

ПРОБИОТИКИ: ВЕКТОР РАЗВИТИЯ*

Чичерин И.Ю.¹, Погорельский И.П.², Дармов И.В.², Лундовских И.А.², Гаврилов К.Е.²

¹ ООО «МедСтар», Сергиев Посад, Россия (141300, Сергиев Посад, ул. Вознесенская, 55), e-mail: rpatron@mail.ru

² ФГБОУ ВПО «Вятский государственный университет», Киров, Россия (610000, Киров, ул. Московская, 36), e-mail: kaf_mb@vyatsu.ru

PROBIOTICS: DIRECTION OF THE DEVELOPMENT

I.Yu. Chicherin¹, I.P. Pogorelsky², I.V. Darmov², I.A. Lundovskikh², K.E. Gavrilov²

¹ LLC «MedStar», Sergiev Posad, Russia (Voznesenskaya st., 55, Sergiev Posad, Russia, 141300), e-mail: rpatron@mail.ru,

² Vyatka State University, Kirov, Russia (Moskovskaya st., 36, Kirov, Russia, 610000), e-mail: kaf_mb@vyatsu.ru

РЕЗЮМЕ

Представлены результаты оценки эффективности различных компонентов жидких нативных культур гомопробиотических лактобактерий и бифидобактерий в коррекции нарушений микробиоценоза кишечника у конвенциональных белых мышей с экспериментальным антибиотико-ассоциированным дисбактериозом. В экспериментах использовали гомопробиотические лактобактерии и бифидобактерии, выделенные из фекалий белых мышей линии BALB/c. Выделенные микроорганизмы выращивали в жидкой питательной среде в микроаэрофильных условиях.

Нативные культуры гомопробиотических лактобактерий и бифидобактерий и их компоненты (нативные микробные клетки, инактивированные микробные клетки, надосадочная жидкость), а также жидкую питательную среду вводили перорально конвенциональным белым мышам с экспериментальным антибиотико-ассоциированным дисбактериозом и оценивали динамику общего содержания микроорганизмов в 1 г фекалий и отдельных представителей кишечной микрофлоры.

Установлено, что надосадочная жидкость, содержащая экзометаболиты, оказывает наиболее выраженное влияние на восстановление нормальной кишечной микрофлоры у подопытных животных. Полученные результаты создают предпосылку для экспериментально обоснованной разработки новых пробиотических препаратов на основе экзометаболитов микроорганизмов.

Ключевые слова: пробиотики, пребиотики, экзометаболиты, экспериментальный дисбактериоз, кишечная микрофлора.

ВВЕДЕНИЕ

Микроэкологические нарушения в желудочно-кишечном тракте сопровождают большинство заболеваний [1-6]. С другой стороны, многочисленные проявления болезней, а также расстройства в функционировании ряда органов и систем часто напрямую связаны с нарушениями микробиоценоза кишечника, которые, в частности дисбактериоз и синдром избыточного бактериального роста, хоть и не приобрели статус самостоятельных

SUMMARY

The results are presented of evaluation of the efficiency of the various components of homoprobiotic lactobacilli and bifidobacteria liquid native cultures in the correction of intestinal microbiocenosis of conventional white mice with antibiotic-associated dysbacteriosis. Homoprobiotic lactobacilli and bifidobacteria isolated from the feces of white mice of BALB/c line were used in the experiments. The isolated microorganisms were grown in liquid nutrient medium under microaerophilic conditions.

Homoprobiotic lactobacilli and bifidobacteria native cultures and their components (native microbial cells, inactivated microbial cells, supernatant) and liquid cultures medium were administered orally to white mice with antibiotic-associated dysbacteriosis, and the dynamics of the total content of microorganisms and the number of some representatives of intestinal microflora in 1 g of feces were evaluated.

Results showed that the supernatant, containing exometabolites, has the most pronounced effect on the renewal of the normal intestinal microflora in experimental animals. These results provide the experimental background for the sound development of new probiotic products based on exometabolites of microorganisms.

Key words: probiotics, prebiotics, exometabolites, experimental dysbacteriosis, intestinal.

нозологических единиц, но стали актуальной проблемой медицины [1, 7].

В соответствии с Отраслевым стандартом «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника», утвержденный приказом № 232 МЗ РФ (2003 г.), современные подходы к лечебной коррекции дисбиотических изменений в кишечнике включают ряд важных мероприятий, в том числе направленных на восстановление нормальной кишечной микрофлоры [8].

* Ссылка для цитирования: Чичерин И.Ю., Погорельский И.П., Дармов И.В., Лундовских И.А., Гаврилов К.Е. Пробиотики: вектор развития. Практическая медицина. - 2012. - №3(58). - С.180-188.

Пробиотики среди средств коррекции нарушений микрофлоры кишечника в течение многих лет занимают особое место в связи с теми эффектами, которые регистрируются как объективно, так и субъективно – улучшением самочувствия больного [9]. Однако еще в 2003 г. E. Lebenthal и Y. Lebenthal отметили противоречивость данных об эффективности многих разработанных и испытанных пробиотиков и сделали вывод о том, что лишь отдельные из большого числа клинических испытаний пробиотиков дали приемлемые оценки их эффективности [10].

Считается, что основным действующим началом пробиотических препаратов являются живые микробные клетки [11, 12]. Поэтому все биотехнологические приемы по разработке и производству пробиотиков направлены на получение высококонцентрированных суспензий пробиотических микроорганизмов, сред высушивания и стабилизации свойств лиофилизированных микроорганизмов, поддержание и доставку в дистальные отделы желудочно-кишечного тракта пробиотических микроорганизмов в максимально возможном жизнеспособном состоянии, в том числе в инкапсулированной форме [11-15].

Появление нового поколения пробиотиков связано не только с совершенствованием биотехнологии их производства, но и с имеющимися случаями низкого, а порой и нулевого эффекта от их применения при некоторых дисбиотических состояниях.

Анализ возможных причин недостаточной эффективности пробиотической коррекции дисбиотических состояний кишечника проведен Н.А. Глушановой [16]. Автором, в частности, указывается со ссылкой на опубликованные результаты исследований других авторов [17, 18], что пробиотик может реализовать свои потенциальные свойства в том случае, если он поступает в кишечник в активном жизнеспособном состоянии в виде жидкой культуры или в виде кисломолочного продукта.

Опубликованы данные о том, что лиофилизированные в составе пробиотических препаратов микроорганизмы плохо приживаются в кишечнике, а по своей активности – значительно уступают пробиотическим микроорганизмам, входящим в состав молочнокислых продуктов [19].

Сравнительное изучение свойств микроорганизмов в составе жидких и лиофилизированных пробиотических препаратов позволило выявить деструкцию клеточной стенки микроорганизмов в результате лиофилизации, что сказывается на более медленной их адаптации в кишечнике и удлинении лаг-фазы [20, 21]. Как следует из опубликованных результатов исследований [22], повреждению клеточной стенки пробиотических микроорганизмов способствует лиофилизация микробных клеток и, в частности, замена культуральной жидкости на специальную среду высушивания.

С учетом данных о том, что лиофилизированные пробиотики недостаточно точно стандартизируются по количеству жизнеспособных микроорганизмов [22], которые в процессе сублимационной сушки испытывают определенное негативное воздействие ряда факторов, вполне ожидаемой является информация о том, что положительный эффект пробиотиков даже при длительном применении носит временный характер или вовсе отсутствует. Поэтому для коррекции дисбиотических нарушений все чаще стали применять сочетание пробиотических и пребиотических препаратов [7, 9, 23].

Таким образом, в связи с вышеизложенным, особенно с противоречивостью данных о действительной эффективности пробиотических препаратов, представляется крайне важным изучение вклада в пробиотический эффект каждого в отдельности компонента (субстанции)

коммерческих пробиотиков для обоснования подходов к повышению безопасности, профилактического и лечебного эффекта данного класса иммунобиологических препаратов.

Теоретическое и экспериментальное обоснование таких подходов возможно при наличии соответствующего биологического объекта изучения без отягощения сопутствующими заболеваниями, вызвавшими и влияющими на дисбиотические изменения в кишечнике.

На человеческом организме проведение экспериментальных исследований невозможно, во-первых, из этических соображений, а, во-вторых, дисбиотические изменения у людей в естественных условиях проявляются как клиничко-лабораторный синдром, сопутствующий основному заболеванию. Поэтому чистоты эксперимента добиться на людях нельзя вследствие наличия у них ряда основных заболеваний, т.е. невозможно найти для данных исследований контингент здоровых людей с выраженным дисбиозом кишечника.

