



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **113817** (13) **C2**
(51) МПК (2017.01)
A61K 31/00
A61K 35/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки: а 2016 03759	(72) Винахідник(и): Соченко Микола Андрійович (UA), Жалко-Титаренко Валентин Порфирівич (UA), Коваленко Олексій Григорович (UA)
(22) Дата подання заявки: 08.04.2016	(73) Власник(и): Соченко Микола Андрійович, вул. Куценко, с. Княжичі, Броварський р-н, Київська обл., 07443 (UA), Жалко-Титаренко Валентин Порфирівич, пр. Ватутіна, 14-а, кв. 4, м. Київ, 02218 (UA), Коваленко Олексій Григорович, вул. Юності, 3, кв. 257, смт Чабани, Києво- Святошинський р-н, Київська обл., 08162 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 10.03.2017	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: RU 2076722, C1, 10.04.1997, 3 арк. UA 9043, C1, 30.09.1996, 4 арк. UA 32145, C1, 15.12.2000, 6 арк. UA 7462, C1, 29.09.1995, 8 арк.
(41) Публікація відомостей про заявку: 25.08.2016, Бюл.№ 16	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.03.2017, Бюл.№ 5	

(54) ПРОБІОТИЧНА ФАРМАЦЕВТИЧНА КОМПОЗИЦІЯ**(57) Реферат:**

Винахід належить до галузі медицини та ветеринарії і може бути використаний в фармацевтиці для одержання пробіотиків, що використовуються для лікування і профілактики кишкових інфекцій, зумовлених патогенами, а також при інфекційних станах, зумовлених дисбактеріозами, які виникають внаслідок хірургічних втручань, антибіотикотерапії, зловживань пухлин, інтоксикацій, променевої хвороби тощо. Задачею пропонованого винаходу є вдосконалення фармацевтичної пробіотичної композиції нового покоління шляхом з'єднання пробіотичних бактерій з сорбентом іншої природи, що супроводжується покращенням адгезії бактерій до слизової оболонки кишечника, в результаті чого досягається посилення лікувальної та профілактичної дії композиції. Пробиотична фармацевтична композиція містить пробіотичні бактерії, з'єднані між собою у мікроагрегати за допомогою полісахаридної речовини Манозану К, кількість якої в 1 мл бактеріальної суспензії складає від 0,1 до 3,0 мг, а концентрація бактерій в 1 мл суспензії дорівнює від 6 до 13 млрд. КУО.

UA 113817 C2

Винахід належить до галузі медицини та ветеринарії і може бути використаний в фармацевтиці для одержання пробіотиків, що використовуються для лікування і профілактики кишкових інфекцій, зумовлених патогенами, а також при інфекційних станах, зумовлених дисбактеріозами, які виникають внаслідок хірургічних втручань, антибіотикотерапії, зловживань пухлин, інтоксикацій, променевої хвороби тощо.

Пробіотики - це лікарські препарати, основою композицій яких складають живі пробіотичні бактерії, що є представниками нормальної та антагоністичної мікрофлори людей і тварин.

Більшість пробіотиків належить до двох родів бактерій: лактобактерій (*Lactobacillus*) і біфідобактерій (*Bifidobacterium*). Але, існує і багато інших видів пробіотичних бактерій. Кожний рід бактерій містить значну кількість видів, а у кожного виду є різні штами, від вибору яких і залежить їх вплив на різні органи і процеси, що відбуваються в організмі.

На цей час створена велика кількість пробіотичних препаратів, які спрямовані на задоволення викликів галузі.

Пробіотики вживають перорально та інтравагінально. Перорально вжиті пробіотичні бактерії потрапляють в порожнину кишки, тобто в середовище кишкового хімусу. Лише дуже незначна частина пробіотичних бактерій (0,8-12 %) припадає на пристінний шар біля поверхні слизової оболонки, адгезується (прикріплюється) до неї та колонізує (заселює) її. Саме на цю частину припадає функція захисту або профілактики від зараження патогенами через конкуренцію за місця (сайти) адгезії на поверхні слизової оболонки та здатність проявляти антагонізм (пригнічення) щодо патогенів. Подібним способом відбувається колонізація і при інтравагінальному введенні, тому цей випадок далі не розглядатиметься.

