МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ТЕХНОЛОГІЙ ТА ДИЗАЙНУ

Факультет хімічних та біофармацевтичних технологій

Кафедра промислової фармації

 РЕФЕРАТ

до дипломної магістерської роботи

на тему

«Обгрунтування складу лікарського засобу на основі пробіотика та біополімеру для імунокорекції при септичних захворюваннях»

Виконала: студентка II курсу групи МгХФ-19

 226-"Фармація,промислова фармація"

 Олисеєнко І. С.

Керівник \_ к.б.н., доц. Любченко Г.А.\_

 (ініціали , прізвище)

Рецензент\_\_ к.б.н., доц. Короткий О.Г.\_

 (ініціали , прізвище)

Київ – 2020

**Актуальність теми.** Набуті станиімунологічної резистентності та супресії виступають одним з головних етіопатогенетичних чинників при багатьох хворобах інфекційного та неінфекційного ґенезу. З огляду на це одним з важливих принципів сучасної терапії вважається її комплексність із застосуванням в разі необхідності диференційованої імунокорекції. В області застосування нових імуномодуляторів відмічається повільний, але неухильний прогрес та відбувається помітне зрушення - перехід від використання препаратів, отриманих хімічним шляхом, в напрямку сполук природного походження або їх аналогів: рекомбінантних цитокінів, моноклональних антитіл та генної терапії . Тому проблема розширення арсеналу таких лікарських засобів та подальше з’ясування відомостей про імунотропні властивості вже відомих речовин вважається вельми актуальною.

Досягнення експериментальної та клінічної імунології, молекулярної біології та фармакології обумовили народження та бурхливий розвиток принципово нової галузі науки – імунофармакології, яка опікується створенням та вивченням фармакологічних засобів для корекції імунологічних процесів, розробкою ефективних методів імунотерапії.

Імуномодулятори природного походження є активаторами природної імунорезистентності та моноцитарно-макрофагальної системи. Вони забезпечують нормалізацію індукції імунної відповіді, корекцію місцевого імунітету, утворення імуноглобулінів, забезпечення цитопротекції, підвищення резистентності епітеліальних клітин до мутагенів, інгібування росту патогенів, інгібування адгезії патогенів до епітелію, перехоплення і виведення вірусів, підтримання фізико-хімічних параметрів гомеостазу приепітеліальної зони. І особливо значими є використання окремих очищених антигенних субстанцій мікроорганізмів, що звільняє імунну систему від дії різних токсичних та непотрібних компонентів мікроорганізмів та дозволяє ціленаправлено спрямовувати імунотерапію.

 Однією з найперспективніших груп пробіотиків зараз розглядаються бактерії роду *Bacillus* . У першу чергу це пов’язано з їх високою антагоністичною активністю щодо представників патогенної та умовно-патогенної флори. Крім того, бактерії роду *Bacillus* не утворюють біоплівок на слизових оболонках і тому не можуть безконтрольно персистувати в організмі, що зараз розглядається як один із найважливіших аспектів застосування пробіотичних препаратів. Дані антагоністичні бактерії є стійкими до літичних і травних ферментів, зберігають життєздатність вздовж усього шлунково-кишкового тракту.

На початку 1970-х років лікарі почали вважати, що за наявності великої кількості ефективних антимікробних препаратів практично всі бактеріальні інфекції можна вилікувати. Проте їхній оптимізм поступово почав згасати, оскільки з’явилася резистентність до різних антибіотиків у багатьох бактерій, зокрема у *Staphylococcus aureus*. Нині полімедикаментозна резистентність стала поширеною в золотистого стафілокока, і це становить серйозну проблему для практичних лікарів.

Золотистий стафілокок – дуже поширений і стійкий збудник людини, який викликає неабиякий спектр відомих та нозокоміальних захворювань у людей та тварин.

             Еволюція золотистого стафілококу в сучасну антибіотичну епоху була окреслена різноманітними подіями виникнення штаму, багато з яких включають набуття антибіотикорезистентності. Доволі велике навантаження метицилін-резистентного *S. aureus* (MRSA) в галузі охорони здоров’я та суспільстві є основним питанням у всьому світі.