Замена человеческого организма вполне обоснованно может быть произведена на организм животных. Важно при этом иметь в виду, что микроорганизмы из сертифицированных пробиотических препаратов часто не способны к длительному существованию в кишечнике человека и животных [24, 25]. Поэтому для приживления в данном биотопе предложено использовать гомопробиотические микроорганизмы, относящиеся к фенотипической группе, доминирующей в кишечнике животных или людей [26]. Для конвенциональных белых мышей такими гомопробиотическими микроорганизмами могут быть лактобактерии и бифидобактерии, выделенные от белых мышей линии BALB/c, полученных из иногороднего питомника.

Для проведения исследований нами разработана модель здоровых экспериментальных животных (конвенциональных белых мышей) с антибиотико-ассоциированным дисбактериозом, получаемым в стандартных условиях путем перорального введения не всасывающегося из желудочно-кишечного тракта антибиотика и, к тому же, не вызывающего системных реакций со стороны организма [27]. Разработанная модель с использованием экспериментальных животных позволяет получать у них воспроизводимые от опыта к опыту однотипные глубокие изменения микробиоценоза кишечника.

Цель исследования

Цель настоящего исследования – сравнительное изучение эффективности различных компонентов жидких нативных культур гомопробиотических лактобактерий и бифидобактерий в коррекции нарушений микробиоценоза кишечника у конвенциональных белых мышей с экспериментальным антибиотико-ассоциированным дисбактериозом.

Исходя из литературных данных, максимальную эффективность живых пробиотических микроорганизмов можно ожидать от гомопробиотических бактериальных культур [11, 12, 28], находящихся в физиологическом состоянии без деструкции клеточной стенки бактерии, наблюдающейся в процессе лиофилизации [13, 20, 21], и потери большей части экзогенных метаболитов в ходе лиофилизации и приготовления сухих препаратов [13].

Материалы и методы исследования

При отработке условий культивирования пробиотических микроорганизмов в жидкой питательной среде использовали регидратированные культуры сертифицированных пробиотиков Лактобактерин (серия 15/6, производство ФГУП НПО «Микроген», Россия) и Би-

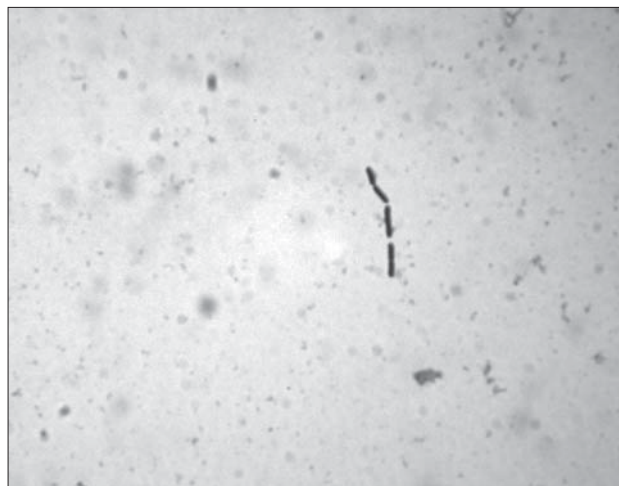
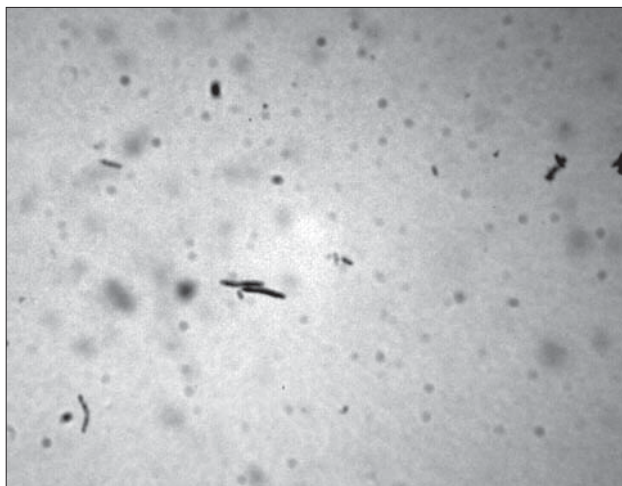


Рисунок – Микрофотография гомопробиотических лактобактерий (1) и бифидобактерий (2). $\times 1000$

бифидумбактерин (серия 315-6, производство ФГУП НПО «Микроген», Россия). Согласно инструкции по медицинскому применению, препарат Лактобактерин сухой создан на основе лактобактерий *L. plantarum* SP-A3, а препарат Бифидумбактерин сухой – на основе бифидобактерий *B. bifidum* 1. В одной дозе лиофилизата препарата Лактобактерин содержится не менее $2 \cdot 10^9$ живых лактобактерий, а в одной дозе лиофилизата Бифидумбактерин – не менее $1 \cdot 10^7$ живых бифидобактерий.

В экспериментах использовали культуры гомопробиотических бактерий, идентифицированных как бифидобактерии и лактобактерии, выделенные из экскрементов белых мышей линии BALB/c – лабораторной линии домашних мышей, традиционно используемых в исследованиях по иммунологии и в онкологии [29].

Изолированное содержание белых мышей линии BALB/c не допускает перекрестного спаривания с беспородными (конвенциональными) белыми мышами, использованными для получения антибиотико-ассоциированного дисбактериоза, что исключает появление и циркуляцию аутоштаммов кишечных микроорганизмов.

Чистые культуры гомопробиотических бифидобактерий и лактобактерий выделяли на плотных питательных средах рекомендованного состава [30, 31] в чашках Петри после инкубирования в микроаэрофильных условиях с использованием системы для анаэробного культивирования (анаэрогат) Anaerobic system Mark III-LE003 (Hi Media Laboratories Pvt.». LTD, Мумбаи, Индия) с пакетами газогенераторными Hi Anaero Gas Pacet.

Общее количество микробных клеток в пересчете на 1 г фекалий животных определяли подсчетом в камере Горяева (модель 851, ЛПО «Красногвардеец», Россия).

Количество живых микроорганизмов (КОЕ) в суспензиях определяли высевом соответствующих десятикратных серийных разведений исследуемых суспензий на плотные питательные среды в чашках Петри и подсчетом выросших колоний по истечении времени инкубирования. Выращивание эшерихий и подсчет выросших колоний проводили на агаре Эндо.

В качестве контрольного препарата использовали биоразенку «Целебная радуга», произведенную ООО МНПК «Вятка биопром» (ТУ 9222-001-10922226-09). Содержание бифидобактерий $1 \cdot 10^8$ КОЕ \cdot г $^{-1}$ и лактобактерий $1 \cdot 10^7$ КОЕ \cdot г $^{-1}$.

Антибиотико-ассоциированный дисбактериоз кишечника у конвенциональных белых мышей, беспородных, обоего пола, массой 18-20 г, воспроизводили путем перорального введения гентамицина (продукция ОАО

«Биохимик», Россия) [27].

Статистическую обработку результатов экспериментов проводили согласно рекомендациям, изложенным в руководстве И.П. Ашмарина и А.А. Воробьева [32].

Результаты исследования

Эксперименты по оптимизации условий культивирования пробиотических микроорганизмов сертифицированных пробиотиков Лактобактерин и Бифидобактерин в жидкой питательной среде на основе ферментативного гидролизата мяса с добавлением дрожжевого экстракта, солей и стимуляторов роста (гемина и сульфита натрия) показали, что в созданных оптимальных микроаэрофильных условиях регидратированные лактобактерии хорошо растут, размножаются и за 2 суток роста при температуре 37 °С их концентрация в 1 мл культуральной среды достигает $(2-2,8) \cdot 10^9$ КОЕ.

Бифидобактерии, регидратированные из сухого препарата Бифидумбактерин, ко 2 суткам роста в жидкой питательной среде значительно отстали в скорости роста. Очевидно, что вакуумная сушка оказала негативное влияние на клетки бифидобактерий, как об этом говорится в уже цитируемой работе [13], что безусловно сказалось на адаптации бифидобактерий к условиям выращивания. Потребовалось 4 суток выращивания бифидобактерий в микроаэрофильных условиях, чтобы их концентрация в жидкой питательной среде достигла уровня $(8-9) \cdot 10^8$ КОЕ \cdot мл $^{-1}$, что выше концентрации бифидобактерий в одной дозе пробиотика Бифидумбактерин.

