

АУТОПРОБИОТИКОТЕРАПИЯ

И.Ю. Чичерин¹, И.П. Погорельский², И.А. Лундовских², К.Е. Гаврилов², М.Р. Шабалина²,
И.В. Дармов²

¹ Научное общество «Микробиота», Сергиев Посад

² Вятский государственный университет, Киров

Autoprobiotic therapy

I.Yu. Chicherin¹, I.P. Pogorelsky², I.A. Lundovskikh², K.E. Gavrilov², M.R. Shabalina², I.V. Darmov²

¹Scientific Society «Microbiota», Sergiev Posad

²Vyatka State University, Kirov

Резюме. Представлены результаты экспериментального изучения выживаемости и приживаемости аутологических штаммов (аутоштаммов) бифидобактерий и лактобактерий в кишечнике конвенциональных белых мышей и морских свинок, а также результаты оценки эффективности использования выделенных аутоштаммов бифидобактерий и лактобактерий при коррекции микрoэкологических нарушений в кишечнике животных с антибиотико-ассоциированным дисбактериозом.

В экспериментах использовали аутоштаммы бифидобактерий и лактобактерий, выделенные из кишечного содержимого конвенциональных белых мышей и морских свинок, а также рифампициноустойчивые производные выделенных бактериальных аутоштаммов.

Установлено, что рифампициноустойчивые производные аутоштаммов бифидобактерий и лактобактерий сохраняют видовую принадлежность и наследственно закрепленный признак антибиотикорезистентности. Введенные перорально погопытным животным аутоштаммы бифидобактерий и лактобактерий не приживаются в кишечнике и элиминируются к 4-м суткам после прекращения введения.

Аутоштаммы бифидобактерий и лактобактерий практически не оказывают влияние на восстановление кишечной микробиоты у погопытных животных с антибиотико-ассоциированным дисбактериозом, в отличие от метаболитов лактобактерий и пребиотика Стимбифид, эффективно восстанавливающих кишечную микробиоту в сжатые сроки.

Ключевые слова: пробиотик, пребиотик, метабитик, микробиота, дисбактериоз, аутоштаммы, белые мыши, морские свинки, аутопробиотикотерапия.

Введение

Проблема эффективности пробиотикотерапии нашла свое отражение во многих публикациях, содержащих результаты клинико-лабораторных и экспериментальных исследований пробиотических препаратов. Одной из причин отсутствия или низкой эффективности пробиотиков является их чужеродность по отношению к микроорганизмам кишечной микробиоты [1, 2].

Abstract. The results are presented of the experimental study of survival rates of autologous bifidobacteria and lactobacilli strains (autostrains) in the intestines of conventional white mice and guinea pigs, as well as an assessment of the effectiveness of the use of isolated bifidobacteria and lactobacilli autostrains in the correction of microecological disorders in the intestines of animals with antibiotic-associated dysbacteriosis.

Bifidobacteria and lactobacilli autostrains isolated from intestinal contents of conventional white mice and guinea pigs, as well as rifampicin-resistant derivatives of isolated bacterial autostrains were used in the experiments.

It is found that rifampicin-resistant derivatives of bifidobacteria and lactobacilli autostrains retain species and genetically fixed sign of antibiotic resistance. Administered orally to experimental animals, autostrains of bifidobacteria and lactobacilli do not survive in the intestines of animals and are eliminated to 4 days after cessation of administration.

Bifidobacteria and lactobacilli autostrains exert virtually no influence on the recovery of the intestinal microbiota in experimental animals with antibiotic-associated dysbacteriosis unlike lactobacilli metabolites and prebiotic Stimbid, efficiently restoring intestinal microbiota in a short time.

Key words: probiotic, prebiotic, metabiotic, microbiota, dysbacteriosis, autostrains, white mice, guinea pigs, autoprobiotic therapy.

Под чужеродностью (гетерологичностью) понимают «особенность» микроорганизмов по происхождению, а потому по структуре и другим качественным характеристикам, включающим видовую, индивидуальную и анатомическую специфичность. Выращенные на искусственных питательных средах пробиотические микроорганизмы приобретают индивидуальную и анатомическую специфичность и в виде чистой культуры попадают в кишечник па-

циента, в биопленке микробно-тканевого комплекса которого все обстоит по-другому [2, 3].

По-иному протекают физиологические процессы, по-иному идет синтез метаболитов, биологически активных соединений и т.д. Трофические, энергетические и иные связи между микроорганизмами внутри микробно-тканевого комплекса, а также связи с внешним миром, генетически детерминированы. Поведенческий код определяет четкие иерархические взаимоотношения внутри биопленки, получившие специальное определение как социальное поведение микроорганизмов (quorum sensing).

Динамичная, саморазвивающаяся система микробного сообщества строго подчиняется экологическому закону системно-динамической комплементарности (закону баланса консервативности и изменчивости). Согласно закону, любая саморазвивающаяся система состоит из двух рядов структур (подсистем), один из которых сохраняет и закрепляет её строение и функциональные особенности, а другой способствует видоизменению и даже саморазрушению системы с образованием новой функционально-морфологической специфики, как правило, соответствующей обновляющейся среде существования системы [4].

Система биопленки кишечника довольно жесткая, и чем жестче организована система (у здорового человека), тем сильнее в ней механизмы консервации, прямолинейней и непосредственней их действие. Безусловно, таким сообществом трудно управлять извне: лечить, восстанавливать нарушенное равновесие. Коллективный иммунитет биопленки сводит на нет идею коррекции дисбиотических нарушений пробиотиками [1, 2].

Отсутствие приживаемости пробиотических микроорганизмов [5] является косвенным доказательством существования микробиоты кишечника человека как самостоятельного органа: эта структура, похожая на ткань высших организмов, получила в научной литературе название «парацитологической системы» [2, 3].

Уже на протяжении более 40 лет у нас в стране и за рубежом для коррекции микрoэкологических нарушений в кишечнике используются пробиотики — препараты на основе живых микробов. Однако осознание экологической и функциональной маргинальности пробиотических микроорганизмов пришло совсем недавно [6], что, впрочем, пока не стало общепризнанным.

В рамках исследований по реализации концепции пробиотикотерапии проводятся работы на новом уровне по обоснованию использования в качестве пробиотиков аутоштаммов микроорганизмов (аутопробиотиков) кишечной микробиоты [7–13].