Інфекції *S. aureus* варіюються від легкої інфекції шкіри та м’яких тканин до більш загрозливого для життя ендокардиту, хронічного остеомієліту, пневмонії чи бактеремії, які зв’язані високою захворюваністю та смертністю.Білкові компоненти клітинної стінки стафілококу відіграють надзвичайну роль в регуляції резистентності мікроорганізму до антибіотиків та забезпеченні захисних механізмів впливу на організм*.*

 Білок клітинної стінки (Eap) *Staphylococcus aureus* бере участь у широкому діапазоні міжбілкових взаємодій, що сприяють ініціації та поширенню стафілококової інфекції. Залежно від штаму *S. aureus,* зріла молекула Eap становить ∼50–70 кДа. Білок SERAM (Eap) майже всюди розповсюджується між штамами *S. aureus* і, здається, функціонує саме як детермінант вірулентності на тваринних моделях хронічної інфекції *S. aureus*. В доповнення до своєї добре зарекомендованої ролі у стимуляції процесів, що ґрунтуються на адгезії, таких як агрегація бактерій та інвазія еукаріотичних клітин, також показує, що Eap безпосередньо входить у складні процеси , що залежать від сигналів, такі як набір лейкоцитів і загоєння ран та ангіогенез.

 Поточні дані свідчать про те, що це надзвичайне різноманіття функцій Eap пов'язане з його унікальною здатністю утворювати між білкову взаємодію з масою майже десятка лігандів, включаючи фосфатазу, зберігаючи бактеріальну клітинну поверхність, позаклітинного матрикса хазяїна, такі як колаген, фібронектин, і ламінін, і протизапальний поверхневий адгезин ссавців ICAM-1. Однак структурні адаптації та біохімічні особливості Eap, які дозволяють специфічні взаємодії з такою кількістю різних лігандів, залишаються досі недослідженими.Важливим є встановленні раніше сигнальні механізми молекулярної взаємодії ЕАР з клітинами імунної системи та запуск продукції захисних цитокінів.

В зв’язку з розвитком галузі промисловості і необхідністю забезпечення ринку фармацевтичними препаратами актуальним є розробка виробництва імунокорегуючих засобів мікробного походження комбінованих з іншими субстанціями для посилення імуномодулюючої дії. До таких препаратів належить Субалін — імуномодулюючий пробіотик, розроблений методами генної інженерії, до складу якого входять живі мікробні клітини *Bacillus subtilis*, котрі синтезують α2-інтерферон людини, що визначає його антимікробну, антикандидозну, антивірусну дію та підсилює імуномодулюючий вплив та біополімер клітинної стінки EAP *Staphylococcus aureus* (мМ 70 кДа), що є білком-адгезином, який неспецифічно взємодіє з імуноглобулінами .

Представники нормальної флори забезпечують формування імунітету стимулюючи неспецифічний (стимуляція фагоцитозу, утворення макрофагів, фібробластів та ін.) і специфічний клітинний імунітет (активація Т-лімфоцитів і субпопуляцій). Стимуляція імунокомпетентних клітин бактеріальними антигенами бактерій полісахаридної та білкової природи призводить до збільшення синтезу імуноглобулінів (насамперед sIgА), лізоциму, пропердину, комплементу, цитокінів — ІЛ-1, ІЛ-6, ІЛ-10, ІЛ-12, ІНФ-α, -β, -γ, тумор-некротичного фактора, макрофагального колонієстимулюючого фактора . Також, пробіотики відіграють компенсаторну роль інфекційного фактора, сприяючи реалізації Th1-імунної відповіді і запобігаючи розвитку атопії.

 Імуномодулятори природного походження є активаторами природної імунорезистентності та моноцитарно-макрофагальної системи. Вони забезпечують нормалізацію індукції імунної відповіді, корекцію місцевого імунітету, утворення імуноглобулінів, забезпечення цитопротекції, підвищення резистентності епітеліальних клітин до мутагенів, інгібування росту патогенів, інгібування адгезії патогенів до епітелію, перехоплення і виведення вірусів, підтримання фізико-хімічних параметрів гомеостазу приепітеліальної зони. І особливо значими є використання окремих очищених антигенних субстанцій мікроорганізмів, що звільняє імунну систему від дії різних токсичних та непотрібних компонентів мікроорганізмів та дозволяє ціленаправлено спрямовувати імунотерапію. До таких препаратів належить Субалін — імуномодулюючий пробіотик, розроблений методами генної інженерії, до складу якого входять живі мікробні клітини *Bacillus subtilis*, котрі синтезують α2-інтерферон людини, що визначає його антимікробну, антикандидозну, антивірусну дію та підсилює імуномодулюючий вплив та біополімер клітинної стінки EAP *Staphylococcus aureus* (мМ 70 кДа), що є білком-адгезином, який неспецифічно взємодіє з імуноглобулінами.