На пристінний шар пробіотичних бактерій припадає функція відновлення нормального складу кишкової мікрофлори, тому що адгезовані пробіотичні бактерії стають осередком пристінного розмноження. Переважна частка введених пробіотичних бактерій, яка знаходилася в хімусі (88-99 %), виводиться назовні з випорожненнями і втрачає свій вплив на біоценоз. Завдяки цьому лікування вимагає повторного введення препаратів, через що воно триває досить довго, а профілактична і лікувальна спроможність пробіотиків залишається недостатньо високою.

Найчастіше використовуються композиції з висушених живих бактерій нормальної мікрофлори кишечника. До них належать біфідумбактерин, лактобактерин та похідні комбінації на зразок біфіколу, біфілакт-екстра та інші.

Як похідну комбінацію можливо навести фармацевтичну композицію біфіколу - сухого ліофілізату двох пробіотичних бактерій для приймання всередину (RU 2076722). Препарат являє собою мікробну масу живих антагоністично активних штамів біфідобактерій (*Bifidobacterium bifidum* 7) та кишкової палички (*Escherichia coli* M-17), ліофілізовану з середовищем культивування і захисною сумішшю, що додається при висушуванні, - сахарозо-желатино-молочний композит. Препарат за фізичним станом являє собою губчасту пористу масу бежевого або білувато-сірого кольору різної інтенсивності зі специфічним запахом. В одній дозі міститься не менше 10 живих біфідобактерій і не менше 10^7 живих кишкових паличок.

Лікувальна дія обумовлена антагоністичною активністю живих біфідобактерій і кишкової палички відносно до патогенних і умовно патогенних мікроорганізмів, включаючи шигели, сальмонели, протей та ін. Препарат має імуномодельючу та ад'ювантну активність за рахунок бактеріальних антигенів, які впливають на вироблення специфічних та неспецифічних, в тому числі місцевих факторів захисту; стимулюють місцеві репаративні процеси в кишечнику. Препарат призначений для лікування реконвалесцентів після гострих кишкових інфекцій при наявності дисфункції кишечника, при виділенні патогенних бактерій, хронічних колітів різної етіології, дисбактеріозів тощо.

Перевагою відомого препарату є його комбінована дія через антагоністичний вплив відразу двох пробіотичних бактерій. Але в композиції препарату неврахований і невизначений рівень адгезії і колонізації слизової оболонки кишечника пробіотичними бактеріями, що обмежує його невикористаний потенціал і обумовлює його недостатню активність.

З метою подолання цього недоліку (притаманну і іншим препаратам) було створено нове покоління пробіотичних препаратів з додаванням твердих сорбентів, які підсилюють адгезією до слизової оболонки. Це - препарати "Біфідумбактерин-форте", "Екофлор", "Кальцідум" та інші.

Відомий комплексний бактеріальний препарат, а також спосіб його одержання описані у патенті UA 9043. Бактеріальний препарат створений на основі автохтонного штаму *B. bifidum*. Бактерії з'єднуються з активованим вугіллем в концентрації $2,1 \times 10^3$ - $1,0 \times 10^5$ клітин на 1 мм² вугілля, а активоване вугілля використовують у вигляді порошку з розміром часток менше 30 мкм.

В патенті UA 9043 використана закономірність, за якою згущення бактерій в пристінному шарі підсилює їх адгезію до слизової. Оскільки, досягти цього по всій поверхні слизової оболонки кишки неможливо, винахідниками вказаного рішення запропоновано досягати згущення точково шляхом накопичення мікробів на поверхні зернин сорбенту.