Авторы данного научного направления считают, что коммерческие пробиотические препараты являются биотехнологическими, поскольку вы-

ращены на искусственных питательных средах и, таким образом, являются инородными для организма определенного человека и отторгаются вследствие биологической несовместимости [11]. Кроме того, они могут вызывать дисбаланс в микробном консорциуме кишечной микробиоты вследствие антагонизма пробиотических микроорганизмов с представителями кишечной микробиоты [7, 8]. Постулируется, что уже при рождении у ребенка формируется «иммунологическая толерантность» к микроорганизмам кишечной микробиоты [7–9].

Таким образом, по мнению авторов [7–13], необходимо индивидуализировать подход к выбору пробиотиков для конкретного лица, что предполагает отбор и хранение в специфических условиях аутопробиотических микроорганизмов, начиная с первых дней жизни человека — будущего реципиента аутопробиотиков, с периодической заменой их в криобанке.

С этой целью разработаны способы получения аутопробиотиков на основе живых бифидобактерий и лактобактерий [10], энтерококков [12], а также способ индивидуального подбора пробиотических препаратов, содержащих бифидобактерии и/или лактобактерии для элиминации условно-патогенных микроорганизмов из организма людей [13].

Предложен также способ получения банка аутохтонных штаммов микроорганизмов для восстановления кишечного микробиоценоза человека [11], который авторы изобретения предлагают создавать, начиная с 7–15-го дня после рождения, периодически (не чаще 1 раза в год) пополняя его образцами микроорганизмов в течение всей жизни.

Следует, однако, отметить, что из четырех отмеченных разработок по проблеме аутопробиотикотерапии, на которые выданы патенты, статус действующих сохранен только у двух [10, 11], то есть разработки, по существу, не востребованы. И только при лечении вагинозов была предпринята попытка практического воплощения концепции пробиотикотерапии, хотя в исследованиях В.А. Мельникова и соавт. [14] было установлено, что бактериальные аутопробиотики на основе лактобацилл, предназначенные для восстановления нормобиоценоза влагалища женщины, не оправдали надежд.

Таким образом, можно заметить явное изменение взгляда на пробиотикотерапию: во-первых, примирение с фактом гетерогенности пробиотических микроорганизмов для микробиоты кишечника и с необходимостью восстановления дефицита микроорганизмов кишечной микробиоты при дисбактериозе соответствующими по видовому составу аутопробиотическими микроорганизмами. А во-вторых, несмотря на эволюцию взглядов на пробиотикотерапию в целом, нет доказательной базы эффективности применения аутологических

штаммов для коррекции микробиологических нарушений в кишечнике.

Более того, концепция пробиотикотерапии продолжает развиваться в рамках космического эксперимента «Пробиовит». Ведется разработка простой и удобной (по мнению разработчиков) технологии (планируемой к осуществлению на борту космического корабля) получения активного лечебно-профилактического продукта (но не препарата!), обладающего иммуномодулирующими свойствами [15].

Предварительными исследованиями в рамках проекта «Биоэмульсия» показана возможность получения на борту международной космической станции кисломолочного продукта на основе лактобацилл (*L. acidophilus*), обладающего необходимыми пробиотическими свойствами, такими как биологическая активность, антагонизм, способность к кислотообразованию и антибиотикоустойчивость.

В то же время вопрос о создании на основе результатов космического эксперимента «Биоэмульсия» малостадийной технологии эмульсионного культивирования микроорганизмов остался открытым. Следует подчеркнуть, что в этих исследованиях не было проведено изучение влияния созданного продукта на восстановление микробиоты, хотя, как было показано в прямых экспериментах, кисломолочный продукт уступает метаболитам пробиотических микроорганизмов по эффективности восстановления микробиоты кишечника [16].

С учетом того, что число выполненных исследований в плане применения аутоштаммов в качестве индивидуального лечебно-профилактического средства невелико, заслуживает внимания работа специалистов ГНЦ РФ «Институт медико-биологических проблем» РАН [17].

В ходе семилетнего цикла исследований активности пробиотических препаратов, созданных на основе аутоштаммов лактобацилл, энтерококков и бифидобактерий, предназначенных для коррекции дисбиотических состояний кишечника и слизистых оболочек у лиц, находящихся в измененных условиях обитания, специалисты Института пришли к выводу о необходимости периодического пополнения дефицита микроорганизмов собственной микробиоты кишечника у людей с высоким риском профессиональных болезней за счет аутоштаммов, предварительно выделенных и сохраненных для целей профилактики и лечения дисбактериозов [17].

Признавая, что активность пробиотических препаратов, основанных на традиционных коллекционных штаммах микроорганизмов, в первую очередь определяется их приживаемостью, авторы, тем не менее, не изучили этот вопрос ни на пациентах, ни в эксперименте на животных. В цитируемой работе [17] нет сведений о биологических свойствах аутоштаммов, их совместимости с ки-

шечной микробиотой, о дальнейшей судьбе аутоштаммов в организме хозяина, их чувствительности к антибактериальным препаратам, наконец, нет данных о том, что же лежит в основе благоприятных эффектов аутопробиотиков — сами микроорганизмы или же их метаболиты.

Как свидетельствуют сами авторы работы [17], большинство аутоштаммов не содержат генов патогенности и, естественно, не способны вызывать заболевание. К тому же, выделенные от практически здоровых людей (волонтеров), они не нуждаются в замене, поскольку в обновляющейся биопленке они естественным образом будут воспроизводиться.

Поэтому непонятно, почему аутопробиотики, выделенные от практически здоровых людей, относящихся к группам лиц с высоким риском профессиональных болезней, были названы средством профилактики инфекционно-воспалительных заболеваний у человека в искусственной среде обитания и в экспериментах по длительной изоляции «МАРС-500» [17]: искусственная среда есть, но инфекционно-воспалительные заболевания у обследованных лиц с сопутствующими дисбактериозами, для профилактики и лечения которых собственно предназначались аутоштаммы микроорганизмов, отсутствуют.

Можно резюмировать, что в цитируемой работе нет теоретического и экспериментального обоснования применения аутологичных штаммов, выделенных из естественных биотопов лиц, относящихся к группам с высоким риском профессиональных болезней, в качестве эффективного средства профилактики инфекционно-воспалительных заболеваний и дисбиотических состояний у людей, в том числе находящихся в искусственной среде обитания.

Тем не менее, проведенные исследования в указанном направлении имеют определенное значение для понимания взаимоотношений пробиотических (аутопробиотических) микроорганизмов с представителями кишечной микробиоты в составе микробно-тканевого комплекса, хотя сами исследования нуждаются в определенной финансовой поддержке.

