

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ – ИНСТИТУТ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОБЛЕМ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

Усанова Нонна Альбертовна

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ
АУТОПРОБИОТИКОВ В КАЧЕСТВЕ СРЕДСТВ КОРРЕКЦИИ
МИКРОФЛОРЫ ЧЕЛОВЕКА В УСЛОВИЯХ ГЕРМОИЗОЛЯЦИИ И
СУХОЙ ИММЕРСИИ**

Специальность 3.3.7. – авиационная, космическая и морская медицина

Диссертация
на соискание ученой степени кандидата
биологических наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН
Ильин Вячеслав Константинович

Москва - 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

	Стр.
ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1 Обзор литературы	8
1.1 Микробиологические риски орбитальных пилотируемых космических полетов	
1.2 Синдром нарушения колонизационной резистентности	16
1.3 Микрофлора человека и ее коактанты	20
1.4 Протективные группы микроорганизмов у человека	27
1.5 Пробиотики как средство профилактики синдрома нарушения колонизационной резистентности	31
1.6 Существующий опыт использования аутопробиотиков в мире	41
1.7 Индексы и коэффициенты, применяемые для оценки микробиоценоза организма	50
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	52
2.1 Структура и объем выполненных работ	
2.2 Моделирование экспериментов	53
2.3 Методы микробиологических исследований	54
2.4 Определение видовой принадлежности и исследование на наличие факторов патогенности при помощи молекулярно-генетических методов	56
2.5 Изоляция и идентификация аутологичных культур и приготовление аутопробиотиков	58
2.5.1 Идентификация чистой культуры аутопробиотика	58
2.5.2 Изготовление аутопробиотика	59
2.5.3 Описание методов статистического анализа	60
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	62
3.1. Эубиотический индекс	
3.1.1 Расчет эубиотического индекса для оценки эффективности использования пробиотических средств	63

3.2 Анализ архивных данных по исследованию микробиоты испытателей в гермокамерных экспериментах продолжительностью до 20 суток	65
3.2.1 Экспериментальное обоснование использования аутопробиотических средств для стабилизации микробиоценоза организма животных	75
3.3 Исследование эффективности аутопробиотических средств в экспериментах с длительной изоляцией	107
3.3.1 Тестирование аутопробиотика на наличие генетических детерминантов патогенности и антибиотикорезистентности аутоштаммов <i>Enterococcus faecium</i>	108
3.3.2 Оценка эффективности аутопробиотиков в экспериментах со 105-суточной изоляцией и «Марс-500»	109
3.3.3 Исследование эффективности в изоляционном эксперименте продолжительностью 520 суток (Марс-500)	112
3.3.4 Исследование активности аутопробиотиков в эксперименте «Сухая иммерсия»	128
ОБСУЖДЕНИЕ	133
ВЫВОДЫ	141
Список литературы	142

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы.

В настоящее время не вызывает сомнений необходимость исследований состояния естественных барьеров колонизации, формируемых у человека на пути инфекционного агента, для выработки стратегии экологического подхода к проблемам профилактики инфекций у человека, находящегося в измененных, экстремальных условиях обитания. Экологическая система человек-микрорганизмы весьма сложна и взаимоотношения в ней определяются многочисленными факторами. От понимания процессов регулирования взаимоотношений в этой системе в главной степени зависит стратегия выбора средств, которые направлены на коррекцию нарушений барьеров колонизационной резистентности, формируемой организмом человека на пути возбудителя инфекции.

В современных условиях резко возросло число стрессовых воздействий и неблагоприятных экологических факторов, сопровождавшихся глубокими нарушениями микробной экологии организма хозяина /Лизько, 1980; Ленцнер с соавт., 1980; Бернхардт, Кноке, 1988; Викторов, 1986; Поликарпов, 1991; Ильин с соавт., 2005/. Следствием этих влияний являются формирование различного вида дисбиозов и вторичных иммунодефицитных состояний, при которых резко снижается резистентность организма, как к экзогенной инфекции, так и к эндогенным ее очагам, формирующимся на поверхности слизистых открытых полостей.

В настоящее время дисбиоценоз рассматривается как клинко-лабораторный синдром, которые выявляется у людей экстремальных профессий – космонавтов, моряков дальнего плавания, подводников, спортсменов-профессионалов. Отмечается дисбиоценоз и у лиц, подвергающихся воздействию неблагоприятных экологических факторов, у иммуносупрессированных больных и у детей при транзиторных состояниях /Гончарова, 1970/. Дисбиоценоз характеризуется исчезновением или снижением количества некоторых облигатных представителей нормальной

микробиоты, увеличением частоты выявления концентрации представителей факультативной микрофлоры и возможности появления необычных для данного биотопа видов бактерий /Ильин, 2005/.

Для коррекции дисбиозов повсеместно используется широкий арсенал пробиотических препаратов, основанных на коллекционных штаммах микроорганизмов – представителей защитных групп. Пробиотики используются космонавтами и водолазами глубоководниками по специальным схемам. Вместе с тем, активность этих пробиотических препаратов определяется в первую очередь приживляемостью микроорганизмов, находящихся в их составе, в организме хозяина /Ильин, 1997/.

Одним из направлений современной профилактики и терапии дисбиозов стало использование в качестве пробиотиков аутологичных штаммов микроорганизмов – представителей протективной микробиоты (аутопробиотиков). Развитию данной концепции послужили предположения о том, что внедряемые в макроорганизм пробиотические микроорганизмы способны вызывать дисбаланс в аутомикрофлоре хозяина, вследствие антагонизма индигенных и промышленных штаммов /Глушанова, Шендеров, 2005/. Согласно мнению Б.А. Шендерова (1998), еще в период внутриутробного развития организм ребенка готовится принять микробиоту матери в качестве «своей», или, другими словами у него формируется иммунологическая толерантность к нормальной микробиоте. Представляется, что аутопробиотики в ряду комплекса средств персонифицированной профилактики могут являться активным фактором противодействия развитию синдрома нарушения колонизационной резистентности, в первую очередь первого барьера колонизации – аутохтонной протективной микробиоты – у человека в измененной среде обитания.

Целью работы является: Экспериментальное обоснование использования аутопробиотиков в качестве средств коррекции микрофлоры человека в условиях гермоизоляции и сухой иммерсии.

Задачи:

1. Осуществить анализ архивных данных микробиологических исследований микрофлоры профессиональных испытателей и волонтеров в гермокамерных экспериментах различной длительности, проводимых в период с 1980 по 1990 годы в Институте медико-биологических проблем.

2. Разработать эффективный критерий оценки динамики изменений количественного и родового состава микрофлоры организма под влиянием факторов измененной среды обитания и использования препаратов.

3. Исследовать эффективность воздействия аутопробиотиков на количественный и родовой состав микрофлоры животных, а также человека в экспериментах с длительной изоляцией и сухой иммерсией

Научная новизна.

Впервые продемонстрировано стабилизирующее воздействие аутопробиотиков на качественные характеристики кишечной микробиоты, микробиоты верхних дыхательных путей и покровных тканей в экспериментах с участием человека, моделирующих воздействие таких факторов космического полета, как длительная изоляция в гермообъекте и невесомость (эксперимент «сухая иммерсия»), а также животных в экспериментах, симулирующих воздействие таких факторов космического полета, как радиация. Проведены сравнительные исследования микрофлоры кишечника у человека в период длительной изоляции без приема профилактических средств, с приёмом профилактических средств на основе пробиотиков, выполненных на основе коллекционных культур и аутопробиотиков.

Научно-практическая значимость работы.

Обоснован курс приема аутопробиотических средств с целью оптимизации качественного состава микробиоценоза операторов гермопомещений в период острой адаптации с целью профилактики развития синдрома нарушения колонизационной резистентности. Разработан и доработан эубиотический индекс для оценки динамики изменений

качественного состава микробиоценоза (родовой и видового состава микробиоты) организма под влиянием факторов измененной среды обитания и использования препаратов.

Положения, выносимые на защиту:

1. Эубиотический индекс является информативным критерием оценки динамики изменений качественного состава микробиоценоза организма под влиянием факторов измененной среды обитания, и использования препаратов, в том числе аутопробиотиков.
2. Аутопробиотики на основе микроорганизмов вида *Enterococcus faecium* и рода *Lactobacillus* осуществляют эффективную оптимизацию качественного состава микробиоценоза кишечника в составе аутопробиотических препаратов у человека в искусственной среде обитания (изоляция, имитируемая невесомость).

Степень достоверности результатов проведенных исследований

Диссертационная работа выполнена с использованием комплекса современных микробиологических и генетических методов исследования. Проведена адекватная статистическая обработка данных. Выносимые на защиту положения и выводы основаны на достоверных результатах исследований, проиллюстрированными рисунками и таблицами. Результаты проведенных исследований были представлены в форме устных и стендовых докладов на следующих научных конференциях: XVII Конференция по космической биологии и аэрокосмической медицине с международным участием, посвященная 100-летию со дня рождения академика О.Г.Газенко 2018 г.; 53-и Научные чтения памяти К.Э.Циолковского 2018 г.; симпозиум «Человек в космосе» (IAA Humans in Space Symposium) 2019 г.; XLVI Общественно-научные чтения, посвященные памяти Ю.А.Гагарина 2019 г.; 55-ые Научные чтения памяти К.Э.Циолковского 2020 г.; XLVIII Общественно-научные чтения, посвященные памяти Ю.А.Гагарина 2021 г.; 56-е Научные чтения, посвященные памяти К.Э.Циолковского 2021 г.; XXIII Международный симпозиум «Человек в космосе» (Human in Space

Symposium) 2021 г.; V Международная научная конференция "Микробиота человека и животных", Россия, Санкт-Петербург, 11-13 октября 2023; XVIII конференция по космической биологии и авиакосмической медицине с международным участием «Земля - Орбита – Дальний космос», 7-8 ноября 2023 года. Результаты работы опубликованы в журналах, входящих в Перечень рецензируемых научных изданий ВАК и индексируемых в базах данных Web of Science и/или Scopus, а также в сборниках докладов научных конференций.

Связь работы с научными программами

Работа выполнена при поддержке программы фундаментальных исследований ГНЦ РФ – ИМБП РАН, тема 64.2

Структура и объём диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, 3 глав, заключения, выводов, списка цитируемой литературы. Диссертация иллюстрирована 57 рисунками и 29 таблицами, 5 формулами. Основной текст изложен на 159 страницах. Библиографический указатель включает 153 источников литературы (80 отечественных и 73 иностранных).

ГЛАВА 1 Обзор литературы

1.1 Микробиологические риски орбитальных пилотируемых космических полетов

Искусственно измененная среда обитания создается человеком тогда, когда он познает природу вещей, лежащих вне рамок повседневных условий существования. Это, в первую очередь, касается освоения космоса, в том числе планет солнечной системы. Для решения этих задач создаются искусственные антропоэкосистемы с измененными параметрами среды обитания. В таких измененных условиях филогенетически сложившееся

взаимоотношение коактантов экологической системы «человек-микроорганизмы» претерпевает изменения. Оно принимает форму синдрома нарушения колонизационной резистентности /Ильин, Кирюхина, 2014/.

Наше столетие ознаменовалось освоением человеком регионов Земли и околоземного пространства, что обусловлено интенсивным взаимодействием законов биосферы с деятельностью человеческого разума. Освоение космического пространства требует личного участия человека, деятельность которого осуществляется в условиях все возрастающих чрезвычайных эмоциональных и физических нагрузок.

В настоящее время, в связи с разработкой программы межпланетных полетов, особую важность приобретает проблема обеспечения инфекционной безопасности членов экипажей длительно действующих орбитальных станций. На важность этой проблемы указывали исследователи еще в те времена, когда космические полеты не были столь продолжительными /Алексеева, 1965/. Так, было сформулировано положение о периодическом накоплении потенциала патогенности в системе «человек-микроб» в длительном космическом полете /Викторов с соавт., 1991/. Одной из составляющих этой концепции было формирование массивных очагов контаминации условно-патогенными микроорганизмами различных биотопов человеческого организма. Опасность данного процесса велика с точки зрения возможности развития оппортунистических инфекций у человека в космическом полете. С течением времени эксплуатации космических станций начинают образовываться и длительно существовать штаммы, по своим свойствам напоминающие госпитальные. Можно предположить, что в условиях межпланетных полетов и эксплуатации лунных баз, в условиях частой (полной и частичной) сменяемости экипажей из различных географических регионов Земного шара интенсивность формирования штаммов с указанными особенностями может быть весьма велика. С другой стороны, имеются свидетельства очевидного угнетения колонизационной резистентности космонавтов в условиях космического полета. Это

обстоятельство определяет необходимость поиска эффективных средств укрепления колонизационной резистентности космонавтов /Puin, et al. 1992, Puin et al., 1998, Puin, 2005/.

Инфекционная безопасность космических полетов представляет собой один из важнейших аспектов медицинского обеспечения этих мероприятий. На протяжении многих лет рядом исследователей была продемонстрирована активизация условно-патогенной микрофлоры человека в процессе пребывания его в герметично замкнутых объектах различных назначений. Многие авторы указывают на большую вероятность появления инфекционных заболеваний в специфичных условиях обитания, создающихся на космическом корабле. При этом подчеркивалось, что возбудителями инфекционных заболеваний в условиях космического корабля могут оказаться представители микрофлоры членов экипажа. Отличительными особенностями этих микроорганизмов является их способность вызывать инфекционные заболевания при наличии определенных условий, основными из которых являются снижение иммунологической реактивности и своеобразие микробиологической обстановки, формирующейся в герметично замкнутом помещении. Основными этиологическими агентами инфекционных заболеваний в этих случаях являются представители аутомикрофлоры человека, а также возможно перекрестное инфицирование, когда возбудитель передается от носителей к восприимчивому организму. В качестве источника инфекции можно рассмотреть два ее вида - антропогенные и неантропогенные. В числе первых главнейшую роль играет носительство операторами герметично замкнутых помещений облигатно - и условно-патогенных микроорганизмов /Ильин, 2005/.

При пребывании человека в условиях герметично замкнутых помещений в течение длительного времени происходит активизация условно-патогенной микрофлоры обследуемых. Так, было показано /Поликарпов, 1982/, что у космонавтов, совершивших 8-суточные полеты,

количество условно-патогенных микроорганизмов возрастало в сотни и тысячи раз, увеличивалось и число энтеробактерий, способных к образованию ферментов патогенности. Борисовой О.К. (1976) было установлено, что в процессе пребывания людей в гермообъектах, происходит замена авирулентных штаммов *Clostridium perfringens* на вирулентные. Та же тенденция прослеживалась в работе Прохорова для штаммов *Staphylococcus aureus* /Прохоров, 1971/.

Первые исследования состава микробиоты человека до и после космического полета были проведены Алексеевой О.Г (1965). Полученные ею экспериментальные данные свидетельствовали о наличии определенных сдвигов в составе микрофлоры полостей рта и зева, а также кожных покровов экипажей космических кораблей "Восток". Возможность развития неблагоприятных изменений в составе аутомикрофлоры экипажей космических кораблей была подтверждена при осуществлении многочисленных модельных исследований с участием обследуемых в герметично замкнутых помещениях. Большой интерес представляли данные, полученные при осуществлении в 1970 году 18-суточного полета космического корабля "Союз-9". Как показали результаты исследований, наиболее выраженные изменения после окончания полетов были выявлены в составе микрофлоры полости носа и кожных покровов космонавтов. В обзоре, посвященном обобщению результатов космического полета кораблей серии "Аполлон" сообщалось о сдвигах в составе микрофлоры кожи членов экипажа, проявляющихся в превалировании грамположительных кокков (стафилококков и стрептококков), некотором угнетении анаэробных представителей микрофлоры, временной колонизацией верхних дыхательных путей чужеродными микроорганизмами, главным образом, стафилококками, что могло явиться результатом микробного обмена /Taylor, 1974/. Суммируя литературные данные, можно определить перечень микроорганизмов, представляющих собой вероятных возбудителей инфекционных заболеваний дыхательного тракта и кожных покровов у

космонавтов. В первую очередь к ним относятся патогенные стафилококки, стрептококки и представители семейства *Enterobacteriaceae*, а также клостридии, синегнойная палочка и грибы /Ильин, 2014; Лизько, 1987; Лизько, 1991/.

Внимание также уделялось вопросам оптимизации микробиоценоза личного состава, обслуживающего космические полигоны, с помощью пробиотиков, в том числе кисломолочных продуктов /Рахманов с соавт., 1991/.

В течение времени пребывания на космической орбитальной станции у космонавтов существенно меняется состав нормальной микробиоты, в результате чего угнетается резистентность организма человека к проникновению в него инфекционных агентов. В годовом медико-техническом эксперименте у обследуемых в кишечнике были зарегистрированы резкое уменьшение, вплоть до полного исчезновения, количества бифидобактерий и лактобацилл, снижение ферментативной и антагонистической активности у штаммов кишечной палочки, обмен штаммами кишечной палочки, увеличение токсигенности ряда организмов /Поликарпов, 1991/. Результаты микробиологических исследований в имитационных экспериментах были подтверждены в условиях реальных космических полетов. Так, по данным Taylor с соавт., (1974), при обследовании членов экипажей «Аполлон» и «Скайлэб» отмечалось снижение числа анаэробных и возрастание аэробных микроорганизмов различных видов. Особую значимость представляют данные по выделению у космонавтов условно-патогенных микроорганизмов, таких как *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacteriaceae*. Важность этих исследований подтверждается тем, что именно этим микробам в последние годы приписывают этиологическую роль в возникновении ряда инфекционных заболеваний. Поэтому, особое внимание должно уделяться принципам химиотерапии космонавтов в случае возникновения у них инфекционных заболеваний, вопросам устойчивости

бактериальных культур к антибиотикам. Отмечались изменения чувствительности к антибиотикам штаммов условно-патогенных микроорганизмов, выделенных от космонавтов во время 7-ми и 96-ти суточных космических полетов /Викторов 1986, Лизько, 1987/.

В течение 7-суточного полета у одного из членов космического экипажа наблюдалось значительное возрастание устойчивости штаммов *Staphylococcus aureus* к антибиотикам бензилпенициллину, ампициллину, олеандомицину, линкомицину. В процессе 96-суточного полета космонавтов в составе их микрофлоры было выявлено появление тетрациклин - резистентных штаммов кишечной палочки, что, было связано с сегрегацией и спонтанной элиминацией плазмиды, попавшей в гермообъект и циркулирующей там некоторое время. /Ильин, автореферат диссертации канд. мед. наук. 1989/. Изменения чувствительности к антибиотикам связывали с изменением ультраструктурных изменений клеток микроорганизмов /Tixador et al., 1985/. Однако более вероятной причиной изменения лекарственной чувствительности у космонавтов исследователи считали распространение R-плазмид, тем более что признаки лекарственной устойчивости легко передавались штамму реципиенту в лабораторных условиях /Ильин, 1988/

При длительном пребывании людей в кабине космического корабля и гермозамкнутом помещении ограниченного объема в формировании микрофлоры членов экипажа приобретают определенное значение экологические факторы, поскольку в этих условиях обитания характерно формирование экосистемы, состоящей из биогенных и абиогенных компонентов. В этой системе человек является основным компонентом. Результаты, полученные в процессе многолетней эксплуатации орбитальных станций, свидетельствуют о том, что в условиях полета в состоянии микробиоценозов слизистых оболочек полостей носа, а также рта и зева космонавтов отмечались признаки активации условно-патогенного компонента, представленного стафилококками и грамотрицательными

бактериями. В отношении стафилококковой флоры они выражались в возрастании массивности ранее имевшихся очагов патогенных стафилококков или образовании новых очагов в результате колонизации экзогенными культурами, источниками которых служили другие члены экипажей или экспедиций посещения. При этом в ряде случаев, из гетерогенных популяций золотистого стафилококка, вегетирующих в открытых биотопах космонавтов, происходил отбор штаммов определенного биотипа, которых отличала способность к «эпидемическому» распространению в изолированном коллективе, что проявлялось в формировании промежуточного носительства у новых хозяев. Учитывая, что участвующие в нем штаммы *Staphylococcus aureus* продуцировали токсины и, следовательно, вызывали определенную иммунологическую перестройку организма реципиента, он может быть квалифицирован, как безманифестная форма стафилококковой инфекции. Появление же клинических симптомов, как это имело место в отдельных случаях, могло быть спровоцировано дополнительным воздействием на организм какого-либо неспецифического травмирующего или астенизирующего фактора. Особую роль сыграла стабильность бактериальных аэрозолей в условиях микрогравитации, наиболее ярко продемонстрированная в условиях полета станции «Салют-7», в котором штаммы золотистого стафилококка из состава микробиоты экипажа, покинувшего станцию, сохранялись в составе микробиоты среды станции и впоследствии контаминировавшие верхние дыхательные пути космонавтов из состава экипажа, прибывшего на станцию около полугода спустя /Лизько, 1987/.

Наряду с этим, типичным процессом, характеризующим изменения состояния микробиоценозов у людей в условиях космического полета, являлось заселение слизистых оболочек полости носа, полости рта и зева, реже покровных тканей, несвойственными для этих биотопов грамотрицательными бактериями: *Proteus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*,

Citrobacter, *Escherichia coli*, роль, которых в качестве возбудителей нозокомиальных инфекций хорошо известна /Ильин, 1988/.

Целый ряд бактерий, например микроорганизмы родов *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, способны вызывать инфекционные поражения верхних дыхательных путей /Поликарпов, 1989/. Существует взаимосвязь между величиной бактериальной популяции в составе аутомикрофлоры толстого кишечника и экстраинтестинальной транслокацией этих бактерий. Установлена корреляционная зависимость между дисбактериотическими сдвигами в составе кишечной микрофлоры человека и наличием воспалительных заболеваний челюстно-лицевой области /Бевз и др., 1994/.

Параллельно с этими изменениями в состоянии микробиоты космонавтов на элементах среды обитания орбитальных станций отмечалось формирование специфических резервуаров накопления и размножения микроорганизмов - в первую очередь грамотрицательных бактерий и плесневых грибов, относящихся к так называемым патогенным сапрофитам. Все эти данные дают основание представить схему (рис.1) распространения условно-патогенных микроорганизмов в кабинах пилотируемых космических аппаратов /Ilyin et al., 2005/.

Spread polyresistant plasmid carrying strains among isolated volunteers.

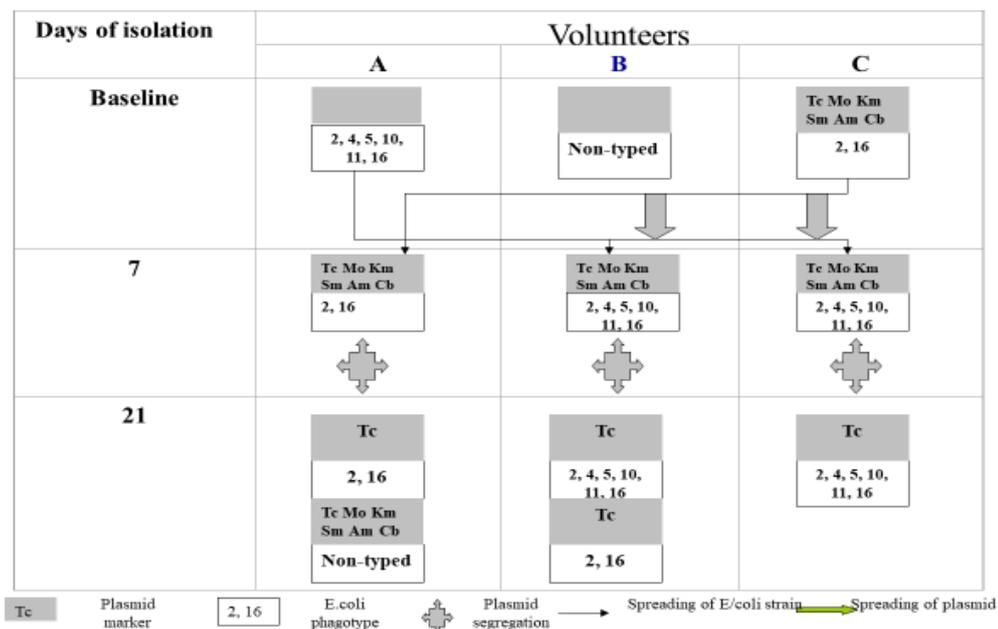


Рисунок 1. Схема распространения микроорганизмов в гермообъекте (Шуин, 2005)

В соответствии с этой схемой, их распространение может проходить как в результате прямого контакта с носителем, так и опосредованно, при участии элементов среды обитания. В последнем случае из основных биотопов передних отделов полости носа, полости рта и зева, пищеварительного тракта микроорганизмы могут попадать на различные участки кожных покровов носителя, постоянно выделяться при кашле, при дыхании, артикуляции в газовую среду, поступать в ассенизационное устройство. В результате непосредственного контакта, а также процессов аэрогенной контаминации указанные микроорганизмы обсеменяют конструкционные материалы интерьера и используемые системы жизнеобеспечения. Здесь, как это было показано, возможно формирование при наличии благоприятных условий (локальное повышение температуры, влажности, скопление конденсата атмосферной влаги, продуктов жизнедеятельности человека) специфических резервуаров накопления и размножения микрофлоры /Ильин с соавт., 1989/.

1.2 Синдром нарушения колонизационной резистентности

Характер изменений в организме, происходящих при стрессе, обсуждается в работах Лизько Н.Н. Стрессовые ситуации создают условия для изменения адгезивных свойств бактерий и клеточной адгезивности макроорганизма. Например, физико-химическое состояние кишечного муцина может быть нарушено желчными кислотами, протеолитическими ферментами и изменениями рН. Резкую редукцию мукозной составляющей (муцина) и снижение кислых мукополисахаридов на поверхности мукозного слоя и покрывающих его клеток считают показателем стрессовой реакции. Имеются прямые доказательства существования некоторой предрасположенности к изменению адгезии во время стресс-индуцированных

сдвигов в процессах пищеварения. Выявлены значительные изменения иммунореактивности в ответ на стресс-активацию гипоталамо–гипофизарно-адреналовой системы. Снижение иммунологической резистентности может оказывать влияние на топографическое распределение некоторых микробных популяций в ЖКТ. Следствие этого - эндогенная контаминация и метаболические последствия усиленного бактериального роста в тонком кишечнике /Лизько,1986; Лизько, 1987/.

Таким образом, синдром нарушения колонизационной резистентности развивается практически во всех случаях использования человеком искусственно измененной среды обитания. При этом, определяющими для развития этого синдрома являются как специфические факторы, т.е. факторы измененной среды обитания (радиация, микрогравитация, гипокинезия для космических полетов; сочетанное воздействие измененной газовой среды и повышенного давления для сатурационных длительных погружений и др.), так и неспецифические, главным образом, стресс индуцированные факторы и факторы замкнутого объема. Они воздействуют практически на все барьеры колонизации. /Лизько, 1996/. Усиленный микробный обмен, экзогенная контаминация, стресс-индуцированный дисбиоз и усиление потенциала патогенности в системе «человек – микроорганизмы» ведет к ослаблению первого барьера, формируемого протективной микрофлорой. Вторым барьер (эпителий покровных тканей и слизистых оболочек) также теряет протективные функции из-за ряда патофизиологических процессов (перераспределение жидкостей, нарушение кальциевого обмена, усиление десквамации эпителия, нарушение физиологической функции кишечника). Третий барьер, представленный факторами клеточного и гуморального иммунитета, также нарушается, что выражается в нарушении фагоцитоза, бактерицидной активности сыворотки, понижение активности киллеров и снижение продукции интерлейкинов, активации остеокласт-активирующего фактора и развитии токсико-аллергических состояний /Ильин, Воложин, Виха, 2005/.

В условиях эксплуатации обитаемых наземных гермопомещений специфические факторы среды (увеличение концентрации продуктов метаболизма, дезадаптация, ограничение гигиенических процедур) и стресс способствуют усилению микробного и, как результат, плазмидного обмена, что приводит уже в первые дни изоляции к спонтанному формированию штаммов по типу госпитальных, увеличению массивности микробных очагов, замене менее вирулентных штаммов на более вирулентные в пределах одного вида, системным дисбактериозам и др. Физиологический статус покровных тканей также нарушается. Нарушается и иммунитет, что выражается в снижении функциональной активности Т-лимфоцитов и цитотоксической активности лимфоцитов - естественных киллеров; уменьшении продукции интерлейкина 2; повышении уровня иммуноглобулинов класса А, М, G; ослаблении фагоцитоза и бактерицидной активности сыворотки крови; повышении чувствительности к бактериальным и химическим антигенам.

Наиболее выраженным и опасным является формирование синдрома нарушения колонизационной резистентности в условиях длительных погружений методом сатурации, при котором комплекс специфических факторов (сочетанное влияние гипербарической среды и измененного газового состава) оказывает мощное селективное воздействие на условно-патогенную микрофлору, и ингибирующее – на протективную микрофлору. Как следствие, проявления синдрома нарушения колонизационной резистентности развиваются линейно, в зависимости от длительности срока изопрессии и величины давления, и на фоне интенсивной колонизации среды обитания инфекционными агентами сапронозного типа, главным образом – синегнойной палочкой. Барьерные функции покровных тканей также нарушены из-за микробаротравм, мацерации эпителия, пониженной активности церуминальных желез в наружных слуховых проходах, которые становятся *locus minoris resistentiae* для инфекций. Весьма часто инфекции в условиях длительных погружений манифестируют в виде наружных отитов,

что приводит к преждевременной декомпрессии заболевших по медицинским показаниям (табл. 1) /Ильин, Воложин, Виха, 2005/.

Таблица 1. Развитие синдрома нарушения колонизационной резистентности в сатурационном длительном погружении, проявляющееся изменениями процентного соотношения микрофлоры покровных тканей операторов (n=18) (%)

Группа микроорганизмов	Сутки исследований						
	Фон	Изопрессия			Декомпрессия		Выход
	0	1-3	5-8	11-13	18-22	24-28	30-34
Протективные грамположительные микроорганизмы	90,3	67,3	62,5	39,6	25,0	38,7	68,5
Условно-патогенные грамотрицательные микроорганизмы	4,8	11,5	32,8	31,0	31,0	40,3	28,5
Синегнойная палочка	0	9,6	25,0	20,6	25,8	29,0	22,8

Таковы микробные инфекционные риски, существующие в текущей практике пилотируемой космонавтики и прогнозируемые для космических межпланетных полетов и лунных баз. Для того чтобы продвинуться в понимании остроты и важности прогнозов необходимо провести серию исследований, о чем говорилось выше. И все же общим выводом по микробиологическому клиническому разделу является необходимость выработки эффективных профилактических мер, способных укрепить колонизационную резистентность членов экипажа навстречу этим прогнозируемым вызовам.

На сегодня существует арсенал пробиотических средств, способных укрепить колонизационную резистентность, в том числе пробиотиков, основанных на штаммах лактобацилл, изолированных от космонавтов. Последнее обстоятельство позволило провести целую серию исследований эффективности пробиотиков, основанных на использовании аутологичных штаммов микроорганизмов – представителей протективных групп микроорганизмов. Исследования позволили прийти к заключению о

возможности использования в качестве аутопробиотиков культуры бифидобактерий, лактобацилл, энтерококков, коринебактерий, салливарных стрептококков как сочетанно, так и порознь, в зависимости от биотопа, требующего санации. Характеристика пробиотических микроорганизмов будет представлена в следующей главе.

1.3 Микрофлора человека и ее коактанты

В условиях искусственно измененной среды обитания филогенетически сложившееся взаимоотношение коактантов экологической системы «человек-микроорганизмы» претерпевает существенные изменения. Для человека оно принимает форму синдрома нарушения колонизационной резистентности. Поэтому не вызывает сомнения необходимость исследования состояния естественных барьеров колонизации, формируемых у человека на пути инфекционного агента, для выработки стратегии экологического подхода к проблемам профилактики инфекций у человека, находящегося в экстремальных условиях обитания.

Van der Waaij (1987) дает следующее определение термина "колонизационная резистентность": это резистентность, с которой сталкиваются потенциально-патогенные микроорганизмы при попытке колонизировать "места обитания" на слизистой оболочке одного из трех трактов, имеющих открытое сообщение с внешним миром: дыхательного, мочеполового и пищеварительного. Характеризуя инфекционную резистентность человека, Van der Waaij называет два основных ее барьера: барьер, сформированный комменсальной микрофлорой и барьер, который образуется за счет факторов клеточного и гуморального иммунитета. Бондаренко В.М. и Жалко-Титаренко В.П. (1991) указывают также в качестве естественного барьера эпителий слизистой оболочки, от физиологического состояния которого в значительной степени зависит возможность его пенетрации клетками возбудителя. Исследования Noble позволяют также причислить к барьерам колонизации и кожные покровы /Noble, 1989/.

Необходимо подробнее остановиться на первом и основном барьере колонизации - барьере, сформированном микробными ассоциациями, состоящими из комменсалов человеческого организма. Система взаимоотношений, как в самих этих ассоциациях, так и между ее коактантами и хозяином достаточно сложна. При заражении возбудитель попадает в организм в виде популяций генетически гетерогенных особей вместе с продуктами питания, водой, частицами капельного и пылевого аэрозолей, и др. Формирование первичного инфекционного очага происходит путем вытеснения нормальной микрофлоры и захвата возбудителем нового ареала обитания. Адгезия, колонизация и последующее размножение возбудителя, синтезирующего токсические субстанции, обуславливают развитие в организме патоморфологических изменений, которые для представителей группы условно-патогенных микробов характеризуются отсутствием специфичности и мозаичностью поражения различных органов и тканей. При нарушении общей резистентности организма, снижении уровня содержания защитной микрофлоры, увеличивается популяция условно-патогенных микроорганизмов, которые могут транслоцироваться в другие биотопы. По аналогичному пути развивается эндогенная инфекция, этиологическим агентом которой является аутохтонная микрофлора.

Согласно современным представлениям, естественную микробиоту любых биотопов подразделяют по происхождению на постоянную (резидентную) и случайную (транзиторную). Если резидентная микробиота включает в себя представителей, специфичных для данного биотопа, то транзиторная состоит из занесенных извне микроорганизмов. Резидентная микробиота биотопа относительно стабильна, но физиологическая роль микроорганизмов, ее составляющих, далеко не равнозначна. Поэтому в резидентной микробиоте различают облигатную и факультативную.

Облигатная микробиота - главная составляющая любого микробиоценоза, она противодействует заселению биотопа случайными микроорганизмами, участвует в процессах ферментации, иммуностимуляции,

т.е. выполняет защитные функции. Например, к облигатной микробиоте толстого кишечника относят бифидобактерии, лактобациллы, типичные кишечные палочки, пептострептококки, эубактерии, большинство видов бактероидов и энтерококков /Борисов, 2002/. Естественная микробиота пищеварительного тракта выполняет важные физиологические функции: обеспечение колонизационной резистентности слизистой оболочки; стимуляция процесса формирования иммунной системы новорожденных и поддержание иммунного тонуса у взрослых при помощи мурамилпептида из клеточных стенок бактерий и других адьювантно-активных макромолекул; участие в обменных процессах (продукция энзимов для метаболизма белков, липидов, нуклеиновых и желчных кислот), поддержание водно-солевого баланса, синтез витаминов группы В, К и D; регуляция газовой среды кишечника, участие в биохимических процессах пищеварения (ферментация пищевых субстратов, регуляция моторно-эвакуаторной функции кишечника); инактивация экзогенных и эндогенных токсических продуктов при помощи механизмов биотрансформации и биodeградации.

Постоянное присутствие в кишечнике достаточного числа прикрепленных к его стенке резидентных микроорганизмов предотвращает размножение патогенных агентов, их инвазию в энтероциты и прохождение через кишечную стенку путем создания в своем биотопе неблагоприятной для посторонней микробиоты рН среды, а также путем выработки бактериоцинов и лишения конкурирующих микроорганизмов питательных веществ и мест адгезии. Полезная метаболическая активность включает продукцию витамина К, биотина, ниацина, пиридоксина и фолиевой кислоты; гидролиз желчных солей и холестерина и регуляцию его уровня; участие в рециркуляции гормонов. Важное значение имеет улучшение баланса микроорганизмов в кишечнике и устранение дисбиозов. Дефицит полезной микробиоты в кишечном микробиоценозе приводит к нарушению рециркуляции эстрогена, секретирующегося в ЖКТ с желчью, и

развитию соответствующих патологических состояний в женской половой сфере /Мельников, Стулова, и др., 2012/.

Нормально функционирующая резидентная микробиота контролирует продукцию токсинов в кишечнике, предупреждая их избыточную выработку и попадание в кровоток. В результате метаболизма резидентной микробиоты, обладающей детоксицирующими и протеолитическими свойствами, в кишечнике обеспечивается протеолиз эндотоксинов, аллергенов и антигенов. Это также касается всасывания в кишечнике частично переваренных белков, в том числе, способствующих развитию пищевой непереносимости и сопутствующих ей кожных заболеваний. Естественно, при нарушении микробиоценоза эти субстанции попадают в кровь.

Заслуживает внимание детоксицирующая и защитная роль индигенной микробиоты в предотвращении негативного влияния радиации, химических загрязнителей пищи, канцерогенных факторов, токсичных эндогенных субстратов, непривычной и экзотической пищи, загрязненной воды за счет стимулирования иммунного ответа и повышения неспецифической иммунорезистентности – потенцирования продукции интерферона, интерлейкина, увеличения фагоцитарной способности макрофагов.

Необходимо подробнее остановиться на основных группах протективной микробиоты, на чьей основе в настоящее время создаются популярные пробиотические средства.

Бифидобактерии – основная группа бактерий кишечника составляет 25% всей микробной популяции в кишечнике взрослых и 95% у новорожденных. Бифидобактерии продуцируют уксусную и молочную кислоты. Развивающееся как следствие этого кислая реакция среды создает антибактериальный эффект. Бифидобактерии способны выделять продукты метаболизма, которые непосредственно ингибируют развитие грамположительных и грамотрицательных условно-патогенных микроорганизмов. Бифидобактерии трансформируют потенциально токсический аммиак (или амины) в ион аммония NH_4 , который не способен

проникать через слизистую в кровоток. Более того, эти бактерии не образуют алифатических аминов, сероводорода и нитритов. Бифидобактерии продуцируют витамины, в основном группы В, а также пищеварительные ферменты, такие как казеинфосфатаза и лизоцим. Бифидобактерии восстанавливают нормальную кишечную микробиоту после антибиотикотерапии /Воробьев, Бондаренко и др., 2004/.

Видовой состав бифидофлоры человека неодинаков и претерпевает изменения. Данное явление связывают с аутогенной сукцессией – закономерной сменой биоценозов в определенной экологической нише /Ventura et al., 2008/. Данная закономерность прослеживается в смене видового состава бифидофлоры в процессе онтогенеза, совпадающими с критическими периодами развития в различном возрасте: становлением иммунной и ферментативной систем, изменение гормонального фона, сменой пищевого рациона, географическими и экологическими факторами /Ефимов и др., 1996; Коршунов и др., 2001 а, б; Крамарь, 2001/. Важно отметить при этом, что вмешательство неблагоприятных внешних факторов, таких как эндогенные инфекции, неблагоприятная экология и др., может нарушить естественный ход развития микробиоценоза /Воронина и др., 2008; Амерханова, 2009/. Бифидобактерии – важнейшие представители облигатной микробиоты кишечника человека, которые играют существенную роль в обеспечении состояния физиологической нормы /Шендеров, 1996; Карпушина и др., 1998/.

Энтерококки, ранее относимые к стрептококкам группы D, — многочисленная группа бактерий рода *Enterococcus*, включающая виды *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. gallinarum*, *E. raffinosus*, *E. irae*, *E. malodoratus* и *E. mundtii*. В клиническом материале от человека встречаются *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gilvus* и *E. pallens*. У новорожденных энтерококки выявляются уже с первых дней жизни, и в последующем на первом году, у детей, находящихся на грудном вскармливании, их уровень колеблется от 10^6 до 10^7 КОЕ/г, где КОЕ -

колониобразующая единица. У детей с искусственным вскармливанием их уровень может достигать 10^8 – 10^9 КОЕ/г. Популяционный уровень энтерококков в кишечнике здорового человека остаётся стабильным, достигая 10^7 – 10^8 КОЕ/г фекалий. Энтерококки находятся практически в каждом отделе кишечника. К основным свойствам энтерококков относятся: участие в синтезе витаминов; участие в метаболизме сахаров (лактозы); иммуностимуляция - поддержка уровня цитокинов широкого спектра; высокая антагонистическая активность против стафилококков, листерий, кишечных палочек, благодаря выработке бактериоцинов; противовоспалительные свойства; высокий уровень устойчивости к факторам внешней среды (температуре, рН). Количество в кишечнике энтерококков в норме не должно превышать общее количество кишечных палочек /Бондаренко, Суворов, 2007/.

Значительную долю популяции протективных групп микроорганизмов для большинства биотопов человека формируют лактобациллы. Лактобациллы - грамположительные палочки, факультативные анаэробы. Лактобациллы различаются по потребности в питательных веществах и факторах роста. Лактобациллы продуцируют ферменты, сбраживающие гексозы, дисахариды и полисахариды. Антагонистическое действие лактобацилл обусловлено высокой кислотообразующей активностью, продуцированием антибиотических веществ (например, ацидофилин – *L. acidophilus*, лактолин - *Lactiplantibacillus. plantarum*, бревин - *Levilactobacillus brevis*), перекиси водорода, лизоцима /Феклисов, 2007; Хакимова, 2023/.

Механизмы проявления колонизационной резистентности организма можно разделить на прямые и непрямые. К прямым механизмам относятся продукция бактериями ингибиторов, нарушающих метаболизм патогенных и условно-патогенных бактерий, конкурентные взаимоотношения с патогенными бактериями за питательные субстраты, за места адгезии, прямую деградацию токсинов, антиэндотоксическое действие,

препятствование транслокации микроорганизмов в другие участки организма. К непрямым эффектам относятся активация иммунной системы, стимуляция системы мононуклеаров, интерферогенная функция, ингибирование конъюгации желчных кислот и др. Естественно, что множественность механизмов, обеспечивающих колонизационную резистентность, предполагает и многообразие вариантов, комбинаций в конкретных ситуациях, определяющих состояние колонизационной резистентности, которая, скорее всего, зависит от количества и качества микробиоты и условий её обитания /Донец, 2015/.

Перечисленные выше функции, благотворно влияющие на здоровье человека, являются стабильными, если поддерживается качественное и количественное постоянство микробиоты в биотопах. Естественно также, что не все положительные функции микробиоты имеют место или в одинаковой степени проявляются во всех биотопах. Они определяются анатомо-физиологическими и биохимическими особенностями биотопов, т.е. желудочно-кишечного, урогенитального трактов, кожи, дыхательных путей и т. д.

Для коррекции дисбиозов повсеместно используется широкий арсенал пробиотических препаратов, основанных на коллекционных штаммах микроорганизмов – представителей защитных групп. Вместе с тем, активность этих пробиотических препаратов определяется в первую очередь приживляемостью микроорганизмов, находящихся в их составе, в организме хозяина.