Інтерферон є важливим фактором імунітету, складовою першої лінії антиінфекційного захисту. α2-інтерферон, що синтезується за дії *Bacillus subtilis* та білку-адгезину ЕАР, є необхідним для розвитку Тh-1-імунної відповіді та активації макрофагів. Інтерферон α-2 суттєво підвищує активність макрофагів та природних кілерів стосовно різних клітин-мішеней, інфікованих вірусом. У свою чергу, активовані макрофаги можуть виділяти про- та протизапальні цитокіни, що забезпечують каскад продукції протективних факторів, регулюють інтенсивність запальних реакцій. Перевагою інтерферонів є неспецифічний противірусний ефект. Крім того, одним із цікавих ефектів інтерферонів є його здатність справляти антибактеріальну дію за рахунок вироблення NO-синтетази, що є потужним бактерицидним фактором . У той же час він характеризується високою антагоністичною активністю щодо патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів (зокрема *Shigella sonnei, Salmonella typhimurium, Esherichia coli, Staphylococcus aureus, Candida* *albicans, Proteus vulgaris, Klebsiella pneumoniae*), що зумовлена здатністю синтезувати до 70 різноманітних антибактеріальних речовин. *Bacillus subtilis* виділяють у просвіт кишечника субтилізин та ферменти, що допомагають руйнувати і виводити ендотоксини патогенної та умовно-патогенної флори. Крім того, ферменти *Bacillus subtilis* беруть участь у процесі пристінкового травлення. На основі штаму *Bacillus subtilis* УКМ В-5020 був створений пробіотик Субалін (виробництва ПрАТ «Біофарма»), що за рахунок вищезазначених властивостей проявляє антивірусну, антибактеріальну та імуномодулюючу дію, сприяє нормалізації якісного і кількісного складу кишкової мікрофлори. Препарат сприяє повному відновленню кількісного рівня власної мікрофлори кишковика (біфідобактерій, лактобацил, кишкової палички). Отже, Субалін запобігає виникненню повторних інфекцій та бере участь у процесах нормалізації місцевого та загального імунітету.

**Мета дослідження:** вивчення імунобіологічних властивостей та імуномодулюючої дїї препаратів нанорозмірного білка-адгезину *Staphylococcus aureus* (EAP) (мМ 70 кДа) та Субаліну в різних комбінаціях залежно від використаних доз. Оцінювали їх вплив на синтез ендогенного інтерферону та фактору некрозу пухлин з метою створення моделі комбінованого імунобіологічного препарату для забезпечення протективного імунітету.

 **Об’єкт дослідження:** Препарати Субалін, що сприяє відновленню нормальної мікрофлори організму та ЕАР, що має імунокорегуючу дію. Фармакологічні впливи Субаліну комбінованого з біополімером клітинної стінки стафілокока, продукція цитокінів.

 **Предмет дослідження:** вивчення імунобіологічної активності розробленого комбінованого препарату. Обгрунтування складу та технології виробництва комбінованого лікарського засобу.

**Методи дослідження:** технологічні аспекти виробництва фармацевтичного препарату Субалін, мікробіологічні (вирощування культур мікроорганізмів), біохімічні (виділення та очистка препаратів), імунобіологічні (імуномодyлюючa дiя, продукція цитокінів – ІФН, ФНП-α, визначення фагоцитарної активності нейтрофілів, імуноферментний аналіз ELISA, моделювання стафілококової інфекції *in vivo*);статистичні.

**Завдання дослідження:**

1. Вивчити поєднану дію препарату Субалін та біополімеру стафілокока ЕАР (мМ 70 кДа).
2. Оцінити їх вплив на синтез ендогенного інтерферону на моделі стафілококової інфекції у мишей та на продукцію фактора некрозу пухлин за допомогою біотесту по цитотоксичному впливу на клітини-мішені пухлинної лінії L929 трансформованих фібробластів мишей за допомогою колориметричного методу.
3. Визначити специфічну фармакологічну активність Субаліну з додаванням біополімера стафілокока природного походження.
4. Створити модель та розробити склад комбінованого імунобіологічного препарату для забезпечення протективного імунітету при септичних захворюваннях.
5. Зробити аналіз та вибір технології виробництва комбінованого імунокорегуючого препарату на основі пробіотика та біополімеру.