К примеру, медицинский центр по оказанию услуг по диагностике и лечению инфекционных заболеваний с применением индивидуально изготовленных препаратов, включающих конструирование аутопробиотиков и создание банков микробиоценозов для повышения эффективности терапии, запрашивает за индивидуализацию услуг 700 000 долларов США [18]. Безусловно, затраты оправданы, когда решается судьба аутопробиотикотерапии, а конечные ее результаты не прогнозируемы.

Цель исследования — выделение из организма лабораторных животных аутологичных штаммов би-

фидобактерий и лактобактерий, изучение их выживаемости и приживаемости в кишечнике, и оценка эффективности их использования для коррекции микробиологических изменений при экспериментальном антибиотико-ассоциированном дисбактериозе.

Материалы и методы

В экспериментах использовали аутологические штаммы (далее аутоштаммы) бифидобактерий и лактобактерий, выделенные из кишечного содержимого конвенциональных белых мышей, а также морских свинок, которых изолированно содержали в индивидуальных кюветах в течение всего периода экспериментов. Выделение аутоштаммов бифидобактерий и лактобактерий проводили согласно методике, описанной в работе [9], с использованием плотных питательных сред рекомендованного состава [19]. При выращивании аутоштаммов в микроаэрофильных условиях использовали систему для анаэробного культивирования Anaerobic system Mark III – LE 003 (Hi Media Laboratories Pvt.Ltd, Мумбаи, Индия) с пакетами газогенераторными Hi Anaero Gas Pacet.

Общее количество бактерий в перерасчете на 1 г фекалий животных определяли подсчетом в камере Горяева. Количество жизнеспособных бактерий (КОЕ·г⁻¹) определяли высевом соответствующих десятикратных разведений суспензий на плотные питательные среды в чашках Петри и подсчетом выросших колоний бактерий по истечении времени инкубации при температуре 37 °С.

Селекцию спонтанных мутантов выделенных аутоштаммов бифидобактерий и лактобактерий осуществляли на плотной питательной среде с рифампицином (Рифампицин – Ферейн, ЗАО «Брынцалов-А», Россия) согласно рекомендациям, изложенным в работе [20]. Стабильность признака антибиотикорезистентности оценивали, характеризуя популяционный состав мутантов аутопробиотических микроорганизмов (Rif^r-мутантов) по R-признаку.

Электронную микроскопию исходных бактерий и их Rif^r-мутантов проводили с помощью просвечивающего электронного микроскопа JEOL JEM-1200 EV при ускоряющем напряжении 72 кВ.

В исследованиях по изучению выживаемости и приживаемости рифампициноустойчивых (Rif^r) мутантов аутоштаммов бифидобактерий и лактобактерий в пищеварительном тракте животных использовали конвенциональных белых мышей обоего пола массой 18–20 г и морских свинок, беспородных, обоего пола, массой 250–300 г.

Нативную культуру лактобацилл *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 получали, выращивая выделенные из пробиотического препарата бактерии в микроаэрофильных условиях при температуре 37 °С в жидкой питательной среде в течение 72 ч. Концентрация бактерий по окончании культивиро-

вания составляла 3,4·10⁹ КОЕ·мл⁻¹. Надосадочную жидкость получали центрифугированием нативной культуры лактобактерий *L. plantarum* 8P-A3 при 3000 г в течение 15 мин.

Антибиотико-ассоциированный дисбактериоз кишечника у лабораторных животных воспроизводили путем перорального введения гентамицина (продукция ОАО «Биохимик», Россия) [21].

В экспериментах использовали пребиотический препарат Стимбифид (продукция ООО «В-МИН» по заказу ООО «МедСтар», Россия). Препарат создан на основе фруктоолиго- и фруктополисахаридов, содержит премикс витаминно-минеральный «Immunity» и вспомогательные вещества (натрия бикарбонат, лактоза, кальция стеарат). Эффективность препарата подтверждена клиническими исследованиями [22].

Статистическую обработку результатов исследований проводили согласно рекомендациям, изложенным в руководстве И.П. Ашмарина и А.А. Воробьева [23].

Результаты и обсуждение

Для изучения выживаемости аутопробиотических бифидобактерий и лактобактерий в желудочно-кишечном тракте лабораторных животных были получены рифампициноустойчивые мутанты (Rif^r) исходных бактерий, способных расти на селективных питательных средах, содержащих рифампицин. Суть методики [20] получения Rif^r-производных индивидуальных штаммов бифидобактерий и лактобактерий, выделенных из фекалий белых мышей и морских свинок [9], состоит в выращивании исходных штаммов на плотных питательных средах с повышающимися концентрациями антибиотика (от 10 мкг·мл⁻¹ до 200 мкг·мл⁻¹) и отборе спонтанных мутантов, сохраняющих видовые признаки [20].

Отобранные Rif^r-мутанты аутоштаммов бифидобактерий и лактобактерий, устойчивые к рифампицину (Rif^r-мутанты), стабильно сохраняли признак антибиотикорезистентности. Изучение популяционного состава мутантных бактерий по этому признаку на плотных питательных средах, содержащих рифампицин в концентрации 180 мкг·мл⁻¹, свидетельствовало о сохранении бактериями признака устойчивости к рифампицину.

Мутантные бактерии, как и исходные бифидобактерии и лактобактерии, являются грам-положительными. На рисунке 1 представлены электронные микрофотографии антибиотикорезистентных бифидобактерий и лактобактерий.

Размеры исходных бактерий и их Rif^r-производных соответствуют размерам клеток бифидобактерий и лактобактерий, приведенным в руководстве Берджи [24]. Rif^r-производные бифидобактерий и лактобактерий сохранили свои видовые признаки: способность к росту на богатых питательных средах

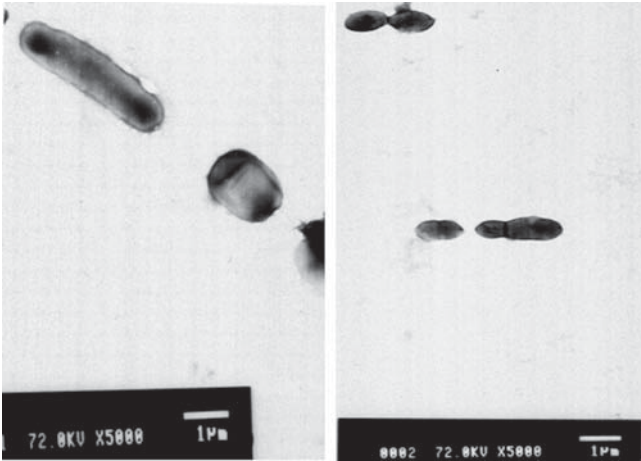


Рис. 1. Микроскопическая картина устойчивых к рифампицину бифидобактерий (А) и лактобактерий (Б). Электронная микроскопия; ув. $\times 5000$

в микроаэрофильных условиях; морфологическую особенность колоний (нежная зернистость, коническая форма, которая более выражена у лактобактерий); бактерии каталазоотрицательные, активно сбраживают углеводы, желатину не разжижают (видовой признак лактобактерий [24]).