Одним из направлений современной профилактики и терапии дисбактериозов стало использование в качестве пробиотиков индигенных штаммов человека. Развитию данной концепции послужили предположения о том, что внедряемые в макроорганизм пробиотики способны вызывать дисбаланс в аутофлоре хозяина, вследствие антагонизма индигенных и промышленных штаммов /Глушанова, Шендеров, 2005/. Пробиотики, основанные на промышленных штаммах, являются инородными для

организма человека и отторгаются вследствие биологической несовместимости, они не имеют возможности внедряться внутрь биопленки кишечника и поэтому пребывают в нем транзиторно /Vairivant, Strober, 2007/.

В современной литературе возрастает количество сообщений о негативных эффектах терапии пробиотическими препаратами, содержащими промышленные штаммы. Большая часть публикаций содержит информацию об инфекционных осложнениях, связанных с употреблением коммерческих пробиотиков. Как правило, подобные осложнения развиваются у ослабленных, возрастных, иммунокомпрометированных пациентов. Данный факт следует всегда учитывать при использовании средств пробиотической коррекции /Boyle, Robins-Browne, Tang, 2006/. Эти данные свидетельствуют о рисках использования пробиотических средств, основанных на коллекционных штаммах, и обосновывают необходимость выбора аутопробиотических препаратов для коррекции микробиоты.

1.4 Протективные группы микроорганизмов у человека

Желудочно-кишечный тракт – комплексная экосистема, которая представлена ассоциацией резидентной микробиоты и клетками различных фенотипических линий эпителиальной стенки. Термин микробиота, предложенный D.C. Savage в 1977, представляет собой коллективное сообщество бактерий на слизистых оболочках каждого индивидуума /Savage, 1977/.

Видовой состав микробиоты формируется по видовому и количественному составу в зависимости от характера микроэкологии в биотопах, поскольку каждый вид микроорганизмов требует оптимальных для своей жизнедеятельности условий, обеспечивающих удовлетворение его биологических потребностей, а также адаптацию к тому окружению, которое складывается в местах его обитания /Бондаренко, 2007/. В процессе эволюции в результате взаимодействия между организмом хозяина и окружающим его микроорганизмами происходит отбор определённых видов

микробов, способных к колонизации соответствующих экологических ниш и использующих организм как новую среду обитания. Так сформировались симбиотические ассоциации, составляющие нормальную микробиоту человека и животных /Бондаренко, 2007/.

Данные о численности, видовом составе и функциональном значении интестинальной микробиоты претерпевали значительные изменения и зависели от методов, имевшихся на момент исследования в арсенале учёных. В 1970-х годах исследования микробиоты проводились с помощью микроскопии и культуральных методов, основанных, в том числе, на анаэробном культивировании, что позволило идентифицировать более 300 видов бактерий кишечника.

Считалось, что колонизация желудочно-кишечного тракта микроорганизмами происходит после рождения. Первые бактерии колонизируют кишечник, попадая из родовых путей матери, и включают аэробные и анаэробные бактерии. Резидентная микрофлора пищеварительного тракта – гетерогенная микробная экосистема, которая содержит до 1×10^{14} КОЕ бактерий /Маслов, 2007/.

У каждого индивида имеются внутривидовые и внутривидовые вариации микробиоты. Например, кишечная микробиота детей представлена меньшим видовым и количественным составом, чем у взрослого человека. С возрастом уменьшается количество протективной микробиоты бифидобактерий и лактобацилл, увеличивается общее число эшерихий при снижении удельного веса *E. coli* с нормальными ферментативными свойствами и нарастании числа гемолитических форм. Кишечная микробиота играет важную роль в нормальном функционировании кишечника и поддержании здоровья организма /Симонова, 2008/.

Группа молочнокислых бактерий включает в себя микроорганизмы филогенетически близких родов: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Carnobacterium*, *Weissella*, *Alloicoccus*, *Dolosigranulum*, *Melissicoccus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Lactosphaera*,

Aerococcus. Молочнокислые бактерии являются важной составляющей нормальной микрофлоры пищеварительного тракта. Лактобациллы, хотя и не являются доминирующими микроорганизмами кишечной микрофлоры, однако выделяются в значительном количестве из различных отделов кишечного тракта. Такие виды, как *Lactobacillus acidophilus*, *Ligilactobacillus salivarius*, *Limosilactobacillus fermentum*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lacticaseibacillus casei*, *Limosilactobacillus reuteri*, *L. gasseri*, *Lactobacillus crispatus* являются представителями лактобациллярной микрофлоры человека. В толстом кишечнике здоровых взрослых людей преобладают *Levilactobacillus brevis* (28%), *L. plantarum* (19%), *L. acidophilus* (12%), *L. casei* (9,5%) /Леванова, 2009; Воропаева, 2013/.

Один из наиболее известных биологических свойств лактобацилл является выраженная способность к продукции молочной кислоты. Активность кислотообразования зависит от состава питательной среды и условий культивирования. Считается, что только L+-изомер молочной кислоты является биологически активной формой, которая быстро и целиком утилизируется организмом человека /Дехтяренко, 2007/.

Лактобациллы продуцируют биологически активные соединения: молочную кислоту, которая угнетает рост патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, а также лизоцим, бактерицидные вещества /Шабанов, 2009; Феклисова, 2007/.

Lactobacillus spp. проявляют антагонизм по отношению к грамотрицательным бактериям за счёт образования молочной кислоты, а антагонистическая активность по отношению к грамположительным бактериям связана с продукцией бактериоцинов /Димова, 2007/.

Антагонизм микроорганизмов обусловлен также скоростью размножения микробной популяции, конкуренцией за источник питания и выборкой других веществ, подавляющие условно-патогенные бактерии, в частности, лизоцима и перекиси водорода /Кузнецова, 2006/.

Колонизирующая способность позволяет лактобациллам включаться в микрофлору стенки, стать составной частью экологического барьера, блокировать рецепторы клеток слизистых от адгезинов патогенных микробов. Во многом колонизирующая способность лактобацилл обеспечивает им адгезивность, устойчивость к лизоциму, пищеварительным сокам и антагонистическому действию других микробов. Ингибиторное действие лактобацилл главным образом сопряжено с молочной кислотой, а затем с антибиотическими веществами. Лактобациллы способны образовывать перекись водорода, что позволяет некоторым исследователям говорить даже об их вирулицидной активности. Изучены бактериоцины лактобацилл – лактоцины. Они причастны и к колонизирующей способности лактобацилл. Доказана способность одного из видов лактобацилл *L. fermentum* – продуцировать лизоцим /Миронов, 2011/.

Представителями облигатной микробиоты кишечника также являются энтерококки. Энтерококки входят в состав нормальной микробиоты пищеварительного тракта человека и играют важную роль в обеспечении колонизационной резистентности слизистых. Энтерококкам отводится существенная роль в стимуляции местного гуморального и клеточного иммунитета, что способствует поддержанию колонизационной резистентности /Бондаренко, 2007/.

В соответствии с существующими стандартами в норме в толстом кишечнике должно обитать от 10^7 до 10^8 жизнеспособных клеток энтерококков на грамм фекалий /Отраслевой стандарт «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника» (ОСТ 91500.11.0004-2003)/. Среди колонизирующих человеческий организм энтерококки наиболее часто встречающимися являются энтерококки двух видов – *E.faecium* и *E.faecalis*. Благодаря уникальной даже для бактерий жизнеспособности (устойчивость к низким значениям pH, к желчным кислотам, к широкому диапазону температур), энтерококки обитают практически во всех отделах кишечника,

часто обнаруживаются во влагалище и желудке /Koneman, 1997; Ouvehand et al., 1999/.

Энтерококки, как естественные обитатели кишечника, принимают самое активное участие в происходящих там метаболических процессах, синтезе витаминов, гидролизе сахаров, в частности лактозы, деконъюгировании желчных кислот, элиминации патогенных бактерий. Количественное содержание энтерококков в кишечнике находится в строгом соответствии с уровнем содержания других индигенных бактерий, в частности кишечных палочек, лактобацилл и бифидобактерий /Бондаренко, Мацулевич 2007/. Энтерококки - эффективные иммуностимуляторы, способные поддерживать адекватный для нормальной работы системы врожденного иммунитета уровень цитокинов широкого спектра.

Бифидобактерии – важнейшие представители облигатной микрофлоры кишечника человека, которые играют существенную роль в обеспечении состояния физиологической нормы /Шендеров, 1996; Карпушин и др., 1998/. Основным местом обитания представителей рода *Bifidobacterium*, является дистальный отдел толстого кишечника человека, где бифидофлора представлена в большом количестве. В фекалиях здоровых детей первого года жизни содержание бифидобактерий составляет 10^{10} - 10^{11} КОЕ/г, детей старшего возраста и взрослых 10^9 - 10^{10} КОЕ/г /Приказ Минздрава РФ № 231 от 9 июня 2003 года/. Бифидобактерии обнаруживаются в различных отделах ЖКТ, ротовой полости и тонкого кишечника здоровых людей и репродуктивной тракте женщин.

В микробиоте взрослого человека большую часть занимают грамотрицательные анаэробы из рода *Bacteroides* (30% от общего содержания бактерий в фекалиях) и *Eubacterium*, бифидобактерии составляют вторую доминирующую часть от 5 до 25%, и играют основную роль в поддержании нормобиоценоза толстого кишечника /Полищук 1996; Шкопоров и др., 2006/.

1.5 Пробиотики, как средство профилактики синдрома нарушения колонизационной резистентности

Микроорганизмы обладают уникальной резистентностью микроорганизмов. Они сохраняют жизнеспособность на высотах более 80 км, в глубинах океана до 11 км, под землёй – до 4 км, в условиях сухой долины в Антарктике, в водных структурах ядерных реакторов. Отдельные формы организмов способны к росту при температурах до -12°C и до $+91^{\circ}\text{C}$, влажности 0,1-2,7% содержания хлоридов 12-36%, pH 0,5-11.

По мере увеличения продолжительности космического полёта все большее значение приобретают экологические проблемы, связанные с безопасностью экипажа. Среди них важнейшее значение имеет проблема воздействия микробного фактора на организм человека.

В настоящее время для коррекции кишечного микробиоценоза используются различные лекарственные препараты и пищевые продукты: пробиотики, пребиотики, симбиотики, синбиотики и т.д.

Пробиотики – лечебные медицинские иммунобиологические препараты, содержащие живые лиофильно высушенные штаммы микробов нормальной микрофлоры и/или продукты микробного происхождения /Миронов, 2011/.

Термин «пробиотик» происходит от латинского слова «про» и греческого слова «биос», что означает «на всю жизнь» /Pradhan, Mallappa, Grover, 2020/. Ферментированные продукты, такие как пиво, хлеб, вино, кефир и сыр, очень часто использовались в пищевых и терапевтических целях задолго до того, как сегодня стало известно о пользе пробиотических микроорганизмов для здоровья /Ozen, Dinleyici, 2015/. Пробиотическая пищевая промышленность считается будущим рынка функциональных продуктов питания, которые, помимо функции питания, приносят пользу для здоровья, что побуждает отрасли делать акцент на продвижении функциональных продуктов /Khedkar, Carraresi, Br€oring, 2017/.

Хотя молочные продукты являются наиболее популярной формой потребления пробиотиков, существуют и другие продукты, содержащие пробиотики, которые доступны потребителю, такие как фруктовые соки и шоколад, хотя они по-прежнему составляют лишь небольшую часть рынка пробиотических продуктов /DePrisco, Mauriello, 2016/. Однако наблюдается значительный рост потребительского спроса на немолочные пробиотические продукты, особенно те, которые содержат мало лактозы и холестерина и не нуждаются в охлаждении. Некоторыми из основных инноваций в такой нише рынка пробиотиков являются соки, немолочные напитки (например, чайный гриб), хлопья и продукты на основе шоколада /Mordor Intelligence, 2019/. Интересной областью для изучения может быть идентификация новых пробиотических микроорганизмов для ферментации вегетарианских продуктов, таких как штаммы со специфическими пробиотическими свойствами и производство витамина B12 /Kwak, 2014/. Перспективными могут явиться и пробиотики, созданные в результате биоинженерии /Kumar 2016, Stgcbs Liu et al., 2018/.

Бактерии, продуцирующие молочную кислоту, были открыты Пастером в 1857 году. Учёные в конце 19 века выделили молочнокислые бактерии (МКБ) из кишечного тракта /Ozen Dinleyici, 2015/.

В начале 20 века И.И. Мечников связал долголетие некоторых групп населения, проживающих на Балканах, с регулярным потреблением ферментированных молочных продуктов, содержащих лактобациллы. /Zommiti, Feuilleley, &Connil, 2020/.

Некоторые авторы описывают, что на грамм просвета желудочно-кишечного тракта человека приходится около 1000 различных видов микроорганизмов, и почти 99,9% из них являются строгими анаэробами /Tesfaye et al., 2019/. Бифидобактерии и лактобактерии представляют собой основные группы нормальной микробиоты кишечника у здоровых людей /Pradhan et al., 2020/. Многие штаммы бактерий и дрожжей были охарактеризованы как потенциально пробиотические; однако представители,

принадлежащие к родам *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*, составляют основу в качестве пула для создания пробиотиков представители, других родов также были коммерциализированы в качестве пробиотиков, таких как *Enterococcus*, *Streptococcus* и *Saccharomyces* /Sarao, Arora, 2017/. Большинство известных пробиотиков были выделены из микробиоты кишечника человека и традиционных ферментированных пищевых продуктов, которые считаются «общепризнанными безопасными» (GRAS) на уровне штаммов. Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) или в соответствии с «квалифицированной презумпцией» безопасности» (QPS) на уровне видов Европейского агентства по безопасности пищевых продуктов (EFSA) /Martin, Langella, 2019; Pradhanetal., 2020/. Кроме того, EFSA присвоило некоторым видам *Lactobacillus* статус QPS на основании их критериев безопасности (идентификация, возможная патогенность, конечное использование). На сегодняшний день 37 видов *Lactobacillus* получили статус QPS и включают хорошо известные виды, такие как *L. acidophilus*, *L. amylolyticus*, *L. amylovorus*, *L. helveticus*, *L. delbrueckii* *Ligilactobacillus animalis*, *Companilactobacillus alimentarius*, *Levilactobacillus brevis*, *Lacticaseibacillus casei*, *Lactiplantibacillus pentosus*, *L. plantarum*, *Lacticaseibacillus paracasei*, *Lactiplantibacillus paraplantarum*, *Limosilactobacillus reuteri*, *Lacticaseibacillus rhamnosus* и *Lactobacillus sayi* /Koutsoumanis, 2020/. Международный журнал систематической и эволюционной микробиологии (IJSEM) недавно опубликовал новую классификацию видов семейства *Lactobacillaceae*, относящуюся к *Lactobacillus*, *Paralactobacillus*, *Pediococcus* и 23 новым родам, основанную на различных генетических подходах и маркерах /Zheng et al., 2020/. Стоит отметить, что некоторые виды, ранее принадлежавшие к роду *Lactobacillus*, использовавшиеся в качестве пробиотиков, были переименованы в *Lactiplantibacillus* (например, *L. plantarum*), *Lacticaseibacillus* (например, *L. casei*), *Limosilactibacillus* (например, *L. reuteri*), *Levilactobacillus* (например, *L. reuteri*, *L. breve*) и др.

Пробиотикам отводится роль стратегических средств, направленных на поддержание и восстановление здоровья человека. Штаммы, используемые в качестве пробиотиков, должны быть:

- безопасными для человека;
- быть резистентными к действию кислого содержимого желудка, жёлчи и ферментам поджелудочной железы;
- обладать выраженными адгезивными свойствами в отношении эпителиальных клеток слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта;
- проявлять антимикробную активность;
- ингибировать адгезию патогенных бактерий;
- быть резистентными к действию антибиотиков;
- сохранять стабильность при хранении препарата. /Ушкалова, 2007/.

Поскольку пробиотики в качестве стимуляторов здоровья все чаще добавляются в пищевые продукты, особенно ферментированные пищевые продукты, а также в лекарства, в дополнение к фундаментальной важности вопросов безопасности пищевых продуктов и возможного неблагоприятного воздействия этих микроорганизмов, необходимо дальнейшее обсуждение вопросов безопасности использования пробиотиков для потребления человеком. Лактобактерии и бифидобактерии, связанные с пищевыми продуктами, исторически считались безопасными, теоретически пробиотики могут вызывать четыре типа побочных эффектов: системные инфекции, вредная метаболическая активность, чрезмерная иммунная стимуляция у восприимчивых людей и участие в горизонтальном генетическом переносе нежелательных детерминант.

Поскольку пробиотики остаются живыми при введении или употреблении, нельзя исключать их способность к инфицированию или выработке токсинов у хозяина. Безопасность их использования включает в себя несколько факторов, таких как потенциальная уязвимость потребителя или пациента, доза и продолжительность потребления, а также форма и частота его введения. Кроме того, необходимо учитывать иммунологические

эффекты, особенно в случае уязвимых групп населения, таких как младенцы со слаборазвитой иммунной функцией /Sanders et al., 2010, 2018/. Ключевые факторы безопасности, которые следует учитывать при использовании пробиотиков в пищевых продуктах, включают их происхождение (предпочтительно из желудочно-кишечного тракта здорового человека), непатогенность и устойчивость к антибиотикам. Некоторые из этих микроорганизмов, такие как энтерококки, также могут вести себя как условно-патогенные микроорганизмы для человека, содержащие элементы устойчивости к антибиотикам и потенциальные факторы вирулентности, и поэтому их использование в качестве пробиотиков вызывает сомнения. Хотя бифидобактерии и лактобактерии считаются безопасными и продолжают использоваться в пищевых продуктах, однако в редких случаях сообщалось об инфицировании некоторыми их видами /Peivasteh-Roudsari et al., 2020/.

Пробиотики могут производиться и продаваться в виде лекарств, пищевых продуктов, пищевых продуктов медицинского назначения, пищевых добавок, детских смесей или кормов для животных фармацевтической и пищевой промышленностью /Telessy, 2019/. Однако ферментированные продукты, содержащие живые организмы, не могут считаться пробиотиками, если их эффекты специально не изучены или их количество неизвестно. Некоторые ферментированные продукты, такие как йогурт, могут быть классифицированы как пробиотики на основании определённых специфических эффектов, таких как улучшение усвоения лактозы у людей с непереносимостью лактозы /Salehi et al., 2021/. По данным Всемирной гастроэнтерологической организации, необходимая доза пробиотика зависит от конкретного микробного штамма и типа продукта /World Gastroenterology Organization, 2017/. Хотя многие имеющиеся в продаже продукты содержат от 1 до 10 миллиардов колониеобразующих единиц на дозу, некоторые пробиотические штаммы продемонстрировали эффективность при более низких уровнях, в то время как другие требуют больших количеств /Sarao, Arora, 2017/. Рекомендуется, чтобы

пробиотический продукт содержал 10^8 – 10^9 КОЕ, чтобы обеспечить терапевтический эффект, исходя из минимального ежедневного потребления 100 г или 100 мл пробиотических продуктов. Пробиотики обладают большим потенциалом для лечения и профилактики кожных заболеваний, таких как атопический дерматит или экзема, акне и аллергические воспаления, но также могут действовать при гиперчувствительности кожи, повреждении кожи, защите ран и в качестве косметического продукта /Roudsari et al., 2015/. Однако взаимосвязь между применением пробиотиков для местного применения и кожными заболеваниями до конца не изучена. Идеальная дозировка и штамм для кожных заболеваний ещё не определены /Knackstedt, Knackstedt, Gatherwright, 2020/. Розацеа, акне и атопический дерматит являются наиболее частыми кожными заболеваниями, которые в основном лечат антибиотиками, нарушающими нормальную микробиоту кожи. В этом смысле была создана новая линия инновационной косметики, так называемая пребиотическая косметика, с целью восстановления баланса такого микробиома, подавления роста транзиторных или патогенных видов путем стимуляции размножения полезных бактерий /Bustamante et al., 2020/. В частности, лактобактерии и бифидобактерии использовались при воспалении кожи, атопическом дерматите и аллергическом контактном дерматите. Атопический дерматит — это воспалительное заболевание кожи, которое возникает на ранних этапах жизни и связано с аллергическим ринитом, пищевой аллергией и астмой /Lolou, Panayiotidis, 2019/. Исследование показало, что добавки с *L. rhamnosus* и *L. reuteri* смогли снизить тяжесть экземы на 56% у детей, страдающих этим заболеванием /Lolou, Panayiotidis, 2019/.

Инфекции дыхательных путей соответствуют инфекциям слизистых оболочек, таким как ринит, синусит, тонзиллит, фарингит, ларингит и простуда. Инфекции верхних дыхательных путей оцениваются примерно в 17 миллиардов случаев в год во всем мире, и лечение будет зависеть от причины инфекции, обычно с помощью антибиотиков или противовирусных

препаратов. Повышение устойчивости бактерий к антибиотикам и снижение доступности вакцин для большинства вирусов требуют поиска новых безопасных, эффективных и подходящих методов лечения, а использование пребиотиков и пробиотиков представляет собой интересную инновационную стратегию. В нескольких исследованиях оценивалось влияние пробиотиков на профилактику респираторных инфекций, но на сегодняшний день результаты неубедительны /Bustamante et al., 2020; Li et al., 2020/. Однако, по словам Сандерса и его сотрудников, существуют убедительные доказательства того, что пробиотики могут снижать частоту и продолжительность инфекций верхних дыхательных путей /Sanders et al., 2019/. Имеются сведения о положительном влиянии пародонтальных повязок, имеющих в своём составе лактобациллы /Воложин с соавт. 2004, Соколова 2007, Barbosa et al, 2020/. Клиническое исследование показало снижение частоты и продолжительности симптомов простуды при употреблении *L. plantarum* и *L. paracasei*. Другое клиническое исследование показало, что использование пробиотиков (*L. paracasei*, *L. casei* и *L. fermentum*) способно снизить заболеваемость инфекциями верхних дыхательных путей за счёт повышения уровня IFN-g в крови и sIgA в кишечнике. Пробиотики могут стимулировать легочный иммунитет за счёт увеличения регуляторного Т-ответа в дыхательных путях, а также снижать риск респираторных инфекций за счёт улучшения кишечного иммунитета. Кроме того, некоторые пробиотические штаммы также обладают противовирусной активностью за счёт прямого взаимодействия пробиотика с вирусом, продукции противовирусных ингибирующих метаболитов и/или стимуляции иммунной системы. Таким образом, их использование может предоставить некоторые альтернативы и поддержать терапию, например, против COVID-19 /Sundararaman et al., 2020; Baud, 2020/.

По мнению Baud с соавт., уже известно, что пероральное применение пробиотических микроорганизмов связано со снижением заболеваемости и тяжести течения ОРВИ, и тогда их приём вместе с общепризнанными

пребиотиками (синбиотиками) может быть рекомендован как часть терапии. Общая стратегия по выравниванию кривой пандемии COVID-19 /Baud et al., 2020/. Уже известно, что микробиом кишечника пациентов с COVID-19 может быть значительно изменён, и те, у кого в избытке было более двух видов *Aspergillus*, имели более тяжелое течение болезни /ISAPP, 2018, 2020, BBC 2021/.

Микробиота кишечника представляет собой многокомпонентное сообщество микроорганизмов, включающее бактерии, археи, грибы, вирусы и простейших /Fan, 2021; Lloyd-Price, 2016/, которое эволюционировало в симбиозе с человеком на протяжении многих тысячелетий /Arumugam, 2011; Belizario 2018/.

Несмотря на прогресс в разработке лекарств, у большинства людей, получающих лечение от расстройств настроения, таких как большое депрессивное расстройство и биполярное расстройство, не достигается полная симптоматическая ремиссия и функциональное восстановление. Кроме того, значительная часть пациентов не переносит существующие препараты /Rios et al., 2017/. Существуют некоторые неврологические расстройства, которые, по-видимому, связаны с кишечной микробиотой, такие как нейродегенеративные расстройства и расстройства настроения, при которых кишечные микробы могут влиять на здоровье мозга с помощью общих механизмов /Naseribafrouei et al., 2014; Radisavljevic et al., 2019; Young et al., 2004/. Фактически, некоторые желудочно-кишечные расстройства имеют высокую распространенность психиатрических симптомов, поскольку дисбиоз кишечника присутствует при многих неврологических заболеваниях. Более того, появляется все больше доказательств того, что пробиотики эффективны в уменьшении симптомов депрессии и тревоги /Kim et al., 2018, 2020; Rios et al., 2017; Kelly 2016/. Микробиота кишечника по-новому тесно взаимодействует с иммунной системой, а воспаление связано с несколькими неврологическими расстройствами, включая болезни Паркинсона и Альцгеймера, рассеянный склероз, расстройство

аутистического спектра, тревогу и депрессию. Это может быть общий механистический путь оси кишечник-микробиота-мозг /Radisavljevic et al., 2019/. Эта осевая структура включает желудочно-кишечный тракт, центральную, вегетативную и нервные системы, а также нейроэндокринную и иммунную системы /Kim et al., 2018/. Кроме того, кишечная микробиота также связана с продукцией нейроактивных соединений, таких как ГАМК, серотонин, дофамин, ацетилхолин, метаболиты триптофана /Radisavljevic et al., 2019/. Появляется все больше доказательств того, что кишечная микробиота и связанные с ней метаболиты могут играть роль в патофизиологии депрессии. Некоторые данные, полученные на животных моделях, начали прояснять роль аномалий микробиома в этиологии депрессии. Метаболизм триптофана по путям серотонина (5-гидрокситриптамина), кинуренина и индола может регулироваться кишечной микробиотой, усиливая возможную передачу депрессивно-подобных поведенческих и физиологических черт через микробиоту. Тем не менее, пути связи между кишечной микробиотой и мозгом ещё полностью не выяснены, вероятно, через нервные, эндокринные и иммунологические пути, на которые может влиять микробиота или её метаболиты /Caspani et al., 2019; Liu, Cao, Zhang, 2015, 2018/.

Несколько исследований доказывают связь между несбалансированной микробиотой кишечника и некоторыми заболеваниями, особенно хроническими, такими как диабет и ожирение. В этом смысле использование пробиотиков может быть интересным подходом к восстановлению гомеостаза микробиома за счёт потребления пищи или добавок, содержащих эти микроорганизмы. Таким образом, потенциал пробиотиков был признан настолько важным для поддержания здоровья человека, что, по мнению Спасова и соавторов, все страны должны принять меры для реализации программ, которые позволят бедным людям получить доступ к ферментированным продуктам питания и пробиотикам, снижая риск таких заболеваний, как диабет, недоедание и инфекции /Spasova et al., 2020/.

Сидоренко, 2005; Симаненков с соавт., 2020/. Как обсуждалось здесь, в настоящее время использование пробиотиков считается полезным для здоровья, включая лечение диареи, непереносимости лактозы, язвенного колита, болезни Крона, инфекции *H. pylori*, метаболических заболеваний, инфекций дыхательных путей, аллергии и психических/неврологических заболеваний. С продолжением исследований микробиома и использованием пробиотиков для профилактики и лечения заболеваний две другие области, в которых в ближайшие годы будут достигнуты значительные успехи, — это использование пробиотиков для здоровья сердечно-сосудистой системы и для снижения абсорбции и повреждения токсинами из окружающей среды /Puebla, Barragan, Reid, 2019/. Тем не менее, чтобы получить надежные доказательства того, что изменения в микробиоме кишечника способны снизить заболеваемость или смягчить течение заболевания, по-прежнему необходимы хорошо спланированные рандомизированные клинические испытания.

Одним из направлений современной профилактики и терапии дисбиозов стало использование в качестве пробиотиков индигенных штаммов. Развитию данной концепции послужили предположения о том, что внедряемые в макроорганизм пробиотические микроорганизмы способны вызывать дисбаланс в аутофлоре хозяина, вследствие антагонизма индигенных и промышленных штаммов /Глушанова, Шендеров, 2005/.

Ряд авторов предлагает использование в качестве препаратов нормальные микробиоценозы человека /Шендеров, Манвелова, 1999; Хачатрян А.П., 1999/. Причём, для бесконечно долгой сохранности биологического материала рекомендуется помещать его в жидкий азот. Биоматериал, хранящийся в подобных криобанках, в последующем может быть использован для конструирования простых и сложных по составу аутопробиотиков и продуктов функционального питания /Шендеров, 2003/.

1.6 Существующий опыт использования аутопробиотиков в мире

Каждый человек представляет собой сложную по составу индивидуальную экосистему, которая формировалась миллионы лет эволюции. Поэтому разработать адекватные промышленные пробиотики для каждого человека для поддержания нормальной микрофлоры на оптимальном уровне практически невозможно. Пробиотические микроорганизмы даже человеческого происхождения иммунологически частично или полностью несовместимы с реципиентом, которому они предназначены и вскоре после их назначения быстро элиминируются из организма. Для скорейшего восстановления здоровья пациента критичным является сокращение периода между началом дисбиотических изменений в организме и их ликвидацией за счёт восстановления индигенной микробиоты /Алферова с соавт. 2022/. Большое значение приобретают клинические исследования, посвящённые приготовлению и использованию в клинической практике средств, основанных на введении собственных микроорганизмов в участки их нормальной колонизации – аутопробиотиков /Боровкова Е.А., 2021/. Разработчиками данного научного направления являются отечественные учёные, которые считают, что подход к выбору пробиотиков для конкретного лица должен быть индивидуальным, и это, в свою очередь, предполагает отбор и хранение аутопробиотических микроорганизмов, начиная с первых дней жизни человека будущего реципиента аутопробиотиков, с периодической заменой их в криобанке /патент, 1999; Шендеров, 1998/.

Одним из направлений современной профилактики и терапии дисбактериозов стало использование в качестве пробиотиков аутологичных штаммов микроорганизмов – представителей протективной микробиоты (аутопробиотиков). Развитию данной концепции послужили предположения о том, что внедряемые в макроорганизм пробиотические микроорганизмы способны вызывать дисбаланс в аутомикрофлоре хозяина, вследствие антагонизма индигенных и промышленных штаммов /Глушанова, Шендеров, 2005/. Согласно мнению Шендерова, еще в период внутриутробного развития

организм ребенка готовится принять микробиоту матери в качестве «своей», или, другими словами, у него формируется иммунологическая толерантность к нормальной микрофлоре /Шендеров, 1998/.

Очевидно, что адгезивная способность промышленных штаммов и аутопробиотиков к клеткам эпителия может различаться и зависит от соответствия рецепторов данного конкретного штамма лактобацилл рецепторам клеток. Например, установлено, что лактобациллы вагинального происхождения лучше прикрепляются к клеткам вагинального эпителия, по сравнению со штаммами, выделенными из других источников, например, из пищевых продуктов /Kirjavainen et al., 1998; Boris, 1998/.

Аутопробиотикотерапия – новый, альтернативный традиционной пробиотикотерапии подход к коррекции дисбиотических нарушений кишечника, предполагающий использование аутопробиотиков, живых индигенных облигатных представителей микробиоты (лактобацилл, бифидобактерий и энтерококков) /Ермоленко, 2020; Соловьёва, 2017; Сундукова, 2013; Suvorov 2018; Cherifi, Robberecht, Miendje, 2004; Viggiano, Badetti, 2004/. Отечественные учёные, являющиеся разработчиками данного научного направления, которые считают, что подход к выбору пробиотиков должен быть индивидуальным, и это, в свою очередь, предполагает отбор и хранение аутопробиотических микроорганизмов, начиная с первых дней жизни человека будущего реципиента аутопробиотиков, с периодической заменой их в криобанке /Boris, Suraz, 1998; Caspani, et al., 2019/. Аутопробиотики – это штаммы нормальной микрофлоры, изолированные от конкретного индивидуума и предназначенные для коррекции его микроэкологии /Шендеров, 2008; Chugh, et al., 2020/. Для безопасности использования отобранные и протестированные на отсутствие факторов патогенности аутоштаммы используют для получения аутопробиотического препарата в виде лиофилизата или питьевого продукта для восстановления или коррекции индивидуального микробиоценоза. Таким образом, метод аутопробиотической терапии индивидуализирует пробиотикотерапию, что

способствует повышению её эффективности и позволяет избежать возможных побочных эффектов, наблюдающихся при применении технологических (промышленных) штаммов микроорганизмов.

Клиническая эффективность аутопробиотиков изучалась в экспериментах на лабораторных животных. Так, Ермоленко Е.И. с соавторами сообщают о длительной персистенции, выраженном бифидогенном эффекте, сохранении популяции эшерихий, ингибировании роста протей и более быстрой (по сравнению с контрольной группой животных) коррекции экспериментального индуцированного антибиотиками дисбиоза кишечника крыс с помощью аутопробиотических (индигенных) штаммов *E. faecium*. Этой же группой учёных выявлены позитивные тенденции в коррекции дисбиоза крыс, вызванного антибиотиками, с помощью разных видов аутопробиотических микроорганизмов (энтерококков, бифидобактерий, лактобацилл, анаэробного консорциума бактерий) /Ермоленко, 2017; Ермоленко, 2020; Suvorov, 2018/.

В исследовании Бойцова А.Г. была оценена адгезия препаратов лактобактерий к буккальному и вагинальному эпителию 24 женщин в 91 опыте. Полученные результаты подтверждают специфический характер адгезии лактобацилл. Это определяется, вероятно, степенью гомологии рецепторов эпителиальных клеток и бактерий. С практической точки зрения подтверждается необходимость индивидуального подбора пробиотиков при заместительной терапии дисбиозов влагалища. В связи с данным фактом исследователи настаивают на необходимости строго индивидуального подбора пробиотиков с предварительной оценкой их адгезивных свойств /Бойцов и др., 2004/.

В настоящее время микроорганизмы рода *Bifidobacterium* широко используются для производства пробиотиков и различных продуктов функционального питания /Шендеров, 2001; Воробьев и др., 2004/.

Индивидуальный подбор пробиотических препаратов, созданных на основе аутологичных штаммов, в первую очередь бифидобактерий и

лактобактерий, является прямым развитием идеи пробиотикотерапии, в том числе касающимися исследований в области космической биологии и биотехнологии /Ильин и др., 2013/.

Недавно разработан метод «иммунологического фильтра» для получения комплексного аутопробиотика, содержащего живые бифидо- и лактобактерии. Полученная после культивирования биомасса представляет собой аутопробиотик, содержащий бифидобактерии и лактобактерии, являющиеся истинными представителями индигенной микрофлоры хозяина, и он может быть применён, как препарат для восстановления и коррекции микробиологических нарушений желудочно-кишечного тракта макроорганизма (человека и животных) /Кириленко, 2015/.

Ряд авторов предлагает использование в качестве препаратов нормальные полноценные микробиоценозы человека /Шендеров, Манвелова, 1999; Хачатрян А.П., Хачатрян Р.Г., 1999; Суворов, Симаненков, 2012/. Причём для бесконечно долгой сохранности биологического материала рекомендуется помещать его в жидкий азот. Биоматериал, хранящийся в подобных криобанках, в последующем может быть использован для конструирования простых и сложных по составу аутопробиотиков и продуктов функционального питания /Суворов, Симаненков, 2012/. В патенте «Способ получения банка аутохтонных штаммов микроорганизмов для восстановления кишечного микробиоценоза человека» /Хачатрян А.П., Хачатрян Р.Г., 1999/ описывается методика создания препарата аутологичных кишечных микроорганизмов. Способ включает отбор проб фекалий из одного и того же организма в период его клинически здорового состояния, начиная с 7-15 дня после рождения и в течение всей жизни периодически не чаще 1 раза в год. Из проб выделяют и идентифицируют аутоштаммы нормальной кишечной микрофлоры. Биомассу каждого вида бактерий отдельно нарабатывают на селективных питательных средах до титра не менее $10^3 - 10^9$ кл/мл. Полученные биомассы объединяют и добавляют стабилизирующий состав. Смесь разделяют на

образцы. Каждый образец консервируют и хранят в течение жизни человека с периодическим контролем биотитра. В грудном возрасте до 1 года в качестве нормальной кишечной микрофлоры выделяют преимущественно бифидобактерии вида *Bifidobacterium bifidum*, *B. brevis*, *B. longum subsp. infantis* и лактобактерии вида *L. acidophilus*, *L. fermenti*. В возрасте старше 1 года в качестве нормальной кишечной микрофлоры выделяют преимущественно бифидобактерии вида *B. longum*, *B. adolescentis*, лактобактерии вида *L. acidophilus*, *L. fermenti*, *L. plantarum*, штаммы бактерий *Escherichia coli* и молочнокислые стрептококки преимущественно вида *Enterococcus faecium*, *E. faecalis*, *E. avium*, *E. salivarius*. В процессе хранения после контроля биотитра дополнительно объединяют в равных соотношениях часть образцов аутоштаммов бактерий, выделенных из нормальной кишечной микрофлоры человека в разные периоды его жизни. Введение в кишечник человека образцов банка аутоштаммов микроорганизмов позволяет одновременно воздействовать на различные звенья нарушенного бактериоценоза кишечника за счёт использования более полного спектра нормальной микрофлоры кишечника /Хачатрян А.П., Хачатрян Р.Г, 1999/.

Методика получения аутопробиотической закваски на основе энтерококков описана в патенте «Способ получения аутопробиотика на основе *E. faecium*, представителя индигенной микрофлоры кишечника хозяина" /Суворов, Симаненков, 2012/. Новизна предлагаемого оригинального способа приготовления молочнокислой закваски заключается в том, что предлагаемый продукт получают из собственного (аутопробиотического) штамма *E. faecium* - обитателя желудочно-кишечного тракта конкретного пациента. Способ отличается тем, что после отбора характерных по морфологии колоний и перед непосредственно получением продукта осуществляют полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с определением вида энтерококка и генетических детерминант патогенности, что предлагается впервые. Данный способ обеспечивает абсолютную

безопасность готового продукта для человека. Способ отличается высокой скоростью получения готовой закваски (4-6 суток с момента взятия материала) /Суворов, Симаненков, 2012/.

Для выделения индигенных энтерококков из фекалий для создания аутопробиотических молочнокислых заквасок необходимо осуществить следующий алгоритм действий: высеивание бактерий из фекалий пациента на селективные среды, идентифицирование выделенных штаммов до рода, осуществление методом ПЦР для определения вида энтерококка и возможного содержания факторов патогенности, произвести отбор клонов, удовлетворяющих требованиям генетической безопасности и физиологической функциональности, депонировать индивидуальные штаммы энтерококков в криохранилище, получить молочнокислую закваску /Суворов, Симаненков, 2012/.

Аутологичные микроорганизмы, а именно лактобациллы, были предложены для лечения бактериальных вагинозов /Коршунов, Ефимов, 2001; Коршунов с соавт., 2001/. По мнению авторов, применение коммерческого препарата лактобактерин в виде вагинальных суппозиториях вызывало улучшение в составе вагинальной микрофлоры, но не приводило к полному восстановлению молочнокислой флоры, вследствие низкой приживляемости лактобактерий кишечного происхождения во влагалище. Было предложено корректировать нарушения микробиоценоза с помощью аутоштаммов лактобактерий, выделенных из влагалища пациенток, причём местный препарат аутоштаммов лактобактерий в виде суппозиториях назначался после проведения курса антибактериальной терапии. Ввиду того, что во влагалище, непосредственно после антибиотикотерапии, в достаточном количестве вводились успешно приживляющиеся в нём собственные лактобактерии, которые становились фактором, препятствующим колонизации патогенными и условно-патогенными микроорганизмами, риск рецидива заболевания сводился к минимуму.

Аналогичный метод был применён для восстановления, нарушенного микробиоценоза влагалища беременных женщин после антибиотикотерапии пиелонефрита, и также заключался в трансплантации собственных живых лактобактерий и формировании индивидуального влагалищного биоценоза /Высоцких, Беккиева, 2007/.

Исследование Мельникова В.А., Стуловой С.В., Тюминой О.В и др. также посвящено исследованию ауто трансплантации собственных вагинальных лактобацилл. Авторы утверждают, что бактериальные препараты (аллогенные лактобациллы), предназначенные для восстановления микробиоценоза влагалища, не оправдали надежд. Это связано с их низкой колонизацией и быстрой элиминацией вводимых бактериальных штаммов из влагалищной среды, а наблюдаемый кратковременный бактериологический эффект, по сути, ложноположительный и не предотвращает рецидив бактериального вагиноза. Авторами проведено рандомизированное двойное слепое исследование применения лактобацилл, которое продолжалось 12 месяцев. Для исследования было определено 165 пациенток с бактериальным вагинозом. На контрольных осмотрах присутствовали 132 пациентки: 70 - из группы леченных собственными лактобациллами (I группа), 62 - из группы леченных аллогенным пробиотиком «Ацилакт» (II группа). Терапевтическая эффективность была исследована с применением критериев клинического улучшения, восстановления микробиоценоза влагалища и исчезновением объективных симптомов, сопровождающих эту инфекцию. Профилактическая эффективность определялась по количеству повторных инфекций, которые имели место в течение всего периода наблюдения. Динамика восстановления биоценоза влагалища до нормоценоза достоверно различается в зависимости от способа его восстановления. При использовании культуры собственных лактобактерий уже через три месяца у большинства женщин (82,2 %) формировался нормоценоз, достигая максимальных цифр (88,7 %) к шести месяцам после лечения, а к концу исследования прирост составил всего 1,5 %. При использовании чужеродных

бактерий, препарата «Ацилакт» нормоценоз восстанавливался к трём месяцам у 61,7 % пациенток, к шести месяцам - у 71,4 % и к двенадцати месяцам - у 78 %. Темп и объём восстановления во II группе женщин достоверно отличался от значений их в I группе ($p \leq 0,05$). Суммируя результаты испытаний аллогенных штаммов и аутоштаммов лактобацилл, авторы пришли к заключению, что лактобациллы обладают генетической гетерогенностью, обуславливающей определённую специфичность по отношению к хозяину /Мельников, Стулова, 2012/.

Штаммы индигенных лактобактерий и бифидобактерий были с успехом использованы для коррекции как дисбиозов влагалища, так и дисбиозов кишечника /Коршунов, Смянов, 1996; Ван Ликуй, дис. 2006; Шендеров, Манвелова, 1999/. Тем не менее, на современном этапе количество исследований применения аутологичных штаммов в качестве индивидуального лечебно-профилактических средств ограничено.

Предварительные результаты испытаний аутопробиотиков свидетельствуют об их значительной эффективности, по сравнению с пробиотиками, изготовленными на основе коллекционных культур. /Соловьева, 2017/. В первую очередь такие препараты должны использоваться для коррекции микрофлоры лиц, чья профессиональная деятельность связана с частым перемещением в различные географические зоны (в частности, спортсменов); а также представителей определённых профессиональных групп, в которых поддерживается относительно постоянный состав, и которые являются объектами микробиологического риска. Деятельность этих групп может быть связана с длительной эксплуатацией объектов с искусственной средой обитания (кессонщики, операторы командных пунктов РВСН, подводники). Аутопробиотики потенциально применимы и в клинической практике, в том числе, для профилактики дисбактериозов у новорожденных. Для данных препаратов не существует проблем биологической совместимости и приживляемости,

поэтому они являются более активными, нежели их аналоги, изготовленные на основе коллекционных штаммов.

Перечень видов препаратов и культур, из которых препараты будут создаваться, может быть весьма велик. В ближайшей перспективе планируется изучение эффективности препаратов на основе вейлонелл, саливарных стрептококков и коринебактерий.