Необходимо отметить следующее: если в качестве посевного материала взять культуру бифидобактерий первой генерации в жидкой питательной среде, то скорость роста бифидобактерий возрастает и оптимальный выход биомассы наблюдается к исходу 3 суток культивирования в микроаэрофильных условиях.

При микроскопии мазков, приготовленных из выросших в жидкой питательной среде лактобактерий, окрасивших по Граму, наблюдаются грамположительные палочки до 7-10 мкм в длину, а бифидобактерий – грамположительные палочки, вариабельные по форме до 7-9 мкм в длину.

Для выделения гомопробиотических лактобактерий и бифидобактерий от белых мышей линии BALB/c, традиционно используемых в клинических и иммунологических исследованиях [29], отбирали фекальные массы животных. Суспендированные фекалии линейных мышей в изотоническом растворе хлорида натрия центрифугировали в центрифужных пробирках для осаждения фрагментов непереваренной пищи, а надосадочную жидкость

Таблица 1.

Динамика концентрации микроорганизмов в кишечном содержимом белых мышей при пероральном введении гентамицина ($\bar{X} \pm I_{95}$, n=6)			
Микроорганизмы	Содержание живых бактерий в 1 г фекалий на ... сутки эксперимента, КОЕ \cdot г ⁻¹		
	начало эксперимента	2	7
Общее количество	$(6,6 \pm 0,4) \cdot 10^9$	$(7,1 \pm 0,6) \cdot 10^5$	$(2,4 \pm 0,5) \cdot 10^4$
Бифидобактерии	$(6,1 \pm 0,5) \cdot 10^6$	$(2,0 \pm 0,5) \cdot 10^4$	$(1,4 \pm 0,5) \cdot 10^2$
Лактобактерии	$(2,6 \pm 0,5) \cdot 10^8$	$(1,6 \pm 0,3) \cdot 10^6$	$(1,3 \pm 0,6) \cdot 10^3$
Эшерихии	$(1,8 \pm 0,6) \cdot 10^4$	$(2,0 \pm 0,5) \cdot 10^3$	$(2,1 \pm 0,7) \cdot 10^1$

Примечание — здесь и в таблицах 2, 3 «п» — количество повторных определений

использовали для посева на соответствующие плотные питательные среды для получения роста изолированных колоний, изучения морфологических и тинкториальных свойств бактерий, соответствия их видовым характеристикам.

На основании комплексного изучения свойств выделенных бактерий они были идентифицированы как *Lactobacillus plantarum* и *Bifidobacterium bifidum* [33]. Чистые культуры гомопробиотических микроорганизмов в дальнейшем выращивали в жидкой питательной среде. На рисунке представлены микрофотографии выращенных микроорганизмов, окрашенных по Граму.

Отработанные условия выращивания гомопробиотических лактобактерий и бифидобактерий в жидкой питательной среде на основе ферментативного гидролизата мяса с дополнительными добавками позволили получить нативные культуры, в которых концентрация гомопробиотических *L. plantarum* составила $2,6 \cdot 10^9$ КОЕ \cdot мл⁻¹, а гомопробиотических *B. bifidum* — $8,1 \cdot 10^8$ КОЕ \cdot мл⁻¹.

Полученные нативные культуры гомопробиотических микроорганизмов с многокомпонентным составом были необходимы для сравнительной оценки эффективности каждого из компонентов в коррекции нарушений микробиоценоза кишечника конвенциональных белых мышей с антибиотико-ассоциированным дисбактериозом.

Для инициации антибиотико-ассоциированного дисбактериоза кишечника конвенциональным белым мышам в течение 7 дней перорально вводили дважды в сутки гентамицин в дозе по 3 мг. До введения антибиотика, на второй и седьмой день введения у животных отбирали фекалии для бактериологического изучения. Всего в опытах было использовано 72 животных. Результаты опытов представлены в таблице 1.

Представленные в таблице 1 данные однозначно свидетельствуют о существенных дисбиотических изменениях микрофлоры кишечника у конвенциональных белых мышей под влиянием перорально вводимого гентамицина, что проявляется снижением (на 5 порядков) как общего содержания микроорганизмов в пересчете на 1 г фекалий, так и отдельных представителей фекальной микрофлоры (на 3-5 порядков).

Для проведения последующих экспериментов все животные с антибиотико-ассоциированным дисбактериозом были разделены на группы по 6 особей в каждой. Через 5 дней, в течение которых животным не вводили перорально гентамицин с целью снижения его концентрации в кишечном содержимом, для воздействия на кишечную микрофлору каждому животному в составе группы начинали вводить перорально:

а) нативную культуру гомопробиотических лактобактерий и бифидобактерий по 0,1 мл 2 раза в сутки (1 группа);

б) нативные живые гомопробиотические лактобактерии и бифидобактерии 2 раза в сутки по 0,1 мл (суточная доза, соответствующая таковой для людей с учетом переводного коэффициента, составила для бифидобактерий 130 тыс., для лактобактерий 26 млн.). Микробные

клетки получали центрифугированием (1000g, 15 минут) и ресуспендированием полученного осадка в аналогичном объеме изотонического раствора хлорида натрия (2 группа);

в) инактивированные в парах хлороформа гомопробиотические лактобактерии и бифидобактерии 2 раза в сутки по 0,1 мл также по 130 тыс. бифидобактерий и 26 млн. лактобактерий (3 группа). Изучение инактивированных лактобактерий и бифидобактерий свидетельствовало, что пары хлороформа щадящим образом инактивируют микробные клетки, не нарушая их целостности, в том числе поверхностных структур клеточной стенки;

г) надосадочная жидкость, полученная при центрифугировании жидкой культуры гомопробиотических лактобактерий и бифидобактерий, в объеме 0,1 мл 2 раза в сутки (4 группа);

д) жидкая питательная среда в объеме 0,1 мл 2 раза в сутки (5 группа);

е) биоряженка «Целебная радуга» 2 раза в сутки по 0,1 мл (6 группа).

В начале введения животным жидких культур гомопробиотических лактобактерий и бифидобактерий и их компонентов, биоряженки «Целебная радуга», жидкой питательной среды, а также на вторые, седьмые и четырнадцатые сутки, у животных в каждой из групп отбирали фекалии для бактериологического исследования.

Результаты экспериментов представлены в таблицах 2 и 3, из которых следует, что наиболее благоприятное действие на микрофлору кишечника белых мышей с антибиотико-ассоциированным дисбактериозом оказывает надосадочная жидкость, полученная в результате центрифугирования нативных культур («жидких пробиотических комплексов») гомопробиотических лактобактерий и бифидобактерий. При этом на 14 сутки экспериментов зафиксировано не только значительное увеличение общего содержания микроорганизмов в фекалиях животных, но и восстановление в близких к физиологическим параметрам численности лактобактерий, бифидобактерий и эшерихий.

Нативные культуры гомопробиотических лактобактерий и бифидобактерий также оказывают стимулирующее воздействие на микрофлору кишечника белых мышей с антибиотико-ассоциированным дисбактериозом, хотя и в меньшей степени, нежели надосадочная жидкость. В то же время в сравнении с нативными живыми клетками *L. plantarum* и *B. bifidum* стимулирующее действие нативных культур на кишечную микрофлору белых мышей отчетливо выше.

Инактивированные бактерии *L. plantarum* и *B. bifidum* практически не иницируют восстановление кишечной микрофлоры у белых мышей с антибиотико-ассоциированным дисбактериозом, уступая в этом отношении вводимой животным перорально жидкой питательной среде, взятой в качестве контроля.

Биоряженка «Целебная радуга», в составе которой присутствуют живые лактобактерии и бифидобактерии,

Таблица 2.