 **Наукова новизна роботи :** вперше проведене дослідження вивченняфармакологічної та імунобіологічної активності комбінованого препарату, запропоновано поєднання інгредієнтів для забезпечення імуномодулюючої та імунокорегуючої дії і створення нового лікарського засобу.

Науково та експериментально обгрунтовано склад та технологію виробництва комбінованого імунокорегуючого засобу, основними діючими речовинами якого є Субалін та білок-адгезин клітинної стінки стафілокока ЕАР.

 **Практичне значення роботи:**

1. Отримані результати дослідження можуть бути використані для поєднаного застосування з метою оптимізації процесу розробки біофармацевтичних препаратів, що проявляють антибактеріальну, імуномодулюючу та імунокорегуючою дією при септичних захворюваннях.
2. Досліджуваний біополімер мікробного походження може бути використаним для поєднаного застосування з метою оптимізації процесу розробки біофармацевтичних препаратів, що посилюють стійкість імунної системи, мають імунотерапевтичні впливи та забезпечують протективний імунітет.
3. Існуюча технологічна схема виробництва Субаліну може бути використана для виробництва фармацевтичного препарату, та оптимізована додаванням біополімеру ЕАР стафілокока як біофармацевтичного інгредієнту, оскільки дозволяє використати вже існуючі потужності виробництва та обладнання.
4. Запропонований склад комбінованого лікарського засобу є перспективним для подальшого дослідження фармакологічних, біофармацевтичних властивостей та розробки нових лікарських форм препаратів.

# ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ

Запропоновано склад нового лікарського засобу з інгібуючою активністю, що володіє противірусною та імунокорегуючою дією.

Дослідження проводили на моделі стафілококової інфекції у мишей при визначенні впливу досліджуваного комбінованого препарату на продукцію ендогенного інтерферону та фактору некрозу пухлин встановлено протекторну дію. Спостерігали стимуляцію продукції ендогенного ІФН -2,0-2,5 рази та синтезу ФНП у сироватці крові мишей у 1,8-2,0 рази при профілактичному застосуванні комбінації препарату з біополімером ЕАР.

В якості АФІ, використано комбінацію пробіотику Субаліну і білку-адгезину стафілококу ЕАР. Досліджуваний біополімер мікробного походження може бути використаним для поєднаного застосування з метою оптимізації процесу розробки біофармацевтичних препаратів, що володіють противірусною та антибактеріальною дією, імунокорегуючими впливами для забезпечення протективного імунітету.

Отримані результати свідчать про синергізм дії препаратів при застосуванні біополімеру стафілокока та білку - адгезину ЕАР.

Існуюча технологічна схема виробництва може бути використана в умовах реального фармацевтичного виробництва та оптимізована додаванням нанорозмірного біополімеру природного походження, як біофармацевтичного інгредієнту, оскільки дозволяє використати вже існуючі потужності виробництва та обладнання.

**Обсяг та структура магістерської роботи**. Структуру роботи становлять вступ, три розділи, висновки, список використаних джерел (108 найменувань) та додатків. Загальний обсяг магістерської роботи 93 сторінки комп’ютерного тексту (без додатків). Додатків 2 на 7 стор, 2 рис. та список використаних джерел літератури.

**Апробація результатів дослідження.** V Міжнародна науково-практична Інтернет-конференція «Технологічні та біофармацевтичні аспекти створення лікарських препаратів різної направленості дії», м. Харків, 26 листопада 2020 року

**Публікації.** Основні результати дипломної магістерської роботи:

- опубліковані у статті: Олисеєнко І.С., Любченко Г.А. Імуномодулююча дія комбінованого лікарського засобу на основі поверхневого нанорозмірного компоненту клітинної стінки стафілокока та пробіотику // Матеріали V Міжнародної науково-практичної інтернет - конференції. – 2020. – С. 348-356;

- апробовані на міжнародній науково-практичній конференції «Технологічні та біофармацевтичні аспекти створення лікарських препаратів різної направленості дії». Олисеєнко І.С., Любченко Г.А. Імуномодулююча дія комбінованого лікарського засобу на основі поверхневого нанорозмірного компоненту клітинної стінки стафілокока та пробіотику. Матеріали V Міжнародної науково-практичної інтернет – конференції «Технологічні та біофармацевтичні аспекти створення лікарських препаратів різної направленості дії», 26 листопада 2020 року, м. Харків, С. 348-356;

**Ключові слова:** *Staphylococcus aureus*, біополімер ЕАР, пробіотик Субалін, цитокіни, фагоцитоз, імунокорекція.