1.7. Индексы и коэффициенты, применяемые для оценки микробиоценоза организма

Обзор методов расчета дисбиотического индекса хорошо представлен в работе Wei, S., et al. 2021. В соответствии с данной работой мы приводим 5 категорий дисбиотических индексов с кратким их описанием:

1. Категория 1: крупномасштабное профилирование бактериальных маркеров. Примером может служить GA-map dysbiosis test (Genetic Analysis AS, Oslo, Norway) - тест для выявления широкого круга бактерий из 10 бактериальных классов и сопоставлении с нормальной микрофлорой контрольной популяцией (n=297 человек составляла контрольная популяция, относительно которой проводится расчёт индекса). При этом параметры нормальной микрофлоры кишечника и детали расчёта недоступны.

2. Категория 2: серия методов, основанных на исследовании таксонов. Эти методы дают хорошие результаты при наличии данных секвенирования. Этот метод расчёта индекса имеет множество модификаций, которые применяются для разных случаев нарушений работы желудочно-кишечного тракта.

3. Категория 3: сопутствующая классификация. В основе индекса лежит расчёт отклонения от нормы (с помощью вычислительных инструментов MetaPhlan2 и HUMAnN2). Исходными данными являются концентрации таксонов или метаболитов.

4. Категория 4: случайные выборки. Метод основан на машинном обучении. Для реализации метода требуется значительная выборка верифицированных данных.

5. Категория 5: сочтанный альфа и бета разброс. Как и во всех выше перечисленных методах в основе расчёта индекса лежит секвенирование. Альфа разброс – разнообразие таксонов у конкретного человека; бета разброс – разнообразие таксонов в популяции.

Все эти методы основаны на анализе высокотехнологичных лабораторных практик анализа, полученных в процессе секвенирования, протеомного анализа, ПЦР. И все эти методы нацелены на выявление патологических состояний желудочно-кишечного тракта человека, ассоциированных с измененным микробиомом кишечника. Ещё более дорогие и более эффективные методы связаны с метагеномными исследованиями фекалий человека /Gupta et al., 2020/. На основании таких исследований существует возможность достоверного предсказания некоторых болезней человека /Chen et al., 2021/. Но, несмотря на очевидные успехи, нет глубокого понимания взаимосвязи микроорганизмов в составе микробиома и его взаимодействия с человеком /Andreu et al., 2021/. Кроме того совершенно не изучена динамика изменения микробиома человека во времени /Schmidt et al., 2018/.

Заключение

Представленный материал убедительно свидетельствует о развитии синдрома нарушения колонизационной резистентности у человека в искусственной среде обитания в части, касающейся в первую очередь барьера, формируемого протективной микрофлорой. Представлены данные об эффективности пробиотических средств. Вместе с тем, материалы, касающиеся использования аутопробиотиков в практике здравоохранения присутствуют в доступной нам литературе в небольшом количестве, а

материалов, свидетельствующих об эффективности аутопробиотиков в качестве средств оптимизации микрофлоры у человека в искусственной среде обитания нет вообще. Что касается существующих индексов для оценки микрофлоры, то они представляются статичными и громоздкими. Это послужило причиной для проведения наших исследований.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Объём исследований

Состав кишечной микрофлоры животных и человека изучали при воздействии на организм нервно-эмоционального стресса.

В эксперименте с биологическими моделями участвовало 26 обезьян - макака резус из вивария ГНЦ РФ ИМБП РАН. Животные содержались в условиях конвенционального вивария. Целью исследования было влияние пребиотика (амбен) на протективную микрофлору кишечника, и приём аутопробиотиков.

В эксперименте Марс – 105 принимали участие 6 человек. В первые 30 дней, в том числе в период острой адаптации, члены экипажа принимали аутопробиотики на основе *Enterococcus faecium*, выделенных от каждого члена экипажа, в виде угольных таблеток, насыщенных культурами *Enterococcus faecium*, в количестве 10^8 КОЕ колониеобразующих единиц (КОЕ) в каждой таблетке.

В эксперименте Марс-500 принимали участие 6 человек. В первые 30 дней, в том числе в период острой адаптации, члены экипажа принимали аутопробиотики на основе культур *Enterococcus faecium*, выделенных от каждого члена экипажа, в виде угольных таблеток, в концентрации 10^8 КОЕ в каждой таблетке. В дальнейшем члены экипажа принимали пробиотики (коммерческие штаммы) через каждые 2 месяца.

В эксперименте Сухая иммерсия принимали участие добровольцы от 6 до 12 человек, добровольцы принимали кефир, обогащённый культурами

Lactobacillus spp. (аутопробиотик) в количестве 10^8 КОЕ, выделенных от каждого человека (испытателя).

2.2 Моделирование экспериментов

Проводились работы в наземных экспериментах в герметизированном объекте (Наземный экспериментальный комплекс ГНЦ РФ ИМБП РАН), в условиях сухой иммерсии на базе ГНЦ РФ ИМБП РАН, а также эксперименты с обезьянами (макака резус на базе вивария ГНЦ РФ ИМБП РАН).

Эксперименты «Марс 105» и «Марс 500» - имитация пилотируемого полета на Марс. Цель экспериментов: сбор информации о состоянии здоровья и работоспособности экипажа в условиях, приближенных к марсианскому полету: длительное нахождение в замкнутом пространстве, автономность; отработка технологий медицинского обеспечения космонавтов для межпланетных полетов и оценка возможностей современных технологий. В эксперименте «Марс-500» испыталы принимали пробиотические и аутопробиотические препараты на протяжении всего эксперимента. (Табл. 2)

Таблица 2. Прием препаратов в эксперименте Марс-500

Вид препарата	Интервал времени
Препарат на основе аутоштаммов <i>E.faecium</i> 0-30 сутки	1-30
Перерыв	30-90
Пробиотик на основе <i>E.faecium</i> Университет Тусция, Италия	90-120
Перерыв	120-180
Пробиотик на основе <i>E.faecium</i> Университет Тусция, Италия	180-210
Перерыв	210-240
Квас на основе <i>Saccharomyces boullardii</i>	240-270
Пробиотик на основе <i>E. faecium</i> + пребиотик Neutraceuticals	270-300
Перерыв	300-360
Пребиотик Neutraceuticals	360-390
Перерыв	390-480

Эксперимент «Сухая иммерсия» для исследования физических и психических изменений человеческого организма в условиях невесомости экспериментальным путём. Сухая иммерсия позволяет воспроизводить, такие факторы космического полёта как опорная и весовая аксиальная разгрузка, перераспределение жидких сред организма, гиподинамия. Метод состоит в погружении испытуемого в иммерсионную ванну с водой, от которой он отделен водонепроницаемой тонкой тканью с площадью, существенно превышающей зеркало воды. При этом человек оказывается свободно "подвешенным" в толще воды и давление, оказываемое на различные части тела, уравновешено, что воссоздает условия, близкие к безопорности. Пребывание в сухой иммерсии сопровождается гипокинезией, снижением мышечного тонуса, перераспределением жидкостных сред в организме человека и как следствие увеличением объема выделяемой жидкости из организма. Модель позволяет проводить исследования эффективности различных средств и методов профилактики негативных влияний гравитационной нагрузки.

2.3 Методы микробиологических исследований

Все обследуемые за 3 дня до взятия проб находились на диете, из рациона питания были исключены продукты, усиливающие процесс брожения в кишечнике, алкоголь, антимикробные лекарственные препараты.

При микробиологических исследованиях кишечника у здоровых лиц использовались пробы фекалий после естественной дефекации, который собирался в стерильный герметичный контейнер с плотно закрывающейся крышкой.

1 г нативной пробы фекалий разводили в 9 мл физиологического раствора, получая исходное разведение 10^1 . Из исходного разведения приготавливали последовательные десятикратные разведения и осуществляли посев на селективные среды в таблице 3. Все среды инкубировали при 37°C 48 часов, чашки со средой Сабуро оставляли на 48 часов при комнатной

температуре. Анаэробы культивировали в анаэроостате. После инкубации проводили подсчёт колоний каждого вида, на плотных средах с учётом степени разведения посевного материала. Отбор проб из глотки и полости носа осуществлялся натошак, до чистки зубов, с помощью тампонов с транспортными средами «Амиес с углём» /Сорап, Италия/.

Суспендирование проб с тампонов производилась в стерильном физиологическом растворе. После эмульгирования производилась раститровка первоначальной концентрации суспензии микроорганизмов в 3-4 раза, путём последовательного переноса 0,5 мл материала из пробирки с первоначальной концентрацией в последующую. Посев производился стеклянным шпателем, аэробным путём, газонем на питательные среды (табл. 3). Инкубация микроорганизмов осуществлялась 24 часа, 48 часов – на агаре Сабура. Первичная идентификация микроорганизмов производилась методом микроскопирования культуральных мазков с окраской по Граму. Микробиологические исследования у здоровых лиц производились в лаборатории микрoэкологии человека ГНЦ РФ – Института медико-биологических проблем РАН /Меньшиков, 2003, МР 2.3.2.2327-08/.

При учёте результатов учитывали, что кишечная микрофлора человека – весьма лабильная система, подверженная колебаниям в зависимости от многих эндогенных и экзогенных факторов, по этому проводились 2-х кратные исследования с небольшим интервалом. По характеру отклонений микрофлоры кишечника от нормы, определяли степень дисбиоза.

Статистическая обработка результатов. Все полученные количественные данные обрабатывались с помощью статистической программы Statistica 6 и 10. Использовались параметрические и непараметрические методы статистики. Степень достоверности различий определялась по методу Стьюдента.

2.4 Определение видовой принадлежности и исследование на наличие факторов патогенности при помощи молекулярно-генетических методов

Для оценки молекулярно-генетических характеристик штаммов из индивидуальных колоний микроорганизмов выделяют хромосомную ДНК. На матрице полученной ДНК проводят ПЦР или реал-тайм ПЦР с использованием праймеров (табл. 4 и 5), высокоспецифичных к определенным родам микроорганизмов. Отдельное исследование с использованием ПЦР (реал-тайм ПЦР) и высокоспецифичных праймеров производится для определения наличия генетических детерминант патогенности будущих штаммов аутопробиотиков.

Оценка результатов ПЦР осуществляется с помощью горизонтального электрофореза 1% агарозном геле.

Для подготовки аутопробиотиков отбирали бактериальные клоны, относящиеся к интересующим видам микроорганизмов, не содержащие генов патогенности.

Таблица 4. ДНК праймеры для определения генов патогенности энтерококков.

Название гена	Нуклеотидная последовательность праймеров		Размер ампликона
	Прямой	Обратный	
<i>gelE</i>	ACCCCGTATCATTGGTTT	ACGCATTGCTTTTCCATC	419
<i>esp</i>	TTGCATAATGCTAGTCCACGACC	GCGTCAATCGGAAGAATCAT	933
<i>sprE</i>	GCGTCAATCGGAAGAATCAT	CGGGGAAAAAGCTACATCAA	233
<i>fsrB</i>	TTTATTGGTATGCGCCACAA	TCATCAGACCTTGGATGACG	316
<i>asaI</i>	CCAGCCAACSTATGGCGGAATC	CCTGTCGCAAGATCGACTGTA	529
<i>cylA</i>	ACTCGGGGATTGATAGGC	GCTGCTAAAGCTGCGCTT	688
<i>cylM</i>	GATTGGAATGTGGGAATCCTAA	ACTTCCGGCAACCTTTAGTGTА	825
<i>efaA</i>	CGTTAGCTGCTTGCGGGAATC	CCATACTACGTTTATCGACAC	735
<i>E.faecalis</i>	TCAAGTACAGTTAGTCTTTATTAG	ACGATTCAAAGCTAACTGAATCAGT	941
<i>E.faecium</i>	TTGAGGCAGACCAGATTGACG	TATGACAGCGACTCCGATTCC	658
<i>van</i>	TTCATGTTCCACGAACCAGAG	CGTTGAACGAACGAATGAAAA	436
<i>hyl</i>	CCGATGCTGATTTGGGATAAT	TCTGGGTCTTTGGCTAGCAGT	359
<i>pilA</i>	TTTTGTGTGACTAATCCAG	ATGGCAATAAATCGGTATGA	842

Таблица 3. Структура бактериологического исследования микрофлоры толстой кишки

Наименование среды	Разведение	Посевная доза из разведения, мл	Условия инкубации			Назначение среды
			Анаэробные/аэробные	Температура, °С	Время, час	
Эндо агар	10^5	0,05	аэробные	37	18 - 24	Подсчет общего числа кишечной палочки, атипичных форм, энтеропатогенных кишечных палочек. Выделение, подсчет УПМ семейство <i>Enterobacteriaceae</i> .
5 % кровяной агар	10^6	0,05	аэробные	37	18 - 24	Подсчет кишечной палочки, кокковой флоры, определение и подсчет гемолизирующей флоры
Маннит солевой агар	10^3	0,05	аэробные	37	18 - 24	Выделение стафилококков
Среда Сабуро	$10^1 - 10^3$	0,05	аэробные	37	48	Выделение грибов рода <i>Candida</i>
Бифидум среда	$10^8 - 10^9$	1,0	анаэробные	37	48	Определение количества бифидобактерий
Среда МРС-2, МРС-4	$10^7 - 10^9$	0,05 - 1,0	анаэробные	37	48	Определение количества лактобацилл
Цитратный агар Симмонса	10^6	0,05	анаэробные	37	48	Для дифференциации энтеробактерий на основании утилизации цитрата
Среда Энтеро	10^6	0,05	аэробные	37	18 - 24	Определение количества энтерококков
SPS агар	10^5	1,0	анаэробные	37	18 - 24	Для селективного выделения <i>C. perfringens</i>

Таблица 5. ДНК праймеры для определения компонентов энтероцинового оперона энтерококков.

Название гена	Функция	Нуклеотидная последовательность праймеров		
		прямой	обратный	Размер ампликона
<i>entA</i>	Энтероцин А	GGGGTGATTAG ATTATGAAACAT TAA	TTAGCTTCCCTGGA ATTGC	230
<i>entB</i>	Энтероцин В	ATGCAAAATGTA AAAGAATTAAG TACG	TTAGTTGCATTTAG AGTATACATTTGCT	223
<i>entK</i>	Гистидинкиназа	GAGGGGATCTC TTGATTAC	CCATACCSTTTTAT CCCTTCAA	339
<i>eniB</i>	Иммунитет продуцента к энтероцину В	AGCAAAAGGAA GAAGAAATATG G	GTGTCATTTTTATA TTCTATA	195
<i>entI</i>	Белок иммунитета к энтероцину А	CTCCACCTACA CCACAAGC	GGTGCAGGTTTAGG AACAGC	289

Методы получения аутопробиотиков на основе лактобацилл и энтерококков

2.5 Изоляция и идентификация аутологичных культур и приготовление аутопробиотиков

2.5.1 Идентификация чистой культуры аутопробиотика

Производили отбор чистых культур микроорганизмов. Идентификацию чистой культуры осуществляли на основании культурально-морфологических свойств /Патент Шендеров, Манвелова, 1999/.

Идентификация чистой культуры *Enterococcus faecium*

На среде Энтеро отбирались типичные по морфологии колонии *E. faecium* сиренево-розового цвета со светло-розовым ободком и отсеивались их на новую чашку Петри с плотной средой Энтеро с целью накопления чистой

культуры. Культивировали в течение 24 часов при температуре 37°C. Препараты из чистых культур микроскопировали при окрашивании по Граму. *E. faecium* при окрашивании по Граму приобретали темно-синий цвет, форма округлая и располагались в виде коротких цепочек. Чистые культуры направлялись на генетический анализ (см. выше).

Идентификация чистой культуры *Lactobacillus spp.*

На среде МРС-4 отбирались типичные по морфологии колонии лактобацилл и отсеивались на новую чашку Петри со средой МРС -4 с целью накопления чистой культуры. Культивировались в течение 48 часов при 37°C в анаэробных или микроаэрофильных условиях. Препараты из чистых культур микроскопировались при окрашивании по Граму. Клетки лактобацилл при окрашивании имели темно-синий цвет, форму палочек и располагались в виде цепочек или отдельных клеток. Чистые культуры направлялись на генетический анализ.

2.5.2 Изготовление аутопробиотика

Методика изготовления аутопробиотического препарата включала в себя отбор проб фекалий у практически здоровых лиц в период их клинически здорового состояния за 30 дней до предполагаемого применения. Из проб выделялись и идентифицировались аутоштаммы лактобактерий и бифидобактерий. Биомасса выделенных микроорганизмов очищалась и нарабатывалась на селективных питательных средах MRS для культивирования лактобактерий и Бифидосреда для бифидобактерий в анаэробных условиях до титра не менее 10^7 – 10^9 КОЕ/мл. Контроль роста осуществлялся бактериологическим методом посева на питательные среды из серийных разведений. Нарботанная биомасса подвергалась лиофилизации, т.е. высушиванию в замороженном состоянии под вакуумом в пенициллиновых флаконах. Содержание клеток аутологичных лактобацилл в одном флаконе было не менее 10^7 КОЕ/мл. Контроль роста осуществлялся

бактериологическим методом посева на питательные среды из серийных разведений. Идентификация микроорганизмов проводилась после получения результатов с использованием коммерческих микротест-систем. Коммерческие микротест-системы для биохимической идентификации микроорганизмов различных групп. (BioMerieux – Франция, Lachema – Чехия).

В экспериментах с использованием кисломолочных продуктов, обогащённых культурами аутоштаммов, микроорганизмы выделялись из кишечника обследуемых, тестировались на отсутствие признаков патогенности. Нарбатывалась биомасса препарата, асептически смывалась физраствором и добавлялась в кефир, приобретавшийся в торговой сети, таким образом, чтобы конечная концентрация аутоштаммов в кефире составила бы 1×10^7 КОЕ/мл. Такой кефир обследуемый выпивал по утрам в течение всего эксперимента в объёме 200 мл.

2.5.3 Описание методов статистического анализа

В данной работе мы проводим квази-ретроспективный анализ проведенных в ИМБП экспериментов по изоляции малых групп. Изоляционные эксперименты проводились как короткие (7-15 дней), так и длительные (до 520 суток). Эксперименты проводились при различных условиях и для отработки различных ситуаций. Проведённые эксперименты преследовали различные научные цели. Анализ кишечной микрофлоры участников экспериментов был второстепенной задачей исследователей. В большинстве случаев изоляционные эксперименты были направлены на исследования психологии малых групп в экстремальных условиях близких к космическим /Supolkina et al., 2021/.

Что касается микробиологических исследований, то общими условиями для всех этих экспериментов можно назвать:

1. Изоляция малых групп (до 6 человек).
2. Одинаковое питание (рационы космонавтов).

В силу этих причин нам необходимо было применять различные статистические подходы и сравнивать результаты экспериментов с учетом протокола изоляционного эксперимента.

Ниже описаны статистические методы, которые использовались для всех экспериментальных данных в соответствии их применимости.

Количественные показатели оценивались на предмет соответствия нормальному распределению с помощью критерия Шапиро-Уилка (при числе исследуемых менее 50) или критерия Колмогорова-Смирнова (при числе исследуемых более 50).

Количественные показатели, имеющие нормальное распределение, описывались с помощью средних арифметических величин (M) и стандартных отклонений (SD), границ 95% доверительного интервала (95% ДИ).

В случае отсутствия нормального распределения количественные данные описывались с помощью медианы (Me) и нижнего и верхнего квартилей ($Q1 - Q3$).

Сравнение трех и более групп по количественному показателю, имеющему нормальное распределение, выполнялось с помощью однофакторного дисперсионного анализа, апостериорные сравнения проводились с помощью критерия Геймса-Хауэлла (при неравных дисперсиях), апостериорные сравнения проводились с помощью критерия Тьюки (при условии равенства дисперсий).

Сравнение трех и более групп по количественному показателю, распределение которого отличалось от нормального, выполнялось с помощью критерия Краскела-Уоллиса, апостериорные сравнения – с помощью критерия Данна с поправкой Холма.

Статистический анализ проводился с использованием программы StatTech v. 3.0.9 (разработчик - ООО "Статтех", Россия). Программа зарегистрирована Федеральной службой по интеллектуальной

собственности, номер регистрации 2020615715, дата регистрации 29.05.2020 года.

Математическая обработка полученных данных проводилась при помощи программного обеспечения Microsoft Excel 2010. Анализ результатов, полученных в исследованиях, показал нормальное распределение величин определяемых показателей, что позволило применить при их обработке общепринятые методы вариационной статистики с использованием t-критерия Стьюдента. Различия считались статистически значимыми при вероятности не менее 95 % ($p < 0,05$).

Результаты эксперимента были обработаны с использованием пакета прикладных программ «Statisticv.10.0 for Microsoft Windows». Данные исследования представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха (Q25–Q75). Достоверность полученных результатов оценивали при помощи непараметрического критерия Вилкоксона.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Эубиотический индекс

Для оптимизации оценки эффективности пробиотического средства нами ранее был разработан и доработан так называемый эубиотический индекс, который выражается в суммировании положительных и отрицательных количественных изменений протективных и условно-патогенных групп микроорганизмов, отражающий позитивные сдвиги в составе микробиоты при приеме препаратов пробиотиков и аутопробиотиков.

К положительным свойствам препаратов пробиотиков или аутопробиотиков, способных обеспечить позитивные сдвиги в составе микробиоты отнесены:

- количественный рост микроорганизмов - представителей видов, относящихся к протективным группам;

- стабилизация количества микроорганизмов - представителей видов, относящихся к протективным группам в пределах нормативных величин;
- снижение количества микроорганизмов - представителей видов, относящихся к условно-патогенным группам;
- стабилизация количества микроорганизмов - представителей видов, относящихся к условно-патогенным группам, в пределах нормативных величин.

К отрицательным показателям препаратов пробиотиков или аутопробиотиков отнесены:

- количественный рост микроорганизмов, представителей видов, относящихся к условно-патогенным группам;
- стабилизация количества микроорганизмов, представителей видов, относящихся к условно-патогенным группам на оптимальных количественных уровнях;
- снижение количества микроорганизмов - представителей видов, относящихся к протективным группам;
- стабилизация количества микроорганизмов - представителей видов, относящихся к протективным группам, на низких количественных уровнях.

При анализе изменений анализируются как данные, полученные непосредственно после приёма препарата пробиотиков и аутопробиотиков, как и отсроченные данные. Индекс выражается в виде отношения количества положительных изменений к количеству отрицательных.

Положительный эффект от приёма препаратов пробиотиков или аутопробиотиков квалифицируется как высокий показатель пробиотического индекса (больше единицы). Отрицательный эффект - индекс меньше или равный единице.

3.1.1 Расчёт эубиотического индекса для оценки эффективности использования пробиотических средств

В начале мы должны рассмотреть дисбиотические индексы, поскольку они используются повсеместно, однако не дают однозначного ответа на вопрос о состоянии микробиоты кишечника здорового человека. Дисбиотические индексы многочисленны, поскольку многие из них строго специализированы под те или иные состояния, отличные от нормы. С другой стороны и понятие нормы кишечной микробиоты человека весьма размыто.

Поскольку в наших исследованиях принимали участие здоровые испытуемые, то необходимо было выбрать индекс, который подходил бы для описания баланса микробиоты кишечника. При этом мы были сильно ограничены имеющимися архивными данными, которые состояли из информации о типе наиболее распространённых микроорганизмов кишечника и их концентрации. По этой причине мы разработали свой эубиотический индекс.

Эубиотический индекс рассчитывался из параметра приоритетности колонизации условно протективных и условно-патогенных микроорганизмов. Параметр приоритетности колонизации $P_n^\pm(t)$ в момент времени t определяется для микроорганизма с порядковым номер $n(t)$ в списке приоритетности колонизации с максимальным порядковым номером $N(t)$ в этом списке. Распределяют микроорганизмы в списке приоритетности в соответствии с их концентрацией в пробе. Так наиболее распространённому микроорганизму присваивается 1-й номер в списке ($n(t)=1$), а наименее распространённому присваивается порядковый номер $n(t)=N(t)$. Для каждой пробы может быть разное число типов обнаруженных микроорганизмов и с разными концентрациями. Для каждого n -го типа микроорганизма можно найти соответствующий ему параметр приоритетности колонизации $P_n^\pm(t)$ по формуле:

$$P_n^\pm(t) = \frac{2 * (N(t) + 1 - n(t))}{N(t) * (N(t) + 1)} \quad (1)$$

При этом верхний индекс «+» относится к условно протективным микроорганизмам, а индекс «-» к условно патогенным. При этом выполняется условие:

$$\sum_{n=1}^N P_n^- + P_n^+ = 1 \quad (2)$$

По сути параметр приоритетности колонизации показывает вклад протективных или патогенных микроорганизмов в общий баланс микробиоты. Эубиотический индекс $I(t)$ для пробы, полученной в момент времени t можно найти по формуле:

$$I(t) = \sum_{n=1}^N P_n^+(t) \div \sum_{n=1}^N P_n^-(t) \quad (3)$$

Эубиотический индекс показывает во сколько раз вклад условно протективной микробиоты отличается от вклада условно патогенной. Если эубиотический индекс больше 1, это означает преобладание вклада условно протективной микрофлоры, и наоборот, если индекс меньше 1.

3.2 Анализ архивных данных по исследованию микробиоты испытуемых в гермокамерных экспериментах продолжительностью до 20 суток

Целью данного исследования являлся анализ архивных данных микробиологических исследований микрофлоры испытуемых и в гермокамерных экспериментах продолжительностью до 8 до 20 суток, проводимых в период с 1980 по 1990 годы в Институте медико-биологических проблем, для изучения влияния периода острой адаптации на их микрофлору.

Задачи исследования:

1. Оценить состояние микробиоты кишечника и верхних дыхательных путей испытуемых в период изоляции;
2. Определить сроки и степень выраженности изменений микробиоценоза

человека в период изоляции.

В данной работе проанализированы архивные журналы изоляционных экспериментов, проводимых в ГНЦ РФ ИМБП РАН в период с 1980 по 1990 годы. Всего были изучены данные 39 испытуемых - участников 7 экспериментов продолжительностью от 8 до 20 суток.

Для оценки изменений микрофлоры был использован эубиотический индекс, показывающий отношение количества положительных изменений микрофлоры к количеству отрицательных изменений.

При анализе результатов учитывался опыт участия испытуемых в экспериментах. Это позволило вычленить группу «профессионалов» или постоянных испытуемых (обозначены на диаграммах как «Постоянные»), и «новичков» (обозначены на диаграммах как «Новые участники»). Исследовались данные микробиоценоза верхних дыхательных путей (нос, глотка) и кишечника.

Различия в эубиотическом индексе постоянных и новых участников эксперимента наиболее отчетливо прослеживаются в начальный период острой адаптации, при этом новые участники показывают немного более лучшее состояние микрофлоры на 5 сутки эксперимента, однако уже к концу изоляционного периода обе группы имели примерно одинаковые значения индекса, без статистически достоверного различия, при этом в обеих группах индекс слегка возрос по сравнению с первым периодом, что говорит о некоторой адаптации участников эксперимента к условиям замкнутого гермообъекта. Также следует отметить то, скорость изменения эубиотического индекса кишечной микрофлоры постоянных испытуемых выше, чем в группе новых участников. Из этого следует то, что количество положительных изменений в группе постоянных испытуемых увеличилось на большую величину, то есть их микрофлора гораздо быстрее адаптировалась к условиям гермообъекта, чем микрофлора новых участников.

Состояние микрофлоры верхних дыхательных путей в 8-ми суточном эксперименте было стабильным на протяжении всего эксперимента у группы

постоянных испытуемых. В то время как у новых участников эксперимента состояние микрофлоры на первом этапе острой адаптации было значительно хуже, чем у постоянных. Эти различия сохранялись на протяжении всего эксперимента, при этом в середине изоляции состояние микрофлоры слегка улучшилось, что говорит о некоторой адаптации к условиям пребывания, однако это улучшение нивелировалось к концу эксперимента. Значение индекса меньше 1 говорит о том, что негативные изменения микрофлоры у данной группы преобладали над позитивными, и в целом состояние микробиоты верхних дыхательных путей было близким к дисбиотическому.

Результаты исследований микрофлоры серии экспериментов с 17-ти суточной изоляцией позволяют сделать вывод о том, что в остром периоде адаптации (первые 7-10 суток изоляции) стабилизация микрофлоры постоянных испытуемых была значительно активнее и успешнее, чем у новых, т.к. эубиотический индекс в группе постоянных испытуемых был выше 1 и значительно выше, чем в группе новых участников.

Однако к середине эксперимента микрофлора кишечника новых испытуемых немного стабилизировалась и к моменту выхода сравнивалась по показателю эубиотического индекса с группой постоянных испытуемых, у которых, напротив, в середине изоляции преобладали негативные изменения в микрофлоре. Это позволяет сделать вывод о том, что постоянные участники в целом лучше адаптируются в период острой изоляции.

При оценке состояния микрофлоры верхних дыхательных путей было выявлено статистически значимое различие между группами, при этом значение эубиотического индекса в группе постоянных участников было на всём периоде изоляции выше, чем в группе новых участников. Также отмечалось небольшое ухудшение состояния микрофлоры в группе постоянных испытуемых в конце острого адаптационного периода, которое впоследствии нивелировалось.

Данные, полученные по кишечной микрофлоре и микрофлоре верхних

дыхательных путей позволяют сделать вывод о большей пластичности микрофлоры группы постоянных испытуемых, которая, по-видимому, лучше приспособилась в период острой адаптации и достаточно быстро восстанавливалась после небольшой отрицательной динамики.

Анализ эубиотического индекса кишечной микрофлоры в обеих группах показал, что в первый период острой адаптации микрофлора постоянных испытуемых была гораздо более стабильной, чем микрофлора новых участников. При этом в середине эксперимента наблюдалось некоторое ухудшение состояния микробиоты в обеих группах, однако к концу изоляции в микрофлоре постоянных испытуемых стали преобладать положительные изменения (эубиотический индекс выше 1), при чем более выраженные, чем в группе новых участников, т.к. индекс, рассчитанный для этой группы, был ниже, чем индекс группы постоянных испытуемых.

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что микрофлора кишечника постоянных испытуемых в целом является более «пластичной» и гораздо быстрее адаптируется к изменённым условиям среды (к которым относится пребывание в гермообъекте), чем микрофлора новых испытуемых. В обеих группах как правило наблюдается ухудшение состояния микробиоты к концу периода острой адаптации с последующей стабилизацией состояния. Сглаживание данного снижения позитивных сдвигов в микрофлоре возможно провести благодаря приёму пробиотических и аутопробиотических препаратов с первых дней пребывания в гермообъекте, что позволит обеим группам быстрее стабилизировать и лучше поддерживать состояние микробиоты. Анализ эубиотического индекса микрофлоры верхних дыхательных путей у испытуемых 20-ти суточного изоляционного эксперимента показал, что в статистически значимых изменениях между двумя группами не наблюдается ни в период острой адаптации, ни в конце эксперимента, при этом показатели микрофлоры новых участников имеют тенденцию к более высоким значениям, чем в группе постоянных испытуемых.

Эксперименты с короткой изоляцией повторялись несколько раз. Таким образом был получен достаточный объем данных для статистической обработки результатов и построения математической модели изменения баланса кишечной микрофлоры человека в изоляционном эксперименте. Стоит заметить, что в каждом отдельном изоляционном эксперименте был свой исходный (измеренный за сутки до начала изоляции) уровень эубиотического индекса – I . Чтобы это учесть, мы использовали относительный индекс R_i , который вычисляется по формуле:

$$R_i(t - \text{й день изоляции}) = \frac{I(t - \text{й день изоляции})}{I(1 - 3 \text{ дня до изоляции})} \quad (4)$$

где $I(t - \text{й день изоляции})$ – эубиотический индекс, вычисленный по результатам на t -й день изоляции, а $I(1 - 3 \text{ дня до изоляции})$ – фоновое значение эубиотического индекса измеренного за 1-3 дня до начала изоляции.

Для более корректного построения математической модели, мы использовали точность расчета относительного индекса R_i до 3-го знака.

В таблице 6 представлены результаты статистического анализа показателя "Относительный индекс, R_i " в зависимости от показателя "День изоляции".

Таблица 6. Анализ показателя "Относительный индекс" в зависимости от показателя "День изоляции"

Показатель	Категории	Относительный индекс, R_i			p
		Me	$Q_1 - Q_3$	n	
День изоляции	5 DD	0,773	0,577 – 1,200	18	0,058
	8 DD	1,307	0,921 – 1,975	11	
	11 DD	1,359	1,077 – 1,424	4	
	15 DD	0,735	0,636 – 0,880	11	

В результате анализа показателя "Относительный индекс" в зависимости от показателя "День изоляции", не были выявлены

существенные различия ($p = 0,058$) (используемый метод: Критерий Краскела–Уоллиса). Подробности представлены на рисунке 2.

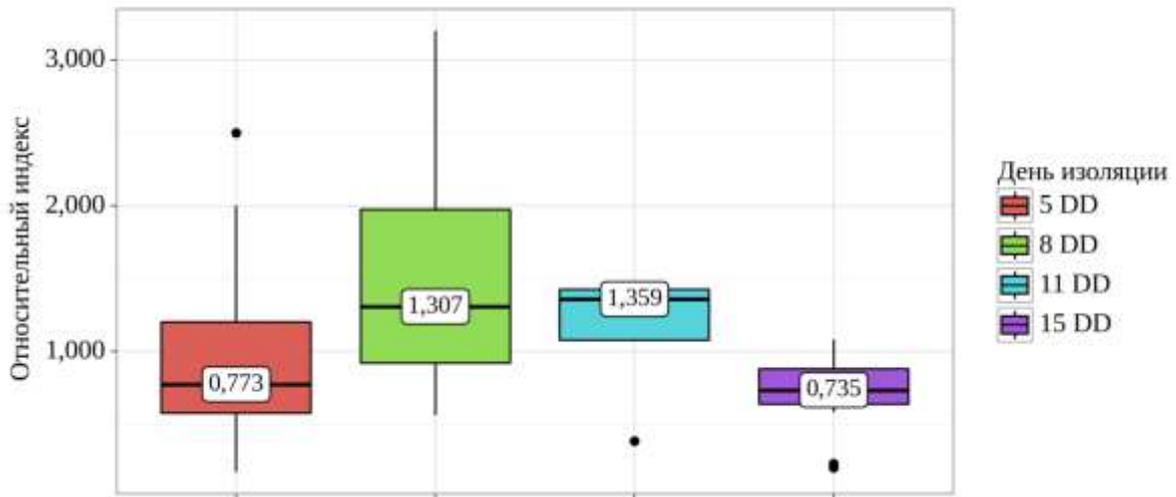


Рисунок 2 – Анализ показателя "Относительный индекс" в зависимости от показателя "День изоляции"

Как видно из рисунка – динамика во времени относительного индекса R_i имеет вид перевернутой параболы. Это обстоятельство мы использовали для построения аппроксимации (рис.3).

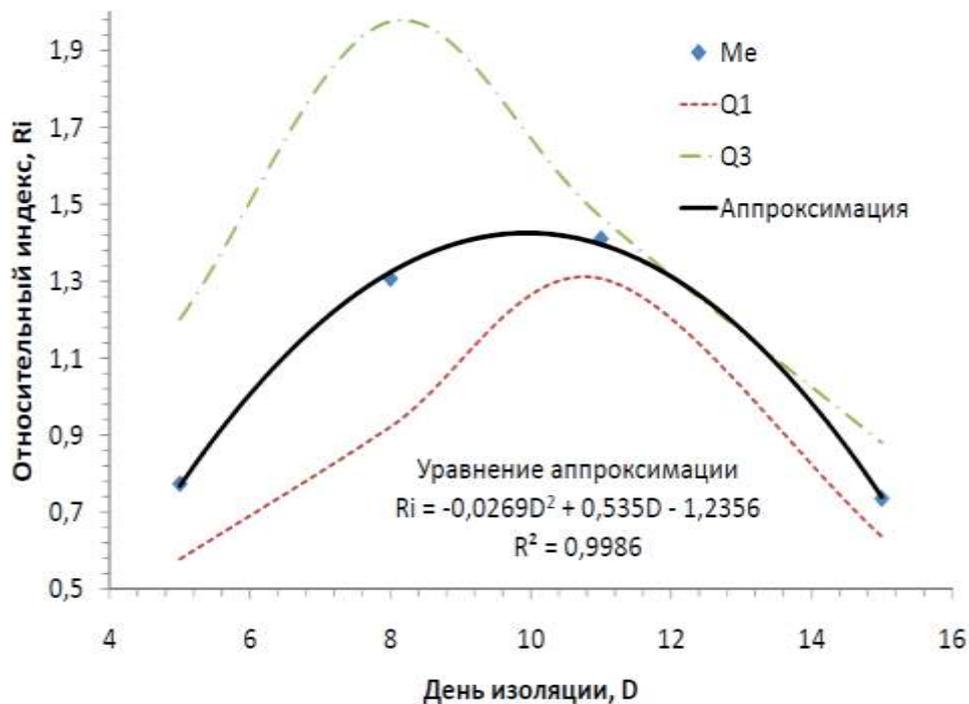


Рисунок 3. Цифровая модель

$$Ri = -0,0269D^2 + 0,535D - 1,2356 \quad (5)$$

Теснота связи для полученной аппроксимации $R^2=0,9986$.

Теснота связи $R^2=0,9986$ по шкале Чеддока оценивается как очень высокая. Таким образом, мы получили математическую модель, способную с высокой степенью достоверности описывать статистически значимые различия в динамике эубиотического индекса кишечной микрофлоры. Границы применимости разработанной математической модели:

1. Фоновые измерения должны быть за 1-3 суток до начала изоляции.
2. Группа изоляции – до 6 человек.
3. Не используются пробиотики, или пребиотики.
4. Модель создана для периода от 4 до 15 суток изоляции.

Затем нами были исследованы показатели эубиотического индекса для различных групп испытуемых. Исследования обнаружили различие в показателях эубиотического индекса (рис. 4-5).

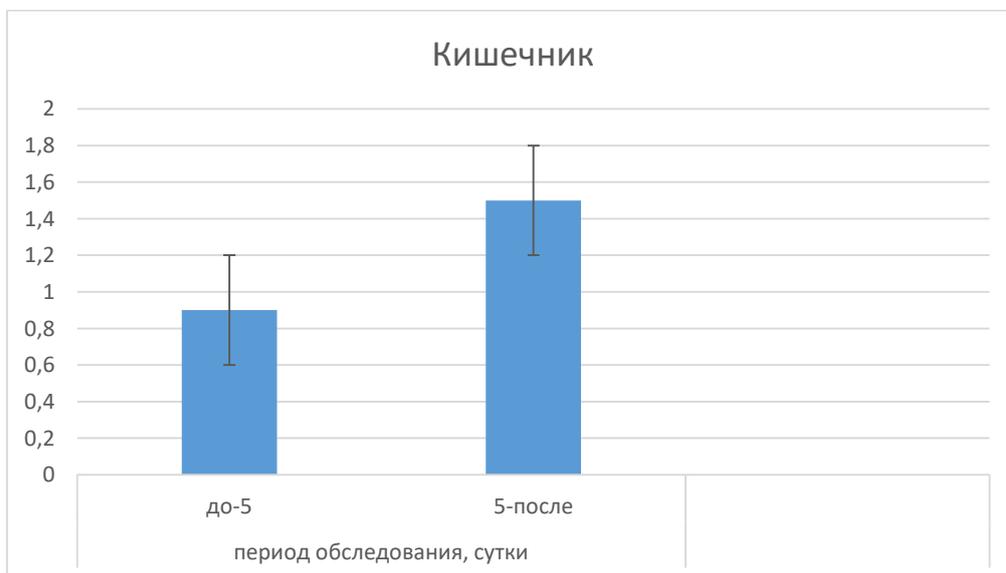


Рисунок 4. Эубиотический индекс (Ei) испытуемых 8-ми суточного изоляционного эксперимента, рассчитанный для микрофлоры кишечника

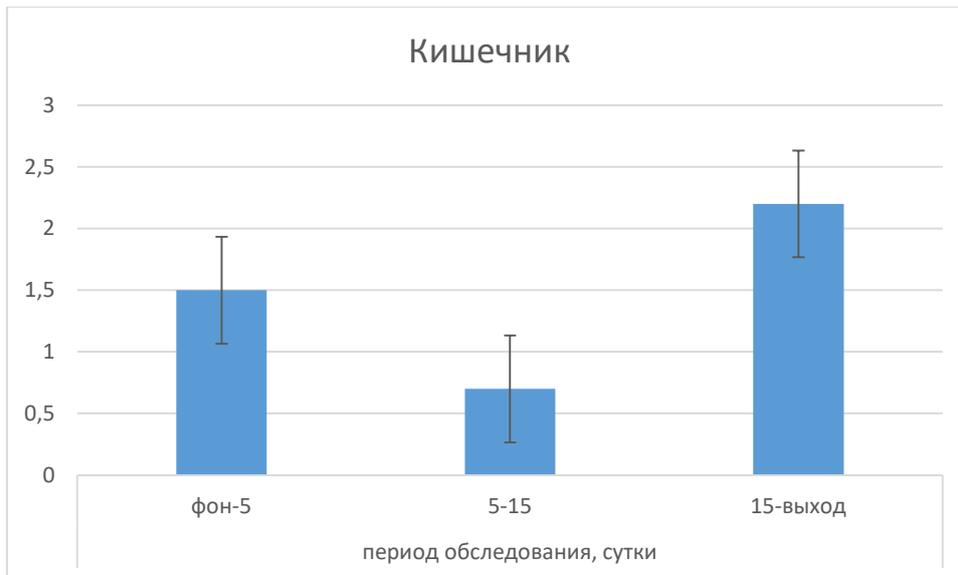


Рисунок 5. Эубиотический индекс (Ei) микрофлоры кишечника у испытуемых 20-ти суточного изоляционного эксперимента

Анализ эубиотического индекса кишечной микрофлоры в обеих группах показал, что в первый период острой адаптации микрофлора постоянных испытуемых была гораздо более стабильной, чем микрофлора новых участников. При этом в середине эксперимента наблюдалось некоторое ухудшение состояния микробиоты в обеих группах, однако к концу изоляции в микрофлоре постоянных испытуемых стали преобладать положительные изменения (эубиотический индекс выше 1), при чем более выраженные, чем в группе новых участников, т.к. индекс, рассчитанный для этой группы, был ниже, чем индекс группы постоянных испытуемых.

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что микрофлора кишечника постоянных испытуемых в целом является более «пластичной» и гораздо быстрее адаптируется к изменённым условиям среды (к которым относится пребывание в гермообъекте), чем микрофлора новых испытуемых. В обеих группах как правило наблюдается ухудшение состояния микробиоты к концу периода острой адаптации с последующей стабилизацией состояния. Сглаживание данного снижения позитивных сдвигов в микрофлоре возможно провести благодаря приёму пробиотических и аутопробиотических препаратов с первых дней пребывания в гермообъекте, что позволит обеим группам быстрее стабилизировать и лучше

поддерживать состояние микробиоты. Анализ эубиотического индекса микрофлоры верхних дыхательных путей у испытуемых 20-ти суточного изоляционного эксперимента показал, что в статистически значимых изменений между двумя группами не наблюдается ни в период острой адаптации, ни в конце эксперимента, при этом показатели микрофлоры новых участников имеют тенденцию к более высоким значениям, чем в группе постоянных испытуемых.

Ниже представлены результаты исследований в 60-суточном эксперименте.