Динамика концентрации микроорганизмов в кишечном содержимом конвенциональных белых мышей с антибиотико-ассоциированным дисбактериозом на фоне введения нативной культуры с гомопробиотическими лактобактериями и ее компонентов ($\bar{X} \pm I_{95}$, n=6)						
Группа животных	Нативная культура и ее компоненты	Микроорганизмы	Содержание живых бактерий в 1г фекалий на ... сутки эксперимента, КОЕ·г ⁻¹			
			Начало эксперимента	2	7	14
1	Нативная культура <i>L. plantarum</i> («жидкий пробиотический комплекс»)	Общее количество	$(2,6 \pm 0,7) \cdot 10^4$	$(2,9 \pm 0,4) \cdot 10^4$	$(5,1 \pm 0,7) \cdot 10^5$	$(6,2 \pm 0,7) \cdot 10^6$
		Бифидобактерии	$(1,8 \pm 0,5) \cdot 10^2$	$(2,6 \pm 0,5) \cdot 10^2$	$(6,1 \pm 0,4) \cdot 10^3$	$(8,1 \pm 0,7) \cdot 10^4$
		Лактобактерии	$(2,1 \pm 0,7) \cdot 10^3$	$(3,8 \pm 0,6) \cdot 10^3$	$(6,8 \pm 0,5) \cdot 10^4$	$(6,1 \pm 0,5) \cdot 10^5$
		Эшерихии	$(1,8 \pm 0,6) \cdot 10^1$	$(2,9 \pm 0,7) \cdot 10^1$	$(3,1 \pm 0,6) \cdot 10^2$	$(4,9 \pm 0,6) \cdot 10^3$
2	Нативные живые клетки <i>L. plantarum</i>	Общее количество	$(2,8 \pm 0,6) \cdot 10^4$	$(2,9 \pm 0,7) \cdot 10^4$	$(3,2 \pm 0,7) \cdot 10^4$	$(1,8 \pm 0,6) \cdot 10^5$
		Бифидобактерии	$(1,5 \pm 0,7) \cdot 10^2$	$(1,6 \pm 0,7) \cdot 10^2$	$(7,0 \pm 0,8) \cdot 10^2$	$(3,0 \pm 0,5) \cdot 10^3$
		Лактобактерии	$(2,1 \pm 0,7) \cdot 10^3$	$(2,0 \pm 0,5) \cdot 10^3$	$(4,9 \pm 0,7) \cdot 10^3$	$(5,1 \pm 0,7) \cdot 10^4$
		Эшерихии	$(1,8 \pm 0,4) \cdot 10^1$	$(1,6 \pm 0,7) \cdot 10^1$	$(8,1 \pm 0,7) \cdot 10^1$	$(8,8 \pm 0,6) \cdot 10^2$
3	Инактивированные клетки <i>L. plantarum</i>	Общее количество	$(2,4 \pm 0,6) \cdot 10^4$	$(2,0 \pm 0,6) \cdot 10^4$	$(1,9 \pm 0,8) \cdot 10^4$	$(4,0 \pm 0,6) \cdot 10^4$
		Бифидобактерии	$(1,6 \pm 0,5) \cdot 10^2$	$(1,5 \pm 0,5) \cdot 10^2$	$(1,3 \pm 0,7) \cdot 10^2$	$(1,9 \pm 0,5) \cdot 10^2$
		Лактобактерии	$(2,8 \pm 0,7) \cdot 10^3$	$(2,4 \pm 0,6) \cdot 10^3$	$(1,8 \pm 0,7) \cdot 10^3$	$(1,9 \pm 0,6) \cdot 10^3$
		Эшерихии	$(1,3 \pm 0,8) \cdot 10^1$	$(1,9 \pm 0,5) \cdot 10^1$	$(3,0 \pm 0,7) \cdot 10^1$	$(3,5 \pm 0,6) \cdot 10^1$
4	Надосадочная жидкость	Общее количество	$(2,8 \pm 0,7) \cdot 10^4$	$(6,7 \pm 0,8) \cdot 10^5$	$(4,5 \pm 0,7) \cdot 10^7$	$(9,1 \pm 0,7) \cdot 10^8$
		Бифидобактерии	$(1,7 \pm 0,5) \cdot 10^2$	$(2,7 \pm 0,5) \cdot 10^3$	$(2,8 \pm 0,7) \cdot 10^4$	$(7,5 \pm 0,6) \cdot 10^6$
		Лактобактерии	$(1,7 \pm 0,6) \cdot 10^3$	$(1,9 \pm 0,7) \cdot 10^4$	$(6,3 \pm 0,8) \cdot 10^5$	$(9,8 \pm 0,7) \cdot 10^7$
		Эшерихии	$(2,1 \pm 0,6) \cdot 10^1$	$(3,1 \pm 0,7) \cdot 10^1$	$(3,1 \pm 0,6) \cdot 10^3$	$(1,0 \pm 0,6) \cdot 10^4$
5	Жидкая питательная среда (контроль)	Общее количество	$(2,1 \pm 0,5) \cdot 10^4$	$(2,0 \pm 0,6) \cdot 10^4$	$(2,8 \pm 0,7) \cdot 10^4$	$(1,6 \pm 0,5) \cdot 10^5$
		Бифидобактерии	$(1,5 \pm 0,7) \cdot 10^2$	$(1,4 \pm 0,7) \cdot 10^2$	$(5,5 \pm 0,6) \cdot 10^2$	$(1,7 \pm 0,6) \cdot 10^4$
		Лактобактерии	$(1,4 \pm 0,5) \cdot 10^3$	$(2,2 \pm 0,6) \cdot 10^3$	$(5,1 \pm 0,7) \cdot 10^3$	$(2,0 \pm 0,7) \cdot 10^4$
		Эшерихии	$(1,5 \pm 0,6) \cdot 10^1$	$(1,8 \pm 0,7) \cdot 10^1$	$(6,8 \pm 0,6) \cdot 10^2$	$(1,7 \pm 0,5) \cdot 10^2$
6	Биоразенка «Целебная радуга» (контроль)	Общее количество	$(2,4 \pm 0,5) \cdot 10^4$	$(4,3 \pm 0,6) \cdot 10^4$	$(6,1 \pm 0,6) \cdot 10^5$	$(5,1 \pm 0,7) \cdot 10^6$
		Бифидобактерии	$(1,5 \pm 0,6) \cdot 10^2$	$(6,9 \pm 0,8) \cdot 10^2$	$(4,3 \pm 0,7) \cdot 10^4$	$(2,0 \pm 0,6) \cdot 10^4$
		Лактобактерии	$(1,9 \pm 0,6) \cdot 10^3$	$(7,3 \pm 0,7) \cdot 10^3$	$(6,3 \pm 0,5) \cdot 10^4$	$(2,8 \pm 0,5) \cdot 10^5$
		Эшерихии	$(1,4 \pm 0,7) \cdot 10^1$	$(4,3 \pm 0,5) \cdot 10^1$	$(2,3 \pm 0,6) \cdot 10^2$	$(1,5 \pm 0,4) \cdot 10^3$

Таблица 3.