Последующее изучение взаимодействия исходных бифидобактерий и лактобактерий с их рифампициноустойчивыми производными при совместном попарном культивировании на плотных питательных средах по методу Н.А. Глушановой и Б.А. Шендорова [9] показало (рис. 2), что исходные бактерии и их Rif^r-мутанты биосовместимы. Важно также отметить, что выделенные от каждого животного индивидуальные штаммы бифидобактерий, лактобактерий и их Rif^r-мутанты полностью совместимы в тесте попарного культивирования на плотных питательных средах.

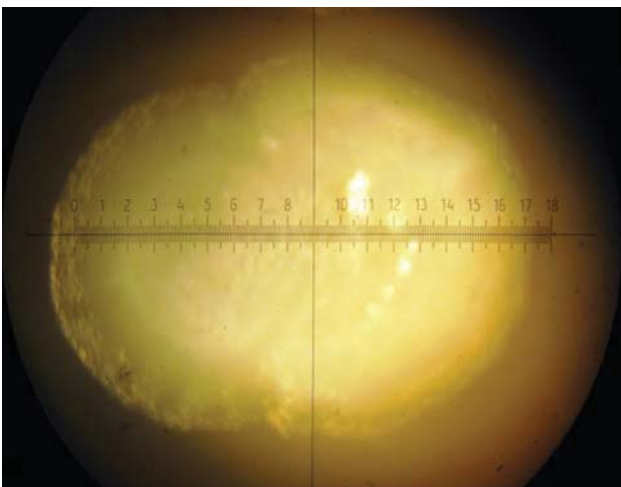


Рис. 2. Микрофотография биосовместимых исходных бифидобактерий и их Rif^r-мутантов при совместном попарном выращивании бульонных культур. Световая микроскопия; ув. $\times 100$

В экспериментах по изучению выживаемости рифампициноустойчивых производных аутоштаммов бифидобактерий и лактобактерий в ходе пассажа по желудочно-кишечному тракту конвенциональных белых мышей, а также морских свинок, были использованы суспензии культур, выращенных на плотной питательной среде в микроаэрофильных условиях при температуре 37 °С в течение 72 ч. Белым мышам вводили перорально в составе суспензии 2 раза в сутки в течение 14 дней по 130 тыс. Rif^r-бифидобактерий и по 26 млн Rif^r-лактобактерий, морским свинкам — также перорально 2 раза в сутки по 1,3 млн Rif^r-бифидобактерий и по 265 млн Rif^r-лактобактерий.

Каждое из подопытных животных помещали в отдельный кювет с крышкой на все время проведения экспериментов. Отбор фекалий для бактериологического анализа осуществляли на протяжении 18 суток. Высев суспензий фекалий от каждого животного производили на плотную питательную среду в чашках Петри, содержащую 200 мкг·мл⁻¹ рифампицина. После инкубации чашек Петри с посевом культур при температуре 37 °С в течение 48 ч определяли число выросших колоний с последующим пересчетом на 1 г фекалий подопытных животных. Результаты экспериментов представлены в таблицах 1 — 3.

Как следует из представленных в таблицах 1 и 2 данных, в фекалиях подопытных животных, исследованных в первые сутки после начала перорального введения антибиотико-резистентных аутоштаммов бифидобактерий и лактобактерий, не было выявлено соответствующих микроорганизмов, о чем свидетельствует отсутствие роста колоний при высеве суспензий фекалий на плотную питательную среду с рифампицином. Рост соответствующих колоний на селективной плотной питательной среде с рифампицином был зафиксирован на 2-е сутки после начала перорального введения Rif^r-мутантных бактерий.

В последующем в течение 2 недель, когда подопытным животным вводили Rif^r-мутантные бактерии, в исследуемых фекалиях обнаруживались соответствующие микроорганизмы, численность которых по сравнению с численностью перорально вводимых Rif^r-мутантных бактерий была незначительной.

В соответствии с результатами, представленными в таблице 3, выживаемость Rif^r-мутантов аутоштаммов бифидобактерий в организме белых мышей и морских свинок составила 0,031% и 0,0032%, а Rif^r-мутантов лактобактерий — 0,00035% и 0,000014% соответственно. После прекращения перорального введения рифампициноустойчивых бифидобактерий и лактобактерий подопытным животным из их фекалий указанные микроорганизмы перестали выделяться на 4-е сутки.

Таблица 1

Содержание аутопробиотических Rif^r-микроорганизмов в кишечном содержимом белых мышей при пероральном введении ($\bar{X} \pm I_{95}$, n=10)

Микроорганизмы	Содержание бактерий в фекалиях на ... сутки эксперимента, КОЕ·г ⁻¹									
	1	2	5	8	10	12	14	15	16	18
Бифидобактерии	0	130±15	146±16	120±12	122±12	108±9	111±10	96±5	14±6	0
Лактобактерии	0	286±18	210±16	360±21	385±32	290±22	195±18	108±15	18±8	0

Таблица 2

Содержание аутопробиотических Rif^r-микроорганизмов в кишечном содержимом морских свинок при пероральном введении ($\bar{X} \pm I_{95}$, n=7)

Микроорганизмы	Содержание бактерий в фекалиях на ... сутки эксперимента, КОЕ·г ⁻¹									
	1	2	5	8	10	12	14	15	16	18
Бифидобактерии	0	146±35	135±20	120±14	128±16	115±10	86±7	76±7	26±4	0
Лактобактерии	0	108±10	130±21	119±12	108±10	96±8	86±8	69±9	16±5	0

Таблица 3

Выживаемость аутопробиотических Rif^r-микроорганизмов при транзите по желудочно-кишечному тракту лабораторных животных