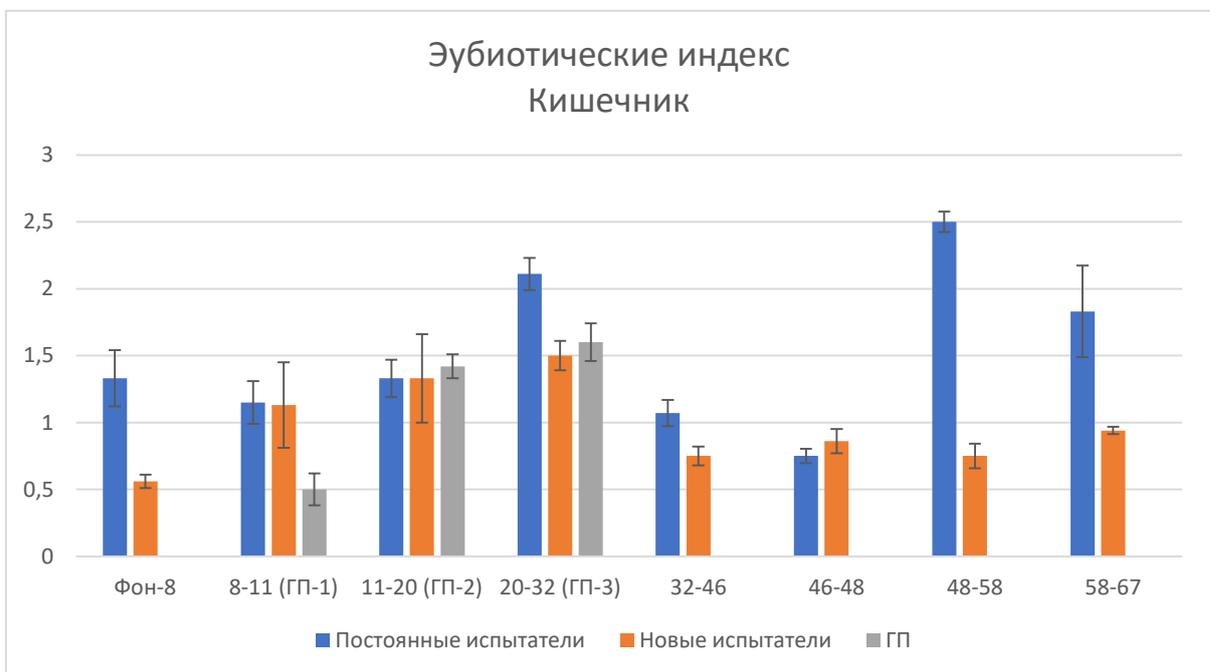


Рисунок 6. Динамика эубиотического индекса микрофлоры кишечника постоянных и новых испытуемых (основная группа) и групп посещения (ГП) в 60-ти суточном эксперименте

При анализе динамики эубиотического индекса микрофлоры кишечника постоянных и новых испытуемых было выявлено, что в группе постоянных испытуемых микрофлора более устойчива к стрессовым факторам, чем у группы новых испытуемых. Практически на всех отрезках изоляционного эксперимента эубиотический индекс у постоянных испытуемых был выше (рис. 6). Однако следует отметить, что в начале эксперимента во время периода острой адаптации состояние микрофлоры у

групп изменялось по-разному. В группе постоянных испытуемых наблюдалось некоторое снижение стабильности микрофлоры кишечника, которое впоследствии восстановилось. В то время как у группы новых испытуемых во время острой адаптации наблюдалось небольшое увеличение эубиотического индекса, что говорит о более быстром приспособлении микрофлоры к стрессовым условиям.

Также необходимо отметить, что после во второй половине эксперимента наблюдался второй минимум значений эубиотического индекса, причём в обеих группах. Этот минимум соответствует окончанию прибытия групп посещения, которые в середине эксперимента непрерывно сменяли друг друга. Этот минимум показывает, что постоянно сменяющиеся группы посещения нарушают стабильность микрофлоры основного экипажа. При этом такой же выраженный минимум во второй части эксперимента наблюдался вне зависимости от того, являлись ли члены основного экипажа постоянными испытуемыми или новыми. Хотя необходимо отметить, что микрофлора постоянных испытуемых восстановилась гораздо быстрее, чем микрофлора группы новых испытуемых, у которых более низкое значение эубиотического индекса наблюдалось вплоть до окончания эксперимента.

Таким образом, в период гермоизоляции состояние микрофлоры верхних дыхательных путей и кишечника претерпевает неблагоприятные изменения. Эти изменения наиболее выражены в период острой адаптации и по окончании эксперимента. Неблагоприятные изменения микробиоценоза менее выражены у профессиональных испытуемых по сравнению с волонтерами. Постоянно сменяющиеся группы посещения нарушают стабильность микрофлоры обеих групп основного экипажа, хотя микрофлора постоянных испытуемых восстанавливалась быстрее, чем микрофлора группы новых волонтеров.

3.2.1 Экспериментальное обоснование использования аутопробиотических средств для стабилизации микробиоценоза организма обезьяны

Воздействие космического излучения на членов экипажа во время космического полета смоделировано на лабораторных животных (макаках резусах) в эксперименте «Гамма-Бриз».

Животные были разделены на 3 группы: 1 – «Гамма-25», 2 – «Гамма-66», 3 -контроль. Взятие материала для исследований был проведено трижды раза: первый - перед облучением, второй - сразу после окончания цикла облучения, третий - через 7 суток после окончания цикла облучения, 4 – через 30 суток после цикла облучения.

Фоновый отбор

Результаты анализов животных приведены в таблице 7.

В группе «Гамма-25» у всех животных общее количество аэробов соответствует норме, в тоже время у 3-ех из 4-х животных резко снижено количество нормальных *E.coli*, а количество лактозонегативной *E.coli* превышает нормальные значения у 2-х животных. Количество *E.faecalis* незначительно снижено у 2 животных, во всех анализах отмечено наличие зеленыящих стрептококков и гемолизирующего золотистого стафилококка. У одного животного отмечено незначительное увеличение количества дрожжеподобных грибов, у остальных содержание грибов соответствует норме. Содержание лактобацилл и клостридий соответствует норме у всех животных, а количество бифидобактерий значительно снижено только у одного животного. В 1-ой пробе отмечено наличие гемолизирующей синегнойной палочки. Степень выраженности дисбактериоза у всех животных соответствует 2-3.

В группе «Гамма-66» у одного животного отмечено незначительное снижение общего количества аэробов, во всех анализах количество

нормальных *E.coli* снижено, причём в 3-х пробах - значительно. Количество лактозонегативной *E.coli* превышает нормальные значения в 3 пробах, в 2 пробах – значительно. Также в одном случае отмечено значительное увеличение количества *S.odorifera*. В 3 случаях отмечено наличие зеленыящего стрептококка. У всех животных количество золотистого стафилококка выше нормальных значений, в 3-х случаях выделен гемолизирующий золотистый стафилококк. Содержание дрожжеподобных грибов, лактобактерий и клостридий в норме, отмечено незначительное снижение количества бифидобактерий в 1 пробах. У двух животных степень дисбактериоза соответствует 2 у 2 животных 2-3.

В контрольной группе у одного животного снижено общее количество аэробов, у 3 животных снижено количество нормальных *E.coli*, в 2 случаях значительно. Количество лактозонегативной *E.coli* превышает нормальное значение у всех животных, в 3 случаях значительно. Содержание *E.faecalis* снижено в 2 пробах, в 1 – значительно. У всех животных отмечено наличие зеленыящего стрептококка. Содержание золотистого стафилококка превышает норму в 2 пробах: в одном – незначительно, во втором случае выделен гемолизирующий золотистый стафилококк. Количество лакто и бифидобактерий у всех животных соответствует норме. В одной пробе отмечено наличие *Bacillus spp.*

Нулевые сутки после цикла облучения

Результаты анализов животных приведены в таблице 8.

В группе «Гамма-25» у 1-го животного незначительно снижено общее количество аэробов, в тоже время у всех животных резко снижено количество нормальных *E.coli*, а количество лактозонегативной *E.coli* превышает нормальные значения у 2-ух животных: в одном анализе - незначительно, в одном - значительно. Количество *E.faecalis* незначительно снижено у 1 животного, во всех анализах отмечено наличие зеленыящих

стрептококков. Содержание лактобацилл, бифидобактерий и клостридий соответствует норме у всех животных. В 4-ех анализах отмечено наличие плесневых грибов. Степень дисбактериоза соответствует 2 у всех животных.

В группе «Гамма-66» у двух животных отмечено незначительное снижение общего количества аэробов, во всех пробах количество нормальных *E.coli* снижено, причем в 3 пробах - значительно. Количество лактозонегативной *E.coli* превышает незначительно нормальные значения в 1 пробе. В одном случае отмечено значительное снижение количества *E.faecalis*, во всех анализах отмечено наличие зеленыящего стрептококка. У одного животного выделен гемолизирующий золотистый стафилококк.

Содержание дрожжеподобных грибов, лактобактерий и клостридий в норме, отмечено незначительное снижение количества бифидобактерий в одной пробе. У одного животного отмечено содержание плесневых грибов. Степень дисбактериоза соответствует 2 у всех животных.

В контрольной группе у всех животных количество нормальных *E.coli* значительно снижено. В 2-ух пробах отмечено превышение нормы по *Morganella morganii spp. Siboni* и *Klebsiella ozaenae*. У всех животных отмечено наличие зеленыящего стрептококка. Содержание гемолизирующего золотистого стафилококка превышает отмечено в 2-ух пробах. Количество бифидобактерий и клостридий у всех животных соответствует норме. В одном анализе отмечено значительное снижение количества лактобактерий.

Таблица 7. Микробиологические характеристики микрофлоры кишечника приматов до облучения

Фон перед облучением (28.11.08)	Норма	Гамма 25				Гамма 66				Контроль			
		630	134	026	773	772	707	305	171	541	233	106	179
Общее количество аэробов	$10^7, 10^8$	6,0E+08	2,0E+07	1,3E+08	4,0E+07	4,5E+06	3,7E+07	7,3E+07	4,6E+07	3,0E+06	2,6E+07	9,5E+08	1,0E+07
Кишечные палочки	$10^6, 10^7$	1,1E+06	<10 ⁴	<10 ⁴	<10 ⁴			4,0E+05	2,0E+04	<10 ⁴	1,4E+05	6,0E+07	<10 ⁴
Кишечные палочки с изм. биохим. свойствами	<10 ⁴	3,0E+05		5,0E+05	0,0E+00	7,8E+05	1,0E+06	0,0E+00	8,0E+06	2,0E+06	6,0E+05	4,0E+07	1,0E+08
<i>S.odorifera</i> biogroup 1	<10 ⁵								1,0E+06				
<i>E. faecalis</i>	$10^6, 10^7$	1,0E+05	5,0E+07	5,0E+07	1,0E+05	1,6E+06	3,4E+06	3,0E+06	1,0E+06	1,0E+08	1,0E+06	1,0E+04	2,5E+05
Стрептококки (з)	0	5,0E+06	5,0E+05	4,0E+07	1,0E+06	1,0E+06	5,0E+06	1,0E+08	0,0E+00	1,0E+09	1,0E+05	1,0E+07	1,0E+07
<i>S.aureus</i>	<10 ⁵	<u>2,4E+05</u>	<u>1,0E+04</u>	<u>8,0E+05</u>	<u>3,1E+05</u>	1,0E+04	<u>1,0E+04</u>	<u>5,0E+06</u>	<u>3,0E+04</u>	3,0E+05	0,0E+00	1,0E+04	<u>1,0E+04</u>
<i>S.epidermidis/ S.haemoliticus</i>	<10 ⁵		1,0E+04		5,0E+04	2,0E+04		1,0E+05		0,0E+00	2,0E+04		
Дрожжи	<10 ⁵	3,0E+05	1,0E+03	4,0E+04	1,0E+03	1,0E+03	1,0E+03	1,0E+03	1,0E+04	1,0E+03	1,0E+04	1,0E+03	3,0E+03
Бифидобактерии	$10^8, 10^9$	1,0E+08	1,0E+08	1,0E+08	4,0E+04	1,0E+08	1,0E+07	1,0E+08	1,0E+08	1,0E+08	1,0E+08	1,0E+09	1,0E+08
Лактобациллы	$10^6, 10^7$	1,5E+07	4,0E+08	5,0E+07	1,0E+07	1,0E+07	1,0E+07	1,0E+08	1,0E+07	1,0E+09	1,0E+08	1,0E+09	1,0E+08
Клостридии	<10 ⁵												
<i>Vacillus</i> spp.	<10 ⁴										1,0E+06		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<10 ⁴	<u>5,0E+06</u>											
Наличие дисбактериоза		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Степень		2-3	2-3	2-3	2-3	2	2-3	2	2-3	2	2	2	2

В группе «Гамма-66» у двух животных отмечено значительное снижение количество нормальных *E.coli*. Количество лактозонегативной *E.coli* значительно превышает значительно нормальные значения у 3-ех животных. У них же отмечено незначительное снижение количества *E.faecalis*, во всех анализах отмечено наличие зеленыящего стрептококка. У одного животного выделен гемолизирующий золотистый стафилококк. Содержание дрожжеподобных грибов, лактобактерий, бифидобактерий и клостридий в норме у всех животных. У одного животного отмечено наличие оксидазоположительных грамотрицательных палочек выше нормальных значений. Степень дисбактериоза соответствует 2 у 2-ух животных, у 2-ух животных 1-2.

В контрольной группе у всех животных количество нормальных *E.coli* значительно снижено. В 2 пробах отмечено значительное снижение *E.faecalis*. У всех животных отмечено наличие зеленыящего стрептококка. Количество бифидобактерий, дрожжеподобных грибов, лактобактерий и клостридий у всех животных соответствует норме. Степень дисбактериоза соответствует 2 у всех животных.

Тридцатые сутки после цикла облучения

Результаты анализов животных приведены в таблице 10. В группе Гамма-25 у всех животных резко снижено количество нормальных *E.coli*, а количество лактозонегативной *E.coli* незначительно превышает нормальные значения у 2 животных. Количество *E.faecalis* незначительно снижено у 2 животных, во всех анализах отмечено наличие зеленыящих стрептококков. Гемолизирующий золотистый стафилококк выделен в 1 анализе. Содержание дрожжеподобных грибов, бифидобактерий и клостридий соответствует норме у всех животных. Количество лактобактерий значительно снижено у всех животных. В 3 пробах отмечено превышение содержания оксидазоположительных грамотрицательных палочек: в 2-ух –

незначительное, в 1-ом - значительное. У 2-ух животных выделены плесневые грибы. Степень дисбактериоза соответствует 2-3 у 3-ех животных, у одного - 2.

В группе «Гамма-66» у двух животных отмечено значительное снижение количество нормальных *E.coli*, у одного - незначительное. Количество лактозонегативной *E.coli* превышает незначительно нормальные значения в 2-ух пробах. В 2-ух пробах отмечено значительное превышение содержания *Morganella morganii spp. Siboni*, в одной - *Klebsiella ozaenae*, также в одной пробе незначительно превышено содержание *Enterobacter aerogenes*. В 2 случаях отмечено значительное снижение количества *E.faecalis*, во всех пробах отмечено наличие зеленыящего стрептококка. У одного животного выделен гемолизирующий золотистый стафилококк. Содержание дрожжеподобных грибов незначительно превышает норму в 2 анализах. Количество бифидобактерий незначительно снижено в одной пробе. Количество лактобактерий значительно снижено у 2-ух животных. Количество клостридий в норме у всех животных. У всех животных отмечено наличие оксидазоположительных грамотрицательных палочек: в 3-ех пробах – незначительное, в одной – значительное. У одного животного отмечено наличие плесневых грибов. Степень дисбактериоза соответствует 3 у всех животных.

В контрольной группе у 2-ух животных количество нормальных *E.coli* значительно снижено. Количество лактозонегативной *E.coli* превышает норму в у всех животных: у двух – значительно, у одного – незначительно, также у 2 животных отмечено значительное превышение содержания *Morganella morganii spp. Siboni*. Во всех пробах отмечено значительное снижение *E.faecalis* и наличие зеленыящего стрептококка. Количество бифидобактерий, дрожжеподобных грибов и клостридий у всех животных соответствует норме. Количество лактобактерий значительно снижено у всех животных. В двух пробах отмечено наличие плесневых грибов. Степень дисбактериоза соответствует 2 у одного животного и 3 - у двух животных.

Таблица 8. Микробиологические характеристики кишечной микрофлоры приматов сразу после облучения

0 сутки после облучения (23.23.08)	Норма	Гамма 25				Гамма 66				Контроль		
		630	134	026	773	772	707	305	171	541	233	106
Общее количество аэробов	$10^7, 10^8$	8,0E+07	7,0E+06	6,5E+07	1,0E+07	6,7E+07	5,0E+06	1,0E+06	3,0E+07	1,0E+07	6,0E+07	6,7E+07
Кишечные палочки	$10^6, 10^7$	<10 ⁴	<10 ⁴	<10 ⁴	<10 ⁴	5,0E+05	<10 ⁴					
Кишечные палочки с изм. биохим. свойствами	<10 ⁴			8,0E+05	1,0E+06			2,0E+04				
Протеи	$10^1, 10^3$	<10 ⁴										
Morganella morganii spp. Siboni												8,0E+06
Klebsiella ozaenae	<10 ⁵										1,0E+06	
E. faecalis	$10^6, 10^7$	1,0E+05	1,0E+06	2,0E+06	8,0E+07	4,4E+07	5,0E+06	1,0E+04	4,0E+07	7,0E+06	4,0E+06	6,0E+05
Стрептококки (з)	0	7,0E+06	6,0E+07	3,0E+07	1,0E+08	5,6E+07	1,0E+08	1,0E+09	1,0E+06	1,0E+07	3,0E+08	1,0E+09
S.aureus	<10 ⁵						5,4E+04		3,4E+03	1,0E+04		5,0E+05
S.epidermidis/ S.haemolyticus	<10 ⁵				8,0E+04	3,5E+04			8,7E+03	4,0E+04		4,0E+04
Дрожжи	<10 ⁵										1,0E+04	
Бифидобактерии	$10^8, 10^9$	1,0E+08	1,0E+08	1,0E+08	1,0E+08	1,0E+08	1,0E+07	1,0E+08	1,0E+08	<10 ⁷	1,0E+08	1,0E+08
Лактобациллы	$10^6, 10^7$	7,0E+07	4,0E+06	1,6E+08	4,0E+07	3,0E+06	2,0E+08	2,0E+08	8,0E+07	8,0E+06	3,5E+07	6,0E+07
Клостридии	<10 ⁵											
Плесневые грибы	<10 ⁴	5,0E+04	8,0E+03	1,7E+05	1,0E+02			6,0E+04				
Наличие дисбактериоза		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Степень дисбактериоза		2	2	2	2	2	2	2	2	2-3	2	2

Таблица 9. Микробиологические характеристики кишечной микрофлоры приматов на 7 сутки после облучения

7сутки после облучения (29.12.08)	Норма	Гамма 25				Гамма 66				Контроль		
		630	134	026	773	772	707	305	171	541	233	106
Общее количество аэробов	$10^7, 10^8$	1,5E+09	3,0E+08	1,9E+09	4,6E+08	7,2E+08	2,6E+08	1,1E+09	1,2E+08	1,1E+09	1,5E+08	2,4E+08
Кишечные палочки	$10^6, 10^7$	<10 ⁴	<10 ⁴	<10 ⁴	<10 ⁴	9,0E+06	3,0E+06	1,0E+04	3,0E+04	<10 ⁴	<10 ⁴	1,0E+04
Кишечные палочки с изм. биохим. свойствами	<10 ⁴			1,0E+06	0,0E+00	5,0E+06	1,1E+06	0,0E+00	4,0E+06			
Протеи	$10^1, 10^3$	<10 ⁴										
<i>E. faecalis</i>	$10^6, 10^7$	1,0E+05	1,0E+04	2,3E+07	1,0E+07	9,0E+05	3,0E+05	6,0E+07	1,0E+05	4,0E+04	3,1E+06	8,0E+04
Стрептококки (з)	0	1,0E+09	1,0E+08	1,0E+07	3,0E+08	3,0E+08	1,0E+08	8,0E+08	2,0E+06	1,0E+09	4,0E+07	1,0E+08
<i>S.aureus</i>	<10 ⁵	<u>1,0E+02</u>			<u>4,0E+02</u>				<u>3,0E+03</u>			
<i>S.epidermidis/ S.haemoliticus</i>	<10 ⁵	1,0E+04		1,0E+04	1,0E+03	3,0E+03	2,4E+04		1,0E+04			1,0E+03
Бифидобактерии	$10^8, 10^9$	4,0E+08	1,0E+08	1,0E+09	1,0E+08	4,0E+08	1,0E+08	1,0E+08	1,0E+08	1,0E+08	1,0E+08	1,0E+08
Лактобациллы	$10^6, 10^7$	8,0E+07	1,0E+08	9,0E+08	5,0E+07	3,0E+06	6,0E+07	1,0E+08	1,0E+06	1,0E+07	1,0E+07	4,0E+07
Клостридии	<10 ⁵											
Грамотрицательные палочки	<10 ⁴								1,0E+07			
Наличие дисбактериоза		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Степень дисбактериоза		2	2	2	2	1-2	1-2	2	2	2	2	2

Таблица 10. Микробиологические характеристики кишечной микрофлоры приматов на 30 сутки после облучения

		Гамма 25				Гамма 66				Контроль		
		630	134	026	773	772	707	305	171			
30 сутки после облучения (30.01.09)	Норма	630	134	026	773	772	707	305	171	541	233	106
Общее количество аэробов	$10^7, 10^8$	4,0E+08	3,8E+07	7,0E+07	1,0E+07	1,8E+08	3,0E+07	1,4E+07	1,0E+08	2,9E+08	7,4E+07	1,0E+07
Кишечные палочки	$10^6, 10^7$	<10 ⁴	2,0E+05	3,0E+07	<10 ⁴	1,0E+06	2,0E+04					
Кишечная палочка гемолитическая	0											
Кишечные палочки с изм. биохим. свойствами	<10 ⁴	4,0E+05		1,0E+04			2,0E+05		1,0E+05	9,0E+04	2,0E+07	1,0E+06
Протеи	$10^1, 10^3$	<10 ⁴										
Morganella morganii spp. Siboni	<10 ⁵					1,0E+07		1,0E+07			1,0E+07	4,0E+06
Klebsiella ozaenae	<10 ⁵								1,0E+06			
Enterobacter aerogenes	<10 ⁵						1,0E+05					
S. faecalis	$10^6, 10^7$	4,0E+06	<10 ⁴	1,0E+07	4,0E+04	1,8E+04	1,0E+04	1,0E+06	1,0E+07	<10 ⁴	<10 ⁴	<10 ⁴
Стрептококки (з)	0	1,0E+07	4,0E+07	1,0E+08	1,0E+09	1,0E+08	1,0E+06	4,0E+07	5,0E+08	1,0E+08	3,0E+07	4,0E+06
S.aureus	<10 ⁵	4,0E+05	4,0E+04	4,0E+04	9,0E+04	5,0E+04	1,0E+04	4,0E+03	2,0E+04	3,0E+03	1,0E+04	5,0E+04
S.epidermidis/ S.haemoliticus	<10 ⁵	3,0E+04	0,0E+00	4,0E+04	3,0E+04	7,0E+04			1,0E+05	4,0E+04		
Дрожжи	<10 ⁵	1,0E+04	5,0E+03	1,0E+04	1,0E+03	1,0E+05	1,0E+05	1,0E+04	1,0E+03	1,0E+03	4,0E+03	1,0E+04
Бифидобактерии	$10^8, 10^9$	1,0E+08	1,0E+08	1,0E+08	1,0E+08	1,0E+08	1,0E+07	1,0E+08	1,0E+08	1,0E+08	1,0E+08	1,0E+08
Лактобациллы	$10^6, 10^7$	<10 ⁴	3,0E+04	7,0E+06	<10 ⁴	<10 ⁴	<10 ⁴					
Клостридии	<10 ⁵											
Грамотрицательные палочки неферментир.	<10 ⁴	1,0E+05	4,0E+06	1,0E+03	2,0E+04	1,0E+05	1,0E+04	6,0E+05	1,0E+07			
Плесневые грибы			4,0E+02		7,0E+02				1,0E+02		1,0E+04	1,0E+03
Наличие дисбактериоза		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Степень дисбактериоза		2-3	3	2-3	2-3	3	3	3	3	2	3	3

Изучение эффективности приема препаратов-аутопробиотиков на основе лактобацилл, бифидобактерий коммерческого пробиотического препарата на основе лактобацилл «Лактовит форте» на состояние дисбактериоза кишечника макак резусов, которые участвовали в эксперименте «Гамма-Бриз», с целью оптимизации количественного состава микробиоценоза кишечника.

В эксперименте было использовано 16 обезьян из вивария ГНЦ РФ ИМБП РАН (номера животных 855, 026, 772, 826, 776, 740, 179, 707, 773, 134, 541, 106, 171, 305, 630, 233). Животные были разделены на 4 группы: первая группа (животные №№ 179, 134, 106, 305) получала аутоштаммы лактобактерий в течении 7 суток 2 раза в день (утром и вечером), вторая группа (животные №№ 026, 772, 707, 773) получала аутоштаммы бифидобактерий в течении 7 суток 2 раза в день (утром и вечером), третья группа (животные №№ 233, 630, 541, 171) получала препарат «Лактовит форте» с в течении 7 суток 2 раза в день (утром, через шприц в рот) и вечером (с кашей), четвертая группа (животные №№ 826, 776, 855, 740) являлась контрольной.

Исследования кала на дисбактериоз у животных проводилось трижды: первое, для определения фона – 20.05.08, второе после приема аутоштаммов лактобацилл и бифидобактерий – 18.06.08, третье после приема «Лактовита форте» - 07.07.08.

Фоновые показатели

При исследовании фоновых показателей состояния микробиоценоза кишечника у животных получены следующие данные, которые представлены в таблице 11. В облигатной микрофлоре снижение общего количества аэробов составило 13 случаев, как и нормальной *E.coli*, стрептококков - 12 случаев, бифидобактерий - 14 случаев, лактобактерий - 2 случая. Вместе с тем, в ряде анализов отмечено отсутствие некоторых видов бактерий: *Enterococcus faecalis* - 15 случаев, бифидобактерии - 2 случая, лактобактерии - 4 случая. В

факультативной флоре отмечено отсутствие у всех животных гемолитической *E.coli*, лактозонегативной *E.coli*, эпидермального и гемолитического стафилококков, клостридий. В одном анализе отмечено отсутствие протей, а в 7 анализах не выделены малонатположительные бактерии. Количество цитратположительных бактерий увеличено в 1 случае, протей в 3 анализах, золотистого стафилококка в 11 анализах. Содержание дрожжей превышает нормальные значения в 16 анализах.

На основании полученных данных наличие дисбактериоза подтверждено у всех испытуемых животных. Степени нарушения микробиоценоза кишечника представлены в следующих соотношениях: 1 степень – 1 случай, 1-2 степень – 2 случая, 2 степень - 11 случаев, 2-3 степень - 1 случай, 3 степень – 1 случай.

Таким образом, у большинства животных диагностирована субкомпенсированная форма дисбактериоза, в основном связанная со снижением количества бактерий из состава облигатной флоры и с увеличением количества патогенных и условно-патогенных бактерий, входящих в состав факультативной флоры (грибы рода *Candida*, и *S.aureus*).

Применение аутопробиотиков на основе лактобацилл

Изучение изменения состава микрофлоры кишечника при использовании аутоштаммов лактобактерий было проведено трижды: первое исследование было проведено до приёма препарата, второе - через 1 месяц после недельного приёма препарата, третье - спустя 2 месяца после приёма препарата. Результаты анализов приведены в таблице 11.

Таблица 11. Состояние микрофлоры кишечника экспериментальных животных при введении аутоштаммов лактобактерий

Микроорганизмы	Номера животных					Дата	
	Норма	179	134	106	305		
Общее количество аэробов	$10^7, 10^8$	1,2E+06	3,2E+06	6,0E+05	4,0E+06	Фон	
Кишечные палочки	$10^6, 10^7$	1,0E+05	1,0E+05	6,0E+04	1,4E+05		
Цитратпозитивные энтеробактерии:	$<10^5$	4,0E+02	4,0E+04	1,6E+04	2,2E+06		
Малонатпозитивные энтеробактерии:	$<10^5$	1,2E+02	н/о	н/о	н/о		
Протеи	$10^{-1}, 10^3$	1,0E+03	1,0E+04	1,0E+03	1,0E+03		
<i>E. faecalis</i>	$10^6, 10^7$	н/о	1,8E+05	н/о	н/о		
Стрептококки	$10^7, 10^8$	1,2E+06	3,2E+06	6,0E+05	4,0E+06		
<i>S.aureus</i>	$<10^5$	1,8E+05	1,8E+05	4,8E+03	6,3E+06		
Дрожжи	$<10^5$	2,4E+05	4,4E+06	6,2E+05	6,3E+06		
Бифидобактерии	$10^8, 10^9$	1,4E+07	2,0E+07	н/о	1,6E+07		
Лактобациллы	$10^6, 10^7$	1,2E+06	1,1E+06	1,2E+06	1,2E+04		
Наличие дисбактериоза		+	+	+	+		
Степень		2	2	2	2		
Общее количество аэробов	$10^7, 10^8$	8,0E+07	8,0E+07	2,4E+08	1,0E+08		+30 дней
Кишечные палочки	$10^6, 10^7$	4,5E+06	1,4E+06	3,2E+07	1,2E+07		
Цитратпозитивные энтеробактерии	$<10^5$	5,0E+03	2,0E+04	1,8E+04	2,2E+04		
Энтерококки:							
<i>S. faecalis</i>	$10^6, 10^7$	7,0E+05	6,0E+05	4,0E+07	3,6E+07		
Стрептококки	$10^7, 10^8$	1,0E+07	8,0E+07	2,4E+08	1,0E+08		
<i>S.aureus</i>	$<10^5$	1,6E+05	2,2E+05	1,6E+03	1,0E+08		
Дрожжи	$<10^5$	1,4E+05	2,0E+05	1,2E+04	3,0E+05		
Бифидобактерии	$10^8, 10^9$	6,0E+07	9,0E+07	1,8E+07	9,0E+07		
Лактобациллы	$10^6, 10^7$	3,4E+07	4,0E+07	1,4E+07	2,0E+07		
Наличие дисбактериоза		+	+	+	+		
Степень		2	2	1	2		
Общее количество аэробов	$10^7, 10^8$	5,1E+07	5,0E+07	8,0E+06	1,0E+06	+60 дней	
Кишечные палочки	$10^6, 10^7$	1,0E+09	1,6E+07	4,0E+05	4,0E+07		
Кишечные палочки с изм. биохим. свойствами	$<10^4$	1,0E+06	н/о	1,0E+06	н/о		
Цитратпозитивные энтеробактерии	$<10^5$		4,0E+06	1,0E+04	3,0E+07		
Малонатпозитивные энтеробактерии	$<10^5$						
Протеи	$10^{-1}, 10^3$	1,0E+04	1,0E+04	1,0E+04	1,0E+04		
<i>Klebsiella oxytoca</i>	$<10^4$		4,0E+06				
<i>S.odorifera</i> biogroup 1	$<10^4$				3,0E+07		
<i>E. faecalis</i>	$10^6, 10^7$	5,0E+07	6,0E+07	4,0E+07	1,0E+07		
Стрептококки	$10^7, 10^8$	1,0E+08	1,0E+08	3,0E+06	1,0E+07		
<i>S.aureus</i>	$<10^5$	2,0E+04	3,0E+05	1,6E+06	5,0E+04		
Дрожжи	$<10^5$	н/о	1,0E+03	1,0E+05	3,6E+03		
Бифидобактерии	$10^8, 10^9$	1,0E+08	1,0E+09	1,0E+08	1,0E+08		
Лактобациллы	$10^6, 10^7$	4,0E+08	1,0E+09	6,0E+07	5,0E+08		
Наличие дисбактериоза		+	+	+	+		
Степень		2	2	2	2		

При сравнении показателей через 1 месяц после курса приема отмечено следующее: в облигатной микрофлоре общее количество аэробов и количество у всех животных нормальной *E.coli* возросло до нормальных значений, количество *Enterococcus faecalis* в 2 случаях увеличилось с 0 до нормальных значений, в 1-ом случае - с 0 до значений ниже нормы, в одном случае отмечено незначительное увеличение количества. Повышение количества стрептококков до нормальных значений зафиксировано у всех животных. Количество бифидобактерий в 3-ех случаях незначительно возросло, в 1-ом случае увеличилось с 0 до нижней границы нормы. Количество лактобацилл возросло на 1 степень у 3 животных, причем исходное значение было в пределах нормы, а в 1 случае отмечено повышение количества лактобактерий от значений ниже нормы до нормы. В факультативной флоре количество *S.aureus* в 2 случаях практически не изменилось, оставшись выше нормальных значений, в одном случае осталось в пределах нормы и в одном случае отмечено повышение количества на 2 степени. Незначительно изменилось содержание дрожжей в 3 анализах (некоторая тенденция к снижению), в 1 анализе отмечено снижение до нормальных значений. У всех животных наблюдалось сохранение дисбактериоза, но в 1 анализе отмечено изменение с субкомпенсированной степени до компенсированной.

При сравнении второго и третьего анализов получены следующие данные:

В облигатной флоре в 2 пробах снижались общее количество аэробов, а в 1 пробе снижались количество нормальной *E.coli* ниже нормальных значений. Количество *Enterococcus faecalis* возрастали до нормальных значений, а количество стрептококков в 1 случаев опускались ниже нормы. У всех животных регистрировались увеличение содержания бифидобактерий до нормальных значений и незначительные колебания лактобактерий в пределах нормы. В факультативной флоре в 2 случаях отмечено появление лактозонегативной *E.coli*, в 1-ой пробе выделены

ранее не встречавшиеся *Klebsiella oxytoca* и *Serratia odorifera* biogroup 1. Также у всех животных отмечено превышение количества протей. В 2 случаях нормализуется количество *S.aureus*, а у одного животного отмечен рост *S.aureus* от нормальных значений до выше нормы. Содержание дрожжей в 3 случаях снижается до нормальных значений, в тоже время в 1 пробе отмечен рост количества грибов от нормальных значений до выше нормы.

Итак, при динамическом наблюдении влияния аутопробиотиков на основе лактобацилл на биоценоз кишечника обезьян можно сделать следующее заключение: приём препарата в течении 1 недели приводит к значительному улучшению облигатной микрофлоры и к незначительным изменениям (с положительной динамикой) в факультативной флоре на протяжении 1 месяца после приёма препарата. В период с 1 месяца до 2 в облигатной флоре наблюдается снижение общего количества аэробов, а в факультативной флоре начинают преобладать условно-патогенные бактерии кишечной группы, которые ранее не были выделены у животных.

Применение аутопробиотиков на основе бифидобактерий

Изучение изменения состава микрофлоры кишечника обезьян при использовании аутопробиотика на основе бифидобактерий было проведено при помощи забора трёх проб кала на дисбактериоз: первый анализ был проведен до приема препарата, второй анализ проведен через 1 месяц после недельного приема препарата, третий анализ проведен через 2 месяца после приема препарата. Результаты анализов приведены в таблице 12.

При сравнении показателей через 1 месяц после курса приема отмечено следующее:

В облигатной микрофлоре общее количество аэробов и количества нормальной *E.coli* у всех животных возросло до нормальных значений,

количество *Enterococcus faecalis* в 3-ех случаях возросло с 0 до значений ниже нормы, в 1 случае с 0 до нормальных значений. В 100% отмечено повышение содержания стрептококков до нормальных значений. Количество бифидобактерий в 3 случаях незначительно изменилось, оставаясь ниже нормальных значений, в 1 случае отмечено увеличение до нормальных значений. Количество лактобацилл у животных практически не изменилось. В факультативной флоре количество *S.aureus* практически не изменилось, оставшись выше нормальных значений в 3 анализах, в одном случае осталось в пределах нормы. Содержание дрожжей в 2 анализах снизилось до нормальных значений, в 2 пробах отмечено незначительное изменение количества в пределах выше нормы. Снижение количества протей наблюдалось в 3 случаях, причем в двух из них отмечено снижение концентрации до 0 и в одном случае до нормальных значений. Во всех случаях у животных наблюдалось сохранение дисбактериоза, но у одного животного отмечено изменение с 3 до 2-3 степени.

При сравнении второго и третьего анализов получены следующие данные: в облигатной флоре у одного животного снижается количество нормальной *E.coli* ниже нормальных значений. Количество *Enterococcus faecalis* возрастает до нормальных значений во всех анализах, а в 1 случае появляется зеленающий стрептококк. У всех животных регистрируется увеличение содержания бифидобактерий до нормальных значений и в 1 случае увеличение количества лактобактерий до нормальных значений. В факультативной флоре во всех анализах отмечено появление ранее не встречавшихся *Klebsiella oxytoca* и *Serratia odorifera* biogroup 1, первая культура выделена в 2 анализах, вторая в 3. В тоже время отмечено одновременное выделение 2 культур у одного животного. Также у всех животных отмечено превышение содержания протей. В 2 случаях нормализуется количество *S.aureus*, у одного животного отмечен рост *S.aureus* от нормальных значений до значений выше нормы и у одного

животного отмечен незначительный рост количества данной культуры. Содержание дрожжей в 2 случаях снижается до нормальных значений.

Итак, при динамическом наблюдении влияния аутоштаммов бифидобактерий на биоценоз кишечника можно сделать следующее заключение: прием препарата в течении 1 недели приводит к значительному улучшению облигатной флоры (нормализация общего количества аэробов и нормальной *E.coli*, энтерококков и стрептококков, но незначительное увеличение количества бифидобактерий) и к незначительным изменениям (с положительной динамикой) в факультативной флоре на протяжении 1 месяца после приема препарата. В период с 1 месяца до 2 в облигатной флоре наблюдается дальнейшее увеличение количества бифидобактерий и лактобацилл до нормальных значений, а в факультативной флоре начинают преобладать условно-патогенные бактерии кишечной группы, в том числе и ассоциации бактерий, которые ранее не были выделены у животных.

Применение коммерческого препарата ЛАКТОВИТ ФОРТЕ

Изучение изменения состава микрофлоры кишечника при использовании препарата Лактовит форте было проведено при помощи забора трёх анализов кала на дисбактериоз: первый анализ был проведён до приёма препарата, второй анализ проведён через 1 месяц после недельного приёма препарата, третий анализ проведён через 2 месяца после приёма препарата. Результаты анализов приведены в таблице 13.

Таблица 12. Состояние микрофлоры кишечника экспериментальных животных при введении аутоштаммов бифидобактерий

	Норма	Номера животных				Дата
		026	772	707	773	
Общее количество аэробов	$10^7, 10^8$	6,0E+06	3,6E+06	6,0E+06	1,6E+06	ноф
Кишечные палочки	$10^6, 10^7$	4,0E+05	1,8E+05	2,4E+05	6,0E+04	
цитратпозитивные энтеробактерии	$<10^5$	8,0E+04	3,6E+04	4,0E+04	1,0E+04	
Малонатпозитивные энтеробактерии	$<10^5$	1,2E+04	1,2E+04	н/о	н/о	
Протеи	$10^{-1}, 10^3$	1,0E+03	н/о	1,0E+04	1,0E+03	
Стрептококки	$10^7, 10^8$	6,0E+06	3,6E+06	6,0E+06	1,0E+06	
<i>S.aureus</i>	$<10^5$	6,0E+03	6,0E+05	3,0E+05	2,0E+05	
Дрожжи	$<10^5$	5,0E+05	1,2E+06	2,2E+06	6,0E+05	
Бифидобактерии	$10^8, 10^9$	3,6E+07	1,2E+07	1,0E+07	1,2E+06	
Лактобациллы	$10^6, 10^7$	1,2E+06	1,2E+07	н/о	1,4E+06	
Наличие дисбактериоза	+	+	+	+	+	
Степень	1	2	1-2	3	2	
Общее количество аэробов	$10^7, 10^8$	3,2E+08	6,0E+07	1,8E+08	3,0E+08	
Кишечные палочки	$10^6, 10^7$	4,2E+07	8,0E+06	3,8E+06	1,2E+07	
Цитратпозитивные энтеробактерии	$<10^5$	2,2E+04	1,6E+04	3,8E+04	1,8E+04	
Протеи	$10^{-1}, 10^3$	н/о	1,0E+02	н/о	н/о	
<i>E. faecalis</i>	$10^6, 10^7$	8,0E+05	2,0E+07	2,0E+05	1,0E+05	
Стрептококки	$10^7, 10^8$	3,2E+08	6,0E+07	1,8E+08	3,0E+08	
<i>S.aureus</i>	$<10^5$	2,2E+03	2,4E+05	2,0E+05	1,8E+05	
Дрожжи	$<10^5$	1,2E+04	2,0E+05	1,6E+05	1,0E+04	
Бифидобактерии	$10^8, 10^9$	6,2E+07	1,5E+08	1,4E+07	1,6E+07	
Лактобациллы	$10^6, 10^7$	5,0E+07	2,4E+07	н/о	1,0E+07	
Наличие дисбактериоза	+	+	+	+	+	
Степень	1	2	1-2	2-3	2	
Общее количество аэробов	$10^7, 10^8$	3,0E+07	2,5E+07	1,0E+07	1,0E+07	+60 дней
Кишечные палочки	$10^6, 10^7$	3,2E+07	2,0E+06	6,0E+06	3,0E+05	
Цитратпозитивные энтеробактерии	$<10^5$	2,0E+06	2,0E+06			
<i>S.odorifera</i> biogroup 1	$<10^4$	2,0E+06	2,0E+06		3,0E+05	
Протеи	$10^{-1}, 10^3$	1,0E+04	1,0E+04	1,0E+04	1,0E+04	
<i>E. faecalis</i>	$10^6, 10^7$	4,0E+06	2,0E+08	1,0E+07	1,6E+08	
Стрептококки	$10^7, 10^8$	1,0E+07		8,0E+08	5,0E+08	
Стрептококки А			2,2E+07			
<i>S.aureus</i>	$<10^5$	3,6E+05	4,0E+04	1,0E+03	6,0E+05	
Дрожжи	$<10^5$	1,0E+02	н/о	1,0E+02	н/о	

Бифидобактерии	10 ⁸ , 10 ⁹	1,0E+09	1,0E+09	1,0E+09	1,0E+08
Лактобациллы	10 ⁶ , 10 ⁷	7,0E+07	1,0E+08	7,0E+08	1,0E+08
Наличие дисбактериоза	+	+	+	+	+
Степень	2	2	1-2	2	2

При сравнении показателей через 1 месяц после курса приёма отмечено следующее: в облигатной микрофлоре общее количество аэробов у всех животных возросло до нормальных значений, количества нормальной *E.coli* возросло до нормальных значений в 2 случаях, а в 1 случае отмечены незначительные изменения количества в пределах ниже нормы. Количество *Enterococcus faecalis* в 3 случаях возросло с 0 до нормальных значений, в 1 случае с 0 до значений ниже нормы. В 2 анализах отмечено повышение содержания стрептококков до нормальных значений, у одного животного отмечены незначительные изменения количества в пределах ниже нормы. Количество бифидобактерий в 3 случаях незначительно изменилось, оставаясь ниже нормальных значений, в 1 случае отмечено увеличение от 0 до значений ниже нормы.