Динамика концентрации микроорганизмов в кишечном содержимом конвенциональных белых мышей с антибиотико-ассоциированным дисбактериозом на фоне введения нативной культуры с гомопробиотическими бифидобактериями и ее компонентов ($\bar{X} \pm I_{95}$, n=6)						
Группа животных	Нативная культура и ее компоненты	Микроорганизмы	Содержание живых бактерий в 1г фекалий на ... сутки эксперимента, КОЕ·г ⁻¹			
			начало эксперимента	2	7	14
1	Нативная культура <i>B. bifidum</i> («жидкий пробиотический комплекс»)	Общее количество	$(3,8 \pm 0,7) \cdot 10^4$	$(1,8 \pm 0,6) \cdot 10^5$	$(4,6 \pm 0,6) \cdot 10^6$	$(9,6 \pm 0,5) \cdot 10^6$
		Бифидобактерии	$(1,5 \pm 0,5) \cdot 10^2$	$(2,0 \pm 0,4) \cdot 10^2$	$(5,7 \pm 0,5) \cdot 10^3$	$(8,5 \pm 0,6) \cdot 10^4$
		Лактобактерии	$(2,1 \pm 0,6) \cdot 10^3$	$(3,1 \pm 0,6) \cdot 10^3$	$(7,6 \pm 0,7) \cdot 10^4$	$(5,2 \pm 0,4) \cdot 10^5$
		Эшерихии	$(1,5 \pm 0,5) \cdot 10^1$	$(2,0 \pm 0,5) \cdot 10^1$	$(4,1 \pm 0,6) \cdot 10^2$	$(2,0 \pm 0,6) \cdot 10^3$
2	Нативные живые клетки <i>B. bifidum</i>	Общее количество	$(3,9 \pm 0,5) \cdot 10^4$	$(2,7 \pm 0,6) \cdot 10^4$	$(2,9 \pm 0,5) \cdot 10^4$	$(1,4 \pm 0,6) \cdot 10^5$
		Бифидобактерии	$(1,6 \pm 0,6) \cdot 10^2$	$(1,8 \pm 0,6) \cdot 10^2$	$(6,5 \pm 0,6) \cdot 10^2$	$(2,2 \pm 0,5) \cdot 10^3$
		Лактобактерии	$(2,5 \pm 0,5) \cdot 10^3$	$(2,0 \pm 0,7) \cdot 10^3$	$(3,5 \pm 0,7) \cdot 10^3$	$(3,6 \pm 0,6) \cdot 10^4$
		Эшерихии	$(2,4 \pm 0,7) \cdot 10^1$	$(1,5 \pm 0,6) \cdot 10^1$	$(7,5 \pm 0,8) \cdot 10^1$	$(2,6 \pm 0,5) \cdot 10^2$
3	Инактивированные клетки <i>B. bifidum</i>	Общее количество	$(2,5 \pm 0,5) \cdot 10^4$	$(2,5 \pm 0,6) \cdot 10^4$	$(1,6 \pm 0,7) \cdot 10^4$	$(3,0 \pm 0,6) \cdot 10^4$
		Бифидобактерии	$(1,4 \pm 0,7) \cdot 10^2$	$(1,6 \pm 0,5) \cdot 10^2$	$(2,2 \pm 0,7) \cdot 10^2$	$(1,6 \pm 0,5) \cdot 10^2$
		Лактобактерии	$(2,6 \pm 0,7) \cdot 10^3$	$(2,0 \pm 0,6) \cdot 10^3$	$(2,0 \pm 0,8) \cdot 10^3$	$(2,8 \pm 0,6) \cdot 10^3$
		Эшерихии	$(2,9 \pm 0,8) \cdot 10^1$	$(3,3 \pm 0,6) \cdot 10^1$	$(5,6 \pm 0,7) \cdot 10^1$	$(6,1 \pm 0,7) \cdot 10^1$
4	Надосадочная жидкость	Общее количество	$(2,6 \pm 0,7) \cdot 10^4$	$(6,1 \pm 0,6) \cdot 10^5$	$(3,5 \pm 0,6) \cdot 10^8$	$(9,8 \pm 0,7) \cdot 10^8$
		Бифидобактерии	$(1,5 \pm 0,6) \cdot 10^2$	$(2,6 \pm 0,4) \cdot 10^3$	$(2,6 \pm 0,6) \cdot 10^4$	$(9,6 \pm 0,8) \cdot 10^6$
		Лактобактерии	$(1,5 \pm 0,8) \cdot 10^3$	$(1,5 \pm 0,6) \cdot 10^4$	$(7,0 \pm 0,7) \cdot 10^5$	$(6,1 \pm 0,67) \cdot 10^7$
		Эшерихии	$(2,0 \pm 0,5) \cdot 10^1$	$(3,4 \pm 0,6) \cdot 10^2$	$(2,9 \pm 0,5) \cdot 10^3$	$(1,2 \pm 0,5) \cdot 10^4$
5	Жидкая питательная среда (контроль)	Общее количество	$(2,0 \pm 0,6) \cdot 10^4$	$(2,9 \pm 0,7) \cdot 10^4$	$(3,1 \pm 0,6) \cdot 10^4$	$(1,8 \pm 0,7) \cdot 10^5$
		Бифидобактерии	$(1,1 \pm 0,8) \cdot 10^2$	$(1,6 \pm 0,5) \cdot 10^2$	$(8,1 \pm 0,8) \cdot 10^2$	$(1,6 \pm 0,6) \cdot 10^4$
		Лактобактерии	$(1,6 \pm 0,5) \cdot 10^3$	$(2,4 \pm 0,6) \cdot 10^3$	$(5,4 \pm 0,6) \cdot 10^3$	$(2,3 \pm 0,6) \cdot 10^4$
		Эшерихии	$(1,7 \pm 0,6) \cdot 10^1$	$(2,4 \pm 0,5) \cdot 10^1$	$(8,6 \pm 0,6) \cdot 10^2$	$(1,8 \pm 0,4) \cdot 10^2$
6	Биоразенка «Целебная радуга» (контроль)	Общее количество	$(2,8 \pm 0,4) \cdot 10^4$	$(4,1 \pm 0,5) \cdot 10^4$	$(5,3 \pm 0,7) \cdot 10^5$	$(4,9 \pm 0,6) \cdot 10^6$
		Бифидобактерии	$(1,4 \pm 0,5) \cdot 10^2$	$(6,9 \pm 0,6) \cdot 10^2$	$(4,9 \pm 0,8) \cdot 10^4$	$(1,7 \pm 0,7) \cdot 10^4$
		Лактобактерии	$(1,8 \pm 0,6) \cdot 10^3$	$(5,1 \pm 0,6) \cdot 10^3$	$(4,6 \pm 0,7) \cdot 10^4$	$(3,1 \pm 0,4) \cdot 10^5$
		Эшерихии	$(3,0 \pm 0,6) \cdot 10^1$	$(4,6 \pm 0,7) \cdot 10^1$	$(2,1 \pm 0,7) \cdot 10^2$	$(1,6 \pm 0,5) \cdot 10^3$

хотя и уступает по стимулирующему эффекту на восстановление кишечной микрофлоры надосадочной жидкости, однако является явно предпочтительной в сравнении с нативными бактериями *L. plantarum* и *B. bifidum*, а тем более с инактивированными бактериальными клетками тех же видов.

С учетом приведенных в таблицах 2 и 3 данных уместно будет представить результаты определения скорости восстановления кишечной микрофлоры у подопытных животных под влиянием перорального введения нативных культур гомопробиотических макроорганизмов и соответствующих компонентов нативных культур.

Данный показатель, впервые введенный нами в научный оборот для оценки скорости восстановления (или угнетения) микрофлоры [34], определяется как частное от деления разницы значений концентраций микроорганизмов в 1 г фекалий в конце и начале экспериментов на 14 (количество дней между двумя временными точками определения концентрации микроорганизмов в фекалиях животных), и характеризует скорость восстановления фекальной микрофлоры ($\text{КОЕ} \cdot \text{г}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$) под влиянием стимулирующих факторов (таблица 4).

Как следует из представленных в таблице 4 данных, скорость восстановления общего содержания микрофлоры в кишечнике белых мышей под влиянием перорального введения нативных культур гомопробиотических микроорганизмов в 40–60 раз выше, чем в контроле. При этом необходимо подчеркнуть следующее: достаточно удалить из нативных культур центрифугированием клеточный компонент, как скорость восстановления кишечной микрофлоры возрастает еще примерно в 100–150 раз (итого до 6500 раз по отношению к контролю).

Таким образом, наличие живых пробиотических бактериальных клеток в «жидком пробиотическом комплексе» явно отрицательно сказывается на восстановлении кишечной микрофлоры при дисбиозе. В случае же с инактивированными микробными клетками, что может происходить в реальных условиях под воздействием агрессивных эндогенных факторов желудочно-кишечного тракта [25, 35–37], четко прослеживается угнетение восстановления кишечной микрофлоры: скорость восстановления микрофлоры в 10–300 раз меньше, чем в контроле.

Выявленная тенденция прослеживается и при анализе результатов, представленных в таблицах 5 и 6. Нативные культуры, введенные перорально экспериментальным животным с антибиотико-ассоциированным дисбактериозом, увеличивают скорость восстановления лактобактерий, бифидобактерий и эшерихий по сравнению с контролем в 4,8–33,1 раза. Надосадочная жидкость, лишенная клеточных элементов после центрифугирования, при пероральном введении экспериментальным животным ускоряет восстановление числа представителей нормальной микрофлоры (лактобактерий, бифидобактерий и эшерихий) по сравнению с контролем в широком диапазоне от 64,6 до 5385 раз в зависимости от вида бактерий индигенной микрофлоры.

Нативные лактобактерии и бифидобактерии, выделенные из «жидких пробиотических комплексов», а также те же, но инактивированные бактерии, не являются стимуляторами восстановления численности представителей собственной микрофлоры кишечника.

Представленные в таблицах 4–6 результаты дают основание полагать, что наиболее существенное положительное влияние на восстановление кишечной микрофлоры конвенциональных белых мышей с антибиотико-ассоциированным дисбактериозом оказывает надосадочная жидкость, освобожденная от клеточных элементов лактобактерий и бифидобактерий в процессе центрифугирова-

ния нативных культур *L. plantarum* и *B. bifidum* («жидких пробиотических комплексов» на основе гомопробиотических микроорганизмов).