Микроорганизмы	Белые мыши			Морские свинки		
	Суточная доза, КОЕ (разовая доза × 2)	Содержание в фекалиях, КОЕ·г ⁻¹ (\bar{X} , на 2–18-е сутки, по данным таблицы 1)	Выживаемость бактерий, процент (доля)	Суточная доза, КОЕ (разовая доза × 2)	Содержание в фекалиях, КОЕ·г ⁻¹ (\bar{X} , на 2–18-е сутки, по данным таблицы 2)	Выживаемость бактерий, процент (доля)
Бифидобактерии	2,7·10 ⁵	85	0,031 (3,15·10 ⁻⁴)	2,6·10 ⁶	83	0,032 (3,19·10 ⁻⁵)
Лактобактерии	5,3·10 ⁷	185	0,00035 (3,49·10 ⁻⁶)	5,3·10 ⁸	73	0,000014 (1,38·10 ⁻⁷)

Невысокая численность Rif^r-микроорганизмов, преодолевших естественные барьеры желудочно-кишечного тракта белых мышей и морских свинок, которые на 4-й день после прекращения их перорального введения подопытным животным вообще перестали выделяться из фекалий, свидетельствует о транзитном характере пребывания меченных устойчивостью к рифампицину (Rif^r-) аутоштаммов пробиотических микроорганизмов в пищеварительном тракте.

В следующей серии экспериментов была изучена эффективность восстановления кишечной микробиоты конвенциональных белых мышей и морских свинок с антибиотико-ассоциированным дисбактериозом под влиянием перорально вводимых культур аутоштаммов бифидобактерий и лактобактерий.

Антибиотико-ассоциированный дисбактериоз инициировали пероральным введением подопытным животным гентамицина: белым

мышам 2 раза в сутки по 3 мг в течение 7 дней, морским свинкам — 2 раза в сутки по 30 мг в течение 7 дней с учетом переводного коэффициента на единицу поверхности тела. В течение всего периода введения гентамицина в фекалиях животных определяли общее количество микроорганизмов, а также количество бифидобактерий и лактобактерий в перерасчете на 1 г фекалий. Результаты определений представлены в таблице 4, на их основании можно однозначно говорить о выраженных нарушениях микробиоты в кишечнике обоих видов подопытных животных.

Для проведения последующих этапов исследования всем подопытным животным с антибиотико-ассоциированным дисбактериозом, разделенным на 5 групп, через 5 дней, в течение которых животным не вводили антибиотик для снижения его концентрации в кишечном содержимом, для воздействия на кишечную микробиоту вводили ауто-

штаммы бифидобактерий и лактобактерий (аутопробиотикотерапия), надосадочную жидкость нативной культуры *L. plantarum* 8P-A3 (метабиотикотерапия), пребиотик Стимбифид (пребиотикотерапия). Нативную культуру аутоштаммов пробиотических микроорганизмов вводили перорально белым мышам по 0,1 мл 2 раза в сутки, морским свинкам — по 0,2 мл 2 раза в сутки в течение 8 дней.

Надосадочную жидкость нативной культуры *L. plantarum* 8P-A3 вводили перорально белым мышам по 0,2 мл 2 раза в сутки, морским свинкам — по 0,3 мл 2 раза в сутки в течение 8 дней. Пребиотик Стимбифид вводили *per os* в суточных дозах с учетом переводного коэффициента на единицу поверхности тела, которые составили для белых мышей 13 мг, для морских свинок — 131 мг. Результаты экспериментов представлены в таблицах 5 и 6.

Таблица 4

Динамика концентрации микроорганизмов в кишечном содержимом белых мышей и морских свинок при пероральном введении гентамицина ($\bar{X} \pm I_{95}$, n=10)

Животные	Микроорганизмы	Содержание бактерий в фекалиях на ... сутки эксперимента, КОЕ·г ⁻¹					
		Начало эксперимента	1	2	5	6	7
Белые мыши	Общее количество	(6,3±0,6)·10 ⁹	(3,4±0,5)·10 ⁷	(1,8±0,6)·10 ⁷	(2,3±0,7)·10 ⁶	(8,1±0,7)·10 ⁵	(2,3±0,6)·10 ⁵
	Бифидобактерии	(6,1±0,6)·10 ⁶	(4,9±0,6)·10 ⁵	(2,2±0,7)·10 ⁴	(1,3±0,6)·10 ³	(1,1±0,6)·10 ³	(1,4±0,7)·10 ²
	Лактобактерии	(1,9±0,8)·10 ⁸	(3,6±0,6)·10 ⁵	(1,4±0,5)·10 ⁶	(1,5±0,7)·10 ⁵	(8,6±0,7)·10 ⁴	(1,2±0,6)·10 ⁴
Морские свинки	Общее количество	(7,6±0,5)·10 ⁸	(2,2±0,6)·10 ⁸	(2,5±0,4)·10 ⁸	(1,3±0,6)·10 ⁶	(2,3±0,8)·10 ⁵	(3,0±0,7)·10 ⁵
	Бифидобактерии	(1,3±0,4)·10 ⁷	(2,0±0,7)·10 ⁵	(1,4±0,6)·10 ⁶	(8,6±0,7)·10 ⁴	(3,3±0,7)·10 ³	(1,3±0,5)·10 ²
	Лактобактерии	(8,6±0,7)·10 ⁶	(2,8±0,6)·10 ⁵	(3,0±0,7)·10 ⁵	(6,0±0,8)·10 ⁴	(5,3±0,6)·10 ²	(5,9±0,6)·10 ¹

Таблица 5

Динамика концентрации микроорганизмов в кишечном содержимом белых мышей с антибиотико-ассоциированным дисбактериозом на фоне введения аутопробиотических бифидобактерий и лактобактерий ($\bar{X} \pm I_{95}$, n=10)