Количество лактобацилл в 1 случае снизилось до 0, в 1 случае увеличилось до нормальных значений. В факультативной флоре количество *S.aureus* практически не изменилось, оставшись выше норм. значений в 3 случаях, в одном случае осталось в пределах нормы. Содержание дрожжей у 2 животных снизилось до нормальных значений, в анализах отмечено незначительное изменение количества в пределах выше нормы. Снижение количества протей наблюдалось в 4 случаях, причём во всех отмечено снижение концентрации до 0. У всех животных наблюдалось сохранение дисбактериоза без изменения степени. При сравнении второго и третьего анализов получены следующие данные: в облигатной микрофлоре в не отмечено изменений в количестве нормальной *E.coli* и общем количестве аэробов. Количество *Enterococcus faecalis* возрастает до нормальных значений у 1 животного, как и количество стрептококков. Во всех анализах регистрируется увеличение

содержания бифидобактерий до нормальных значений, в 1 случае увеличение количества лактобактерий до нормальных значений. В факультативной в 2 анализах отмечено появление ранее не встречавшейся *Serratia odorifera biogroup 1*. Также у всех животных отмечено превышение содержания протей. В 1 случае увеличивается количество *S.aureus* до значений выше нормы. Содержание дрожжей в 1 случае снижается до нормальных значений, в 1 случае отмечено незначительное снижение в пределах выше нормы. Можно сделать следующее заключение: при динамическом наблюдении влияния препарата Лактовит форте на биоценоз кишечника можно сделать следующие выводы: приём препарата в течении 1 недели приводит к значительному улучшению облигатной флоры (нормализация общего количества аэробов и нормальной *E.coli*, энтерококков и стрептококков, но незначительное увеличение количества бифидобактерий) и к незначительным изменениям (с положительной динамикой) в факультативной флоре на протяжении 1 месяца после приёма препарата. В период с 1 месяца до 2 в облигатной флоре наблюдается дальнейшее увеличение количества бифидобактерий и лактобацилл до нормальных значений, а в факультативной флоре начинают преобладать условно-патогенные бактерии кишечной группы.

Исследование контрольной группы

Изучение изменения состава микрофлоры кишечника контрольной группы было проведено при помощи забора трёх анализов кала на дисбактериоз: первый анализ был взят до приёма препаратов животными других групп, второй анализ проведён через 1 месяц после недельного приёма препаратов, третий анализ проведён через 2 месяца после приёма препаратов. Результаты анализов приведены в таблице 14. При сравнении показателей через 1 месяц после курса приёма отмечено следующее: в облигатной микрофлоре общее количество аэробов и нормальной *E.coli* у 2 животных возросло до нормальных значений. Количество *Enterococcus*

faecalis в 4 случаях возросло с 0 до нормальных значений. В 1 анализе отмечено незначительное снижение содержания стрептококков в пределах ниже нормы. Количество бифидобактерий в 4 случаях незначительно изменилось, оставаясь ниже нормальных значений. Количество лактобацилл в 3 анализах изменилось с 0 до нормальных значений. В факультативной флоре количество *S.aureus* практически не изменилось, оставшись выше нормальных значений у всех животных (в двух случаях отмечено снижение на 1 степень). Содержание дрожжей также практически не изменилось у всех животных, оставшись выше нормальных значений (в двух случаях отмечено снижение на одну степень). Снижение количества протей наблюдалось в 4 случаях, причём во всех отмечено снижение концентрации до 0. В 100% случаев у животных наблюдалось сохранение дисбактериоза, в 1 анализе отмечено снижение степени с 2 до 1, и в одном с 2-3 до 2. При сравнении второго и третьего анализов получены следующие данные: в облигатной микрофлоре не отмечено изменений в количестве нормальной *E.coli* и общем количестве аэробов. Количество *Enterococcus faecalis* возрастает до нормальных значений у всех животных, количество стрептококков увеличивается до нормы в 1 случае. У всех животных регистрировался увеличение содержания бифидобактерий до нормальных значений. В факультативной флоре в 1 анализе отмечено появление ранее не встречавшейся *Serratia odorifera biogroup 1*, *Kluyvera ascorbata* и *Klebsiella ozaenae*. Также у всех животных отмечено превышение содержания протей. В 2 случаях снижается количество *S.aureus* до нормальных значений. Содержание дрожжей во всех анализах снижается до нормальных значений.

Таким образом, при динамическом наблюдении за биоценозом кишечника контрольной группы можно сделать следующие выводы: через 1 месяц после первичного забора происходило значительное улучшение облигатной флоры (нормализация общего количества аэробов и

нормальной *E.coli*, энтерококков и стрептококков, незначительное увеличение количества бифидобактерий и нормализация содержания лактобактерий) и к незначительным изменениям (с положительной динамикой) в факультативной флоре. В период с 1 месяца до 2 в облигатной микрофлоре наблюдалось дальнейшее увеличение количества бифидобактерий, лактобацилл и энтерококков до нормальных значений, а в факультативной флоре начинали преобладать условно-патогенные бактерии кишечной группы, ранее не выделявшиеся у животных. В тоже время наблюдается снижение количества дрожжей и *S.aureus* (табл. 13-14).

Эффективность аутопробиотического препарата

Следующий цикл исследований был посвящен оценке эффективности аутопробиотического препарата в кисломолочном продукте, кисломолочного продукта лечебно-профилактического действия и пробиотического препарата на основе коллекционных культур.

В исследованиях принимали участие 26 животных из вивария ГНЦ РФ ИМБП РАН.

В эксперименте использовались следующие препараты:

1. Кисломолочные продукты на основе аутологичных штаммов лактобацилл (группа «Аутоштаммы»)
2. Кисломолочный продукт на основе штамма *Lactobacillus acidophilicus* (группа «Кефир»)
3. Препарат на основе пребиотика аминокислоты (группа Амбен) в сочетании с пробиотиком на основе двух активных штаммов лактобацилл (группа «БАД»)

Таблица 13. Состояние микрофлоры кишечника экспериментальных животных при введении Лактовит форте

	Норма	Номер животного				Дата	
		233	171	541	630		
Общее количество аэробов	$10^7, 10^8$	2,0E+06	2,8E+06	4,0E+08	1,4E+06	Фон	
Кишечные палочки	$10^6, 10^7$	1,4E+05	1,6E+05	1,0E+07	1,2E+05		
цитратпозитивные энтеробактерии	$<10^5$	1,6E+04	2,0E+04	1,4E+04	1,2E+04		
Протеи	$10^{-1}, 10^3$	1,0E+03	1,0E+04	1,0E+03	1,0E+03		
Стрептококки	$10^7, 10^8$	2,0E+06	2,8E+06	4,0E+08	1,4E+06		
<i>S.aureus</i>	$<10^5$	4,6E+06	7,2E+05	8,8E+03	3,6E+04		
Дрожжи	$<10^5$	1,4E+06	2,0E+05	4,4E+05	1,4E+05		
Бифидобактерии	$10^8, 10^9$	4,0E+07	н/о	2,5E+07	8,0E+07		
Лактобациллы	$10^6, 10^7$	1,4E+06	1,4E+06	1,2E+06	1,4E+05		
Наличие дисбактериоза	+	+	+	+	+		
Степень	1	2	2	1-2	2		
Общее количество аэробов	$10^7, 10^8$	1,0E+08	4,0E+08	4,0E+07	2,0E+08		+30 дней
Кишечные палочки	$10^6, 10^7$	1,8E+07	3,4E+07	6,0E+06	2,6E+05		
цитратпозитивные энтеробактерии	$<10^5$	6,0E+03	7,0E+04	4,0E+03	7,6E+04		
<i>E. faecalis</i>	$10^6, 10^7$	6,0E+07	2,4E+07	4,0E+05	4,0E+07		
Стрептококки	$10^7, 10^8$	1,0E+08	3,0E+06	4,0E+07	2,0E+08		
<i>S.aureus</i>	$<10^5$	3,6E+05	2,0E+05	3,2E+03	3,2E+05		
Дрожжи	$<10^5$	3,6E+05	1,2E+04	1,0E+04	2,0E+05		
Бифидобактерии	$10^8, 10^9$	1,8E+07	5,0E+07	6,0E+07	2,4E+06		
Лактобациллы	$10^6, 10^7$	н/о	1,4E+07	1,0E+07	2,4E+07		
Наличие дисбактериоза	+	+	+	+	+		
Степень	2	2	2	1-2	2		
Общее количество аэробов	$10^7, 10^8$	3,6E+07	3,0E+08	7,0E+07	1,6E+07	+60 дней	
Кишечные палочки	$10^6, 10^7$	1,0E+07	1,0E+09	1,2E+08	4,0E+05		
цитратпозитивные энтеробактерии	$<10^5$	1,0E+03	1,0E+07	н/о	3,0E+05		
<i>S.odorifera biogroup 1</i>	$<10^4$		1,0E+07		3,0E+05		
Протеи	$10^{-1}, 10^3$	1,0E+04	1,0E+04	1,0E+04	1,0E+04		
<i>E. faecalis</i>	$10^6, 10^7$	1,0E+08	1,6E+08	1,0E+08	1,0E+07		
Стрептококки	$10^7, 10^8$	3,0E+07	1,0E+07	1,0E+08	4,0E+07		
<i>S.aureus</i>	$<10^5$	1,0E+05	4,0E+05	1,5E+05	1,0E+05		
Дрожжи	$<10^5$	1,5E+05	н/о	2,5E+03	1,0E+02		
Бифидобактерии	$10^8, 10^9$	1,0E+08	1,0E+09	1,0E+08	1,0E+09		
Лактобациллы	$10^6, 10^7$	1,0E+09	1,0E+08	1,0E+08	6,0E+08		
Наличие дисбактериоза	+	+	+	+	+		
Степень дисбактериоза	2	1-2	2	1-2	2		

Таблица 14. Состояние микрофлоры кишечника экспериментальных животных контрольной группы

	Норма	Номер животного				Дата
		855	826	776	740	
Общее количество аэробов	$10^7, 10^8$	6,4E+06	8,0E+08	3,6E+08	4,0E+06	Фон
Кишечные палочки	$10^6, 10^7$	1,6E+05	2,0E+07	6,0E+07	2,0E+05	
Цитратпозитивные энтеробактерии	$<10^5$	1,6E+04	4,0E+04	2,0E+04	2,0E+04	
малонатпозитивные энтеробактерии	$<10^5$	1,2E+04	1,2E+04	1,4E+04	1,4E+04	
Протеи	$10^{-1}, 10^3$	1,0E+03	1,0E+03	1,0E+03	1,0E+03	
Стрептококки	$10^7, 10^8$	6,4E+07	8,0E+08	3,6E+08	4,0E+06	
<i>S.aureus</i>	$<10^5$	1,4E+05	4,8E+04	6,0E+06	2,6E+06	
Дрожжи	$<10^5$	6,0E+06	5,0E+05	4,0E+06	4,4E+05	
Бифидобактерии	$10^8, 10^9$	2,5E+07	4,0E+07	1,0E+06	8,0E+07	
Лактобациллы	$10^6, 10^7$	1,2E+06	н/о	н/о	н/о	
Наличие дисбактериоза	+	+	+	+	+	
Степень	1	2	2	2-3	3	
Общее количество аэробов	$10^7, 10^8$	3,8E+08	3,0E+08	6,0E+08	3,2E+08	
Кишечные палочки	$10^6, 10^7$	2,2E+07	3,2E+07	8,0E+07	4,4E+07	
Цитратпозитивные энтеробактерии	$<10^5$	3,6E+04	2,8E+04	4,2E+04	1,2E+03	
Малонатпозитивные энтеробактерии	$<10^5$	1,2E+04	н/о	н/о	н/о	
<i>E. faecalis</i>	$10^6, 10^7$	5,0E+05	5,0E+05	6,0E+05	6,0E+05	
Стрептококки	$10^7, 10^8$	3,8E+08	3,0E+08	6,0E+08	3,2E+06	
<i>S.aureus</i>	$<10^5$	2,2E+05	2,0E+02	2,6E+05	1,6E+05	
Дрожжи	$<10^5$	1,2E+05	2,4E+05	6,0E+05	1,4E+05	
Бифидобактерии	$10^8, 10^9$	2,0E+07	2,6E+07	1,0E+07	6,0E+07	
Лактобациллы	$10^6, 10^7$	2,8E+07	3,6E+07	2,0E+07	2,0E+07	
Наличие дисбактериоза	+	+	+	+	+	
Степень	1	1	2	2	2	
Общее количество аэробов	$10^7, 10^8$	1,0E+07	1,0E+07	1,0E+07	4,0E+07	+60 суток
Кишечные палочки	$10^6, 10^7$	8,0E+07	1,4E+07	1,0E+06	1,0E+09	
Цитратпозитивные энтеробактерии	$<10^5$	1,2E+05		1,0E+05		
<i>S.odorifera</i> biogroup 1		1,2E+05				
<i>Kluyvera ascorbata</i>				1,0E+05		
<i>Klebsiella ozaenae</i>					1,0E+07	
Протеи	$10^{-1}, 10^3$	1,0E+04	1,0E+04	1,0E+04	1,0E+04	
<i>E. faecalis</i>	$10^6, 10^7$	8,0E+07	1,0E+07	1,0E+07	1,0E+08	
Стрептококки	$10^7, 10^8$	8,0E+08	1,0E+08	1,0E+08	1,0E+08	
<i>S.aureus</i>	$<10^5$	2,0E+05	8,0E+03	1,0E+04	8,0E+03	
Дрожжи	$<10^5$	1,0E+02	5,0E+03	1,0E+04	4,0E+03	
Бифидобактерии	$10^8, 10^9$	1,0E+09	1,0E+09	1,0E+09	1,0E+09	
Лактобациллы	$10^6, 10^7$	3,0E+08	2,0E+08	1,0E+09	1,0E+09	
Наличие дисбактериоза	+	+	+	+	+	
Степень	2	2	2	2	1-2	

В эксперименте использовали 26 обезьян вида макака резус. 13 обезьян из их числа массой до 8-ми кг были высажены в приматологические кресла и в течение 6-ти дней выявляли животных, которые охотно потребляют «кефир». С этой целью использовали специальные поилки. Точно также тестировали обезьян, находившихся в клетках. На основе этих наблюдений было отобрано 10 обезьян стабильно потребляющие «кефир».

В первую группу «Аутоштаммы» вошли 5 животных (виварные номера 026, 541, 068, 265, 234), во вторую группу - «Кефир» (№№ 221, 206, 348, 551, 203). Третья группа принимала БАД «Амбен», в неё вошли №№ 773,630,134,707,069. Четвертая группа – контроль в неё вошли 6 обезьян (№№ 015,164,169,645,326,322).

Поскольку точное дозирование препаратов с использованием поилок вызывало значительные трудности (обезьяны могли и отвлекаться, и просто отказываться от потребления препарата, вырывать поилку или выдергивать пробку) было решено добавлять необходимое количество препарата в рацион каш по 50 мл 2 раза в день с промежутком 3,5-4 часа.

Для соблюдения идентичности все обезьяны были высажены в индивидуальные клетки по группам. Таким образом, образовалось 3 экспериментальные группы по 5 обезьян и группа контроля из 6-ти животных. Курс приёма данных препаратов составил 14 дней. Отбор проб фекалий для микробиологических исследований осуществлялся перед курсом приёма препарата на 14 сутки (по окончании курса), а также на 28 сутки после приёма препарата. Кроме того, осуществляли клиническое обследование животных.

Все животные, участвующие в эксперименте, были адаптированы к условиям средней широты и содержания в индивидуальных клетках в помещениях вивария. Рацион питания состоял из натуральных продуктов в соответствии с рекомендациями приматологических руководств.

Данные экспериментальные обезьяны в ИМБП поступили из питомника ГУ НИИ МП РАМН, город Адлер в 2007 и 2008 годах. За этот период ежегодно проводились исследования на условно-патогенные и патогенные бактериальные заболевания, глистные инвазии и туберкулез. По данным последних экспертиз (Московская ветлаборатория, ноябрь 2010 года) инфекции и гельминты (дизентерия, сальмонеллез, колибактериоз и яйца гельминтов) у животных не обнаружены.

Все обезьяны адаптированы к условиям содержания в различных системах фиксации (приматологическое кресло, ложементы), обслуживающему персоналу, процедурам и мероприятиям по посадке их в системы фиксации. В этих системах обезьяны неоднократно находились сроком до месяца. Последний год перед настоящим экспериментом животные в многосуточных исследованиях не использовались. За этот период по данным ежедневного наблюдения и периодических клинических обследований значительных отклонений от нормативных показателей для обезьян индивидуального клеточного содержания, не отмечалось. Практически, у всех приматов ежедневный осмотр не выявлял значительных нарушений со стороны этой системы. Микрофлора кишечника оценивалась по наличию следующих видов: *Bifidobacterium sp.*, *Lactobacillus sp.*, *Enterococcus sp.*, *E. coli*, *Enterobacter sp.*, *Staphylococcus sp.*, *S. aureus*, *Clostridium sp.*, *P. aeruginosa*, *Bacillus sp.*, *Candida sp.*. Оценивалось количество микроорганизмов в норме у обезьян всех групп, а также в динамике после употребления напитка «Кефир» с пробиотическим препаратом, «Аутоштаммы» и БАД «Амбен» - пребиотик, иммуномодулятор на основе аминокислоты (табл. 16). На основе полученных данных определялось, повысилось или понизилось количество данного микроорганизма у обезьян обеих групп. Для оценки эффективности динамики изменений количественны и видовых характеристик микрофлоры нами был использован эубиотический индекс (табл. 15).

Результаты суммированы на рисунках 7-14.

Таблица 15. Результаты микробиологических обследований обезьян (эубиотический индекс)

	контроль		аутоштаммы		кефир		амбен	
Кол-во особей	6		5		5		5	
Сроки (сут.)	Фон-14	30	Фон-14	30	Фон-14	30	Фон-14	30
Эубиотический индекс	0,9	0,8	4	1,5	2,3	0,5	3	1,3

Таблица 16. Сравнительная оценка динамики дисбактериозов при приеме кисломолочного аутопробиотика на основе лактобацилл и других пробиотических препаратов (% случаев дисбактериоза).

	Фон	После 2 недельного курса	Месяц спустя после курса
Кисломолочный продукт на основе аутопробиотиков	100	8	58
Кисломолочный продукт лечебно-профилактического назначения	100	20	85
Пробиотики на основе коллекционных культур	100	58	85

Из данных представленных в таблице 16 следует, что безусловное преимущество в части коррекции дисбактериоза принадлежит аутопробиотикам. Аутопробиотики быстро и эффективно восстанавливают оптимальный микробиоценоз кишечника. Следующими по значимости явились билактин с амбеном и кефир.

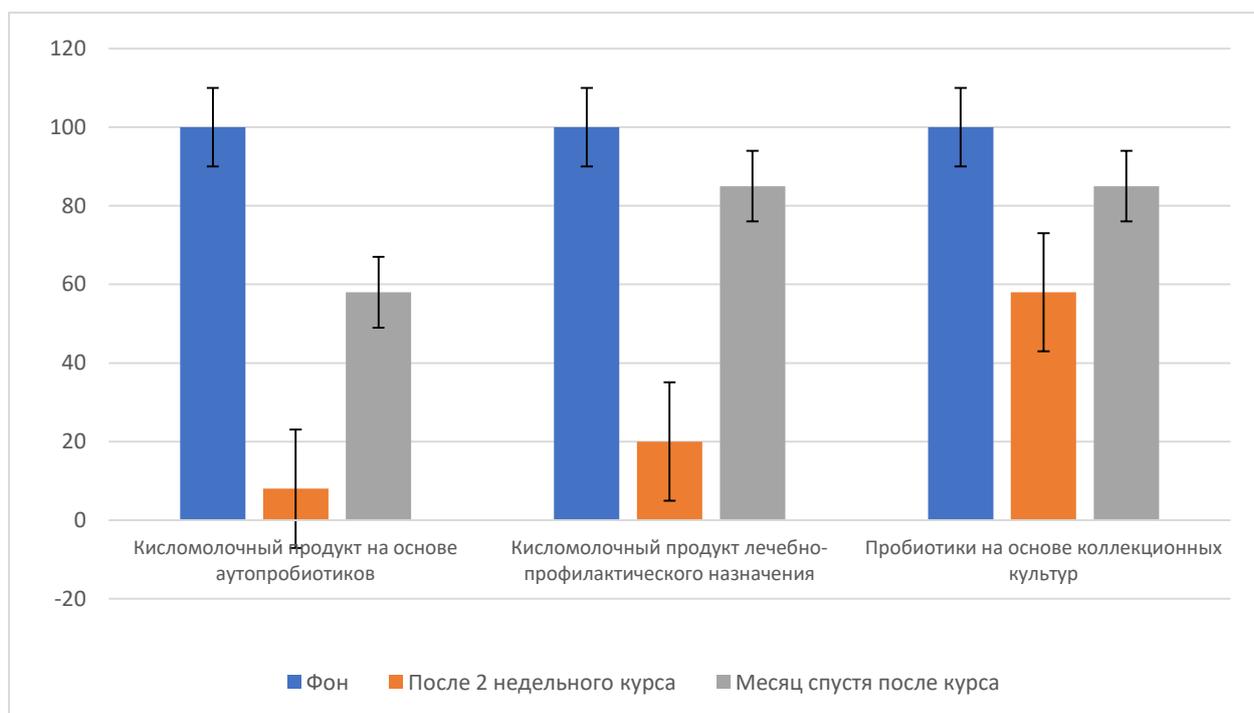


Рисунок 7. Сравнительная оценка динамики дисбактериозов при приеме кисломолочного аутопробиотика на основе лактобаци

Таблица 17. Результаты микробиологических обследований обезьян (эубиотический индекс)

	контроль		аутоштаммы		кефир		амбен	
	Фон-14	30	Фон-14	30	Фон-14	30	Фон-14	30
Кол-во особей	6		5		5		5	
Сроки (сут.)	Фон-14	30	Фон-14	30	Фон-14	30	Фон-14	30
Эубиотический индекс	0,9	0,8	4	1,5	2,3	0,5	3	1,3

Исследование динамики изменений микробиоты различных групп

На рисунках с 8 по 14 представлены данные по динамике изменения микробиоты различных групп при приеме аутоштаммов на основе лактобактерий, пребиотика «Амбен» и кефира обогащённого лактобактериями.

Исследование кишечной микрофлоры проводились до приёма (фон), через 2 недели и спустя месяц после приёма.

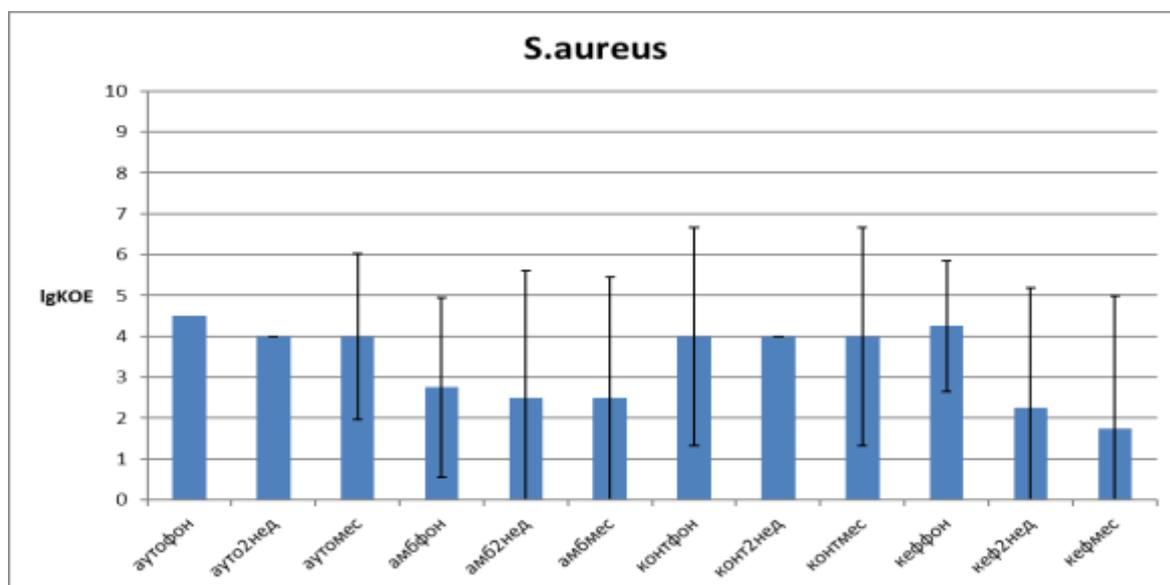


Рисунок 8. Количественные изменения золотистого стафилококка в составе кишечной микрофлоры обезьян

Обозначения на рисунках с 8 по 14

Аутофон – фоновые показатели перед приемом аутопробиотика;

Ауто2нед – после двух недельного приема аутопробиотика;

Аутомес – спустя месяц после приема аутопробиотика;

Амбфон – фоновые показатели перед приемом препарата «Амбен»;

Амб2нед – после двух недельного приема препарата «Амбен»;

Амбмес - спустя месяц после приема препарата «Амбен»;

Контфон – фоновые показатели;

Конт2нед - спустя две недели без приема;

Контмес - спустя месяц без приема;

Кеффон – фоновые показатели перед приемом кефира обогащённого лактобактериями;

Кеф2нед - после двух недельного приема кефира обогащённого лактобактериями;

Кефмес - спустя месяц после приема кефира обогащённого лактобактериями.

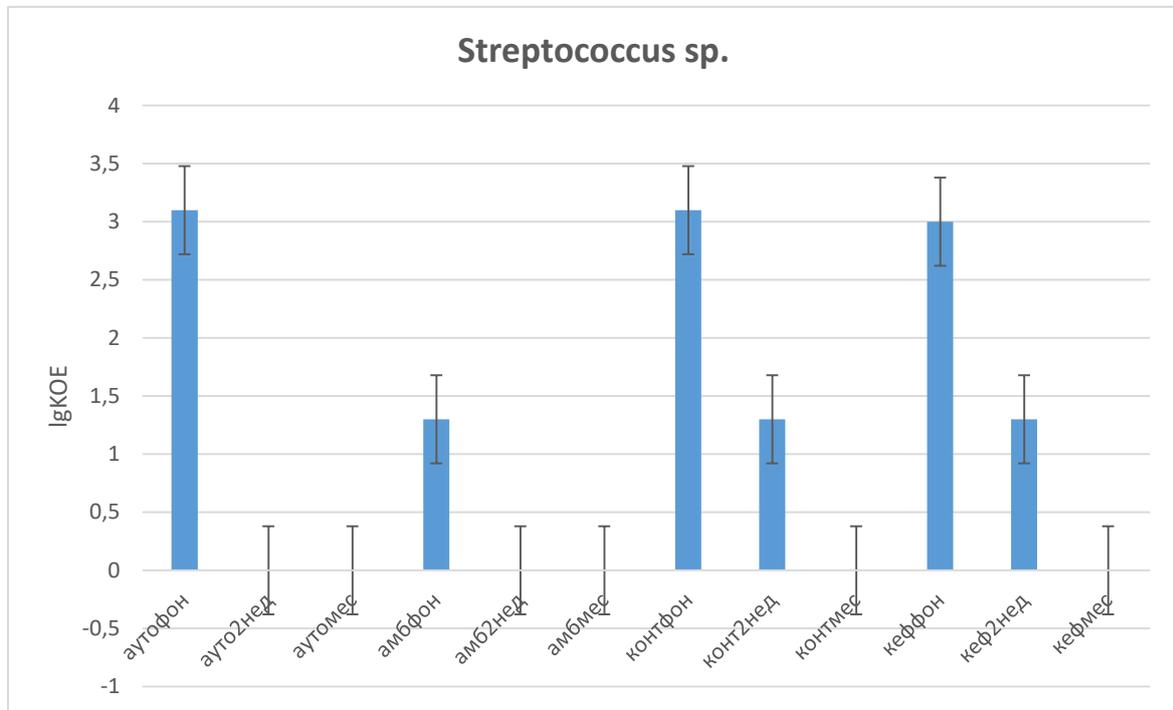


Рисунок 9. Количественные изменения альфа гемолитического стрептококка в составе кишечной микрофлоры обезьян

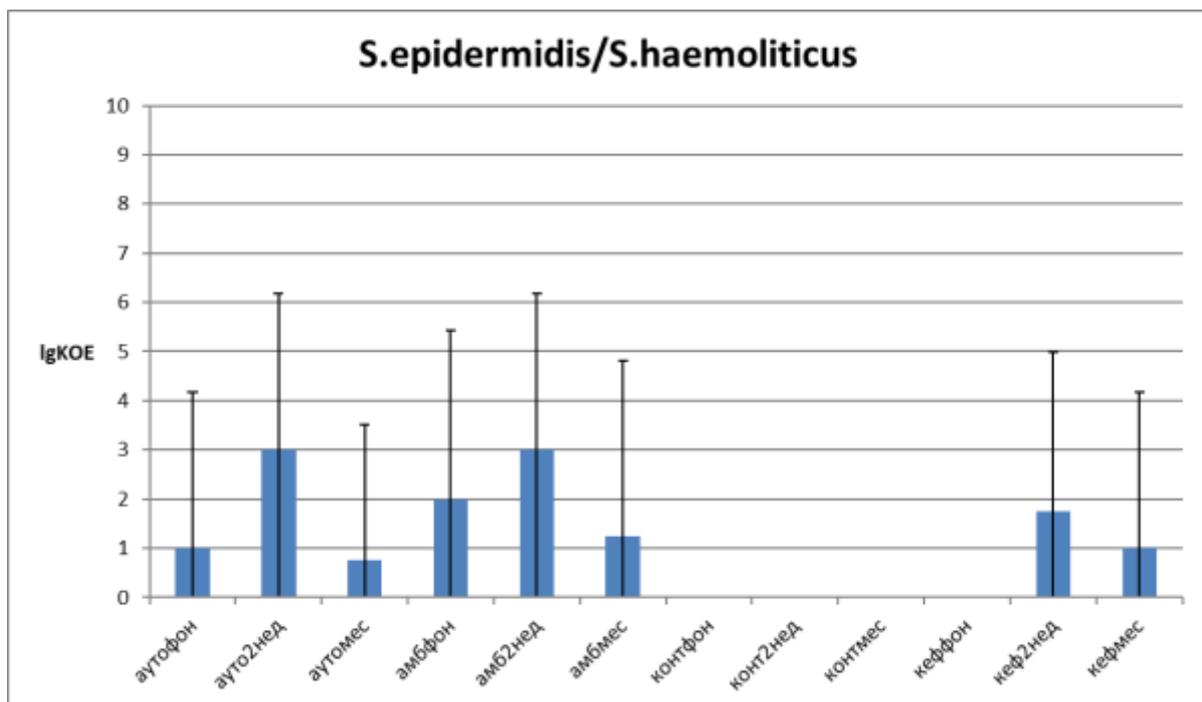


Рисунок 10. Количественные изменения гемолитического стафилококка в составе кишечной микрофлоры обезьян

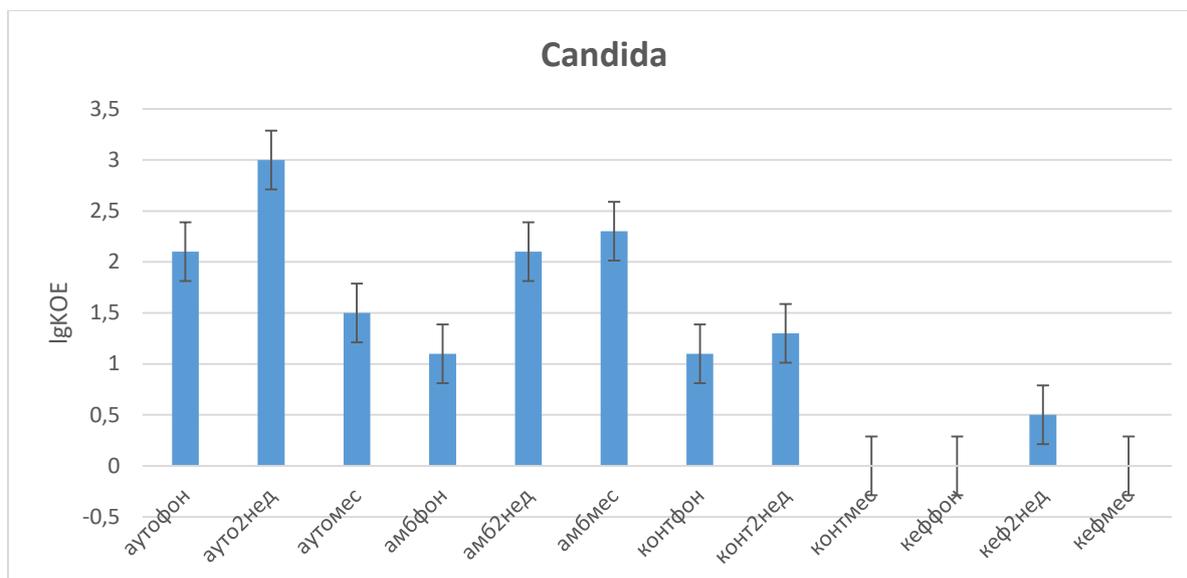


Рисунок 11. Количественные изменения условно-патогенных дрожжеподобных грибов рода *Candida* в составе кишечной микрофлоры обезьян

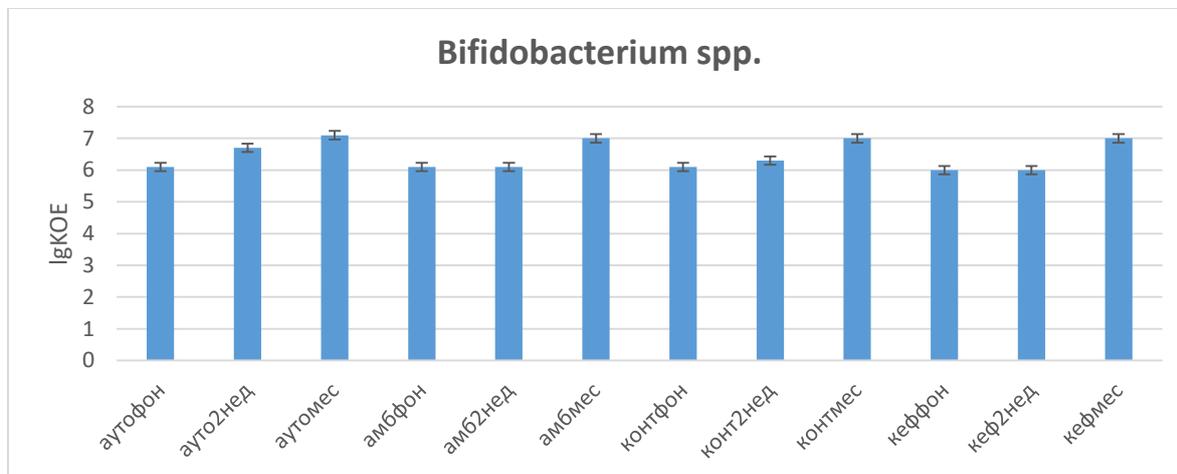


Рисунок 12. Количественные изменения бифидобактерий в составе кишечной микрофлоры обезьян

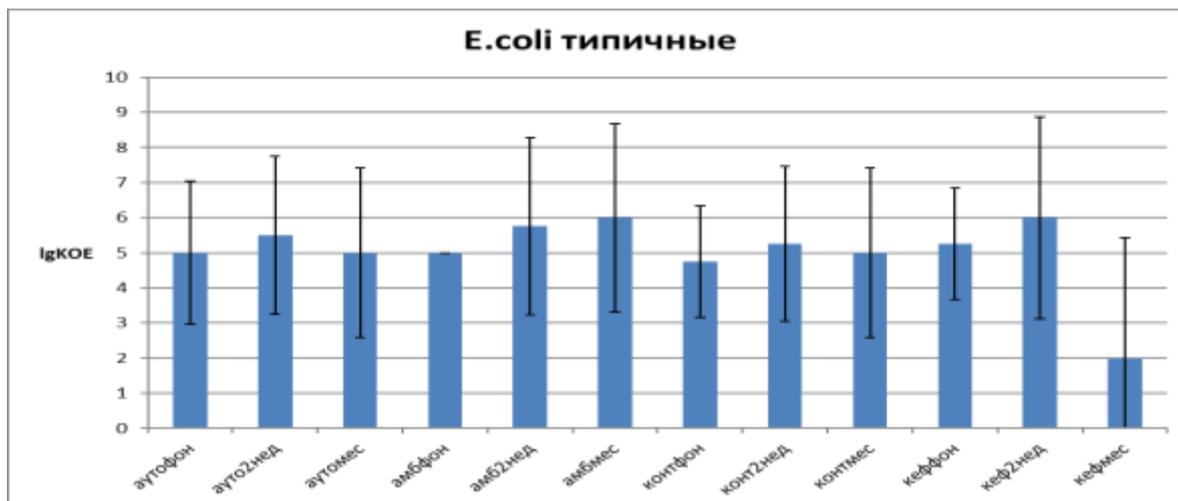


Рисунок 13. Количественные изменения непатогенных кишечных палочек в составе кишечной микрофлоры обезьян

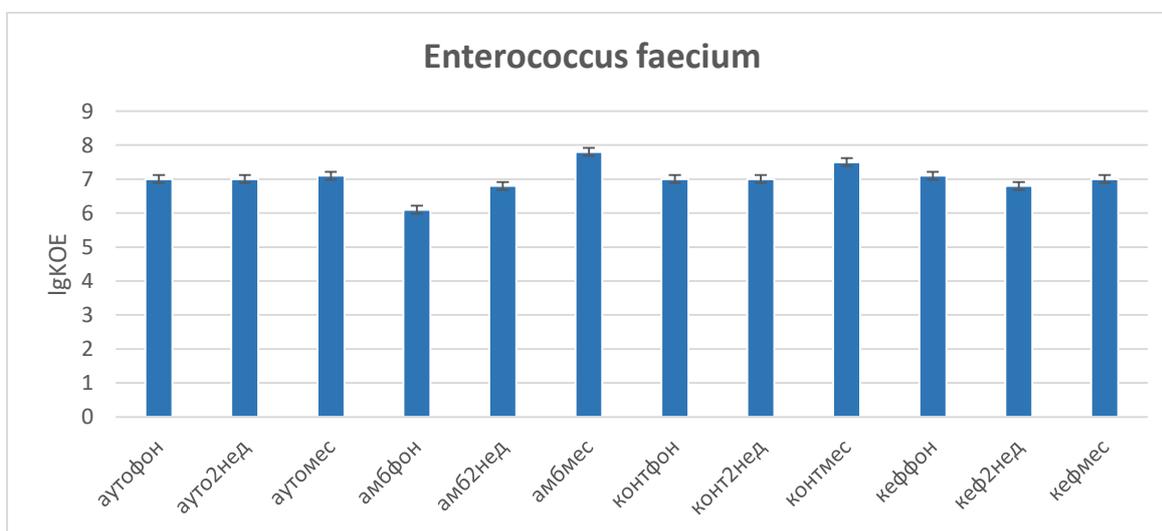


Рисунок 14. Количественные изменения *E. faecium* в составе кишечной микрофлоры обезьян

3.3 Исследование эффективности аутопробиотических средств в экспериментах с длительной изоляцией.

Применение пробиотиков на основе аутоштаммов для коррекции микробиоценоза кишечника испытуемых в условиях 105 и 520-суточного эксперимента по длительной изоляции «Марс-105» и «Марс-500».

Как уже указывалось выше, длительная изоляция ведет к развитию дисбактериозов, вызванных увеличением доли условно-патогенных микроорганизмов в составе микрофлоры покровных тканей и слизистых

оболочек, что ведет к перекрестному инфицированию и спонтанному формированию штаммов с признаками госпитализма. Для профилактики дисбактериоза испытуемых в условиях эксперимента «Марс-500» был применён препарат, созданный на основе аутоштаммов энтерококков. Для коррекции дисбактериоза кишечника применялись угольные таблетки, насыщенные культурами *Enterococcus faecium*, в количестве 10^8 КОЕ. Аутоштаммы *E. faecium* были выделены из состава микрофлоры кишечника испытуемых за 1 месяц до начала эксперимента (рис. 15). Препараты применялись в течение первых 30 суток эксперимента по 1 таблетке 2 раза в день во время приёма пищи.

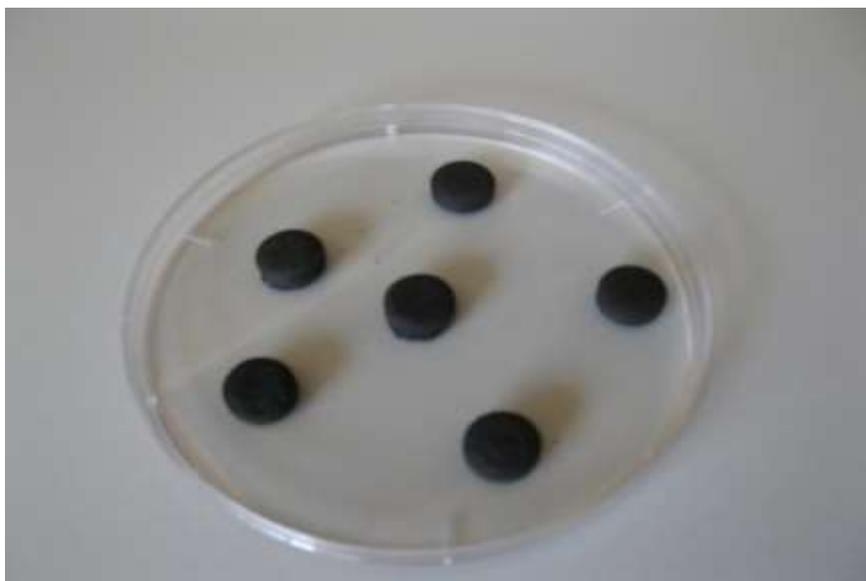


Рисунок 15. Энтерококковый аутопробиотик, сорбированный на угольные таблетки.

3.3.1 Тестирование аутопробиотика на наличие генетических детерминантов патогенности и антибиотикорезистентности аутоштаммов *Enterococcus faecium*

Одним из важнейших критериев выбора аутопробиотических бактерий является их безопасность для здоровья пациентов, с целью доказательства которой был проведен анализ выделенных аутоштаммов на наличие генов, кодирующих известные факторы патогенности

энтерококков. Исследование проводилось на базе ФГБУ НИИ экспериментальной медицины СПбО РАН.

В исследование включили 35 изолированных аутоштаммов *E. faecium*. Наличие факторов патогенности устанавливали с помощью метода полимеразной цепной реакции (ПЦР). Детекцию результатов производили методом электрофореза в агарозном геле. Перечень искомых генов указан в таблице 18. Для оценки потенциальных антимикробных свойств выделенных изолятов аналогичным образом определяли наличие генов, кодирующих синтез энтероцинов А и В (*entA*, *entB*), регуляторный белок (*entK*), а также белок устойчивости к энтероцину В (*eniB*) и белок иммунитета к энтероцину А (*entI*) (рис.16-17).