І хоча ефективність дії пробіотичних бактерій при цьому помітно зросла, зв'язок бактерій з активованим вугіллям виявився недостатньо стійким, внаслідок чого в порожнину кишечника потрапляють звільнені від мікробів частинки вугілля, які здатні вторинно сорбувати на собі патогенні бактерії, підвищувати їх адгезію і цим підсилювати, а не гальмувати інфекційний процес.

Відомий спосіб одержання комплексного пробіотичного бактеріального препарату (патент UA 32145), в якому передбачено переробляти сорбент в твердий споживний субстрат і вже на ньому вирощувати бактерії. Для цього спочатку активоване вугілля насичують споживним середовищем, поєднуючи його з концентратом при температурі 4-10 °С. Потім на цій суміші вирощують пробіотичні мікроорганізми при оптимальній температурі. Для одержання сухого препарату суміш піддають ліофільному висушуванню.

Згадана фармацевтична композиція була розроблена з урахуванням здатності розташованих в хімусі пробіотичних бактерій до засвоєння мікроелементів, зокрема радіоцезію-137.

Недоліком відомого рішення є досить складні режими сорбції поживних середовищ і їх недостатній зв'язок з вугіллям, що погіршує лікувальну дію вказаної вище композиції.

Задачею пропонованого винаходу є вдосконалення фармацевтичної пробіотичної композиції нового покоління шляхом з'єднання пробіотичних бактерій з сорбентом іншої природи, що супроводжується покращенням адгезії бактерій до слизової оболонки кишечника, в результаті чого досягається підсилення лікувальної та профілактичної дії композиції.

Поставлена задача вирішується тим, що пробіотична фармацевтична композиція, згідно з винаходом, містить мікроагрегати, в яких пробіотичні бактерії з'єднані між собою речовиною полісахаридної природи - Манозаном К. Кількість Манозану К в 1 мл бактеріальної суспензії складає від 0,1 до 3 мг, а концентрація бактерій в 1 мл суспензії може бути від 6 до 13 млрд КУО.

Авторами цього винаходу доведено, що досягнення заявленого технічного результату забезпечується тим, що замість недостатнього і нестійкого накопичення пробіотичних бактерій на нерозчинних твердих сорбентах створюється їх агрегація між собою, яка різко підвищує загущеність бактерій при потрапленні їх в пристінний шар. Агрегацію зумовлює додавання речовини-мікроагрегатора - Манозану К, здатної до утилізації (перетравлення) на поверхні слизової оболонки кишки, завдяки чому вдається уникнути недоліків препаратів-попередників з твердими сорбентами і на порядок підвищити рівень адгезії.

Агрегація пробіотичних бактерій здійснюється шляхом сполучення пробіотичних бактерій між собою через додавання в бактеріальну завись, концентрацією від 6 до 13 мільярдів колоніє утворювальних одиниць (КУО) в 1 мл, Манозану К в кількості від 0,1 до 3 мг на мл бактеріальної суспензії. Кількісні співвідношення Манозану К до бактеріальної суспензії запропонованих концентрацій та діапазон цих відношень в максимальному ступені відповідає досягненню технічного результату, що заявляється.

Крім того, для створення захисту клітин від загибелі під час ліофільного сушіння використано сахарозо-желатино-молочний кріопротектор, кількість якого добирається емпірично для кожного пробіотичного препарату окремо.

Принцип дії Манозану К, який за своєю природою є ендегенним розгалуженим $\alpha(1-2)\rightarrow\alpha(i-3)\rightarrow\alpha(1-6)$ - зв'язаним полімером D-манопіранози, що продукується дріжджовими грибами роду *Candida*, ґрунтується на лігандній взаємодії з лектиновими рецепторами оболонок пробіотичних бактерій. Його висока активність як мікроагрегатора базується на наявності вільних ОН-груп біля 3-го та 4-го вуглецевих атомах бокових ланцюгів полімеру. Манозан К є цілком доступною і ефективною речовиною, яка поряд з іншими перевагами як сорбента має протівірусні та протипухлинні властивості. (Пат. UA 7462). Слід зауважити, що властивість Манозану К, яка використана в цій заявці, невідома з рівня техніки. Спосіб його отримання розроблено одним із авторів даного винаходу і захищено патентом України (Пат. UA 7462 A61K 35/76, опубл.29.09.1995).