Зафиксированный положительный эффект, состоящий в стимуляции восстановления нормальной микрофлоры кишечника белых мышей с антибиотико-ассоциированным дисбактериозом, может быть отнесен на счет экзометаболитов, накапливающихся в культуральной среде в процессе роста и размножения *L. plantarum* и *B. bifidum* при оптимальных микроаэрофильных условиях.

Обсуждение полученных результатов

Недостаточная убедительность эффективности современных пробиотических препаратов, а также наличие побочных проявлений со стороны организма в ходе приема пробиотиков, приводят к снижению интереса к бактериотерапии [38] и даже ставят под сомнение целесообразность использования живых пробиотических микроорганизмов [11, 38].

Одной из главных причин недостаточной эффективности пробиотиков является чужеродность для человека входящих в их состав микроорганизмов, высокая видовая, индивидуальная и анатомическая специфичность аутохтонной микрофлоры пациента. Выращенные искусственно, пробиотические микроорганизмы являются чужеродными и отторгаются вследствие биологической несовместимости [13, 20, 21, 39, 40].

Однако, современная наука не исключает пробиотики из арсенала средств лечения дисбактериозов. Более того, в комплексной терапии острых кишечных инфекций для своевременной и эффективной коррекции дисбиотических нарушений особое место отводится сочетанному использованию пробиотических и пребиотических препаратов [40].

С учетом недостатка данных о механизмах пробиотической эффективности сертифицированных препаратов, постоянно уточняются знания о функциональной активности пробиотических микроорганизмов и свойствах их экзометаболитов. Так, относительно недавно были опубликованы экспериментальные данные, касающиеся выраженного увеличения активности *E. faecalis* и *B. subtilis* после добавления компонентов клеточной стенки *S. aureus* в среду культивирования, а также стимуляции пробиотической активности *E. coli* M17 после обработки ее экзометаболитами стафилококка [41].

Разработан и запатентован комплексный обогатитель пищевых продуктов на основе нативных культур пробиотических микроорганизмов – представителей нормальной микрофлоры человека, из которых центрифугированием удалены клетки микроорганизмов [42]. Полученный продукт характеризуется наличием таких основных экзометаболитов, как экзополисахариды, органические кислоты и витамины группы В, которые активно участвуют в усвоении макро- и микронутриентов.

Лактобактерии *L. plantarum* пробиотика Лактобактерин, а также бифидобактерии и энтерококки (*B. longum*, *E. faecium*) пробиотика Бифиформ обнаружили свойства микробных стимуляторов бактериального антагонизма, который осуществляется за счет экзометаболитов и пептидогликана бактериальных клеток исследуемых видов [43]. Микробное распознавание «свой-чужой» в условиях кишечного микросимбиоза человека определяется экзометаболитами микросимбионтов. При этом экзометаболиты индигенных и транзиторных эшерихий по-разному распознаются доминантными бифидобактериями [44].

Низкомолекулярные экзометаболиты *E. coli* M17 и аутоstimуляторы ускоряют рост естественных симбионтов человека – *B. adolescentis* MC-42, *L. acidophilus* A-91 в 10–15 раз, увеличивают их антагонистическую актив-

ность, что послужило основанием для разработки общей схемы получения новых пробиотиков на основе аутоимуляторов роста нормальной микрофлоры кишечника человека [45].

Очевидно, что описанные положительные эффекты компонентов клеточной оболочки микроорганизмов и их экзометаболитов могут быть объяснены тем, что продукты жизнедеятельности микроорганизмов и структурные компоненты клеточной стенки характеризуются высокой питательной активностью и биоусвояемостью [42] и сообщают дополнительные преимущества полезной микрофлоре кишечника [23].

Таким образом, истинная конструктивность идеи пробиотического и лечебного применения пробиотиков, по-видимому, стала наполняться новым содержанием [10]. Именно с этой точки зрения следует оценивать полученные нами результаты. Сами по себе гомопробиотические лактобактерии и бифидобактерии, выделенные от белых мышей линии BALB/c, по своему происхождению не являются чужеродными для конвенциональных белых мышей и поэтому способны приживаться в биоупленке их кишечника.

Получение на основе гомопробиотических лактобактерий и бифидобактерий жидких нативных культур («жидких пробиотических комплексов») позволило в

Таблица 4.

Влияние нативных культур гомопробиотических лактобактерий и бифидобактерий на скорость восстановления кишечной микрофлоры в целом у конвенциональных белых мышей с антибиотико-ассоциированным дисбактериозом				
Нативные культуры и их компоненты, введенные per os	Скорость увеличения общего количества кишечной микрофлоры соответственно вводимому пробиотическому микроорганизму ...			
	L. plantarum		B. bifidum	
	КОЕ · г ⁻¹ · сут ⁻¹	Кратность к контролю	КОЕ · г ⁻¹ · сут ⁻¹	Кратность к контролю
Нативная культура («жидкий пробиотический комплекс»)	4,1 · 10 ⁵	41,4	6,8 · 10 ⁵	61,8
Нативные живые клетки	1,1 · 10 ⁴	1,1	7,2 · 10 ³	0,7
Инактивированные клетки	1,1 · 10 ³	0,1	3,6 · 10 ²	0,03
Надосадочная жидкость	6,5 · 10 ⁷	6566	6,9 · 10 ⁷	6273
Жидкая питательная среда (контроль)	9,9 · 10 ³	1	1,1 · 10 ⁴	1
Биоряженка «Целебная радуга» (контроль)	3,6 · 10 ⁵	36,4	3,5 · 10 ⁵	31,8

Таблица 5.

Влияние нативных культур гомопробиотических лактобактерий L. plantarum на скорость восстановления отдельных представителей кишечной микрофлоры у конвенциональных белых мышей с антибиотико-ассоциированным дисбактериозом						
Нативные культуры и их компоненты, введенные per os	Скорость восстановления индигенных микроорганизмов...					
	Бифидобактерии		Лактобактерии		Эшерихии	
	КОЕ · г ⁻¹ · сут ⁻¹	Кратность к контролю	КОЕ · г ⁻¹ · сут ⁻¹	Кратность к контролю	КОЕ · г ⁻¹ · сут ⁻¹	Кратность к контролю
Нативная культура («жидкий пробиотический комплекс»)	5,8 · 10 ³	4,8	4,3 · 10 ⁴	33,1	3,5 · 10 ²	31,8
Нативные живые клетки	2,0 · 10 ²	0,2	3,5 · 10 ³	2,7	6,2 · 10 ¹	5,6
Инактивированные клетки	0,21 · 10 ¹	0,002	- 6,4 · 10 ¹	—	0,16 · 10 ¹	0,15
Надосадочная жидкость	5,4 · 10 ⁵	450	7,0 · 10 ⁶	5385	7,1 · 10 ²	64,6
Жидкая питательная среда (контроль)	1,2 · 10 ³	1	1,3 · 10 ³	1	1,1 · 10 ¹	1
Биоряженка «Целебная радуга» (контроль)	1,4 · 10 ³	1,2	2,0 · 10 ⁴	15,4	1,1 · 10 ²	10,0

Таблица 6.

Влияние нативных культур гомопробиотических бифидобактерий B. bifidum на скорость восстановления отдельных представителей кишечной микрофлоры у конвенциональных белых мышей с антибиотико-ассоциированным дисбактериозом						
Нативные культуры и их компоненты, введенные per os	Скорость восстановления индигенных микроорганизмов...					
	Бифидобактерии		Лактобактерии		Эшерихии	
	КОЕ · г ⁻¹ · сут ⁻¹	Кратность к контролю	КОЕ · г ⁻¹ · сут ⁻¹	Кратность к контролю	КОЕ · г ⁻¹ · сут ⁻¹	Кратность к контролю
Нативная культура («жидкий пробиотический комплекс»)	6,1 · 10 ³	5,6	3,7 · 10 ⁴	24,7	1,4 · 10 ²	11,7
Нативные живые клетки	1,5 · 10 ²	0,1	2,4 · 10 ³	1,6	1,7 · 10 ¹	1,4
Инактивированные клетки	0,14 · 10 ¹	0,001	1,4 · 10 ¹	0,01	0,23 · 10 ¹	0,19
Надосадочная жидкость	6,9 · 10 ⁵	627	4,4 · 10 ⁶	2933	8,6 · 10 ²	71,7
Жидкая питательная среда (контроль)	1,1 · 10 ³	1	1,5 · 10 ³	1	1,2 · 10 ¹	1
Биоряженка «Целебная радуга» (контроль)	1,2 · 10 ³	1,1	2,2 · 10 ⁴	14,7	1,1 · 10 ²	9,2

опытах на конвенциональных белых мышах с антибиотико-ассоциированным дисбактериозом выявить вклад как нативных культур, так и отдельных их компонентов (нативных и инактивированных микробных клеток, надосадочной жидкости, жидкой питательной среды) в восстановление кишечной микрофлоры.