Результаты анализа показали, что большинство аутоштаммов свободно от генов, кодирующих факторы патогенности. Тем не менее, наличие небольшого числа штаммов, имеющих эти гены, доказывает целесообразность проведения предварительных генетических исследований.

Кроме того, присутствие у некоторых штаммов генов, кодирующих энтероцин А и другие компоненты энтероцинового регулона, свидетельствует о повышенной антимикробной активности и, соответственно, о более выраженном пробиотическом эффекте этих бактерий.

Таблица 18. Некоторые известные праймеры патогенности энтерококков

Функция	Фактор	Ген(ы)
Адгезия и колонизация	Адгезин Адгезин Адгезин Пили I типа	<i>asaI esp efaApilA</i>
Пенетрация, колонизация, повреждение тканей	Желатиназа Сериновая протеиназа Fsr регулятор Гиалуронидаза Цитолизин	<i>gelE sprE fsr Bhyl cyl</i>
Гемолиз, токсигенность, бактериоциногенность	Цитолизины	<i>cylA, M</i>
Устойчивость к ванкомицину	Фермент устойчивости к ванкомицину	<i>van</i>

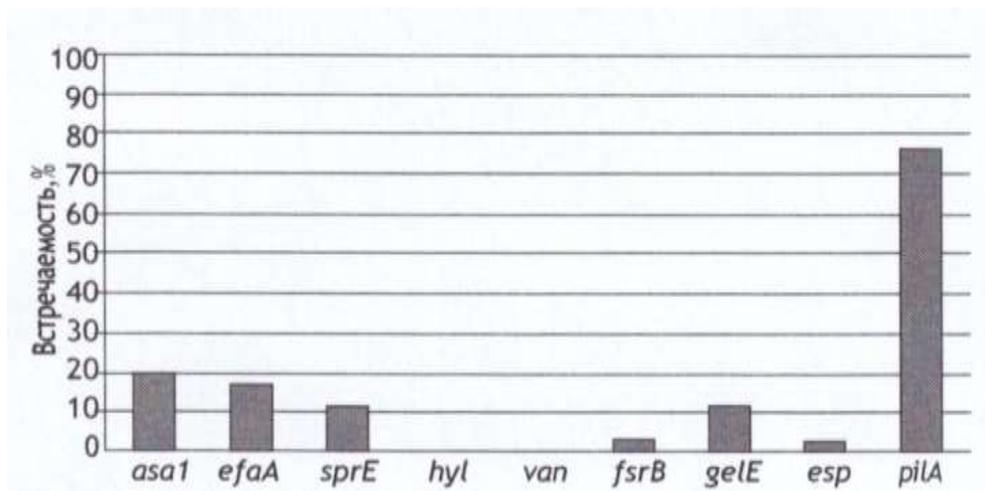


Рисунок 16. Частота встречаемости генов, кодирующих факторы патогенности в исследованных аутоштаммах *E. faecium*

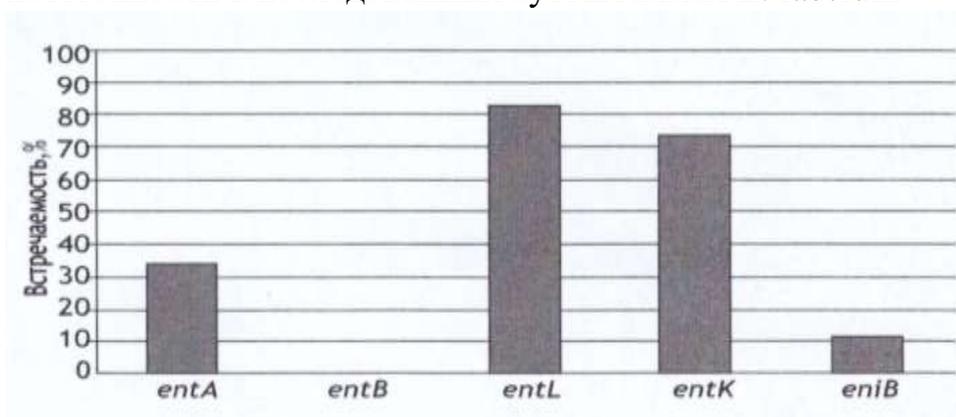


Рисунок 17. Частота встречаемости генов, кодирующих компоненты энтероцинового регулона энтерококков.

3.3.2 Оценка эффективности аутопробиотиков в эксперименте со 105-суточной изоляцией и «Марс-500»

Как свидетельствуют данные 105-суточного изоляционного эксперимента, предваряющего эксперимент с 520-суточной изоляцией. Во время эксперимента произошло снижение количества видов микроорганизмов, относящихся к условно-патогенной группе: патогенные эшерихии, дрожжи, клебсиеллы, гемолитические и золотистые стафилококки, клебсиелла и протей, с тенденцией к восстановлению только спустя 30 суток после окончания курса приема препарата аутопробиотика на основе *Enterococcus faecium* (табл. 19). При этом

популяция протективных групп – лактобацилл, бифидобактерий, непатогенных кишечных палочек и энтерококков находилась в пределах нормы. На рисунке 18 и 19 показано динамика количественного изменения облигатной и факультативной микрофлоры кишечника у испытуемых (табл. 19-20). Также надо отметить динамику количественного изменения группы неферментирующих бактерий и плесневых грибов у испытуемых (рис. 20, табл. 21).

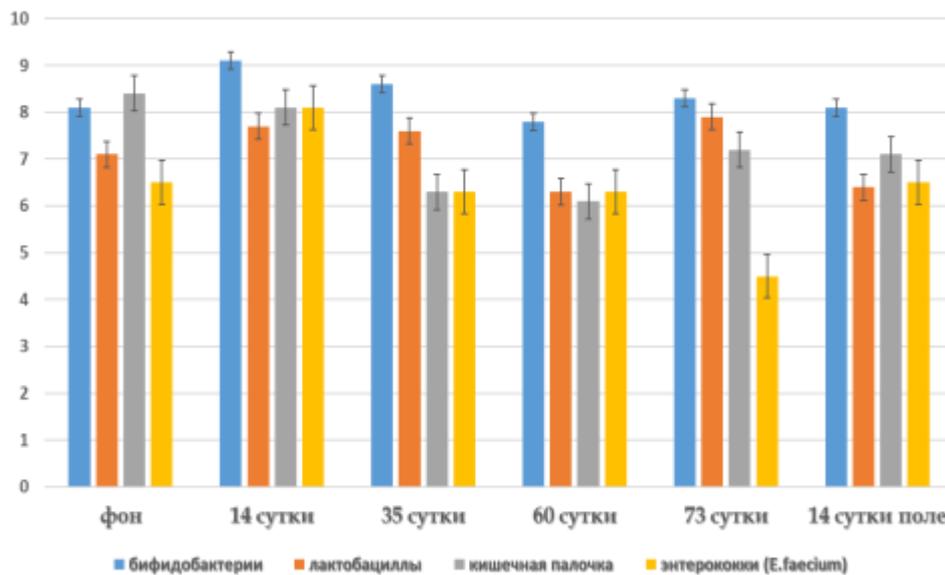


Рисунок 18. Динамика количественных изменений облигатной микрофлоры кишечника у испытуемых в 105-суточном эксперименте

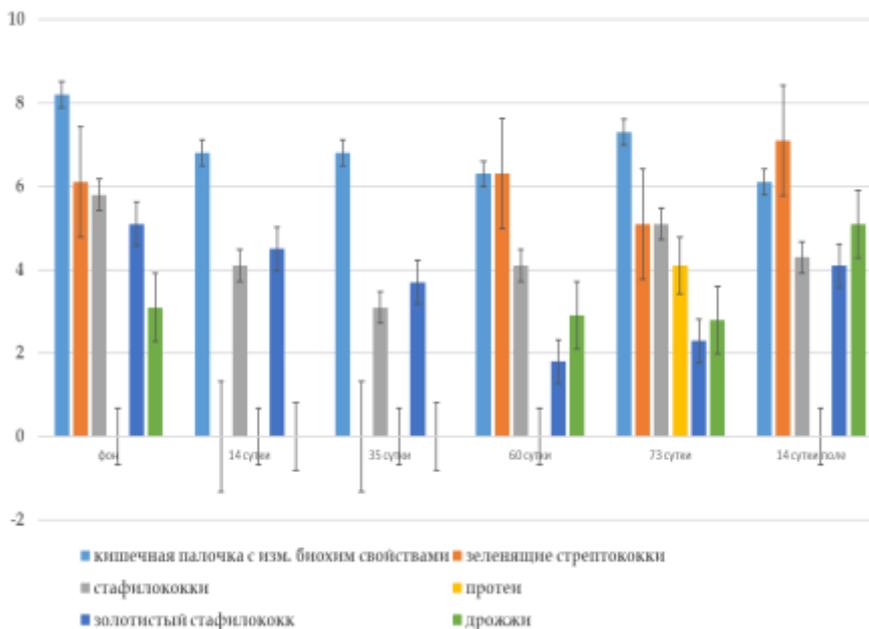


Рисунок 19. Динамика количественных изменений факультативной микрофлоры кишечника у испытуемых в 105-суточном эксперименте

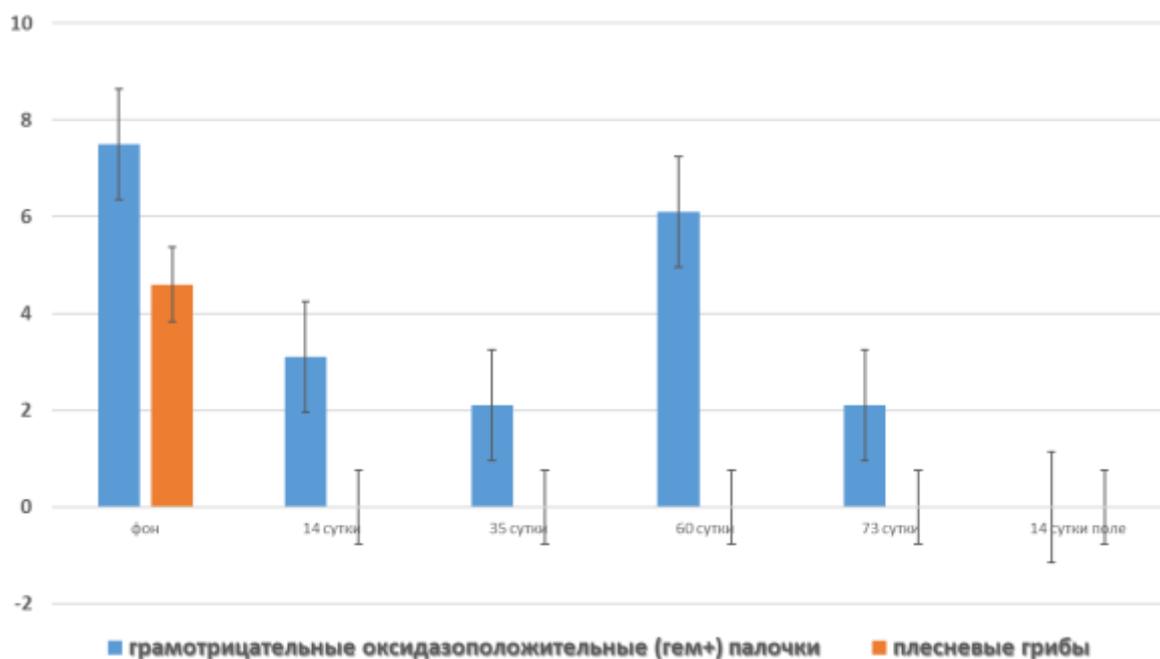


Рисунок 20. Динамика количественных изменений группы неферментирующих бактерий и плесневых грибов у испытуемых в 105-суточном эксперименте.

Таблица 19. Динамика облигатной микрофлоры кишечника у испытуемых в 105-суточном эксперименте с использованием аутопробиотика на основе *Enterococcus faecium*

Микроорганизмы	Сроки отбора проб					
	Фон	14 сутки	35 сутки	60 сутки	73 сутки	14 сутки после эксперимента
<i>Bifidobacterium</i>	10^8	10^9	10^8	10^7	10^8	10^8
<i>Lactobacillus</i>	10^7	10^7	10^7	10^6	10^7	10^7
<i>E. coli</i>	10^8	10^8	10^7	10^6	10^7	10^7
<i>E. faecium</i>	10^7	10^8	10^7	10^6	10^5	10^7

Таблица 20. Динамика факультативной микрофлоры кишечника у испытуемых в 105-суточном эксперименте с использованием аутопробиотика на основе *Enterococcus faecium*

Микроорганизмы	Сроки отбора проб					
	Фон	14 сутки	35 сутки	60 сутки	73 сутки	14 сутки после эксперимента
<i>E. coli</i> с изменёнными биохим. свойствами	10^8	10^6	10^6	10^6	10^7	10^6
<i>Streptococcus viridans</i>	10^6	0	0	10^6	10^5	10^7
<i>Staphylococcus</i>	10^5	10^4	10^3	10^4	10^5	10^4
<i>Proteus</i>	0	10^7	0	0	0	0
<i>S.aureus</i>	10^5	10^4	10^3	10^1	10^2	10^4
<i>Candida</i>	10^3	0	0	10^3	10^3	10^5

Таблица 21 Динамика неферментирующих микроорганизмов в кишечнике испытуемых в 105-суточном эксперименте

Микроорганизмы	Сроки отбора проб					
	Фон	14 сутки	35 сутки	60 сутки	73 сутки	14 сутки после эксперимента
Грамотрицательные оксидазоположительные гемолитические палочки	10^7	10^3	10^1	10^6	10^2	0

3.3.3 Исследование в изоляционном эксперименте длительностью 520 суток «Марс-500»

При использовании препаратов на основе аутологичных препаратов на основе *E. faecium* удалось избежать количественного роста условно-патогенных микроорганизмов в период острой адаптации в течение первых нескольких недель эксперимента. Микрофлора кишечника в течение периода приема препарата отличалась стабильностью и достаточно высокими показателями облигатной микрофлоры – бифидобактерий, лактобацилл, непатогенных энтерококков (рис. 21).

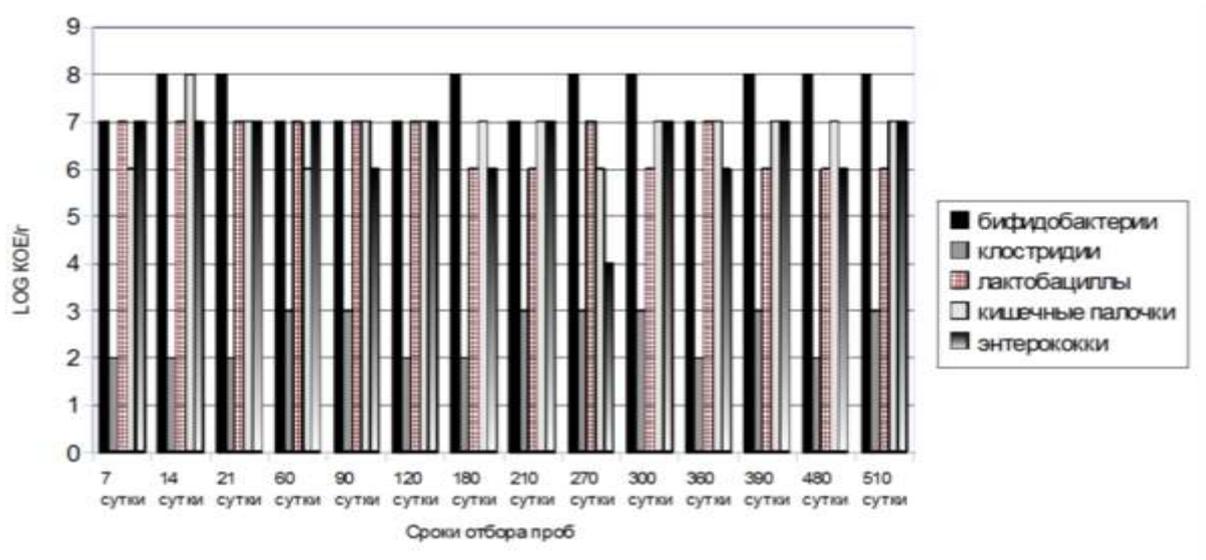


Рисунок 21. Динамика факультативной микрофлоры кишечника у испытуемых в 520-суточной изоляции (n=6)

Кроме того, в результате приема препарата значительно снизился уровень содержания в кишечнике неферментирующих бактерий и грибов. Это происходило даже несмотря на значительный уровень контаминации среды обитания условно-патогенными микроорганизмами (рис. 22).

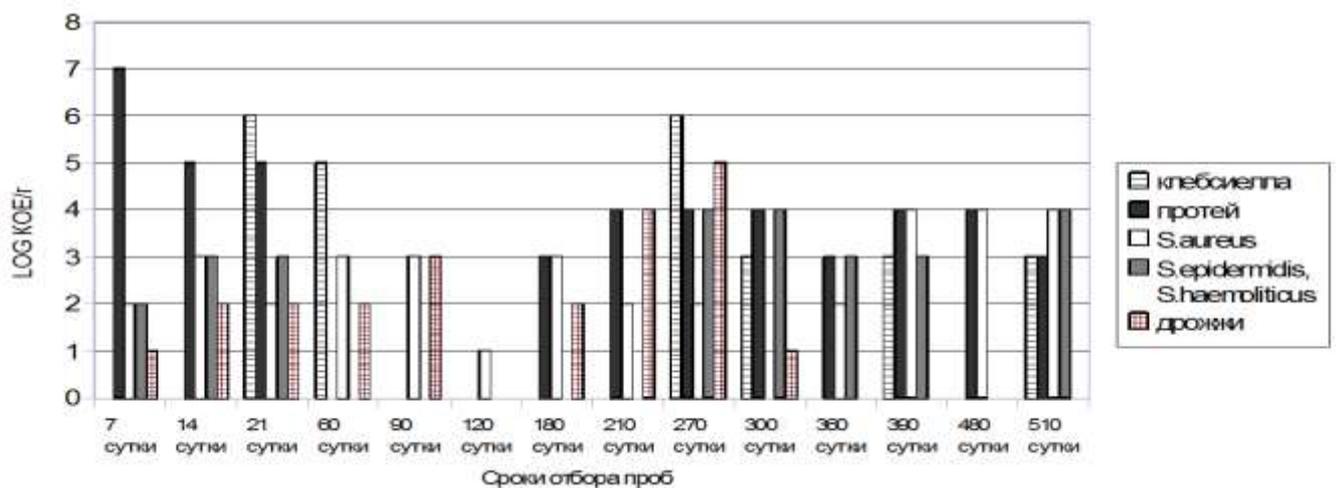


Рисунок 22. Динамика облигатной микрофлоры кишечника у испытуемых в 520-суточной изоляции (n=6) контаминации среды обитания условно-патогенными микроорганизмами.

Во время приема препарата отмечалась стабилизация клостридий, кишечной палочки. После отмены препарата появились спорадические

подъёмы уровня обсемененности лактозонегативных кишечных палочек, дрожжей и клебсиелл, отмечался подъем кокковой микрофлоры (рис. 21).

В ротоглотке в период приема препаратов и в последующие 200 суток отсутствовали стафилококки, нейссерии и зеленыящие стрептококки. Начиная с сотого дня эксперимента наблюдались разовые подъёмы синегнойной палочки, бактерий кишечной группы, не встречавшиеся в начале эксперимента (рис. 23-33).

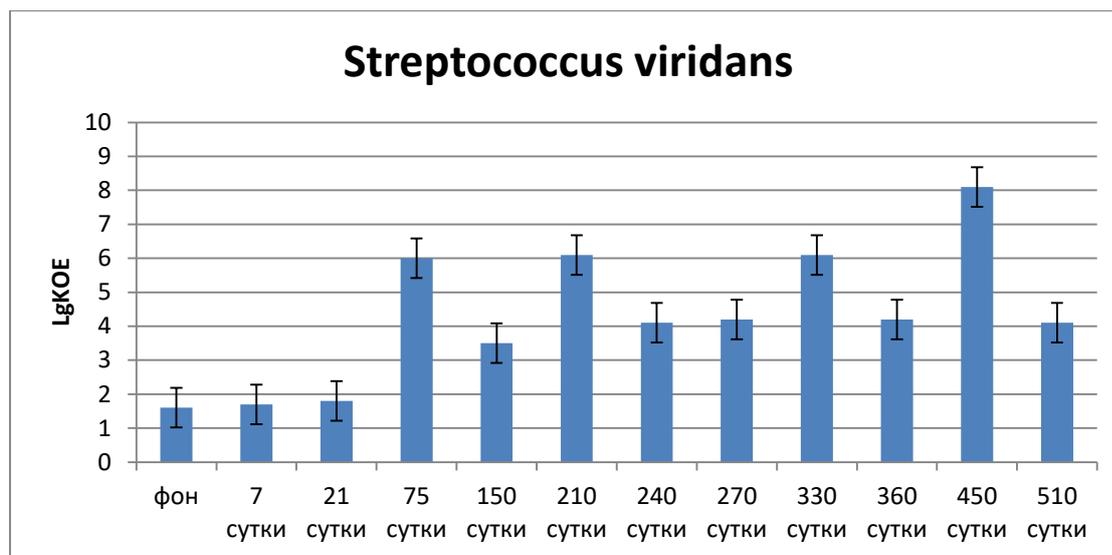


Рисунок 23. Динамика изменений зеленыящих стрептококков в ротоглотке в эксперименте Марс-500

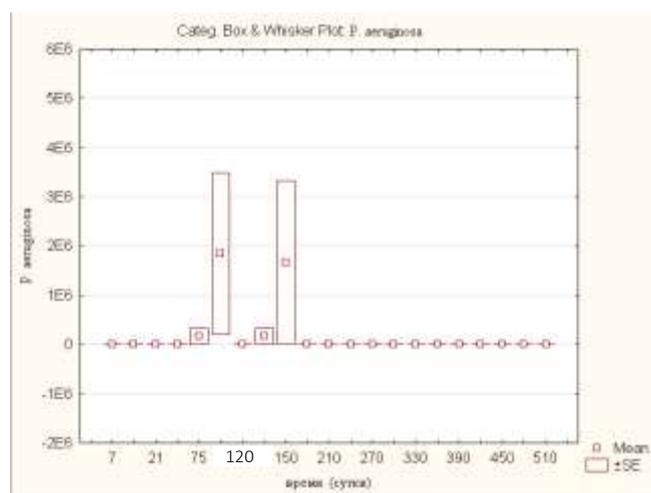


Рисунок 24. Динамика изменений синегнойной палочки в ротоглотке в эксперименте Марс-500

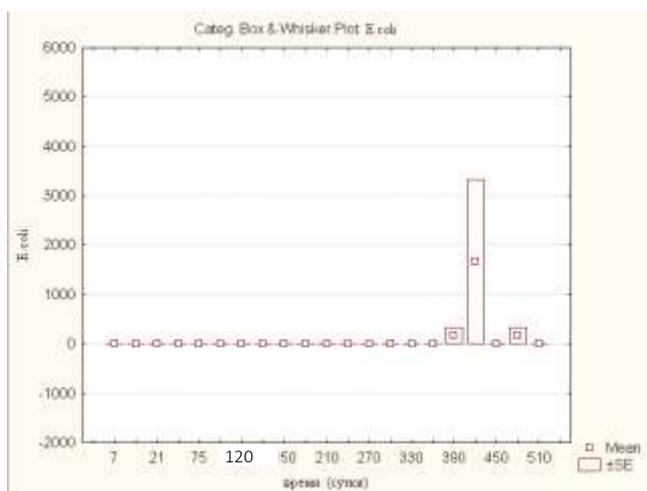


Рисунок 25. Динамика изменений *E.coli* в ротоглотке в эксперименте Марс-500

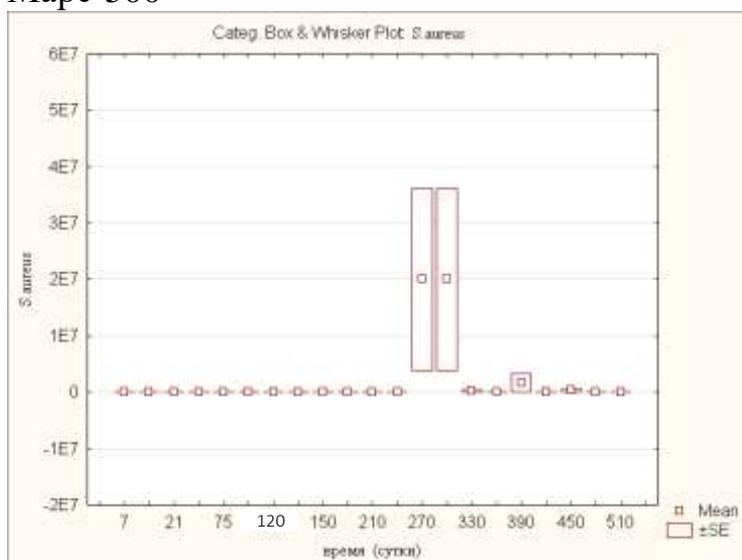


Рисунок 26. Динамика изменений *S. aureus* в ротоглотке в эксперименте Марс-500

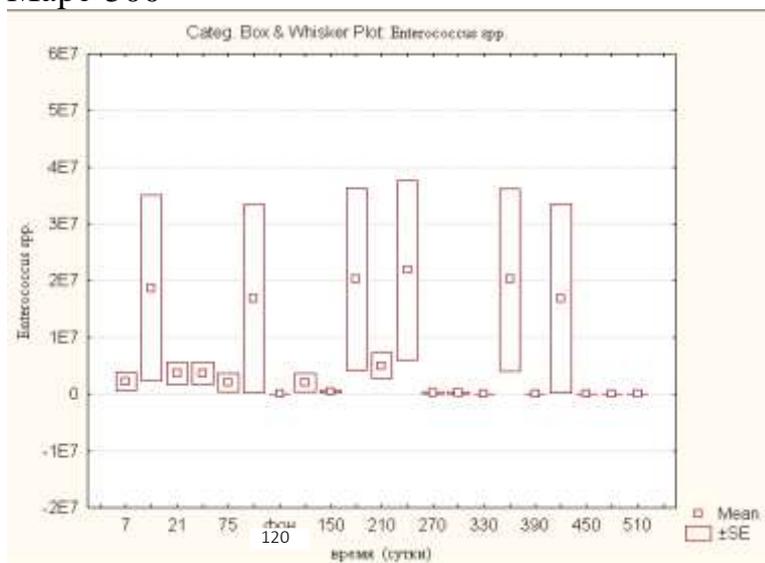


Рисунок 27. Динамика изменений *Enterococcus spp.* в ротоглотке в эксперименте Марс-500

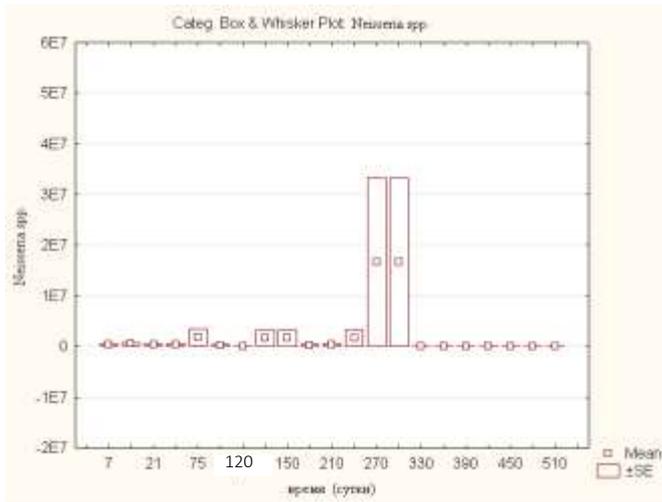


Рисунок 28. Динамика изменений *Neisseria spp.* в ротоглотке в эксперименте Марс-500

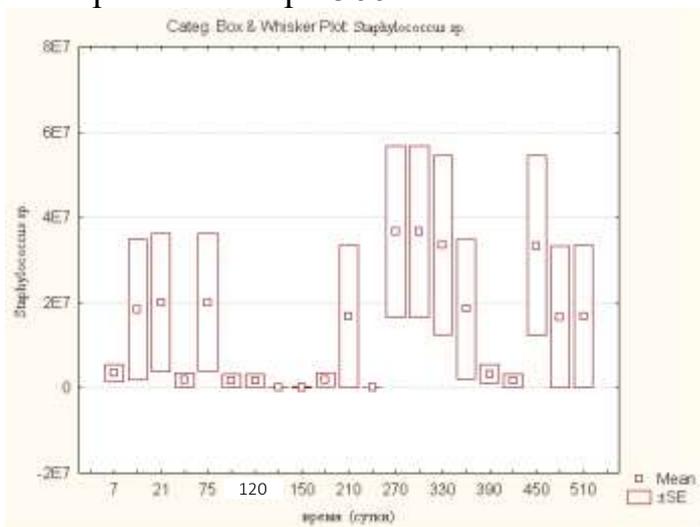


Рисунок 29. Динамика изменений *Staphylococcus sp.* на слизистых носовых пазух в эксперименте Марс-500

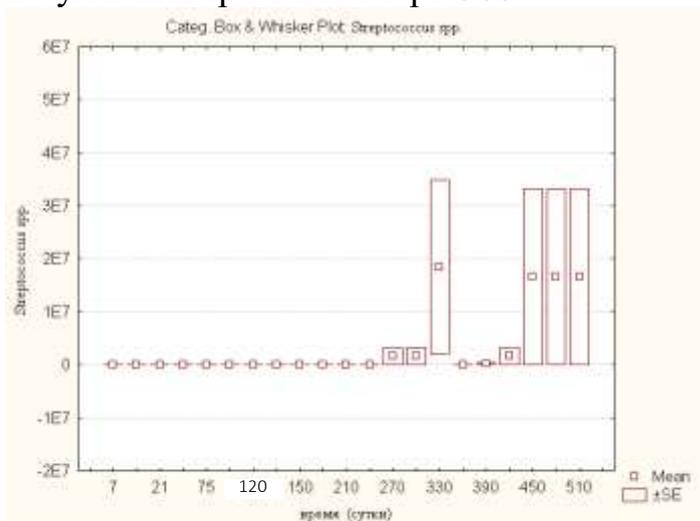


Рисунок 30. Динамика изменений *Streptococcus spp.* на слизистых носовых пазух в эксперименте Марс-500

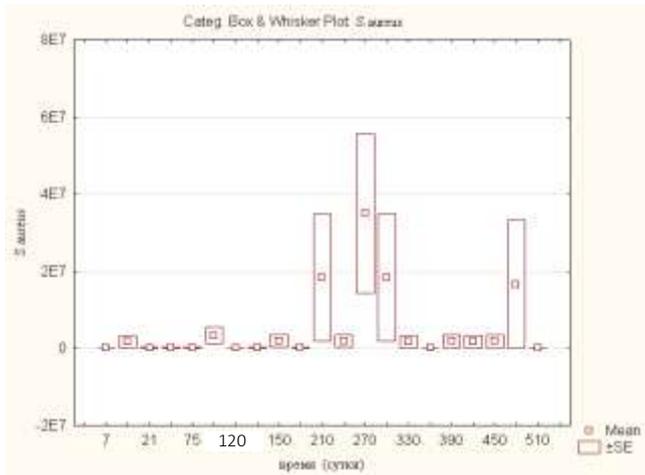


Рисунок 31. Динамика изменений *S. aureus* на слизистых носовых пазух в эксперименте Марс-500

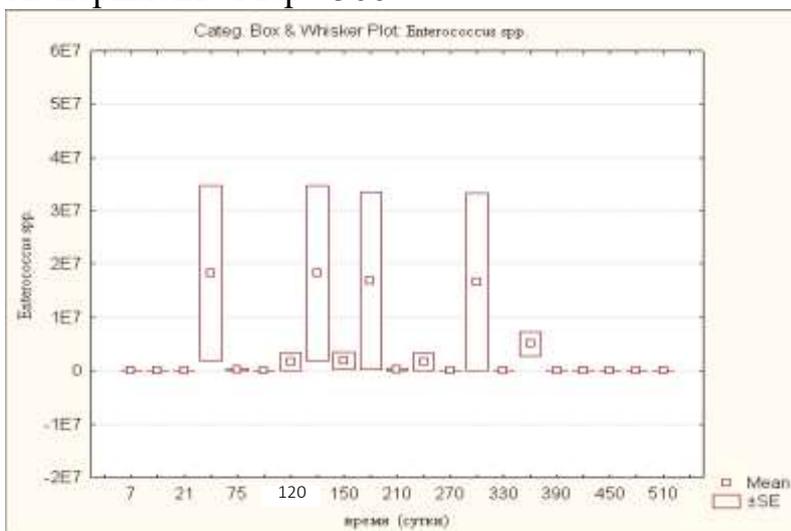


Рисунок 32. Динамика изменений *Enterococcus spp.* на слизистых носовых пазух в эксперименте Марс-500

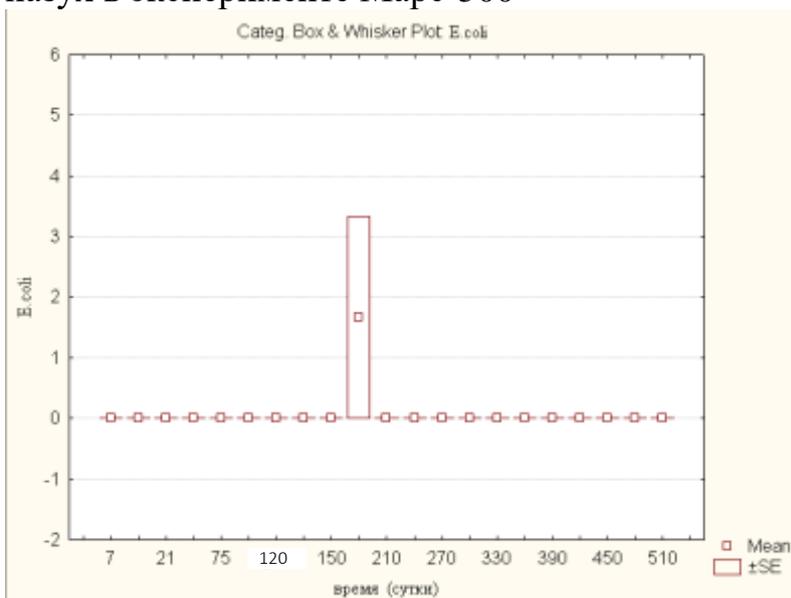


Рисунок 33. Динамика изменений *E. coli* на слизистых носовых пазух в эксперименте Марс-500

В начале эксперимента на кожных покровах доминировали представители непатогенной кокковой микрофлоры, практически отсутствовал золотистый стафилококк (рис. 34). Вместе с тем, на влагосодержащих кожных покровах практически отсутствовали такие важнейшие комменсалы кожной микрофлоры как коринебактерии, и присутствовали представители кишечной флоры, в том числе лактозонегативные кишечные палочки, элиминированные из биотопа по окончании курса приема аутопробиотика. (рис. 44). В отдаленные сроки после отмены препарата отмечались спорадические подъемы уровня обсемененности патогенными дрожжами (рис. 39), появились и доминировали до окончания эксперимента гемолитические зеленящие стрептококки. В подмышечной впадине отсутствовали эпидермальные и золотистые стафилококки, энтерококки и коринебактерии (рис. 41-49). Спорадически наблюдался количественный рост патогенной микрофлоры (рис. 34-40).

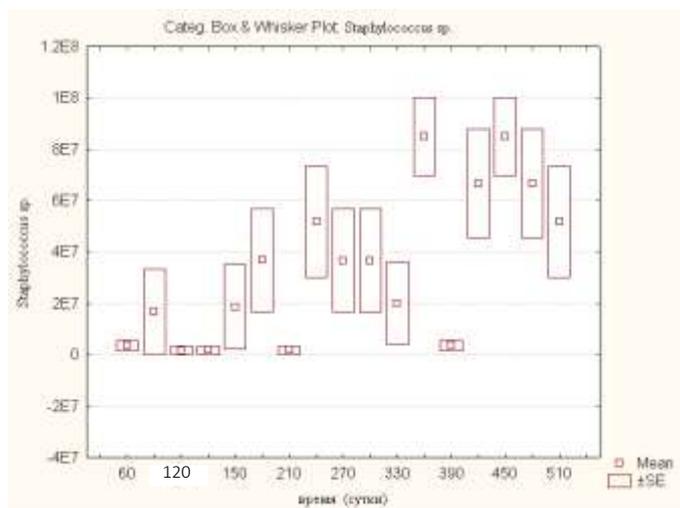


Рисунок 34. Динамика изменений *Staphylococcus sp.* на коже промежности в эксперименте Марс-500

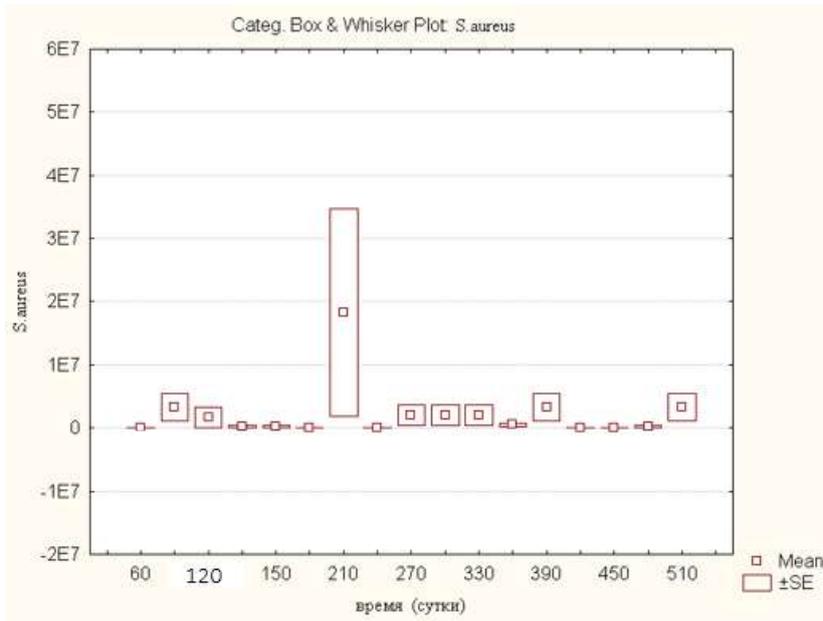


Рисунок 35. Динамика изменений *S. aureus* на коже промежности в эксперименте Марс-500

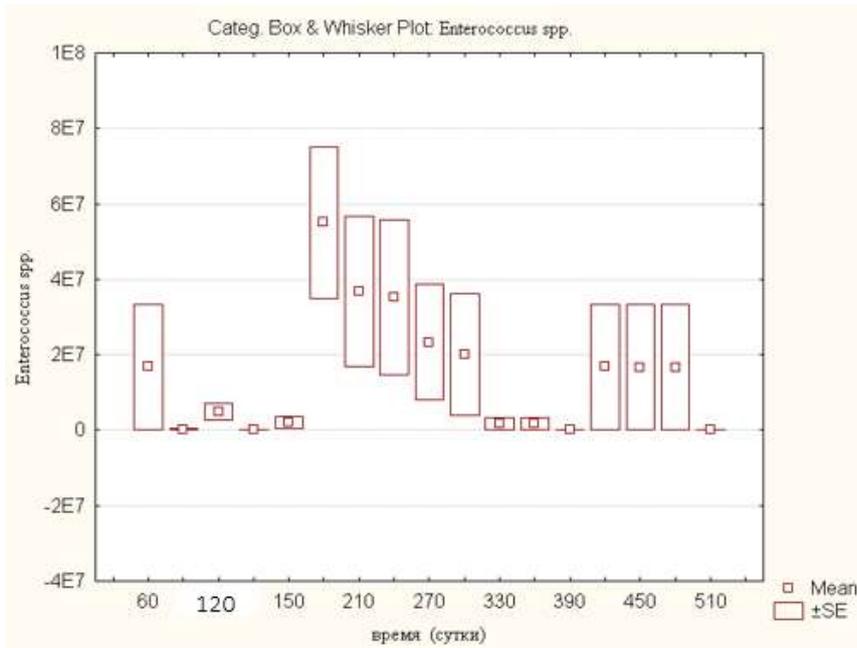


Рисунок 36. Динамика изменений на коже промежности *Enterococcus spp.* в эксперименте Марс-500

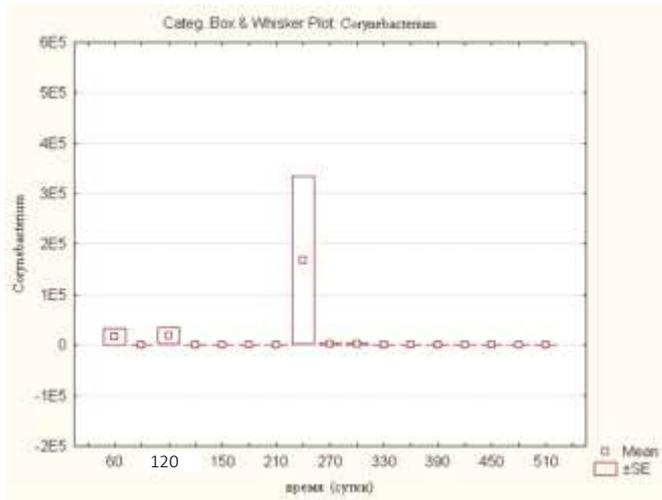


Рисунок 37. Динамика изменений *Corynebacterium* на коже промежности в эксперименте Марс-500

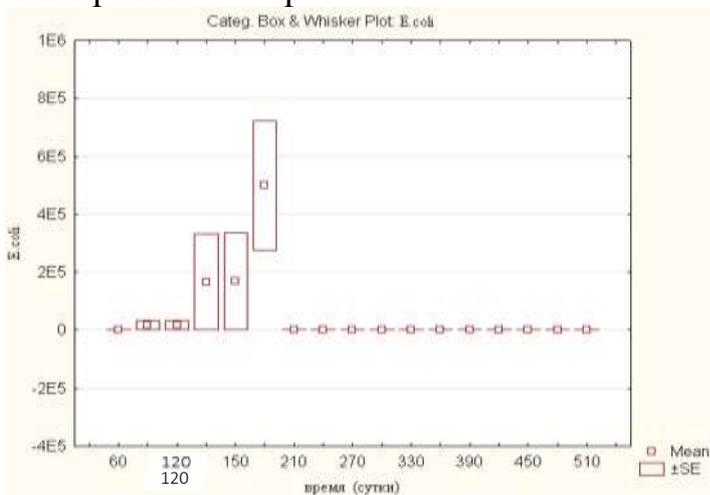


Рисунок 38. Динамика изменений *E. coli* на коже промежности в эксперименте Марс-500