Манозан К може додаватись в процесі росту мікробної культури або після його завершення безпосередньо в середовище росту, або в інше середовище, в якому ресуспендовано мікробну масу, залежно від вибраного технологічного рішення. Утворення агрегатів пробіотичних бактерій відбувається на мікроскопічному рівні, відтак у подальшому викладі вони називатимуться "мікроагрегатами". Їх утворення контролюється мікроскопічно об'єктивами х40 та х90 і має складати від 50 до 99 % відносно до неагрегованої чисельності бактерій.

Експериментально доводиться, що в кишечнику мікроагрегати адгезуються до слизової оболонки кишечника. Завдяки тому, що Манозан К перетравлюється гідролазами шлунко-кишкового тракту, мікроагрегати руйнуються, і вивільнені пробіотичні бактерії через їх високу загущеність, адгезуються в місці дотику зі слизовою оболонкою кишок. При цьому вторинна агрегація доколишніх патогенів - мікробів та вірусів - через зникнення агрегатора стає неможливою.

Вказаний вище механізм утворення мікроагрегатів пробіотичних бактерій з Манозаном К та їх процеси взаємодії із слизовою оболонкою кишечника являють собою основну перевагу технічного рішення, що заявляється.

Терапевтична ефективність мікроагрегатного пробіотичного препарату безпосередньо пов'язана з адгезією бактерій на слизовій оболонці кишечника. У зв'язку з цим був проведений порівняльний аналіз адгезії агрегатованих і неагрегованих біфідобактерій та лактобацил.

Винахід, що заявляється, підтверджується прикладами конкретного виконання.

Приклад 1.

РІВЕНЬ МІКРОАГРЕГАЦІЇ БАКТЕРІАЛЬНОЇ СУСПЕНЗІЇ ЗАЛЕЖНО ВІД КІЛЬКОСТІ МАНОЗАНУК

Добова рідка культура лактобацил та біфідобактерій кожна розливалась по 3 флаконах, в яких містилось: у №1-1 мг Манозану К, у №2-10 мг Манозану К та у №3 – 30 мг Манозану К. До кожного додавалось 10 мл культури. Після цього концентрація Манозану К набула наступних значень: Суміш №1-0,1 мг/мл, Суміш №2-1 мг/мл, Суміш №3-3 мг/мл

Суміші експонували при кімнатній температурі протягом 2 годин до утворення осаду в №3, що було ознакою завершення процесу взаємодії. Після цього придонну частину суміші з кожного флакона переносили кількома краплями на предметне скло, препарати підсушували, фіксували на полум'ї і фарбували, потім мікроскопували під об'єктивами 40х та 90х.

Результати наведені в таблиці 1

Таблица 1

Процентна кількість мікроагрегатів на 100 підрахованих бактерій в полі зору в залежності від № суміші у співвідношеннях Манозану К і кількості бактеріальної суспензії

Вид бактерій	Концентрація клітин на мл	Суміш №1 кількість мікроагрегатів	Суміш №2 Кількість мікроагрегатів	Суміш №3 Кількість мікроагрегатів
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	10^6	2	49	100
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	10^9	2	68	100
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	10^{13}	1	56	100
<i>Bifidobacterium Bifidum</i>	10^6	3	38	100
<i>Bifidobacterium Bifidum</i>	10^9	6	52	100
<i>Bifidobacterium Bifidum</i>	10^{13}	11	41	100
Рівень адгезії до слизової оболонки кишечника КУО/см ²	Без мікроагрегатів і Манозану $1,72 \cdot 10^5$	$9,5 \cdot 10^5$	$1,03 \cdot 10^7$	$8,76 \cdot 10^7$

Наведені в таблиці 1 результати показують, що зі зростанням кількості мікроагрегатів на порядки зростає рівень адгезії, водночас кількість мікроагрегатів пропорційна концентрації Манозану К і може регулюватись в залежності від потреб.