В обобщенном виде восстановление кишечной микрофлоры выглядит следующим образом. Надосадочная жидкость нативных культур лактобактерий и бифидобактерий оказывает наиболее выраженное стимулирующее действие на кишечную микрофлору, обеспечивая по сравнению с дисбиотическим состоянием увеличение общего содержания микроорганизмов в 1 г фекалий на 4 порядка, а бифидобактерий, лактобактерий и эшерихий — на 3-4 порядка. При этом скорость восстановления общего содержания микрофлоры в кишечнике животных под влиянием перорального введения надосадочной жидкости относительно контроля увеличивается до 6500 раз. Аналогичный стимулирующий эффект надосадочной жидкости установлен и в отношении восстановления численности лактобактерий, бифидобактерий и эшерихий собственной кишечной микрофлоры.

В меньшей степени стимулирующий эффект на рост собственной микрофлоры кишечника выявлен у нативных культур и нативных клеток лактобактерий и бифидобактерий (соответственно, на два и один порядок в сравнении с дисбиотическим состоянием на фоне введения гентамицина или по величине скорости восстановления общего содержания кишечной микрофлоры соответственно в 41,4–61,8 и 0,7-1,1 раза по сравнению с контролем). Инактивированные лактобактерии и бифидобактерии не оказывают положительного влияния на восстановление кишечной микрофлоры.

Жидкая питательная среда по оказываемому эффекту сравнима с нативными живыми клетками лактобактерий и бифидобактерий: скорость увеличения общего содержания кишечной микрофлоры под влиянием нативных лактобактерий и бифидобактерий превышает контроль соответственно в 1,1 и 0,7 раза.

Кисломолочный продукт биоразженка «Целебная радуга», содержащий лактобактерии и бифидобактерии, по эффективности восстановления собственной кишечной микрофлоры (в том числе скорости увеличения количества кишечной микрофлоры) белых мышей сравним с нативными культурами гомопробиотических лактобактерий и бифидобактерий, но уступает по этим показателям надосадочной жидкости.

Таким образом, в прямых опытах на конвенциональных белых мышах с экспериментальным антибиотико-ассоциированным дисбактериозом впервые установлено, что основной вклад в эффективность пробиотических препаратов вносят продукты жизнедеятельности микроорганизмов — экзосомы, а микробные клетки, их продуцирующие, не участвуют в восстановлении микробиоценоза кишечника.

Кроме того, чужеродные микробные клетки являются для макроорганизма мощной антигенной и аллергенной нагрузкой, выделяя при разрушении токсические субстанции (эндотоксин — ЛПС в случае грамотрицательных бактерий), что может привести к усугублению нарушений микробиоценоза кишечника и возникновению сопутствующих заболеваний [12, 46].

Можно без преувеличения говорить о том, что полученные результаты являются основой для экспериментально обоснованной разработки новых пробиотических препаратов, в состав которых войдут экзосомы микроорганизмов.

В связи с этим открывается перспектива исследований, связанных с разработкой регламентированных питательных сред, обеспечивающих при выращивании пробиотических микроорганизмов выработку и накопление в культуральной среде тех или иных экзосом, проявляющих максимальную эффективность в коррекции дисбиотических нарушений в кишечнике.

Документальное подтверждение значения микробных экзосом, активно участвующих в восстановлении кишечной микрофлоры макроорганизма при различных дисбиотических состояниях, дает мощный импульс к развитию новых уникальных технологий выделения из бесклеточных фильтратов или супернатантов биологически активных экзосом, перспективных для конструирования нового класса пробиотических препаратов, лишенных ряда недостатков, присущих современным пробиотикам и в целом пробиотикотерапии.

Очевидно, что эти пробиотические препараты будут характеризоваться возросшей эффективностью при существенном снижении антигенной и аллергизирующей нагрузки на макроорганизм. Исчезнет необходимость в поддержании субнормальных температур для сохранения жизнеспособности микроорганизмов, на основе которых создаются современные пробиотики, что может повлиять на сроки хранения новых препаратов в сторону их увеличения. В конечном итоге появится возможность качественной стандартизации разрабатываемых пробиотиков на основе экзосом по норме суточного потребления не живых микроорганизмов, а биологически активных химических соединений.

Выводы

1. Из кишечного содержимого белых мышей линии BALB/c выделены чистые культуры гомопробиотических лактобактерий (*L. plantarum*) и бифидобактерий (*B. bifidum*), изучены их свойства и способность расти в жидкой питательной среде на основе ферментативного гидролизата мяса с добавлением дрожжевого экстракта, солей и стимуляторов роста.

2. Получены нативные культуры гомопробиотических лактобактерий и бифидобактерий («жидкие пробиотические комплексы») с концентрацией $2,6 \cdot 10^9$ КОЕ \cdot мл⁻¹ и $8,1 \cdot 10^8$ КОЕ \cdot мл⁻¹ соответственно, использованные для сравнительной оценки эффективности самих нативных культур и их компонентов в коррекции нарушений микробиоценоза кишечника конвенциональных белых мышей с антибиотико-ассоциированным дисбактериозом.

3. Наиболее существенное положительное влияние на восстановление кишечной микрофлоры конвенциональных белых мышей оказывает надосадочная жидкость, освоенная центрифугированием нативных культур от клеток лактобактерий и бифидобактерий.

4. Скорость восстановления общего содержания микрофлоры в кишечнике животных под воздействием перорального введения надосадочной жидкости относительно контроля возрастает до 6500 раз. Аналогичный стимулирующий эффект надосадочной жидкости установлен и в отношении восстановления численности лактобактерий, бифидобактерий и эшерихий собственной кишечной микрофлоры животных.