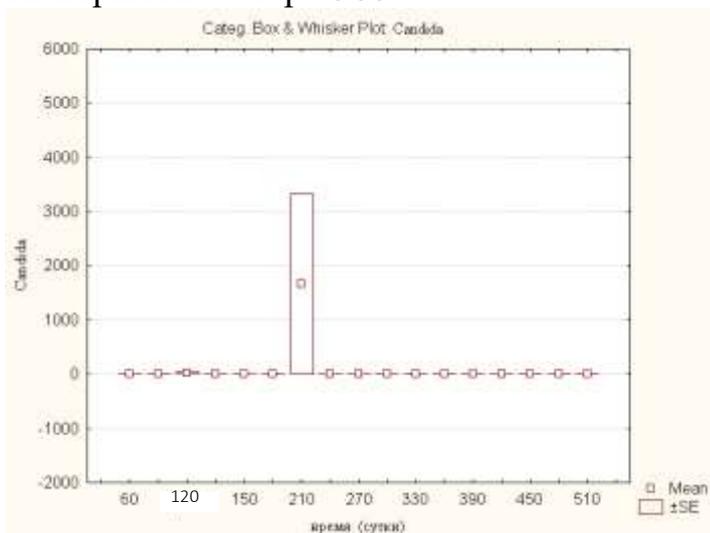


Рисунок 39. Динамика изменений *Candida* на коже промежности в эксперименте Марс-500

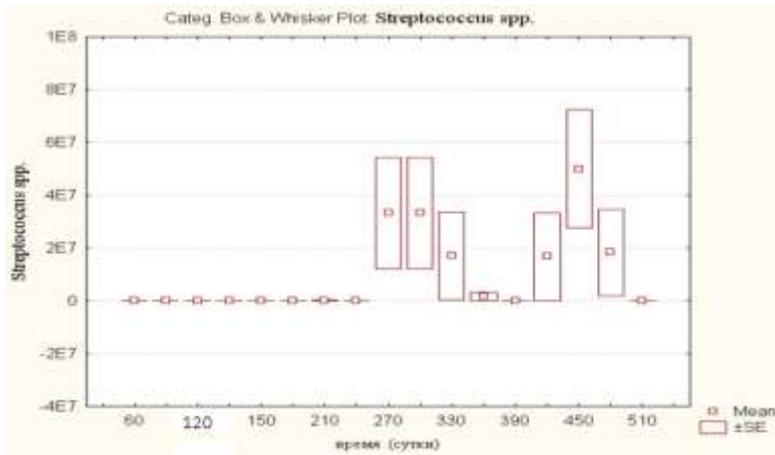


Рисунок 40. Динамика изменений *Streptococcus spp.* на коже промежности в эксперименте Марс-500

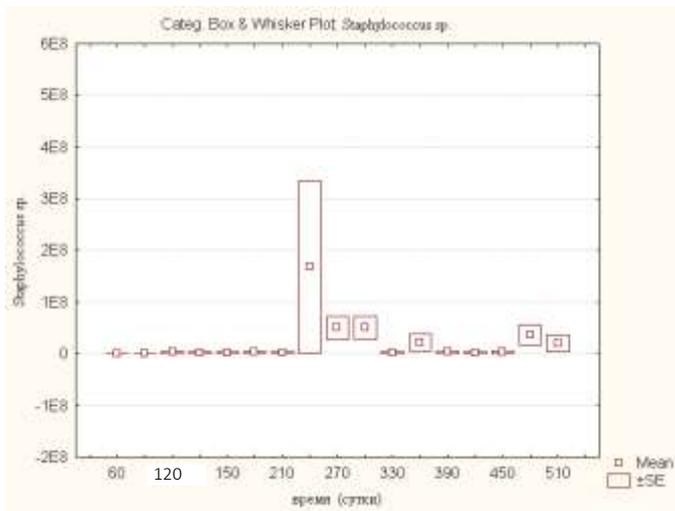


Рисунок 41. Динамика изменений *Staphylococcus sp.* в подмышечной впадине в эксперименте Марс-500

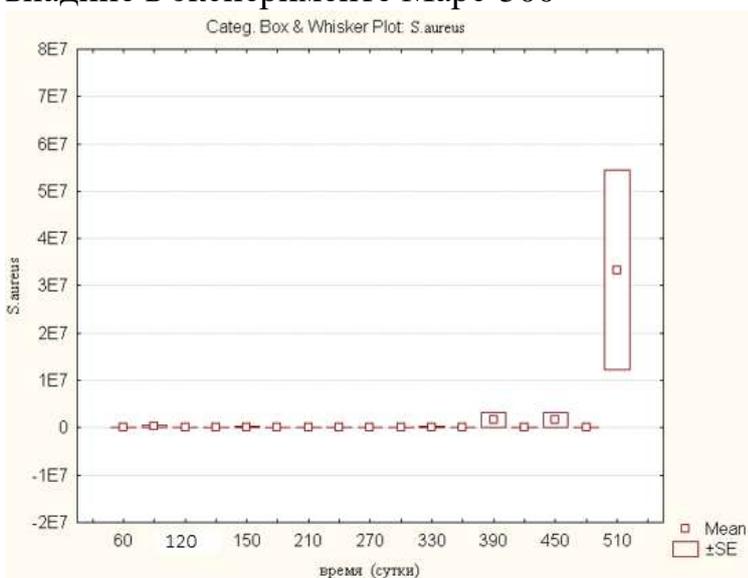


Рисунок 42. Динамика изменений *S. aureus* в подмышечной впадине в эксперименте Марс-500

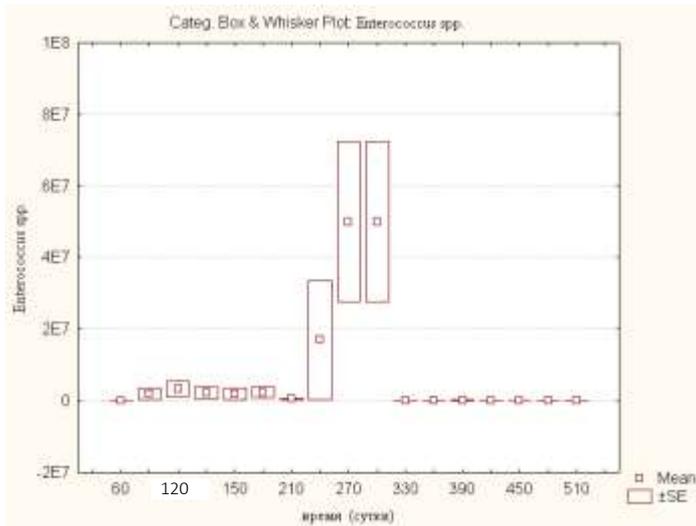


Рисунок 43. Динамика изменений *Enterococcus spp.* в подмышечной впадине в эксперименте Марс-500

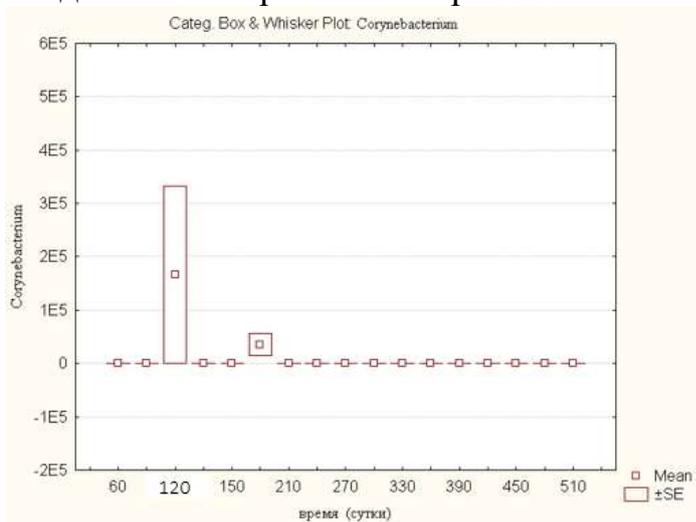


Рисунок 44. Динамика изменений *Corynebacterium* в подмышечной впадине в эксперименте Марс-500

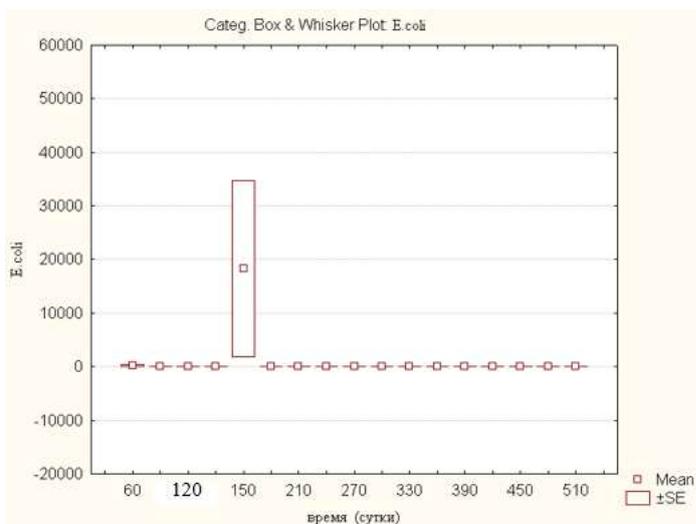


Рисунок 45. Динамика изменений *E. coli* в подмышечной впадине в эксперименте Марс-500

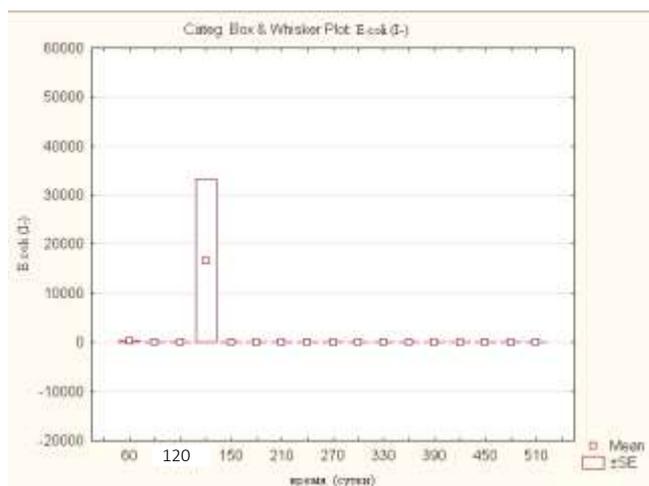


Рисунок 46. Динамика изменений лактозонегативных *E. coli* в подмышечной впадине в эксперименте Марс-500

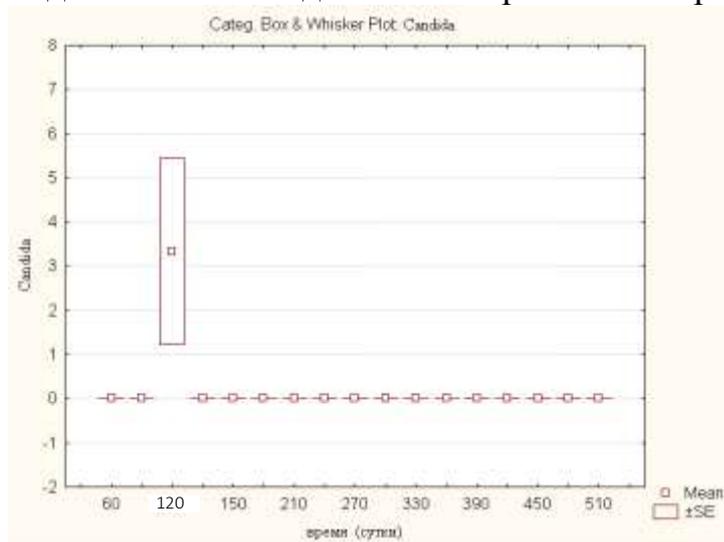


Рисунок 47. Динамика изменений дрожжеподобных грибов рода *Candida* в подмышечной впадине в эксперименте Марс-500

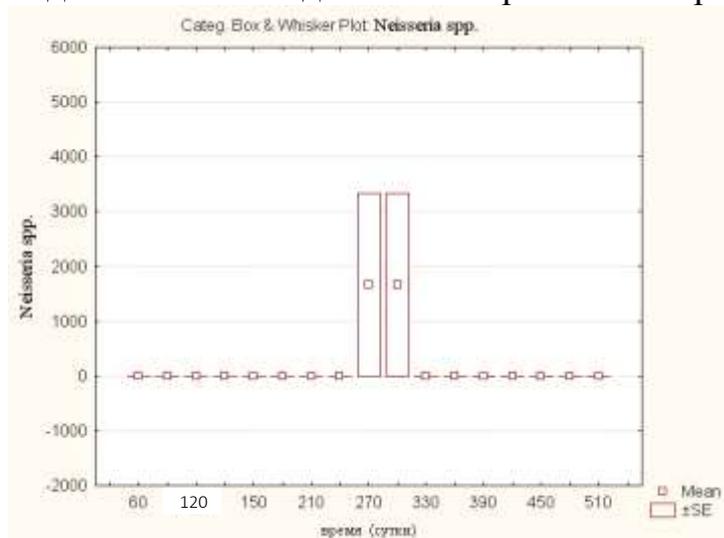


Рисунок 48. Динамика изменений *Neisseria spp.* в подмышечной впадине в эксперименте Марс-500

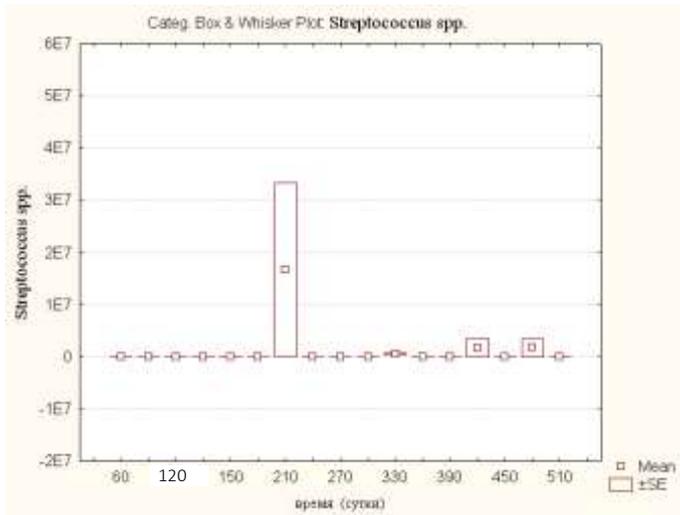


Рисунок 49. Динамика изменений *Streptococcus spp.* в подмышечной впадине в эксперименте Марс-500

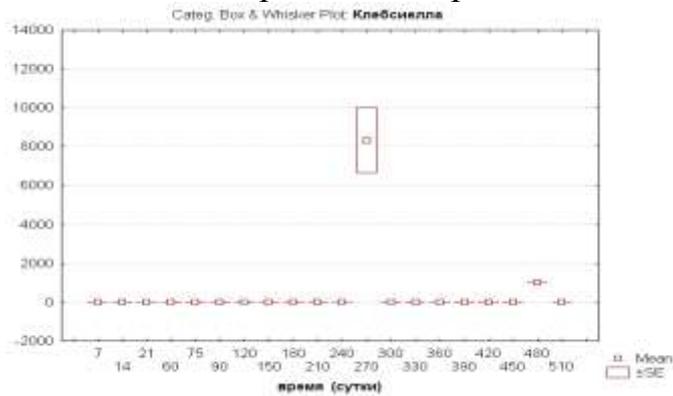


Рисунок 50. Динамика изменений *Klebsiella spp.* в кишечнике в эксперименте Марс-500

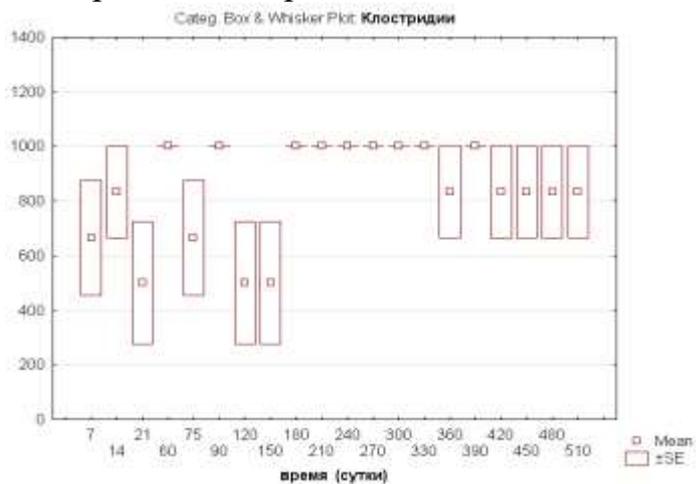


Рисунок 51. Динамика изменений *Clostridium spp.* в кишечнике в эксперименте Марс-500

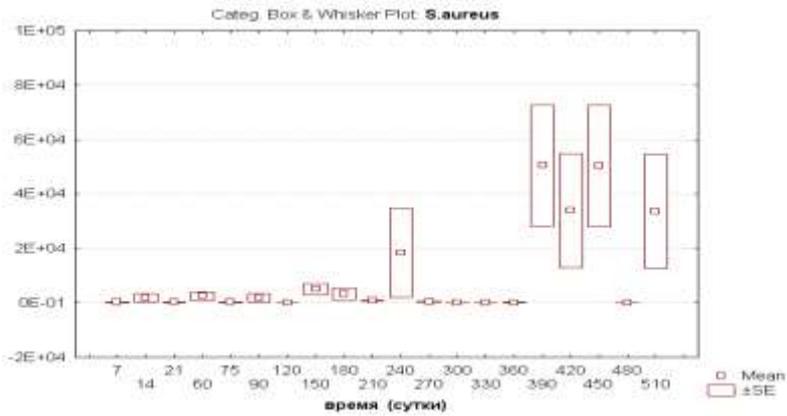


Рисунок 52. Динамика изменений *S.aureus* в кишечнике в эксперименте Марс-500

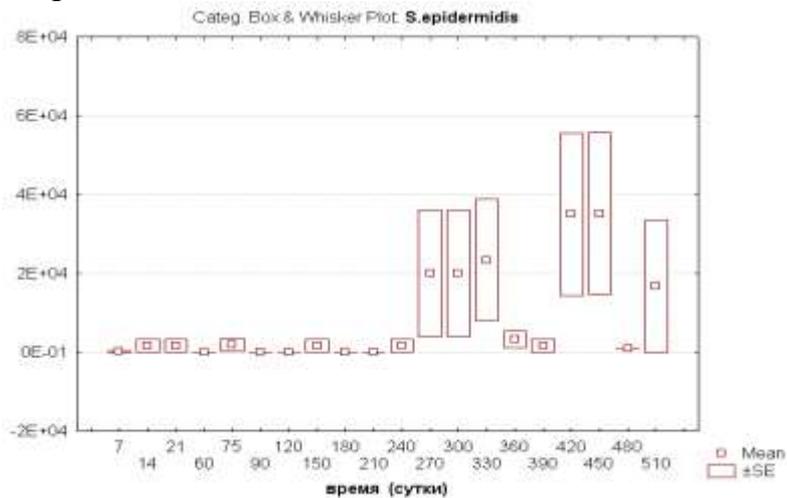


Рисунок 53. Динамика изменений *S.epidermidis* в кишечнике в эксперименте Марс-500

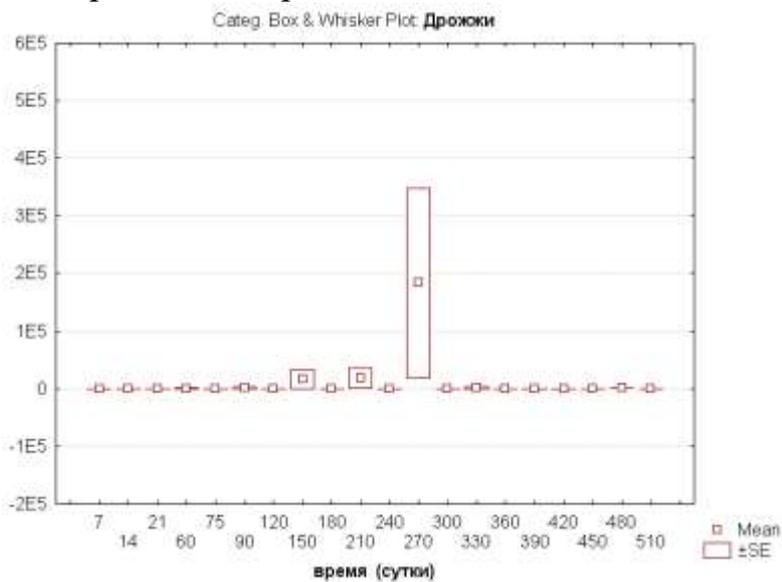


Рисунок 54. Динамика изменений патогенных *Candida* в кишечнике в эксперименте Марс-500

Из данных, приведенных в таблице 22-23, следует, что наивысших показателей эубиотический индекс для кишечной микрофлоры достигался лишь при приеме аутопробиотических препаратов (6,3) со значительным потенцированным эффектом. Значительно меньших характеристик (4,1) индекс достиг при приеме пробиотика на основе коллекционных штаммов энтерококка). Несколько большие величины (4,4) были достигнуты при использовании последнего препарата вместе с пребиотиком. Использование отечественных пребиотика и пробиотика, а также кваса на основе сахаромицет было охарактеризовано достаточно скромными позициями индекса (2,5 и 2,1 соответственно).

Таблица 22. Значения эубиотического индекса при приеме различных препаратов в эксперименте «Марс-500»

Сутки взятия проб	Эубиотический индекс		
	кишечник	Верхние дыхательные пути	Покровные ткани
14	5	1,5	1,7
21	5,2	1,5	Не определяли
60	4,9	0,7	
75	6,3	0,8	1,7
90	4	1,5	1,2
120	4,9	2,3	1,4
150	3,5	1,4	3,8
180	2,9	1,8	3,4
210	2,6	2,4	1,8
240	4,1	1,2	1,1
270	1,4	1,4	0,8
300	2,1	0,7	0,5
330	3,2	0,9	0,5
360	4,4	1,6	0,7
390	2,3	1,8	1,2
420	2,1	2,1	1,5
450	2,5	1,4	0,5
480	1,2	1,2	0,7

Таблица 23. Значение эубиотического индекса в экспериментах без использования пробиотических средств и в эксперименте «Марс-500»

Эксперименты в гермообъектах без профилактики	
Период	Эубиотический индекс
Фон – 14 сутки	1,1
14 – 30 сутки	0,9
Эксперименты с использованием аутопробиотика на основе <i>Enterococcus faecium</i>	
фон-14 сутки	5
14 сутки – 30 сутки	5,2

Был проведен анализ показателя "I(520)" в зависимости от показателя "Day (520)" представленный в таблице 24.

Таблица 24. Анализ показателя "I(520)" в зависимости от показателя "Day (520)"

Показатель	Категории	I(520)			p
		M ± SD	95% ДИ	n	
Day (520)	-14 DD	1,35 ± 0,71	0,61 – 2,09	6	< 0,001*
	7 DD	3,68 ± 3,08	0,45 – 6,92	6	
	14 DD	1,85 ± 1,44	0,34 – 3,36	6	
	21 DD	1,98 ± 1,21	0,72 – 3,25	6	
	60 DD	1,56 ± 0,60	0,93 – 2,18	6	
	75 DD	1,79 ± 0,77	0,98 – 2,60	6	
	90 DD	2,06 ± 1,55	0,42 – 3,69	6	
	120 DD	2,22 ± 1,82	0,31 – 4,14	6	
	150 DD	2,50 ± 2,06	0,34 – 4,66	6	
	180 DD	1,68 ± 0,70	0,94 – 2,41	6	
	210 DD	0,71 ± 0,27	0,43 – 1,00	6	
	300 DD	0,61 ± 0,17	0,43 – 0,78	6	
	390 DD	0,88 ± 0,20	0,67 – 1,09	6	
	420 DD	0,79 ± 0,26	0,52 – 1,07	6	
	450 DD	0,83 ± 0,23	0,59 – 1,06	6	
510 DD	1,00 ± 0,28	0,70 – 1,29	6		

Согласно полученным данным при анализе показателя "I(520)" в зависимости от показателя "Day (520)", нами были выявлены статистически значимые различия ($p < 0,001$) (используемый метод: *F*-критерий Уэлча) (рис 55). Согласно этим данным наилучшие показатели эубиотического индекса были в течение первой фазы эксперимента, т.е.

тогда, когда использовался аутопробиотический препарат. Впоследствии положительные значения индекса были связаны как с последствием аутопробиотика, так и с применением пребиотиков и аллогенных пробиотиков.

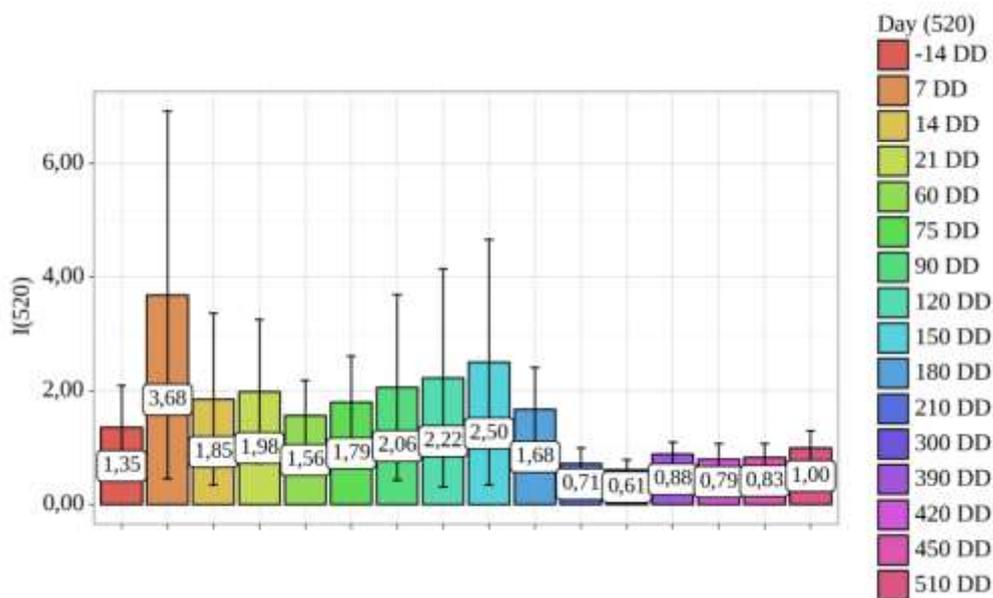


Рисунок 55. Анализ показателя "I(520)" в зависимости от показателя "Day (520)"

3.3.4 Исследование активности аутопробиотиков в эксперименте «Сухая иммерсия»

«Сухая иммерсия» - метод, разработанный в качестве наземного метода моделирования воздействий микрогравитации на организм.

Эксперимент проводился по принятой методике. Одновременно с лицами, принимавшими участие в эксперименте, проводились клинико-физиологические исследования, направленные на изучение биохимических и метаболических аспектов адаптации и изменений, происходящих в органах и системах организма. Длительность пребывания в иммерсионной ванне – от 3 до 7 суток.

Основные результаты влияния используемых препаратов на микробиоценоз кишечника были суммированы в таблицах 25-26.

Таблица 25. Результаты исследования микрофлоры кишечника испытуемых в эксперименте «Сухая иммерсия» (Lg КОЕ на г)
Экспериментальная группа

Испытатель 1			
Исследование	Норма	Фон	Выход
Бифидобактерии	9 - 10	1,00E+09	1,00E+08
Лактобактерии	7 - 8	1,00E+07	1,00E+08
Кишечная палочка типичные	7 - 8	1,00E+06	1,00E+06
E.coli (L-)	<4	1,00E+04	-
Энтеробактерии	<4	1,00E+04	1,00E+06
Золотистый стафилококк	<2	-	1,00E+05
Стафилококки	< или = 4	1,00E+03	-
Энтерококки	5 - 7	1,00E+06	1,00E+06
Испытатель 2			
Бифидобактерии	9 - 10	1,00E+09	1,00E+09
Лактобактерии	7 - 8	1,00E+06	1,00E+08
Кишечная палочка типичные	7 - 8	1,00E+06	1,00E+06
Энтеробактерии	<4	-	1,00E+08
Золотистый стафилококк	<2	-	1,00E+03
Стафилококки	< или = 4	1,00E+03	1,00E+05
Энтерококки	5 - 7	1,00E+06	1,00E+08
Грибы рода Candida	< или = 4	1,00E+03	-
Испытатель 3			
Бифидобактерии	9 - 10	1,00E+06	1,00E+08
Лактобактерии	7 - 8	1,00E+07	1,00E+08
Кишечная палочка типичные	7 - 8	1,00E+06	1,00E+08
Золотистый стафилококк	<2	1,00E+05	1,00E+03
Энтерококки	5 - 7	1,00E+06	1,00E+06
Испытатель 4			
Бифидобактерии	9 - 10	1,00E+08	1,00E+08
Лактобактерии	7 - 8	1,00E+07	1,00E+07
Кишечная палочка типичные	7 - 8	1,00E+08	1,00E+08
Энтеробактерии	<4	-	1,00E+06
Золотистый стафилококк	<2	1,00E+03	1,00E+05
Энтерококки	5 - 7	1,00E+06	1,00E+06
Испытатель 5			
Бифидобактерии	9 - 10	1,00E+06	1,00E+08
Лактобактерии	7 - 8	1,00E+04	1,00E+06
Кишечная палочка типичные	7 - 8	1,00E+06	1,00E+08
Энтеробактерии	<4	1,00E+04	1,00E+06
Золотистый стафилококк	<2	1,00E+05	1,00E+05
Стафилококки	< или = 4	1,00E+03	-
Энтерококки	5 - 7	1,00E+06	1,00E+06

Таблица 26. Результаты исследования микрофлоры кишечника испытуемых в эксперименте «Сухая иммерсия» (Lg КОЕ на г)
Контрольная группа

Испытатель 1			
Исследование	Норма	Фон	Выход
Бифидобактерии	9 - 10	1,00E+08	1,00E+08
Лактобактерии	7 - 8	1,00E+04	1,00E+04
Кишечная палочка типичные	7 - 8	1,00E+06	1,00E+06
Энтеробактерии	<4	-	1,00E+06
Золотистый стафилококк	<2	-	1,00E+03
Стафилококки	< или = 4	-	1,00E+03
Энтерококки	5 - 7	1,00E+06	1,00E+08
Испытатель 2			
Бифидобактерии	9 - 10	1,00E+07	1,00E+08
Лактобактерии	7 - 8	1,00E+03	1,00E+04
Кишечная палочка типичные	7 - 8	1,00E+04	1,00E+06
Кишечная палочка лактозонегативная	<4	1,00E+06	-
Энтеробактерии	<4	1,00E+06	1,00E+06
Стафилококки	< или = 4	1,00E+03	-
Испытатель 3			
Бифидобактерии	9 - 10	1,00E+08	1,00E+07
Лактобактерии	7 - 8	1,00E+04	1,00E+07
Кишечная палочка типичные	7 - 8	1,00E+06	1,00E+06
Золотистый стафилококк	<2	1,00E+05	-
Стафилококки	< или = 4	-	1,00E+03
Энтерококки	5 - 7	1,00E+06	1,00E+06
Грибы рода Candida	< или = 4	1,00E+05	-
Испытатель 4			
Бифидобактерии	9 - 10	1,00E+09	1,00E+08
Лактобактерии	7 - 8	1,00E+07	1,00E+08
Кишечная палочка типичные	7 - 8	1,00E+06	1,00E+06
Энтеробактерии	<4	1,00E+06	1,00E+04
Золотистый стафилококк	<2	-	1,00E+03
Стафилококки	< или = 4	1,00E+03	1,00E+03
Энтерококки	5 - 7	1,00E+06	1,00E+06
Грибы рода Candida	< или = 4	1,00E+03	1,00E+03
Испытатель 5			
Бифидобактерии	9 - 10	1,00E+06	1,00E+08
Лактобактерии	7 - 8	1,00E+07	1,00E+04
Кишечная палочка типичные	7 - 8	1,00E+06	1,00E+08
Энтеробактерии	<4	1,00E+04	-
Золотистый стафилококк	<2	1,00E+05	1,00E+03
Стафилококки	< или = 4	-	1,00E+05
Энтерококки	5 - 7	1,00E+06	1,00E+06
Грибы рода Candida	< или = 4	1,00E+05	-
Испытатель 6			
Бифидобактерии	9 - 10	1,00E+09	1,00E+09
Лактобактерии	7 - 8	1,00E+07	1,00E+07
Кишечная палочка типичные	7 - 8	1,00E+06	1,00E+06
Золотистый стафилококк	<2	1,00E+05	1,00E+03

Стафилококки	< или = 4	-	1,00E+05
Энтерококки	5 - 7	1,00E+08	1,00E+06

Из данных, представленных в таблицах 25-26, следует, что при приёме аутопробиотиков происходила оптимизация количественного и видового состава кишечной микрофлоры, что нашло своё отражение в значениях эубиотического индекса (табл. 27).

Таблица 27. Показатели эубиотического индекса кишечной микрофлоры в эксперименте «Сухая иммерсия»

Экспериментальная группа	Контрольная группа
4,55	1,54

Показатели эубиотического индекса свидетельствуют об активности аутопробиотиков в составе кисломолочного продукта. Невыраженные положительные значения эубиотического индекса у контрольной группы можно объяснить воздействием пробиотического препарата, содержащего саливарный стрептококк.

В данном исследовании обращает на себя внимание рост молочнокислых бактерий групп лактобацилл и бифидобактерий, которые существенно выросли количественно в опытной группе (рис. 56). Из данных, представленных на рисунках 57, 58 следует, что при использовании кисломолочного продукта с суспендированной культурой лактобацилл происходит интенсивное восстановление лактобацилл и в меньшей степени бифидобактерий. В контрольной группе эти показатели были без изменений.

**Количественный состав представителей протективной микрофлоры
кишечника в эксперименте «Сухая иммерсия»**

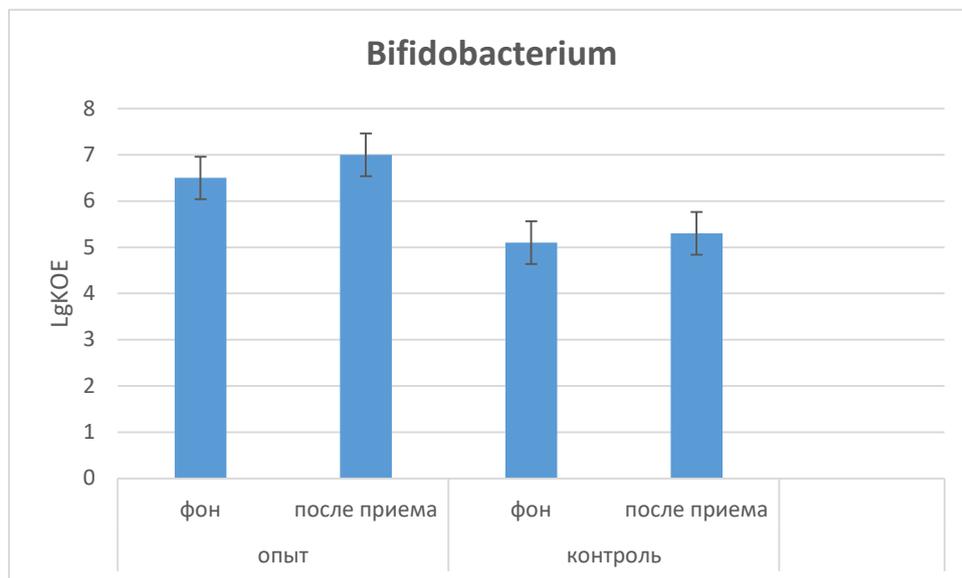


Рисунок 56. Динамика изменения уровня бифидобактерий в кишечнике у опытной и контрольной групп в эксперименте «Сухая иммерсия».

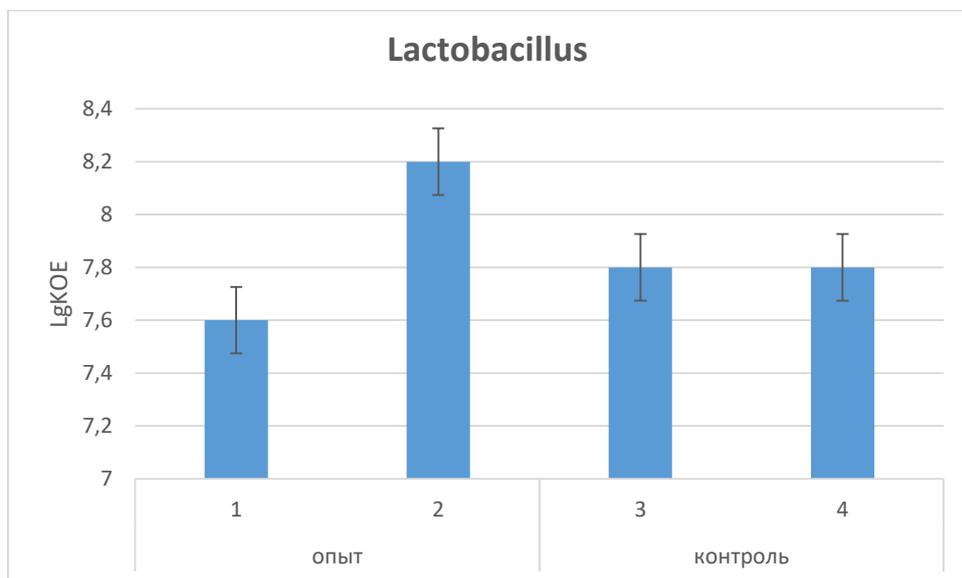


Рисунок 57. Динамика изменения уровня лактобацилл в кишечнике у опытной и контрольной групп в эксперименте «Сухая иммерсия».

ОБСУЖДЕНИЕ

Основные изменения микрофлоры кишечника космонавтов являются следующими: изменение микрофлоры кишечника происходит таким образом, что в предполетный период больше не встречается нормобиоз, превалирует дисбактериоз второй (рост условно-патогенной микрофлоры) и третьей (рост условно-патогенной микрофлоры, декомпенсированной за счет снижения количества протективной микрофлоры) степеней.

Эти предполетные изменения продиктованы следующими обстоятельствами:

- «стресс ожидания» перед полетом;
- результат транслокации членов экипажей в другие географические регионы, где находятся космодромы.

Между тем, результаты экспериментов с участием человека в условиях изоляции свидетельствуют о том, что в течение первых 7-12 дней изоляции происходит интенсивный микробный обмен между членами экипажа. В этот период велик, как никогда, риск аутоинфекций и перекрестных инфекций у членов экипажа. В это период происходит распространение условно-патогенных микроорганизмов в несвойственные им биотопы, увеличение массивности микробных очагов, сформированных в традиционных нишах обитания, количественная редукция микроорганизмов протективных видов, замена более вирулентными штаммами менее вирулентных в пределах одного вида (на примере клостридий) /Борисова, 1976/ (табл. 28).

Таблица 28. Усиление токсигенных и патогенных свойств клостридий в экспериментах с изоляцией длительностью не более 30 суток.

Позиции	Всего выделено штаммов	Активность токсина (DLM/ml)			
		Менее 2	2-4	10	20
До эксперимента	150	5	103	42	0
После эксперимента	150	3	57	78	12
Позиции	Гемолитическая активность	Протеолитическая активность			
До эксперимента	1,91±0,35	0,95±0,51			
После эксперимента	2,8±0,18	1,66±0,47			

Итак, позволительно предположить три фактора, определяющих успех или неуспех долговременной изоляции с позиций микробиологической безопасности человека:

- преодоление самого неблагоприятного рубежа – первых 7-15 суток изоляции,
- состав микробиоты, вносимой группами посещения или в составе грузопотока,
- наличие условий для формирования «госпитальных штаммов» в условиях изоляции.

В длительных космических полетах, не сопровождающихся посещениями экипажей и их сменами, например, полетах на орбитальных станциях типа «Салют», и таких, какие предполагаются для реализации марсианской и лунной программ после периода острой адаптации в составе микрофлоры членов экипажа происходит снижение количества условно-патогенных видов, а в их популяции снижается доля, сформированная их представителями, обладающими выраженной способностью продуцировать ферменты агрессии и защиты /Викторов 1986, Лизько 1987, Поликарпов, 1982/.

На станциях МКС и «Мир» этот процесс занимает, по сути дела, весь период времени до возвращения экипажа, либо до очередной микробиологической пертурбации, вызванной появлением нового микробного консорциума в составе микрофлоры новоприбывших членов экипажа, либо в составе грузопотока. Между новоприбывшими и основными членами экипажей происходит активное и быстрое распространение не только штаммов условно-патогенных микроорганизмов, персистирующих в верхних дыхательных путях, но и представителей кишечной микрофлоры. Они очень легко передаются от участников группы посещения к членам основной группы и часть из них способна персистировать там вплоть до окончания полёта. В этот процесс вовлекаются и последующие члены групп посещения, и полезный груз,

привносящие новые и новые микробные консорциумы в ПКК /Ильин, 2005/.

Поэтому, учитывая весьма высокую реципиентную способность экипажей, можно предположить достаточно пагубный сценарий для марсианских и лунных экспедиций при высадке на планеты, в которых присутствует микробный консорциум, способный интегрироваться в микробиоценоз членов экипажа, либо при возвращении на Землю /Ильин, 2014/.

В условиях межпланетного полета проблема привнесения в ПКК новых микробных консорциумов в составе групп посещения и полезного груза не стоит. Зато очень актуальна проблема привнесения в среду обитания ПКК микроорганизмов в процессе контаминации скафандров в процессе ВКД. Уже на этапе орбитальных полетов исследователи подтвердили наличие спорообразующих микроорганизмов земного происхождения на внешней поверхности МКС /Дешева, 2024/. Эти микроорганизмы впоследствии использовались для исследований выживаемости на внешней стороне космического корабля «Фотон-М № 4» при прохождении плотных слоёв атмосферы в составе имитатора метеорита. /Slobodkin, 2015/. Исследования показали высокую выживаемость в таких экстремальных условиях при разогреве материала до 600-1000°C. Эти микроорганизмы могут быть объектами эпидемиологической настороженности. Разумеется, условия их существования в условиях скудной среды и в условиях инкапсуляции не ставят эти микроорганизмы в ряд особо опасных для человека, однако классические примеры развития инфекций по спорозному типу не исключают такого развития событий при межпланетном полете, когда микроорганизмы существуют в двух фазах – «дремлющей», сапрофитической, и «агрессивной», патогенной. В этом случае микроорганизмы «атакуют» непосредственно из ниш обитания, минуя традиционную «триаду Громашевского» - источник инфекции, пути

передачи и восприимчивый организм. /Ильин В.К., дис., 1989/. Таким образом, возникает синегнойная инфекция у водолазов-глубоководников. Таким является риск развития инфекций микроорганизмами-технофилами в длительном космическом полете и критическими микроорганизмами из состава микробиоценозов внешней оболочки станции /Pyin et al., 1998/.

Известны, кроме этого, исследования С.Wickremasinghe (2009) с коллегами из Индийского космического агентства, изучавшего состав микрофлоры пылевых частиц, образованных в стратосфере, которые свидетельствуют о том, что примерно десятая часть изолятов не типировалась существующей на Земле библиотекой генов. Это может предположить не только «восходящий», но и «нисходящий» путь транслокации микроорганизмов в составе пылевых частиц в Земной атмосфере. И чем выше траектория полёта, тем выше вероятность вовлечения таких микроорганизмов в среду обитания пилотируемого космического комплекса (ПКК), что делает прогноз микробиологической безопасности экипажа малопредсказуемым /P.DeVoever, Pyin, 2007/.