Приклад 2

ЕФЕКТИВНІСТЬ АДГЕЗІЇ МІКРОАГРЕГОВАНИХ І НЕАГРЕГОВАНИХ ПРОБІОТИЧНИХ БАКТЕРІЙ (БІФІДОБАКТЕРІЙ) ДО СЛИЗОВОЇ ЖИТТЄСПРОМОЖНИХ ФРАГМЕНТІВ КИШЕЧНИКУ ЛЮДИНИ

Готували суспензію мікроагрегованих біфідумбактерій. Для цього до 30 мл рідкої культури біфідумбактерій додавали 30 мг Манозану К і підрожували суміш в термостаті при 37 °С добу. Для випробування адгезії отримували видалений від людини в результаті хірургічного втручання фрагмент товстого кишечника. Як правило, при операції фрагмент кишки видаляється в межах здорової тканини. Клаптика такої здорової тканини достатньо для випробування адгезії пробіотичних бактерій. Від здорової частини фрагмента відсікали 2 шматочки, вимірювали площу їх слизової оболонки, після чого їх занурювали в суспензію мікроагрегованих (дослід) та неагрегованих (контроль) пробіотичних бактерій, і витримували 60

хв. для здійснення адгезії. Надалі для видалення неспецифічних адгезованих бактерій кожний фрагмент 4-кратно відмивали в змінюваному розчині Хенкса. Після цього під бінокулярним мікроскопом відсепаровували слизову оболонку, яку потім дезінтегрували в 0.25 % розчині трипсину. Дезінтеграт висівали на живильне агаризоване середовище Блауроку або інше придатне для вирощування анаеробів середовище для наступного підрахунку числа колоній. Посіви вміщували в анаеробних умовах в термостат при 37 °C на добу. На другий день підраховували кількість вирослих колоній і зробили перерахунок на квадратний міліметр площі слизової оболонки кишки. Результати, наведені в таблиці 2, показують, що рівень адгезії мікроагрегованих біфідобактерій на порядок вищий за такий, що спостерігається при використанні тієї ж концентрації не агрегованих в суспензії біфідобактерій. Цим на рівні адгезії підтверджується висока терапевтична здатність заявленої пробіотичної фармацевтичної композиції.

Таблиця 2

Адгезія неагрегованих біфідобактерій порівняно з адгезією мікроагрегованих біфідобактерій на слизовій кишечнику людської кишки.

Концентрація бактерій, КУО на мл	Мікроагрегатор	Рівень адгезії на поверхні слизової (КУО на см ²)	Кратність підвищення рівня адгезії
10 ⁶	-	1,72·10 ⁵	1
10 ⁸	-	9,5·10 ⁵	5,55
10 ⁶	Манозан К	4,32·10 ⁶	25,1
10 ⁸	Манозан К	7,34·10 ⁶	42,69
10 ¹³	Манозан К	1,03·10 ⁷	60,2

Приклад 3.

ЕФЕКТИВНІСТЬ АДГЕЗІЇ МІКРОАГРЕГОВАНИХ І НЕАГРЕГОВАНИХ ПРОБІОТИЧНИХ БАКТЕРІЙ (БІФІДУМБАКТЕРІЙ ТА ЛАКТОБАЦИЛ) ДО СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ КИШЕЧНИКУ ТВАРИН