5. Полученные результаты являются научной базой экспериментально обоснованной разработки биотехнологий нового класса стандартизованных пробиотических препаратов на основе биологически активных микробных экзосом, лишенных ряда недостатков, присущих современным пробиотическим препаратам, содержащим живые, в том числе лиофилизированные микроорганизмы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Воробьев А.А., Абрамов Н.А., Бондаренко В.М., Шендеров Б.А. Дисбактериозы – актуальная проблема медицины. Вестн РАМН 1997; (3): 4-7.
2. Бондаренко В.М., Петровская В.Г. Ранние этапы развития инфекционного процесса и двойственная роль нормальной микрофлоры. Вестн РАМН 1997; (3): 7-10.
3. Парфенов А.И. Клинические проблемы дисбактериоза. Рос гастроэнтерол журнал 1999; (4): 49-55.
4. Воробьев А.А., Бондаренко В.М., Лыкова Е.А., Григорьев А.В., Машуевич Т.М. Микробиологические нарушения при клинической патологии и их коррекция бифидосодержащими пробиотиками. Вестн РАМН 2004; (2): 13-17.
5. Маев И.В., Самсонов А.А. Терапевтическая тактика при синдроме избыточного бактериального роста в тонкой кишке. Consilium medicum 2008; 9(7): 44-50.
6. Tillman R., King C., Toskes P. Continued experience with the xylose breath test: Evidence that the small bowel culture as a gold standart for bacterial overgrowth may be tarnished. Gastroenterology 1981; 80: 1304
7. Минушкин О.Н., Ардатская М.Д., Зверков И.В., Чичерин И.Ю. Дисбактериоз кишечника (понятие, диагностика, принципы лечебной коррекции). Современные возможности пребиотической терапии: учебно-методическое пособие для врачей и курсантов циклов усовершенствования врачей; М: ФГУ «Учебно-научный медицинский центр» Управления делами Президента Российской Федерации; 2010; 50 с.
8. Отраслевой стандарт «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника» (ОСТ 91599.11.0004-2003), утвержден приказом № 231 МЗ РФ от 09.06.2003 г. М: 2003.
9. Грачева Н.М., Ардатская М.Д., Аваков А.А., Соловьева А.И. Сравнительная оценка клинико-лабораторной эффективности современных про- и пребиотических препаратов в коррекции дисбиотических нарушений желудочно-кишечного тракта: отчет о клинико-лабораторном исследовании; М: Московский НИИЭМ им. Г.Н. Габричевского, 2010; 23 с.
10. Lebenthal E., Lebenthal Y. Пробиотики: концепция лечебного применения, ожидающая своего признания. Журн микробиол 2003; (4): 88-90.
11. Шендеров Б.А., Манвелова М.А. Пробиотики и функциональное питание. Микробиологические аспекты. Пробиотики и пробиотические продукты в профилактике и лечении наиболее распространенных заболеваний человека. Материалы Всероссийской конференции с международным участием; 21-23 апреля 1999 г; М: 1999; с. 23-24.
12. Шендеров Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание: в 3 т. Том 3: Пробиотики и функциональное питание; М: Издательство ГАРАНТЪ, 2001; 289 с.
13. Долинов К.Е. Основы технологии сухих биопрепаратов. М: Медицина 1969; с. 152-219.
14. Малахов Ю.А. Пробиотики и пробиотические продукты в профилактике и лечении наиболее распространенных заболеваний человека. Материалы Всероссийской конференции с международным участием; 21-23 апреля 1999 г; М: 1999; с. 110.
15. Козьминых Ю.В., Малков А.В., Марков А.В. Подбор и конструирование питательных сред для производства жидких пробиотиков. Сборник материалов Международной научно-практической конференции, посвященной памяти Г.И. Гончаровой «Пробиотические микроорганизмы – современное состояние вопроса и перспективы использования»; Москва: 2002; с. 77-78.
16. Глушанова Н.А. Экспериментальное обоснование новых подходов к коррекции микробиоценоза кишечника: дис. д-ра мед. наук: защищена в 2006 г. М: 2006; 260 с.
17. Ефимов Б.А. Дисбактериозы кишечника и их коррекция кисломолочными продуктами, приготовленными с использованием индигенных микроорганизмов: автореф. дис. канд. мед. наук: защищена в 1993 г. М.: 1993; 24 с.
18. Петров Л.Н. Витафлор. Бактериальный препарат нового поколения для лечения и профилактики дисбактериозов. СПб: Санкт-Петербургская торгово-промышленная палата, 2003; 68 с.
19. Суворов А.Н. Дисбактериоз с позиций современной медицинской микробиологии. Тезисы докладов научной конференции «Актуальные проблемы дисбактериозов» Барнаул, 1997; с. 3-8.
20. Вахитов Т.Я., Момот Т.Н., Шалаева О.Н., Петров Л.Н. Состав и биологическая активность экзометаболических Escherichia coli M-17. Журн микробиол 2003; (6): 20-25.
21. Lankford C.E., Walker V.R., Reeves V.B., Nabbut N.H., Byers B.R. Inoculum-dependent division lag of Bacillus cultures and its relation to an endogenous factors («schizokinen») J Bacteriol 1966; 57(3): 620-626.
22. Larkin M. Probiotics strain for credibility Lancet 1999; 354 (9193): 1884.
23. Захаренко С.М., Фоминых Ю.А., Мехтиев С.Н. Инфекции, микробиота кишечника человека и метаболический синдром. Эффективная фармакотерапия Гастроэнтерология 2011; 3: 14-20.
24. Коршунов В.М., Смянов В.В., Ефимов Б.А. Рациональные подходы к проблеме коррекции микрофлоры кишечника. Вестн РАМН 1966; (2): 60-65.
25. Дармов И.В., Чичерин И.Ю., Погорельский И.П., Лундовских И.А., Дурнев Е.А. Выживаемость микроорганизмов пробиотиков в желудочно-кишечном тракте экспериментальных животных. Журн инфектологии 2012; 4 (1): 68-74.
26. Панин А.Н., Малик Н.И. Селекция штаммов для изготовления пробиотика ветеринарного назначения. Пробиотики, пребиотики, синбиотики и функциональные продукты питания. Современное состояние и перспективы. Сборник материалов международной научной конференции; 2-4 июня 2004 г; М: 2004; с. 18-10.
27. Заявка на выдачу патента РФ. Способ моделирования дисбактериоза кишечника у лабораторных животных. И.В. Дармов, И.Ю. Чичерин, И.П. Погорельский, И.А. Лундовских; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВПО «Вятский государственный университет», № 2011149501/17 (074291); заявл. 15.12.2011.
28. Каширская Н.Ю. Значение пробиотиков и пребиотиков в регуляции кишечной микрофлоры. Русский мед. журн. 2000. Т. 8 (№ 13-14). С. 572-575.
29. Potter M. History of the BALB/c family. The BALB/c mouse: Genetic and Immunology. Cur Top Microbiol Immunol 1985; 122: 1-15.
30. Иванов В.П., Бойцов А.Г., Коваленко А.Д., Ластовка О.Н., Нилова Е.А. Совершенствование методов диагностики дисбактериоза толстого кишечника: информационное письмо. СПб: Центр госсанэпиднадзора, 2002; 31 с.
31. Лихачева А.Ю., Бондаренко В.М., Соколова К.Я. Современное состояние вопроса таксономии бактерий рода Lactobacillus. Журн микробиол 1992; (9-10): 74-78.
32. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л: Медгиз, 1962; 280 с.
33. Определитель бактерий Берджи: Девятое издание в 2 т. Т.2. Под ред Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уилльямса. Пер. с англ. под ред. Г.А. Заварзина; М: Мир, 1997; 368 с.
34. Заявка на выдачу патента РФ. Способ оценки воздействия экзогенных факторов на микрофлору кишечника. И.В. Дармов, И.Ю. Чичерин, И.П. Погорельский, И.А. Лундовских, С.Н. Янов; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВПО «Вятский государственный университет», № 2012101059/17 (001468); заявл. 11.01.2012.
35. Дармов И.В., Чичерин И.Ю., Погорельский И.П., Лундовских И.А. Выживаемость микроорганизмов пробиотиков в условиях in vitro, имитирующих процесс пищеварения у человека. Эксп клин гастроэнтерол 2011; (3): 6-11.
36. Дармов И.В., Чичерин И.Ю., Ердякова А.С., Погорельский И.П., Лундовских И.А. Сравнительная оценка выживаемости микроорганизмов пробиотиков в составе коммерческих препаратов в условиях in vitro. Эксп клин гастроэнтерол 2011; (9): 96-101.
37. Чичерин И.Ю., Дармов И.В., Погорельский И.П., Лундовских И.А., Гаврилов К.Е. Выживаемость бифидобактерий и лактобактерий в условиях in vitro в желудочном соке и дуоденальном содержимом людей. Журн инфектологии 2012; (1): 57-59.
38. Probiotics: a critical review. Ed. Tannok G.W. Wymondham (United Kingdom): Horizont Scientific press, 1999.
39. Вахитов Т.Я., Яшина О.Ю., Петров Л.Н., Королюк А.М. Изучение действия препарата аутоиммуляторов роста Escherichia coli M-17 (препарат «Актофлор») на рост чистых и смешанных культур бактерий. Журн микробиол 2000; (3): 88-90.
40. Токарева Н. Коррекция и профилактика дисбактериоза. Эффективная фармакотерапия Гастроэнтерология 2011; (3): 77-85.
41. Семенов А.В. Способ повышения антагонистической активности бактерий. Вестник ОГУ. 2007; (6): 100-103.
42. Патент РФ 2397246 С1 Комплексный обоганитель пищевого продукта. Б.А. Шендеров, Я.В. Иванова, И.М. Сорокина. Патентообладатель ООО «Бактотех», Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, РОСНАУКА. заявка: 2009123993/13, 24.06.2009, опубл. 20.08.2010.
43. Семенов А.В. Условия выявления микробной стимуляции антагонистической активности пробиотиков. Вестник ОГУ 2009; (12): 115-117.
44. Бухарин О.В., Перунова Н.П. Микробное распознавание «своей-чужой» в условиях кишечного микросимбиоза человека. Журн микробиол 2011; (6): 46-51.
45. Вахитов Т.Я., Петров Л.Н. Биотехнология: разработка новых пребиотиков на основе аутоиммуляторов роста нормальной микрофлоры человека (цитировано 22.02.12). Адрес доступа: aidsconference.spb.ru/cgi-bin/sort.pl?ses=10&abs=3&year=5&ang=rus.
46. Salminen M.K., Rautelin H., Tynkynen S., Poussa T., Saxelin M., Valtonen V., Jarvinen A. Lactobacillus bacteremia, species, identification, and antimicrobial susceptibility of 85 blood isolates. Clin Infect Dis 2006; 42: 35-44.