Классическим примером того, как быстро штаммы сапрофитических микроорганизмов, случайно занесённых в среду обитания ПКК, меняют свои трофологические предпочтения служит «хрестоматийная» ситуация с освоением в качестве источников питания неметаллических поверхностей, бортовой кабельной сети и других объектов инфраструктуры ПКК рядом почвенных сапрофитов, силою случайных обстоятельств, занесённых в среду обитания ПКК. Для этого было достаточно гораздо менее десятилетия. Позволительно предположить аналогичное развитие ситуации применительно к экстратеррестриальным микроорганизмам, попавшим в среду ПКК и лунных баз. При этом в качестве «жертв» следует рассматривать одновременно человека и объекты среды обитания. Ещё одним микробиологическим риском межпланетных полётов и лунных баз является влияние факторов комплексного воздействия среды лунного грунта на микробиоту человека. Эксплуатация лунных баз предусматривает

как минимум несколько сменяемых экипажей, и, как следствие, возможен временной перерыв между экспедициями. При возможности контаминации лунного грунта террестриальной микрофлорой, возможна ее трансформация под действием ионизирующей и неионизирующей радиацией, и, возможно, иными мутагенными факторами. В результате этого микрофлора, филогенетически оставаясь тропной человеческому организму, может приобрести мало прогнозируемые свойства. /Ильин В.К., 2014/.

Чувствительность к антибиотикам в условиях космического полета изменяется. Многочисленные исследования, проведенные *in vitro* в результате экспозиции культур микроорганизмов (золотистого стафилококка и кишечной палочки) в условиях космического полета биоспутников серии «Бион», свидетельствуют о незначительном увеличении чувствительности к бета-лактамам и аминогликозидам /ЦИТОС-2 Tixador R., 1982/. Однако, это незначительное изменение было вполне достаточно для того, чтобы перевести исследуемые культуры из разряда чувствительных в разряд умеренно чувствительных, а умеренно чувствительные в разряд устойчивых, что очень важно для прогнозирования успешности антибиотикотерапии в случае ее показания. Что касается частоты распространения генетических факторов, определяющих устойчивость к антибиотикам, изменения частоты переноса в сторону увеличения (в 10 раз) касалось грамположительных палочек. Эти особенности не затрагивали грамотрицательную флору. Вместе с тем, сегрегационная стабильность плазмидных коинтегратов, сформированных в результате исследований *in vitro* в космическом полете, гораздо выше в условиях космического полета. То есть генные коинтеграты, детерминирующие множественную лекарственную устойчивость, сформировавшиеся в условиях космического эксперимента на МКС, очень прочны и не «разваливаются» с течением времени. Это обстоятельство также

является фактором риска, поскольку есть основания предполагать достаточно интенсивное формирование штаммов с признаками госпитализма в условиях длительного космического полёта. Поэтому необходимо проводить углублённые исследования чувствительности к антибиотикам и обмена генами лекарственной устойчивости у микроорганизмов, подверженных воздействиям факторов межпланетного полёта и лунного грунта (табл. 29). На основании полученных результатов можно рассчитать риск формирования штаммов с признаками госпитализма в условиях межпланетных полётов и на лунных базах.

Таблица 29. Изменение множественной лекарственной устойчивости в процессе изоляции групп из 4 человек в гермообъекте в течении 30 суток (% от общего количества изолированных культур) /Ильин, 1989/

Число детерминант резистентности	Сутки эксперимента			
	0	7-10	20-22	30-32
0	40,5	52,0	24,3	43,7
1	20,0	18,7	40,1	14,2
2	18,7	19,4	17,0	19,7
3	6,8	14,0	12,2	19,7
4	4,3	7,0	3,2	5,7
5	1,7	3,0	2,1	2,3
6	2,4	1,4	0,5	0,5
7 и более	0,4	3,0	0,3	5,4

Мы перечислили основные микробные риски, существующие в текущей практике пилотируемой космонавтики для экипажей и прогнозируемые для космических межпланетных полетов и лунных баз. Представленные сведения определяют необходимость выработки эффективных профилактических мер, способных укрепить колонизационную резистентность членов экипажа навстречу этим прогнозируемым вызовам.

Сегодня существует арсенал пробиотических средств, способных укрепить колонизационную резистентность, в том числе пробиотиков,

основанных на штаммах лактобацилл, изолированных от самих космонавтов.

Представленные в работе результаты совершенно очевидно свидетельствуют о возможности использовать, штаммы лактобацилл, изолированных от космонавтов для создания пробиотических, в том числе, аутопробиотических средств.

Для оптимизации микрофлоры кишечника рекомендуется использовать аутопробиотики, основанные на аутологичных штаммах бифидобактерий, лактобацилл и энтерококков. При этом приём пробиотиков,, основанных на коллекционных штаммах, нельзя игнорировать. Наши результаты свидетельствуют, что аутопробиотики следует принимать, преследуя цель добиться эрадикации нежелательной бактериальной группы, в то время как используя коммерческие препараты можно лишь стабилизировать микрофлору на каком-либо приемлемом уровне. Для сценариев межпланетных полётов и лунных баз приемлемыми представляется оба варианта.

Таким образом, существует большой положительный опыт использования аутопробиотиков на основе бифидобактерий и лактобацилл для оптимизации микрофлоры кишечника человека в различных экспериментах – нормобарическая изоляция, сухая иммерсия, и др. в различных формах выпуска – таблетки, лиофилизаты, обогащенные кисломолочные продукты и др.

Большую и перспективную группу составили исследования новых эффективных коллекционных пробиотических штаммов микроорганизмов – представителей видов, не относящихся к традиционно отбираемых для пробиотиков. Так, имеются положительные результаты использования для санации верхних дыхательных путей коринебактерий а для санации пародонта – саливарный стрептококк /Кирюхина, 2009/.

Предварительные результаты применения аутопробиотиков и новых пробиотических культур в экспериментах, имитирующих изменённые

условия обитания, а также в клинических исследованиях говорят об их несомненной эффективности /Боровкова, 2021/. Отсутствие проблем развития инфекционных осложнений, биологической несовместимости и приживляемости позволяет предположить эффективность применения аутопробиотиков при реализации лунной программы. Применение индивидуализированного подхода в выборе препаратов позволит повысить эффективность профилактики и лечения, а также понизить риск развития неблагоприятных эффектов у каждого отдельного человека.

В настоящее время концепция создания криобанков микробиоценозов человека и аутопробиотиков может рассматриваться как отдельная часть опережающих исследований в реализации лунной программы и других долгосрочных полетов. Поэтому перспективными исследованиями в направлении разработки средств профилактики инфекций для успешной реализации лунной программы являются следующие:

1. Исследования сроков хранения аутопробиотических препаратов в лиофилизированном виде и в условиях криохранилищ.
2. Исследование стабильности препаратов в условиях воздействия радиации в параметрах, характерных для лунного грунта
3. Исследование эффективности новых аутопробиотиков и новых форм их выпуска в экспериментах, имитирующих факторы космического полета (гипокинезия, сухая иммерсия, длительная изоляция)
4. Исследования с использованием искусственной петли кишечника возможности включения аллогенных хемолитотрофов в микробное сообщество толстого кишечника

ВЫВОДЫ:

1. Анализ архивных данных экспериментов с участием человека свидетельствует, что в период гермоизоляции состояние микрофлоры верхних дыхательных путей и кишечника претерпевают неблагоприятные изменения, заключающиеся в количественном снижении протективных групп микроорганизмов и количественное увеличение представителей условно-патогенной микрофлоры. Эти изменения наиболее выражены в период острой адаптации.

2. Разработан эубиотический индекс в качестве информативного критерия оценки динамики изменений количественного и видового состава микрофлоры организма под влиянием факторов измененной среды обитания, и использования препаратов, в т.ч. аутопробиотиков.

3. Применение аутопробиотических препаратов в экспериментах, имитирующих воздействие факторов космического полёта на организм человека (изоляция, сухая иммерсия) и животных (облучение) позволяет оптимизировать количественный и видовой состав микрофлоры, таким образом, препятствуя риску формирования ауто - и перекрёстных инфекций в период острой адаптации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеева О.Г. Состояние некоторых факторов естественного иммунитета аутофлоры космонавтов в период подготовки к после полёта на космических кораблях. «Восток -1», «Восток -2», «Восток -3», «Восток – 4», в книге: Проблемы космической биологии М.: Наука, 1965, т. 4, с. 230-303.

2. Алферова Л.С., Ермоленко Е.И., Черникова А.Т., Новикова Н.С., Анопова А.Д., Васюкова Е.А., Цапиева А.Н., Демченко Е.А., Гладышев Н.С., Гладышева Н.П., Симаненкова А.В., Попова П.В., Дмитриев А.В., Каронова Т.Л., Суворов А.Н. Аутопробиотические энтерококки как компонент комплексной терапии метаболического синдрома // Журнал Российский журнал персонализированной медицины. 2022. Том 2 №6 С. 100-101.

3. Амерханова А.М. Научно-производственная разработка новых препаратов-синбиотиков и клиничко-лабораторная оценка их эффективности: Диссертация доктора биологических наук М., 2009. 54 с.

4. Бевз Н.И. и др. Микрофлора кишечника у больных воспалительными заболеваниями челюстно-лицевой области // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 1994. № 4. С. 22-24.

5. Бернхардт Х., Кноке М. Влияние стресса на гастроинтестинальную микрофлору // Космическая биология и авиакосмическая медицина 1988. Т. 22. №3 С. 94-95.

6. Бойцов А.Г., Рищук С.В., Ильясов Ю.Ю. и др. Адгезия лактобактерий к клеткам вагинального и буккального эпителия // Вестник Санкт-Петербургской Медицинской академии им. И.И. Мечникова. 2004. №4 (5) С.191-193.

7. Бондаренко В.М., Жалко-Титаренко В.П. Динамика образования инфекционного очага в кишечнике // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 1991. №8. С. 23-27.

8. Бондаренко В.М., Суворов А.Н. Симбиотические энтерококки и проблемы энтерококковой оппортунистической инфекции. Издательстве «Медицина» Москва, 2007. 230 с.

9. Бондаренко, В.М., Мацулевич Т.В. Дисбактериоз кишечника как клиничко- лабораторный синдром: современное состояние проблемы / М.: Москва : Издательская группа "ГЭОТАР-Медиа", 2007. 304, 389 с.

10. Борисов Л.Б. Медицинская микробиология, вирусология, иммунология учеб. пособие. М.: МИА, 2002. 300 с.

11. Борисова О.К. Исследование биологических свойств у людей в условиях имитации космических полетов и в космических полетах. Автореферат Диссертации кандидата биологических наук. М., ИМБП МЗ СССР, 1976. 18 с.

12. Боровкова Е.А. Использование аутопробиотикотерапии для коррекции микрoэкологических нарушений человека. Диссертация кандидата биологических наук. Ставрополь, 2021. 25 с.

13. Ван Ликуй Использование пробиотиков и аутоштаммов лактобактерий в комплексном лечении бактериального вагиноза: Диссертация кандидата медицинских наук. Москва, 2006. 50 с.

14. Викторов А.Н. Медицинское значение особенностей формирования экологической системы «человек – микроорганизм» в обитаемых герметизированных объектах // Тезисы докладов VIII Всесоюзной конференции по проблемам космической биологии и авиакосмической медицины. - М.: Наука, 1986. 221-222 с.

15. Викторов А.Н., Ильин В.К., Поликарпов Н.А. и др. Микробиологические аспекты обитаемости глубоководных барокомплексов. // Косм, биология и авиакосмическая медицина», 1991, 6 с.

16. Воложин А.И., Ильин В.К., Максимовский Ю. М. и др. Разработка и применение пародонтальной повязки из коллагена и суспензии клеток *Lactobacillus casei* 37 в комплексном лечении

воспалительных заболеваний пародонта (результаты микробиологических исследований) // Стоматология: Двумесичный научно-практический журнал. 2004. Т. 83. № 6. - С. 6-8.

17. Воробьев А.А., Бондаренко В.М., Лыкова Е.А. и др. Микрoэкологические нарушения при клинической патологии и их коррекция бифидосодержащими пробиотиками // Вестн. РАМН, 2004. №2 С.13-17.

18. Воронина О.Л., Кунда М.С., Субботина М.Е. и др. Анализ видового разнообразия бифидофлоры и влияние симбиотика «Бифидум-Мульти-1» на становление и развитие бифидобактерий у детей // Вопр. дет. диетологии, 2008. Т.6. №5 С. 59-64.

19. Воропаева, Е.А. Роль микробиоценозов открытых полостей в формировании реактивности организма; диагностические критерии дисбиозов для оценки состояния здоровья человека. Автореферат Диссертация доктора биологических наук: М., 2013. 38 с.

20. Высоцких Т.С., Беккиева М.Х., Тикина А.П. Применение культуры собственных лактобацилл после антибиотикотерапии гестационного пиелонефрита // Материалы IX всероссийского научного форума «Мать и дитя». - 2007.43 с.

21. Глушанова Н.А., Шендеров Б.А. Взаимоотношения пробиотических и индигенных лактобацилл хозяина в условиях совместного культивирования *in vitro* // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2005. № 2. С. 56-61.

22. Гончарова Г.И. Изучение бифидобактерий, разработка препарата «сухой бифидумбактерин» и его эффективность при кишечных заболеваниях детей первого года жизни: Автореферат Диссертации кандидата биологических наук. Москва, 1970. 15 с.

23. Дешевая Е.А., Фиалкина С.В., Шубралов Е.В., Смирнов Ю.И. Исследования микрофлоры в зоне модуля МИМ2 Международной

космической станции до и после внекорабельной деятельности. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2024. № 3. С. 35

24. ГОСТ 31454-2012 Кефир. Технические условия.

25. Дехтяренко, Н.В., Шикаренко Л.Н., Дуган А.М. Закономерности проявления биологических свойств новых штаммов *Lactobacillus*, перспективных для создания препаратов и продуктов с пробиотической активностью //Журнал Клиническое питание. 2007. №12. С.37.

26. Димова, М.И., Коваченко Н.К. Бактериоциогенные и пробиотические свойства штамма *Lactobacillus plantarum* УКМ В – 2705 // Журнал Клиническое питание. 2007. №12 С. 38.

27. Донец, В.Н. Возможности пробиотической терапии внебольничных пневмоний (клинико-экспериментальное исследование): Автореферат Диссертации кандидата медицинских наук. СПб., 2015. 26 с.

28. Ермоленко Е.И., Котылева М.П., Лавренова Н.С., Карасева А.Б., Цапиева А.Н., Алехина Г.Г., Никитенко Н.А., Соловьева О.И., Милюхина И.В., Лapidус А.Л., Суворов А.Н. Новая стратегия выбора аутопробиотиков // Материалы 2-ой научной конференции с международным участием «Микробиота человека и животных», Санкт-Петербург, 18-19 сентября 2020 г. – Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. 2020. № 1-2. 81-82 с.

29. Ермоленко Е.И., Лapidус А.Л., Суворов А.Н. Оптимизация микробной терапии дисбиотических состояний посредством аутопробиотиков // Санитарная и клиническая микробиология. Материалы XI съезда ВНПОЭМП, Москва, 16–17 ноября 2017 года. 2017. 925 с.

30. Ефимов Б.А., Кафарская Л.И., Тарабрина Н.П. Микрофлора у населения различных стран // Дисбактериозы и эубиотики: Тез. докл. конф. М.,1996. 12-14.

31. Ильин В.К. Обоснование способов и средств коррекции микробиологического статуса и профилактики инфекционных

заболеваний у водолазов-глубоководников. Диссертация на соискание учёной степени доктора медицинских наук. Москва 1997. 225 с.

32. Ильин В.К., Суворов А.Н., Кирюхина Н.В., Усанова Н.А., Старкова Л.В., Бояринцев В.В., Карасева А.Б. Аутопробиотики как средство профилактики инфекционно-воспалительных заболеваний у человека в искусственной среде обитания // Журнал Вестник РАМН. 2013. № 2. С. 56–62.

33. Ильин В.К. Роль R-плазмид в изменении лекарственной чувствительности *Escherichia coli* у космонавтов. Диссертация кандидата медицинских наук. Москва, 1989. 160 с.

34. Ильин В.К., Воложин А.И., Виха Г.В. Колонизационная резистентность организма в измененных условиях обитания. Монография. Москва, Наука, 2005. 250 с.

35. Ильин В.К., Кирюхина Н.В. Синдром нарушения колонизационной резистентности у человека в искусственной среде обитания и его профилактик // «Acta Naturae», 2014, № 2(21), С.11-20.

36. Карпушина С.Г., Тюрина М.В., Иванов А.А. и др. Выделение, идентификация и некоторые биологические свойства бифидобактерий из кишечника человека // Биотехнология, 1998. № 2. С. 28-36

37. Кириленко М.А., Кузнецов О.Ю. Создание аутопробиотического препарата, содержащего активный комплекс бифидобактерий и лактобактерий // Медицинские науки. 2015 С.63

38. Кирюхина Н.В. Применение пробиотиков в целях коррекции микрофлоры верхних дыхательных путей. Диссертация кандидата медицинских наук. Москва, 2009. 43 с.

39. Клиническая лабораторная аналитика в пяти томах под редакцией Меньшиков В.В., справочник М.: Издательство: Агат-Мед, 2003. том 4. 360 с.

40. Коршунов В.М., Ефимов Б.А., Кафарская Л.И. и др. Способ лечения бактериального вагиноза: Патент № 2217155 Российская Федерация. 2001.

41. Коршунов В.М., Поташник Л.В., Ефимов Б.А. и др. Качественный состав нормальной микрофлоры кишечника у лиц различных возрастных групп // Журн. Микробиол., эпидемиол. и иммунобиол., 2001 а. №2 С. 57-61.

42. Коршунов В.М., Поташник Л.В., Ефимов Б.А. и др. Микрофлора у детей Монголии, России и Швейцарии //Журнал Микробиол., эпидемиол. и иммунобиол., 2001 б. №2 с.61-64.

43. Коршунов В.М., Смеянов В.В., Ефимов Б.А. Рациональные подходы к проблеме коррекции микрофлоры кишечника //Журнал Вестн. РАМН. 1996 № 2. С. 60-65.

44. Крамаль Л.В. Микробная экология кишечника людей, проживающих в условиях техногенного воздействия крупного промышленного города: Автореферат Диссертации доктора медицинских наук. М., 2001.80 с.

45. Кузнецова, Е.К. Микробиоценоз репродуктивной системы мужчин и его роль в течении гонококковой инфекции. Диссертация кандидата медицинских наук. Оренбург, 2006. 125 с.

46. Леванова Г.Ф., Ефимов Е.И. Фенотоксономия и геносистематика лактобацилл; под ред. Г.И. Григорьевой: монография. Н. Новгород: Изд-во Ю.А. Николаев, 2009. 258 с.

47. Ленцнер А.А., Ленцнер Х.П., Микельсаар М.Е. и др. Видовой состав лактофлоры и пищеварительного тракта космонавтов в длительных космических полётах. В книге: «Актуальные проблемы космической биологии и медицины». Москва. 1980. 66-74 с.

48. Лизько И.Н., Гончарова Г.И., Семенова Л.П. Коррекция микроэкологии кишечника у лиц в экстремальных условиях // Тезисы

Доклада VII Всесоюзной конференции по проблемам космической биологии и медицины, Калуга, 1986. М.: Наука, с. 88-89.

49. Лизько Н.Н. Дисбактериозы экстремальных состояний // Антибиотики и мед. биотехнология. 1987. Т. 32, № 3. С. 184-186.

50. Лизько Н.Н. Микроэкологические аспекты космических полетов //Журнал Вестн. РАМН. 1996. № 8. с. 31-34.

51. Лизько Н.Н. Проблемы микробной экологии у человека в космическом полёте // Тезисы докладов 6 Всероссийского съезда микробиологов, эпидемиологов и паразитологов г. Нижний Новгород – 1991. Т. 2. с. 107.

52. Маслов В.А., Гюлазян Н.М. Микробиоценоз желудочно-кишечного тракта: современное состояние проблемы. // Журнал Лечащий врач. 2007. №6 С. 10-14.

53. Мельников В.А., Стулова С.В., Тюмина О.В. и др. Аутотрансплантация лактобацилл в восстановлении индивидуального биоценоза влагалища женщины // Фундаментальные исследования. – 2012. – № 1 . – с. 64-67.

54. Меньшиков В.В. Клиническая лабораторная аналитика том 4, Частные аналитические технологии в клинической лаборатории справочник М.: Издательство: Агат-Мед, 2003. с. 30-33.

55. МР 2.3.2.2327-08 Методические рекомендации по организации производственного микробиологического контроля на предприятиях молочной промышленности (с атласом значимых микроорганизмов) Документ утверждён Главным государственным санитарным врачом РФ 7 февраля 2008 года.

56. Миронов А.Ю., Харсеева Г.Г., Клюкина Т.В. Основы клинической микробиологии и иммунологии под ред. проф. А. Ю. Миронова; М-во здравоохранения и соц. развития РФ, ГОУ ВПО "Первый Моск. мед. ун-т им. И. М. Сеченова". Ростов-на-Дону. 2011, 160 с.

57. Патент 2139070 Российская Федерация, МПК А61К 35/74, С12N 1/20. Способ получения аутопробиотика, содержащего живые бифидобактерии и лактобациллы / Б.А. Шендеров, М.А. Манвелова; заявитель и патентообладатель Шендеров Б.А. – № 99105814/13; заявл. 31.03.1999; опубл. 10.10.1999. с. 6.

58. Поликарпов Н.А. Условно-патогенные энтеробактерии, как возможные возбудители различных инфекционных процессов у экипажей космических кораблей: Автореферат Диссертации кандидата биологических наук. М.,1982. 18 с.

59. Поликарпов Н.А. Антибиотикочувствительность условно-патогенной микрофлоры до и после пребывания в герметично-замкнутом помещении //Косм. биология и авиакосм. медицина. – 1989. Т. 23. №3. С. 62-65.

60. Поликарпов Н.А., Викторов А.Н., Халангот А.Ф. Нуклеазная активность микроорганизмов и проблема контроля за состоянием аутомикрофлоры операторов герметично-замкнутых объектов // Косм. биол. и авиакосм. медицина. 1991. №6. С. 39-42.

61. Полищук Е.И. Формирование микробиоценозов новорожденных // Журн.практич. врача, 1996 № 5. С. 6-10.

62. Прохоров В.Я. Патогенные стафилококки, как возможная причина инфекций применительно к условиям космического полета. Автореферат Диссертации кандидата медицинских наук. Москва, 1971. 22 с.

63. Рахманов Р.С., Назаров А.П., Пономарева Н.Г., Дорофеева В.И. Микробиоценоз кишечника у военнослужащих при адаптации к условиям службы // Воен.-мед. журнал. 1991. № 6. С. 68-69.

64. Сидоренко А.Б. Применение лактобактерина иммобилизованного на коллагене для повышения эффективности лечения пародонтита у больных сахарным диабетом 2 типа с патологией сердечно-сосудистой системы: диссертация кандидата медицинских наук. – Москва, 2005. 43 с.

65. Симаненков В.И., Бакулина Н.В., Тихонов С.В. и др. Эффективность и безопасность аутопробиотической терапии у пациентов с сахарным диабетом второго типа // Медицинский алфавит. 2020. Т.1 № 30. С. 48-53.

66. Симонова, Е.В., Пономарева О.А. Роль нормальной микрофлоры в поддержании здоровья // Сибирский медицинский журнал. – 2008. № 8 С. 21-28.

67. Соколова С.И. Применение лактобактерина, иммобилизованного на коллагене в комплексном лечении хронического катарального гингивита у детей с гуморальными иммунодефицитными состояниями: диссертация кандидата медицинских наук. Москва, 2007. 33 с.

68. Соловьёва О.И., Симоненков В.И., Суворов А.Н. Использование пробиотиков и аутопробиотиков в лечении синдрома раздражённой толстой кишки // Эксперим. и клин. гастроэнтерология. 2017 т.143 № 7 С.115-120

69. Суворов А.Н., Симаненков В.И., Сундукова З.Р., Ермоленко Е.И., Цапиева А.Н., Донец В.Н., Соловьёва В.И. Способ получения аутопробиотика на основе *Enterococcus faecium*, представителя индигенной микрофлоры кишечника хозяина: Патент № 2560778. Российской Федерации 2012.

70. Ушкалова, Е.А. Роль пробиотиков в гастроэнтерологии // Фарматека 2007. № 6. С. 16-23

71. Феклисова, Л.В. Применение лактозосодержащих пробиотиков: оценка много летнего использования Аципола в педиатрической практике/ Л.В. Феклисова// Педиатрия. 2007. №2. С. 123-127.

72. Хачатрян А.П., Хачатрян Р.Г. Способ получения банка аутохтонных штаммов микроорганизмов для восстановления кишечного микробиоценоза человека. – Патент № 2126043.Российской Федерации 1999.

73. Хакимова Л.Р., Потапова С.М., Ахметова Л.Р., Гимранова И.А. Изучение биологических свойств аутоштаммов *Lactobacillus* sp. для создания пробиотиков // *Russian clinical laboratory diagnostics*/ 2023. 68(8) С. 482-484 <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-8-480-488>.

74. Шабанов Н.А. Влияние метаболитов *Lactobacillus fermentum* на ультраструктуру патогенных эшерихий. // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2009. №2. С. 3-6.

75. Шендеров Б. А. Нормальная микрофлора и её роль в поддержании здоровья человека // *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*.1998. Том 8, N 1. С. 61-65.

76. Шендеров Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание. М.: Грантъ, 2001 с .316.

77. Шендеров Б.А. Роль анаэробных неспорообразующих бактерий в поддержании здоровья человека // *Вестн. РАМН*, 1996. №1 С.8-11

78. Шендеров Б.А. Функциональное питание, криогенные банки микробиоценозов и их роль в сохранении и восстановлении здоровья // *Вестник восстановительной медицины*. 2003. №1. С. 29-31.

79. Шендеров Б.А., Манвелова М.А. Способ получения аутопробиотика, содержащего живые бифидобактерии и лактобациллы: Патент № 2139070. Российской Федерации. 1999.

80. Шкопоров А.Н., Кафарская Л.И., Афанасьева С.С. и др. Молекулярно-генетический анализ видового и штаммового разнообразия бифидобактерий у детей раннего возраста // *Вестн. РАМН*, 2006. № 1 С. 43–52. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(99\)00043-6](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(99)00043-6).

81. Andreu, V. P., Augustijn, H. E., Chen, L., Zhernakova, A., Fu, J., Fischbach, M. A., Medema, M. H. //A systematic analysis of metabolic pathways in the human gut microbiota. *bioRxiv*.- 2021-02.

82. Arumugam M., Raes J., Pelletier E., Le Paslier D., Yamada T., Mende D.R., Fernandes G.R., Tap J., Bruls T., Batto J.M., Bertalan M., Borrueel N., Casellas F., Fernandez L., Gautier L., Hansen T., Hattori M., Hayashi T.,

Kleerebezem M., Kurokawa K., Bork P. Enterotypes of the human gut microbiome // *Nature*. - 2011. – Vol. 473, № 7346. - p. 174–180.

83. Barboza, E. P., Arriaga P.C., Luz D.P., Montez C., Vianna K. C. Systematic review of the effect of probiotics on experimental gingivitis in humans. *Brazilian Oral Research*, 34. <https://doi.org/10.1590/1807-3107BOR-2020.VOL34.0031>.

84. Baud, D., Agri V.D., Gibson G.R., Reid G., Giannoni E. Using probiotics to flatten the curve of coronavirus disease COVID-2019 pandemic. *Frontiers in Public Health*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2020.00186>.

85. BBC. (2020). Probiotics in food, beverages, dietary supplements and animal feed. Available at: <https://www.bccresearch.com/market-research/food-andbeverage/probiotics-market-ingredients-supplements-foods-report.html>. (Accessed 14 April 2021).

86. Beliza'rio, J. E., Faintuch, J. (2018). Microbiome and gut dysbiosis. *Experientia Supplementum* (2012), 109, p.459–476. https://doi.org/10.1007/978-3-319-74932-7_13.

87. Boirivant M., Strober W. The mechanism of action of probiotics. // *Curr Opin Gastroenterol* 2007; 23(6): 679-92.

88. Boris S., Suruez J.E., Vazquez F. et al. Adherence of Human Vaginal *Lactobacilli* to Vaginal Epithelial Cells and Interaction with Uropathogens // *Infect. Immun.* – 1998. - Vol. 66. - №. 5. – p.1985-1989.

89. Boyle R.J., Robins-Browne R.M., and Tang M.L.K. Probiotic use in clinical practice: what are the risks // *Am J Clin Nutr* 2006; 83:1256–64.

90. Bustamante, M., Oomah B.D., Oliveira W.P., Burgos-Díaz C., Mónica Rubilar & Shene C. Probiotics and prebiotics potential for the care of skin, female urogenital tract, and respiratory tract. *Folia Microbiologica*, 65 (2), p.255–264. <https://doi.org/10.1007/s12223-019-00759-3>.

91. Caspani, G., Kennedy S., Foster J.A., Swann J. Gut microbial metabolites in depression: Understanding the biochemical mechanisms. *Microbial Cell*, 6(10), p.454–481. <https://doi.org/10.15698/mic2019.10.693>.

92. Chen, L., Wang, D., Garmaeva, S., Kurilshikov, A., Vila, A. V., Gacesa, R., Fu, J. The long-term genetic stability and individual specificity of the human gut microbiome. *Cell*, 2021 184(9), p.2302-2315.effects. Antonie van Leeuwenhoek International.

93. Cherifi S., Robberecht J., Miendje Y. *Saccharomyces cerevisiae* fungemia in an elderly patient with *Clostridium difficile* colitis. *Acta Clin Belg* 2004;59:223– 224.

94. De Prisco, A., & Mauriello, G. Probiotication of foods: A focus on microencapsulation tool. *Trends in Food Science and Technology*, 2016. 48, 27–39. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.11.009>.

95. Fan, Y. Pedersen O. Gut microbiota in human metabolic health and disease // *Nature reviews. Microbiology*. - 2021. - Vol. 19, № 1. - P. 55–71.

96. Gupta, V. K., Kim, M., Bakshi, U., Cunningham, K. Y., Davis III, J. M., Lazaridis, K. N., Sung, J. A predictive index for health status using species-level gut microbiome profiling. *Nature communications*, 2020 11(1), 4635.

97. Ilyin V.K., Victorov A.N. Policarpov N.A. et.al. Microbial aspects of habitable deep diving complexes exploration. // *Undersea Biomedical Research* 1992.6. p.23-28.

98. Ilyin V.K., Victorov A.N. et al. Cultural, biochemical, genetic, ultrastructural microbial characteristics under high pressure. // *High pressure biology and medicine*// Papers presented to the 5th. International meeting on high pressure biology Saint-Petersburg, 1998.

99. Ilyin V.K., Viktorov A.N. et al. The basic principles of deep divers anti-infection safety.// *Mat. Int. Conf. “Advances in high pressure bioscience and biotechnology”* Heidelberg, Germany, 1998.

100. Ilyin V.K. Microbiological status of cosmonauts during orbital spaceflights on Saljut and Mir orbital stations.//*«Acta astronautica»* 56 2005, p.445-453.

101. ISAPP. (2018). ISAPP position statement on minimum criteria for harmonizing global regulatory approaches for probiotics in foods and

supplements. Available at: <https://isappscience.org/minimum-criteria-probiotics>. (Accessed 27 May 2021).

102. ISAPP. (2020). ISAPP provides guidance on use of probiotics and prebiotics in time of COVID-19 Available at: <https://isappscience.org/isapp-providesguidance-on-use-of-probiotics-and-prebiotics-in-time-of-covid-19>. (Accessed 9 April 2021).

103. Janaki Wickramasinghe, Chandra Wickramasinghe and William Napier, *Comets and the Origin of Life*, //World Scientific Publishing, 2009, ISBN 981-256-635-X.

104. Kelly, J. R. Transferring the blues: Depression-associated gut microbiota induces neurobehavioural changes in the rat. //Journal of Psychiatric Research, 2016, 82, p.109–118. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2016.07.019>.

105. Khedkar S., Carraresi L., & Br€oring, S. Food or pharmaceuticals? Consumers' perception of health-related borderline products.// PharmaNutrition, 5(4), p.133–140. <https://doi.org/10.1016/j.phanu.2017.10.002>.

106. Kim H., Kim J.S., Kim Y.G., Jeong Y., Kim J.E., Paek N.S. Kang C.H.. Antioxidant and probiotic properties of lactobacilli and bifidobacteria of human origins. //Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2020. 25(3), p.421–430. <https://doi.org/10.1007/s12257-020-0147-x>.

107. Kim N., Yun M., Young Joon Oh & Hak-Jong Choi. Mind-altering with the gut: Modulation of the gut-brain axis with probiotics. // Journal of Microbiology, 2018. 56(3), p.172–182. <https://doi.org/10.1007/s12275-018-8032-4>.

108. Kirjavainen P. V., Ouwehand A. C., Isolauri E. et al. The ability of probiotic bacteria to bind to human intestinal mucus // FEMS Microbiol. Lett. – 1998. - Vol. 167. - № 2. – p.185–189.

109. Knackstedt, R., Knackstedt T., Gatherwright J. // The role of topical probiotics in skin conditions: A systematic review of animal and human studies and implications for future therapies.// Experimental Dermatology, 2020. 29(1), p.15–21. <https://doi.org/10.1111/exd.14032>.

110. Koutsoumanis K. Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 12: Suitability of taxonomic units notified to EFSA until. //EFSA Journal, 2020 18(7), <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6174>.

111. Kumar M. Bioengineered probiotics as a new hope for health and diseases: An overview of potential and prospects. // Future Microbiology, 2016. 11 (4), 585–600. <https://doi.org/10.2217/fmb.16.4>.

112. Kwak H. S. Nano- and microencapsulation for foods, nano- and microencapsulation for foods(pp. 1–409). South Korea: Wiley Blackwell.2014. <https://doi.org/10.1002/9781118292327>.

113. Liu X., Cao S., & Zhang X. (2015). Modulation of gut microbiota-brain axis by probiotics, prebiotics, and diet.// Journal of Agricultural and Food Chemistry, 63(36), 7885–7895. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b02504>.

114. Liu, Y., Tran, D. Q., & Rhoads, J. M. Probiotics in disease prevention and treatment.// Journal of Clinical Pharmacology, 2018. 58, S164–S179. <https://doi.org/10.1002/jcph.1121>.

115. Lloyd-Price J. The healthy human microbiome / J. Lloyd-Price, G. Abu-Ali, C. Huttenhower // Genome medicine. 2016. Vol. 8, № 1. p.51.

116. Lolou, V., & Panayiotidis, M. I. Functional role of probiotics and prebiotics on skin health and disease. // Fermentation, 2019 5(2). <https://doi.org/10.3390/fermentation5020041>.

117. Martín R., Langella P. Emerging health concepts in the probiotics field: Streamlining the definitions. // Frontiers in Microbiology, 2019. 10, p.1047. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01047>. Microorganisms, <https://doi.org/10.3390/microorganisms8121907>.

118. Mordor Intelligence. (2019). Global probiotics market: Growth, trends, and forecast (2020–2025). Available at: <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/probiotics-market>. (Accessed 14 April 2021).

119. Naseribafrouei A., Hestad K., Avershina E., Sekelja M., Linløkken A., Wilson R., Rudi K. Correlation between the human fecal microbiota and depression. // *Neurogastroenterology and Motility*, 2014. 26(8), p.1155–1162. <https://doi.org/10.1111/nmo.12378>.

120. Noble WC. Skin flora of the normal and immune compromised host // *Curr Probl Dermatol*. 1989;18. p.37-41.

121. Ouwehand, A. C., Kirjavainen, P. V., Shortt, C., & Salminen, S. (1999). Probiotics: Mechanisms and established effects. // *International Dairy Journal*, 9(1), 22-25

122. Ozen, M., & Dinleyici, E. C. The history of probiotics: The untold story. // *Beneficial Microbes*, 2015. 6(2), p.159–165. <https://doi.org/10.3920/BM2014.0103>.

123. P.DeBoever, Ilyin V.K., D.Hanus, G.Van der Auvera Conjugation-mediated plasmid exchange between bacteria grown under space conditions // *Z-Tec Publishing, Bremen Microgravity Sci Technol*. XIX-5/6 2007, p.138-144.

124. Peivasteh-Roudsari L., Pirhadi M., Karami H., Tajdar-oranj B., Molae-Aghae E., Sadighara P. Probiotics and food safety: An evidence-based review. // *Journal of Food Safety and Hygiene*. 2020. <https://doi.org/10.18502/jfsh.v5i1.3878>.

125. Pradhan, D., Mallappa, R. H., Grover S. Comprehensive approaches for assessing the safety of probiotic bacteria. // *Food Control*, 2020. p.108, <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106872>.

126. Puebla-Barragan, S., Reid, G. Forty-five-year evolution of probiotic therapy. // *Microbial Cell*, 2019 6(4), p.184–196. <https://doi.org/10.15698/mic2019.04.673>.

127. Radisavljevic N., Cirstea M., & Finlay B.B. (2019). Bottoms up: The role of gut microbiota in brain health. // *Environmental Microbiology*, 21(9), p.3197–3211. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14506>.

128. Rios A. C., Maurya P.K., Pedrini M., Zeni-Graiff M., Asevedo E., Mansur R.B., Wieck A., Grassi-Oliveira R., McIntyre R.S., Mirian A.F.

Hayashi, Brietzke E. Microbiota abnormalities and the therapeutic potential of probiotics in the treatment of mood disorders. // *Reviews in the Neurosciences*, 2017. 28(7), p.739–749. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2017-0001>.

129. Roudsari M. R., Karimi R., Sohrabvandi S., Mortazavian A.M. Health effects of probiotics on the skin. // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2015. 55(9), p.1219–1250. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.680078>.

130. Salehi B., Dimitrijević M., Aleksić A., Neffe-Skocińska K., Zielińska D., Kołożyn-Krajewska D., Sharifi-Rad J., Stojanović-Radić Z., Prabu S.M., Céilia F Rodrigues C.F., Martins N. Human microbiome and homeostasis: Insights into the key role of prebiotics, probiotics, and symbiotics. // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2021. 61(9), p.1415–1428. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1760202>.

131. Sanders, M. E., MA Akkermans L., Dirk Haller D., et al. Safety assessment of probiotics for human use. // *Gut Microbes*, 2010. 1(3), p.164–185. <https://doi.org/10.4161/gmic.1.3.12127>.

132. Sanders, M. E., Merenstein D., Merrifield C.A., Hutkins R. Probiotics for human use. *Nutrition Bulletin*, 2018. 43(3), p.212–225. <https://doi.org/10.1111/nbu.12334>.

133. Sanders, M. E., Merenstein D.J., Reid G., Gibson G.R., Robert A Rastall R.A. Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: From biology to the clinic. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 2019. 16(10), p.605–616. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0173-3>.

134. Savage D.S. Microorganisms associated with epithelial surfaces and stability of the indigenous gastrointestinal microflora. - // *Die Nahrung.*, 1987., v.31, N5,6. p.383-395.

135. Sarao, L. K., & Arora, M. Probiotics, prebiotics, and microencapsulation: A review. // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2017. 57(2), 344–371. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.887055>.

136. Schmidt, T. S., Raes, J., & Bork, P. The human gut microbiome: from association to modulation. *Cell*, 2018. 172(6), 1198-1215.
137. Slobodkin A., Gavrilov S., Lonov V., Iliyev V. Spore-Forming Thermophilic Bacterium within Artificial Meteorite Survives Entry into the Earth's Atmosphere on FOTON-M4 Satellite Landing Module. // *PLOS ONE* | . <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132611> July 7, 2015
138. Spacova I., Dodiya H.B., Happel A.U., Strain C., VandenhevelD., Wang X., ReidG. Future of probiotics and prebiotics and the implications for early career researchers. *Frontiers in Microbiology*, 2020. 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01400>.
139. Sundararaman A. Ray M., Ravindra P. V. Halami P.M. Role of probiotics to combat viral infections with emphasis on COVID-19. // *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020. 104 (19), 8089–8104. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10832-4>.
140. Supolkina, N., Yusupova, A., Shved, D., Gushin, V., Savinkina, A., Lebedeva, S. A., Kuznetsova, P. External communication of autonomous crews under simulation of interplanetary missions. *Frontiers in Physiology*, 2021. Nov 9: <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.751170>
141. Suvorov A., Karaseva A., Kotyleva M., Kondratenko Y., Lavrenova N., Korobeynikov A., Kozyrev P., Kramskaya T., Leontieva G., Kudryavtsev I., Guo D., Lapidus A., Ermolenko E. Autoprobiotics as an approach for restoration of personalised microbiota // *Frontiers in microbiology*. – 2018. – Vol. 9, art. 1869. – p.1-9.
142. Telessy, I. Nutraceuticals. In R. B. Singh, R. R. Watson, & T. Takahashi (Eds.), *The role of functional food security in global health* (pp. 409–421). San Diego: Academic Press. 2019. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813148-0.00025-4>.
143. Tesfaye, W., Suarez-Lepe J.A., Loira I., Palomero F., Morata A. Dairy and nondairy-based beverages as a vehicle for probiotics, prebiotics, and symbiotics: Alternatives to health versus disease binomial approach through

food. In Milk-based beverages: Volume 9: The science of beverages p. 473–520. Spain: Elsevier. 2019. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815504-2.00014-1>.

144. Tixador R., Moatti N., Lapchine L., Gasset G., Eche B. Cytos 2, 1982

145. Van der Waaij D. Colonization resistance of the digestive tract - mechanism and clinical consequences // *Nahrung*. 1987. 31(5-6):507-17.

146. Ventura M., Turrone F., Ribbera A. et al. Bifidobacteria: the model human gut commensal // *Therapeutic Microbiology: // Probiotics and Related Strategies* / Ed. J. Versalovic and M. Wilson, 2008. p.35-50.

147. Victorov A.N., Ilyin V.K., Policarpov N.A., et al. Microbiologic hazards for inhabitants of deep diving hyperbaric complexes. // *Undersea Biomed Res*. 1992 May; 19(3). p.209-213.

148. Wei S., Bahl M. I., Baunwall S. M. D., Hvas C. L., & Licht T. R. (2021). Determining gut microbial dysbiosis: a review of applied indexes for assessment of intestinal microbiota imbalances. // *Applied and Environmental Microbiology*, 87(11), e00395-21.

149. World Gastroenterology Organization. Global guidelines: Probiotics and prebiotics. Available at: <http://www.worldgastroenterology.org/guidelines/global-guidelines/probiotics-and-prebiotics>. (Accessed 14 April 2021).

150. Young S., Simon M., Baird M. et al. Bifidobacterial species differentially affect expression of cell surface markers and cytokines of dendritic cells harvested from cord blood // *Clin. Diagnost. Labor. Immunol.*, 2004 Vol. 11, No. 4. P.686-690.

151. Zhang, H., Yeh C., Jin Z., Ding L., Bryan Y Liu B.Y., Zhang L., Kathleen Dannelly H. Prospective study of probiotic supplementation results in immune stimulation and improvement of upper respiratory infection rate. // *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2018. 3(2), p.113–120. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2018.03.001>.

152. Zommiti M., Feuilloley M. G. J., & Connil N. Update of probiotics in human world: A nonstop source of benefactions till the end of time. //Microorganisms 2020 Nov 30; 8(12) <https://doi.org/10.3390/microorganisms8121907>

153. Zunic P., Lacotte J., Pegoix M., et al. *Saccharomyces boulardii* fungemia. Aproposofacase. //Therapie 1991;46:498 –9.