Додавали 3,0 г Манозану К на 1 л середовища після вирощування пробіотичних біфідобактерій та лактобацил. Для випробування адгезії у еваназованої білої миші асептично відсікали фрагмент тонкого кишечника. Фрагмент розсікали вздовж і нарізували шматочками по 3 мм. Від цього шматочки самотужки вивертались слизовим шаром назовні, утворюючи так звані "муфточки", ширину і довжину яких вимірювали штангель-циркулем для обрахунку площі. Одну фракцію шматочків ("муфточок") занурювали в середовище з мікроагрегатами (дослід), окремо біфідобактерій та окремо лактобацил. Іншу фракцію -у відповідне за концентрацією середовище неагрегованих (контроль) окремо біфідобактерій та окремо лактобацил. Через 60 хвилин кожену фракцію для видалення неспецифічно адгезованої мікрофлори 4-разово відмивали в змінюваному ізотонічному розчині хлориду натрію і пофракційно дезінтегрували в 0.25 % розчині трипсину. Дезінтеграт висівали для підрахунку числа колоній, посіви ставили на 1 добу в термостат при 37 °C. На другий день в посівах підраховували кількість вирослих колоній і робили перерахунок на квадратний міліметр площі слизової оболонки кишки. Результати, наведені в таблиці 3, показують, що рівень адгезії мікроагрегованих біфідобактерій в 28-59 разів вищий за рівень адгезії такої ж за концентрацією неагрегованої суспензії (рідкої культури), а рівень адгезії мікроагрегованих лактобацил в 26-65,5 разів вищий за рівень адгезії такої ж за концентрацією неагрегованої суспензії (рідкої культури).

Таблиця 3

Адгезія неагрегованих біфідобактерій порівняно з адгезією мікроагрегованих біфідобактерій на слизовій оболонці кишечника білих мишей.

Концентрація мікробів, КУО/ мл	Мікроагрегатор	Рівень адгезії на поверхні слизової оболонки (КУО на см ²)	Кратність підвищення рівня адгезії
10 ⁶ біфідобактерій	-	1,15·10 ⁵	1
10 ⁸ біфідобактерій	-	6,8·10 ⁵	5,9
10 ⁶ біфідобактерій	Манозан К	3,33·10 ⁶	28,7
10 ⁸ біфідобактерій	Манозан К	6,8·10 ⁶	59,1

10 ⁶ лактобацил	-	8,39·10 ⁵	1
10 ⁸ лактобацил	-	3,6·10 ⁶	4,3
10 ⁶ лактобацил	Манозан К	2,2·10 ⁷	26
10 ⁸ лактобацил	Манозан К	5,5·10 ⁷	65,5

Цим дослідом доводиться також, що адгезія мікроагрегованих бактерій залежить не стільки від виду пробіотичних бактерій, скільки від стану їх мікроагрегованості.

Приклад 4.

5 ВПЛИВ ПРИЖИВЛЕННЯ У КИШЕЧНИКУ БІФІДОБАКТЕРІЙ МІКРОАГРЕГОВАНИХ З МАНОЗАНОМ К ТА БЕЗ НЬОГО НА РОЗМНОЖЕННЯ КИШКОВОГО ПАТОГЕНА - САЛЬМОНЕЛА ТИФІМУРІУМ

10 Для відтворення приживлюваності було виділено по 10 мишей для неагрегованих і для мікроагрегованих препаратів біфідобактерій. Спочатку, щоб наситити кишечник мишей біфідумбактеріями, їм зранку і надвечір через рот примусово давали по 0,2 мл культури біфідобактерій: перша група мишей отримувала їх в неагрегованому стані, друга - в мікроагрегованому стані. На третю добу всі миші одночасно були заражені через рот по 0,3 мл добової культури *Salmonella typhimurim*. На 4-й день після зараження миші було забито в парах ефіру, стерильно вирізано шматки товстого кишечника. Видалені шматки було зважено і дезінтегровано. Зведений по групах дезінтеграт посіяно в розведеннях на чашки з агаризованим середовищем Плоскирева, посіви поставлено в термостат при 37° С на 1 добу, а потім підраховано кількість вирослих колоній сальмонел. Результати дослідження показано в таблиці 4. Вони свідчать про те, що мікроагреговані бактерії порівняно з неагрегованими, у 26 разів зменшують кишкову популяцію сальмонел.

20 Отже, захисна функція композиції біфідобактерій з Манозаном К у 26 разів вища, ніж у тих же бактерій, що застосовувались у неагрегованій формі.

