI», 352.

9. Ashmaryn, V. P., Vorobjov, A. A. (1962). Statystychni metody v mikrobiolohichnykh doslidzhennyakh [Statistical methods in microbiological studies]. Lviv: Medhyz, 85.

10. Pimenov, E. V., Oboryn, V. A., Yvonyn, A. G. (2011). Otsenka adgezivnykh svoystv spor vaktsinnykh shtammov Bacillus Anthracis na eritrotsitakh mlekoopitayushchikh s pomoshch'yu fotokolorimetrii [Evaluation of adhesive properties of spore vaccine strains of Bacillus Anthracis on erythrocytes of mammals using photocolourimetry]. Problemy osobo opasnykh infektsiy, 110, 41–43.

11. Makhrova, T. V., Zaslavskaja, M. Y., Majanskyj, A. N. (2004). Vliyanie metabolitov stafilokokkov na adgezivnye reaktsii v sisteme «Candida albicans – bukkal'nye epiteliotsity» [Influence of staphylococcal metabolites on reaction adhesive system “Candida albicans – buccal epithelial cells”]. ZhMEI, 5, 4–7.

12. Khyzhnyak, O. S. (2015). Vyvchennya adhezivnykh vlastyvostry bifidobakteriy ta laktobatsyl pry sumisnomu kul'tyvuvanni [Study of adhesive properties of bifidobacteria and lactobacilli in the joint cultivation]. Farmakom, 1, 71–74.

13. Anisimov, T. I., Bukovskaja, S. N. et. al (1989). Rukovodjashhij dokument po standartizacii. rD 42-28-8-89 / Doklinicheskie ispytaniya novykh medicinskih immunobiologicheskikh preparatov [Guidance document on standardization. 42-28-8-89 pA / Pre-clinical testing of new medical immunobiological preparations]. Moscow, 31.

14. Khyzhnyak, O. S. (2015). Rozrobka skladu kapsul'noyi masy profilaktychnoho zasobu na osnovi probiotychnykh bakteriy [Development of the capsule mass of drug based on probiotic bacteria]. Farmakom, 3-4, 43–48.

Рекомендовано до публікації д-р фарм. наук, професор Краснопольський Ю. М.
Дата надходження рукопису 11.03.2016

Хижняк Оксана Сергіївна, аспірант, кафедра біотехнології і аналітичної хімії, Національний технічний університет «Харківський Політехнічний Інститут», вул. Кирпичова, 21, м. Харків, Україна, 61002
E-mail: Oksana.khizhnyak@gmail.com

UDC 547,792:547,856

DOI: 10.15587/2313-8416.2016.67685

PRIMARY ANTIMICROBIAL SCREENING OF NOVEL [1,2,4]TRIAZOLO[4,3-*a*]QUINAZOLIN-5(4*H*)-ONE DERIVATIVES

© S. Danylchenko, O. Drushlyak, S. Kovalenko, S. Kovalenko, A. Elliott, J. Zuegg

Aim. The aim of the given study was to conduct primary antimicrobial screening of novel [1,2,4]triazolo[4,3-*a*]quinazolin-5(4*H*)-one derivatives.

Methods. The set of 169 novel [1,2,4]triazolo[4,3-*a*]quinazolin-5(4*H*)-one derivatives has been tested for activity against 5 bacteria: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*, and 2 fungi: *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*. Primary antimicrobial screening has been conducted by whole cell growth inhibition assays, using the provided samples at a single concentration. Samples were tested in water – 0.3 % DMSO solutions with final sample concentrations 32 µg/ml (70–80 µMol).

Results. [1,2,4]Triazolo[4,3-*a*]quinazolin-5(4*H*)-ones 5{1}, 7{1}, 7{2}, 7{3} showed more than 80 % inhibition of *Acinetobacter baumannii* growth and compounds 7{4} showed more than 80 % inhibition of growth fungi *Cryptococcus neoformans*.

Conclusions. For the first time conducted antimicrobial screening of novel [1,2,4]triazolo[4,3-*a*]quinazolin-5(4*H*)-ones showed that compounds, which had no amide group exhibited no antimicrobial activity, but several [1,2,4]triazolo[4,3-*a*]quinazolin-5(4*H*)-one derivatives containing amide group attached by carbon or sulfur-carbon chain possess antimicrobial activity against *Acinetobacter baumannii* or fungi *Cryptococcus neoformans*

Keywords: [1,2,4]triazolo[4,3-*a*]quinazolin-5(4*H*)-one, antimicrobial activity *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*

Meta. У даному дослідженні було поставлено за мету провести первинний скрінінг на антимікробну активність нових похідних [1,2,4]триазоло[4,3-*a*]хіназолін-5(4*H*)-ону.

Методу. Масив 169 нових похідних [1,2,4]триазоло[4,3-*a*]хіназолін-5(4*H*)-ону було тестовано на активність проти 5 видів бактерій: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* та *Staphylococcus aureus*, та 2 видів грибів: *Candida albicans* та *Cryptococcus neoformans*. Первинний скрінінг на антимікробну активність було проведено тестуванням усього масиву на подавлення росту клітин, за умов однакової концентрації сполук. Зразки сполук було тестовано у водних з 0.3 % ДМСО розчинах при остаточній концентрації сполук 32 µг/мл (70–80 µМол).