Группа животных	Микроорганизмы	Содержание бактерий в фекалиях на ... сутки эксперимента, КОЕ·г ⁻¹			
		Начало эксперимента	2	5	8
Белые мыши, получавшие нативную культуру аутопробиотических бифидобактерий	Общее количество	(2,5±0,7)·10 ⁵	(1,5±0,7)·10 ⁵	(4,6±0,6)·10 ⁶	(9,6±0,5)·10 ⁶
	Бифидобактерии	(1,6±0,5)·10 ²	(2,1±0,6)·10 ²	(5,7±0,5)·10 ³	(8,5±0,7)·10 ⁴
	Лактобактерии	(1,3±0,6)·10 ⁴	(3,0±0,7)·10 ³	(7,5±0,7)·10 ⁴	(5,2±0,4)·10 ⁵
Белые мыши, получавшие нативную культуру аутопробиотических лактобактерий	Общее количество	(2,4±0,6)·10 ⁵	(2,9±0,6)·10 ⁵	(9,6±0,7)·10 ⁵	(6,5±0,7)·10 ⁶
	Бифидобактерии	(1,5±0,7)·10 ²	(2,9±0,6)·10 ²	(6,6±0,7)·10 ³	(8,6±0,7)·10 ⁴
	Лактобактерии	(1,3±0,6)·10 ⁴	(3,8±0,7)·10 ⁴	(6,9±0,8)·10 ⁴	(6,6±0,8)·10 ⁵
Белые мыши, получавшие надосадочную жидкость нативной культуры <i>L. plantarum</i> 8P-A3	Общее количество	(2,6±0,6)·10 ⁵	(3,5±0,7)·10 ⁶	(4,5±0,7)·10 ⁹	(1,4±0,6)·10 ¹⁰
	Бифидобактерии	(1,7±0,7)·10 ²	(6,4±0,6)·10 ⁴	(1,6±0,6)·10 ⁶	(2,4±0,5)·10 ⁷
	Лактобактерии	(1,3±0,6)·10 ⁴	(2,9±0,7)·10 ⁵	(1,6±0,7)·10 ⁷	(1,6±0,7)·10 ⁸
Белые мыши, получавшие пребиотик Стимбифид	Общее количество	(2,3±0,6)·10 ⁵	(1,5±0,2)·10 ⁸	(8,6±0,7)·10 ⁹	(1,6±0,7)·10 ¹⁰
	Бифидобактерии	(1,4±0,7)·10 ²	(2,4±0,3)·10 ⁵	(2,3±0,6)·10 ⁷	(3,4±0,6)·10 ⁷
	Лактобактерии	(1,5±0,7)·10 ⁴	(4,2±0,4)·10 ⁶	(2,6±0,7)·10 ⁸	(5,6±0,6)·10 ⁸
Белые мыши: самовосстановление кишечной микробиоты (контроль)	Общее количество	(2,2±0,6)·10 ⁵	(4,1±0,7)·10 ⁵	(8,0±0,7)·10 ⁵	(2,5±0,5)·10 ⁶
	Бифидобактерии	(1,4±0,7)·10 ²	(3,1±0,6)·10 ²	(2,5±0,5)·10 ³	(3,6±0,6)·10 ⁴
	Лактобактерии	(1,3±0,6)·10 ⁴	(2,2±0,7)·10 ⁴	(1,8±0,7)·10 ⁴	(3,5±0,7)·10 ⁵

Таблица 6

Динамика концентрации микроорганизмов в кишечном содержимом морских свинок с антибиотико-ассоциированным дисбактериозом на фоне введения аутопробиотических бифидобактерий и лактобактерий ($\bar{X} \pm I_{95}$, n=10)

Группа животных	Микроорганизмы	Содержание бактерий в фекалиях на ... сутки эксперимента, КОЕ·г ⁻¹			
		Начало эксперимента	2	5	8
Морские свинки, получавшие нативную культуру аутопробиотических бифидобактерий	Общее количество	(3,2±0,7)·10 ³	(4,1±0,6)·10 ³	(2,6±0,7)·10 ³	(7,1±0,6)·10 ⁶
	Бифидобактерии	(1,3±0,8)·10 ²	(3,6±0,7)·10 ³	(2,8±0,8)·10 ⁴	(3,6±0,5)·10 ⁴
	Лактобактерии	(6,1±0,6)·10 ¹	(5,8±0,6)·10 ²	(2,6±0,7)·10 ³	(3,5±0,6)·10 ⁴
Морские свинки, получавшие нативную культуру аутопробиотических лактобактерий	Общее количество	(3,1±0,6)·10 ³	(3,9±0,5)·10 ³	(4,8±0,6)·10 ³	(6,8±0,7)·10 ⁶
	Бифидобактерии	(1,2±0,5)·10 ²	(4,8±0,6)·10 ²	(5,1±0,7)·10 ⁴	(1,5±0,8)·10 ⁵
	Лактобактерии	(5,8±0,6)·10 ¹	(1,4±0,6)·10 ²	(2,4±0,5)·10 ⁴	(3,0±0,7)·10 ⁵
Морские свинки, получавшие надосадочную жидкость нативной культуры <i>L. plantarum</i> 8P-A3	Общее количество	(3,0±0,7)·10 ³	(4,7±0,7)·10 ³	(6,4±0,7)·10 ³	(2,0±0,6)·10 ⁹
	Бифидобактерии	(1,4±0,8)·10 ²	(3,6±0,5)·10 ⁴	(2,3±0,6)·10 ⁵	(2,5±0,7)·10 ⁷
	Лактобактерии	(5,9±0,6)·10 ¹	(3,8±0,7)·10 ⁴	(3,5±0,7)·10 ⁵	(3,0±0,5)·10 ⁶
Морские свинки, получавшие пребиотик Стимбифид	Общее количество	(3,1±0,7)·10 ³	(6,5±0,6)·10 ⁶	(4,6±0,6)·10 ⁹	(6,8±0,7)·10 ⁹
	Бифидобактерии	(1,4±0,5)·10 ²	(3,4±0,5)·10 ⁴	(1,8±0,7)·10 ⁶	(2,3±0,8)·10 ⁷
	Лактобактерии	(6,0±0,7)·10 ¹	(3,6±0,6)·10 ⁴	(3,0±0,6)·10 ⁵	(3,6±0,6)·10 ⁶
Морские свинки: самовосстановление кишечной микробиоты (контроль)	Общее количество	(3,0±0,7)·10 ³	(4,1±0,6)·10 ³	(4,3±0,7)·10 ³	(6,5±0,7)·10 ⁶
	Бифидобактерии	(1,5±0,6)·10 ²	(1,7±0,5)·10 ²	(1,8±0,6)·10 ³	(1,7±0,6)·10 ⁴
	Лактобактерии	(5,9±0,7)·10 ¹	(5,3±0,7)·10 ¹	(2,7±0,7)·10 ²	(3,9±0,8)·10 ⁴

Из представленных в таблицах 5 и 6 результатов следует, что исходное общее количество фекальной микробиоты составило: у белых мышей (2,2–2,6)·10³ КОЕ·г⁻¹, у морских свинок — (3,0–3,2)·10³ КОЕ·г⁻¹. Нарастание общего количества микроорганизмов в фекалиях отмечено на 2-е сутки введения надосадочной жидкости нативной культуры *L. plantarum* 8P-A3 (т.е. в ходе метабиотикотерапии), а также в ходе перорального введения пребиотика Стимбифида. В дальнейшем вплоть до 8-х суток наблюдений отмечалось положительное влияние метабиотикотерапии и пребиотикотерапии на восстановление кишечной микробиоты у подопытных животных.