Таблиця 4

Вплив мікроагрегованої і неагрегованої суспензії біфідобактерій на розвиток популяції сальмонел в кишечнику мишей

Форма суспензії біфідумбактерій	Кількість сальмонел, виявлена в товстому кишечнику мишей(КУО / г)	Рівень захисту
Неагреговані	4285,7	1
Мікроагреговані	164,89	26

Приклад 5

25 ЗАХИСНА ДІЯ МІКРОАГРЕГОВАНОЇ І НЕАГРЕГОВАНОЇ СУСПЕНЗІЇ БІФІДУМБАКТЕРІЙ ТА ЛАКТОБАЦИЛ ПРОТИ ЗАРАЖЕННЯ САЛЬМОНЕЛАМИ ТВАРИН (БІЛИХ МИШЕЙ)

30 Для визначення захисної дії порівнюваних композицій була використана природна інфікуюча доза для використаного штаму сальмонел, яка складала 100 000 мікробів на мишу вагою 20,0. Перед зараженням трьом групам по 10 мишей протягом двох діб відгодовували двічі на день мікроагреговану і немікроагреговану суспензію біфідобактерій. Третя група слугувала контролем і біфідобактерій не отримувала. В той же спосіб трьом групам по 10 мишей протягом двох діб відгодовували двічі на день мікроагреговану і немікроагреговану суспензію лактобацил. Третя група слугувала контролем лактобацил не отримувала. На третю добу всім мишам в ротову порожнину вводили по 100 000 мікробів вірулентного штаму *Сальмонели тифімуриум*. На 35 четвертий день було проведено аналіз на вміст і кількість КУО сальмонел в суспензії випорожнень. Отримані результати показали, що у випорожненнях мишей, що не отримували біфідобактерій, кількість сальмонел на 1.0г випорожнень становила 320187 КУО (табл.5). Кількість сальмонел у випорожненнях мишей, які отримували неагреговані біфідумбактерії, була дещо меншою і складала 204375 КУО/г. У випорожненнях мишей, які отримували 40 мікроагреговані біфідобактерії, кількість сальмонел була в 20,0 разів менша і складала всього 15937 КУО/г. Схожі результати біли отримані при використанні лактобацил. Неагреговані лактобацили захищали від заселення кишечника мишей сальмонелами в 1.93 разу, а мікроагреговані в 11,7 разу.

Таблиця 5

Захисна дія мікроагрегованих і неагрегованих про
біотичних бактерій проти зараження мишей сальмонелами

Форма застосованої суспензії Біфідобактерій	Кількість сальмонел у випорожненнях (КУО/г)	Рівень захисту порівняно з контролем
Неагреговані біфідобактерії	204375	1,6
Мікроагреговані біфідобактерії	15937	20,0
Без біфідобактерій і без лактобацил (контроль)	320187	1,0
Неагреговані лактобацили	165777	1,93
Мікроагреговані лактобацили	27359	11,7

Отже, мікроагрегована композиція мала потужну захисну дію, яка складала від 11,7 до 20 разів відносно до контролю мишей, котрі не отримували пробіотичних бактерій. Разом з тим, захисна дія мікроагрегованих біфідобактерій та лактобацил набагато перевершувала неагреговану композицію. Отримані дані узгоджуються з результатами випробуванням адгезії, а також даними про колонізацію кишечника, які були наведені в попередніх прикладах.

Таким чином, усі дослідження, наведені вище, переконливо свідчать про високий терапевтичний потенціал пробіотичної фармацевтичної композиції, що заявляється.

ФОРМУЛА ВІНАХОДУ

Пробіотична фармацевтична композиція, яка **відрізняється** тим, що пробіотичні бактерії з'єднані між собою у мікроагрегати за допомогою полісахаридної речовини Манозану К, кількість якої в 1 мл бактеріальної суспензії складає від 0,1 до 3,0 мг, а концентрація бактерій в 1 мл суспензії дорівнює від 6 до 13 млрд. КУО.

Комп'ютерна верстка Л. Бурлак

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601