У животных, получавших нативные культуры аутоштаммов бифидобактерий и лактобактерий, а также в контрольных группах, где шло самовосстановление кишечной микробиоты у животных, получавших только пищевой рацион, восстановление кишечной микробиоты значительно отставало, о чем свидетельствуют обобщенные результаты экспериментов, представленные в таблице 7.

Из представленных результатов следует, что наиболее выраженное влияние на восстановление микробиоты как у белых мышей, так и у морских свинок оказывают метаболиты надосадочной

жидкости нативной культуры *L. plantarum* 8P-A3 и пребиотик Стимбифид. Так, скорость восстановления микробиоты кишечника белых мышей под влиянием метаболитов лактобактерий превышает аналогичный показатель в контрольной группе животных в 5965 раз, а под влиянием пребиотика Стимбифид — в 7118 раз. У морских свинок скорость восстановления кишечной микробиоты превышает контрольные показатели в 308 раз в случае введения животным метабиотиков надосадочной жидкости *L. plantarum* 8P-A3, а при введении пребиотика Стимбифид — в 1047 раз.

Из результатов, приведенных в таблице 7, также следует, что аутопробиотикотерапия штаммами бифидобактерий и лактобактерий фактически не сказывается на стимуляции восстановления микробиоты кишечника у морских свинок, а у белых мышей лишь в несколько раз увеличивается скорость восстановления кишечной микробиоты по сравнению с контрольной группой животных, находившихся в режиме самовосстановления микробиоты.

Положительный эффект метабиотикотерапии и пребиотикотерапии, состоящий в стимуляции восстановления микробиоты кишечника у белых мышей и морских свинок, может быть отнесен на счет экспериментально подтвержденной общнос-

Сравнительная оценка эффективности аутопробиотикотерапии, метапробиотикотерапии и пребиотикотерапии у конвенциональных белых мышей и морских свинок с экспериментальным антибиотико-ассоциированным дисбактериозом

Животные	Группа животных	Скорость восстановления микробиоты при...							
		аутопробиотикотерапии				метапробиотикотерапии		пребиотикотерапии	
		бифидобактериями		лактобактериями		КОЕ·г ⁻¹ ·сут ⁻¹	Кратность к контролю	КОЕ·г ⁻¹ ·сут ⁻¹	Кратность к контролю
		КОЕ·г ⁻¹ ·сут ⁻¹	Кратность к контролю	КОЕ·г ⁻¹ ·сут ⁻¹	Кратность к контролю				
Белые мыши	Опытная	1,2·10 ⁶	4,2	7,8·10 ⁵	2,7	1,7·10 ⁹	5965	2,0·10 ⁹	7118
	Контрольная	2,9·10 ⁵	1	2,9·10 ⁵	1	2,9·10 ⁵	1	2,9·10 ⁵	1
Морские свинки	Опытная	8,9·10 ⁵	1,1	8,5·10 ⁵	1,05	2,5·10 ⁸	308	8,5·10 ⁸	1047
	Контрольная	8,1·10 ⁵	1	8,1·10 ⁵	1	8,1·10 ⁵	1	8,1·10 ⁵	1

ти действия пребиотика и метаболитов лактобактерий на уровне сложно устроенного микробно-тканевого комплекса, частью которого является микробиота.

Индивидуальный подбор пробиотических препаратов, созданных на основе аутологичных штаммов, в первую очередь бифидобактерий и лактобактерий, является не только прямым развитием идеи пробиотикотерапии, но и своеобразной данью моде, разрекламированной научными публикациями, касающимися исследований в области космической биологии и биотехнологии [15,17].

Появились экспериментальные данные, согласно которым в условиях длительных космических полетов бактериальные пробиотики, полученные в лабораторно-производственных условиях на Земле, могут оказаться неэффективными. Нормальной в такой ситуации была бы реакция, направленная на поиск препарата, одинаково эффективного как в земных, так и в космических условиях. Однако для коррекции микробиологических нарушений в кишечнике у космонавтов предлагается использовать пробиотики, полученные непосредственно на борту космического корабля.

Для этого разрабатывается технология, осуществление которой в ходе космического полета не потребует от космонавтов специальных знаний в области практической микробиологии, что само по себе звучит странно, когда речь идет о производстве лечебно-профилактического препарата, повышающего работоспособность космонавтов в экстремальных условиях. К таким условиям относится длительная изоляция космонавтов в герметично замкнутом объекте, при которой развивается дисбактериоз [17].

Для его профилактики, с одной стороны, предлагается использовать аутопробиотики, созданные в земных лабораторно-производственных условиях [10 – 13, 17], с другой стороны – полученную на борту космической станции силами экипажа кис-

ломолочную форму запатентованного пробиотика «Витафлор» [15, 25]. Закваска «Витафлор», порошок лиофилизированного молока и Твин-80 являются составной частью пробиотически активного биопрепарата, который, обладая высоким пробиотическим потенциалом, адаптогенным и иммуностимулирующим действием, должен предотвратить развитие дисбиотических состояний у космонавтов [25].

Пробиотик «Витафлор» и технология его производства должны, согласно условиям эксперимента, заменить жидкие пробиотики, полученные в наземных условиях, которые проявляли высокую чувствительность к факторам космического полета, инактивировались и утрачивали пробиотические свойства. Но нет гарантии того, что пробиотические микроорганизмы, полученные по космической технологии, будут толерантны к указанным факторам.

Возможно, причина низкой эффективности пробиотиков в условиях космического корабля кроется в другом. Так, при изучении роли внеклеточного полимерного матрикса в устойчивости бактериальных биопленок к экстремальным факторам среды специалисты Института микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН [26] установили важность внеклеточных полимерных веществ в формировании матрикса биопленок и обеспечении устойчивости этих структурированных сообществ к экстремальным факторам окружающей среды. А ведь система биопленки кишечника человека в составе микробно-тканевого комплекса как раз и сформирована микробиотой в сочетании с внеклеточным матриксом, нарушение структуры которого при различных воздействующих факторах приводит к изменению качественного и количественного состава микробиоты, в том числе к отчуждению пробиотических микроорганизмов, будь то биотехнологических (наземных) или созданных по космической технологии на основе

аутологических штаммов индивидуальной микрофлоры космонавтов.

Представленные в настоящей работе результаты экспериментальных исследований по оценке эффективности аутопробиотикотерапии при восстановлении кишечной микробиоты у конвенциональных белых мышей и морских свинок с антибиотико-ассоциированным дисбактериозом однозначно свидетельствуют о более низкой эффективности аутопробиотикотерапии в сравнении с метабиотикотерапией и пребиотикотерапией.

Так, пероральное введение аутоштаммов бифидобактерий и лактобактерий подопытным животным с антибиотико-ассоциированным дисбактериозом практически не сказалось на скорости восстановления микробиоты кишечника, особенно у морских свинок. В то же время при метабиотикотерапии антибиотико-ассоциированного дисбактериоза у конвенциональных белых мышей скорость восстановления микробиоты по сравнению с контролем (самовосстановление микробиоты кишечника!) возросла в 5965 раз, а в ходе пребиотикотерапии Стимбифидом — в 7118 раз. У морских свинок с антибиотико-ассоциированным дисбактериозом скорость восстановления микробиоты на фоне метабиотикотерапии увеличилась в сравнении с контролем в 308 раз, а на фоне пребиотикотерапии — в 1047 раз.

Сопоставляя результаты, представленные в таблицах 5–7, с данными таблиц 1–3, можно отметить, что низкая эффективность аутоштаммов бифидобактерий и лактобактерий вполне соответствует низкой выживаемости и отсутствию приживаемости аутоштаммов микроорганизмов в кишечнике тех животных, из кишечного содержимого которых они были изолированы.

Действительно, выживаемость аутоштаммов бифидобактерий в кишечнике конвенциональных белых мышей составила 0,031%, аутоштаммов лактобактерий — 0,00035%, а в кишечнике морских свинок — соответственно 0,0032% и 0,000014%. Выделение аутоштаммов бифидобактерий и лактобактерий и вовсе прекратилось на 4-е сутки после окончания их перорального введения в организм подопытных животных.

Отсутствие приживаемости аутоштаммов бифидобактерий и лактобактерий в биопленке микробно-тканевого комплекса кишечника подопытных животных можно объяснить их гетерологичностью, ставшей вполне реальной после выделения бактерий из кишечного содержимого и их размножения на искусственных питательных средах, после чего они фактически стали биотехнологичными, а значит — и гетерологичными.

Естественно, что такие ставшие чужеродными микроорганизмы, прошедшие через барьеры желудочно-кишечного тракта животных

в минимальном количестве, отторгаются системой биопленки кишечника, имеющей иную функционально-морфологическую специфику, отличную от специфики монокультуры аутоштаммов бифидобактерий и лактобактерий.

Таким образом, настоящими исследованиями подтверждены данные об отсутствии приживаемости микроорганизмов пробиотиков [5], а также гомологичных бифидобактерий и лактобактерий [27] в желудочно-кишечном тракте экспериментальных животных. И где бы пробиотики не производились — в наземных научно-производственных лабораториях или по новым технологиям на борту космического корабля, микроорганизмы пробиотиков не будут приживаться в кишечнике, что, безусловно, скажется отсутствием эффективности пробиотикотерапии или аутопробиотикотерапии. От осознания этого научного факта зависит и выбор средств коррекции колонизационной резистентности и восстановления микробиоты кишечника.

При этом особо следует отметить то, что одним из первых, кто на основании экспериментальных и клинических исследований высказался о невозможности промышленного производства адекватных пробиотиков для поддержания индигенной микробиоты на оптимальном уровне путем простого механического отбора отдельных штаммов пробиотических микроорганизмов или их наборов, был Б.А. Шендеров [28], обосновавший в свое время необходимость и возможность практического использования аутопробиотикотерапии [10].

На сегодняшний день весьма актуальным является научный подход, согласно которому выбор средств профилактики и лечения нарушений микробиоценоза кишечника должен быть корректным и направленным на то звено нарушенной регуляции, которое утратило возможность самовосстановления [1]. Именно пребиотики и метабиотики, обладающие высокой клинической эффективностью, содействуют восстановлению собственной микробиоты кишечника без привлечения технологии его заселения чужеродными пробиотическими или аутопробиотическими штаммами.

Выводы

1. Из кишечного содержимого здоровых конвенциональных белых мышей и морских свинок выделены и охарактеризованы аутоштаммы бифидобактерий и лактобактерий. Получены маркированные по признаку устойчивости к рифампицину производные аутоштаммов бифидобактерий и лактобактерий, стабильно наследующие признак антибиотикоустойчивости и сохраняющие видовые характеристики.

2. Изучена приживаемость маркированных аутоштаммов бифидобактерий и лактобактерий в кишечнике конвенциональных белых мышей и

морских свинок. Установлено, что маркированные аутоштаммы бифидобактерий и лактобактерий, находящиеся в физиологически активном состоянии и вводимые перорально подопытным животным, не приживаются в био пленке слизистой оболочки кишечника и элиминируются к 4-м суткам после прекращения введения.

3. Впервые получены экспериментальные данные, свидетельствующие о низкой эффективности аутопробиотикотерапии в коррекции нарушений микробиоценоза кишечника, связанной с различиями в индивидуальной видовой и метаболической специфике аутологичных пробиотических штаммов, их незначительной выживаемостью и приживаемостью в желудочно-кишечном тракте и крайне малой концентрацией синтезируемых ими биологически-активных соединений, неадекватных получению положительных биологических эффектов при взаимодействии с целевыми рецепторами слизистой оболочки кишечника.

4. В результате сравнительной оценки эффективности аутопробиотикотерапии, метабиотикотерапии и пребиотикотерапии установлено, что наиболее выраженное положительное влияние на восстановление кишечной микробиоты конвенциональных белых мышей и морских свинок с антибиотко-ассоциированным дисбактериозом оказывают пребиотик Стимбифид и метаболиты надосадочной жидкости нативной культуры лактобактерий *L. plantarum* 8P-A3.

5. Скорость восстановления общего содержания микробиоты в кишечнике конвенциональных белых мышей и морских свинок относительно контроля под воздействием перорального введения пребиотика Стимбифид увеличивалась соответственно в 7118 и 1047 раз, а при пероральном введении надосадочной жидкости нативной культуры лактобактерий *L. plantarum* 8P-A3 — в 5965 и 308 раз соответственно.

6. Результаты экспериментальных исследований свидетельствуют о том, что при развитии нарушений микробиоценоза кишечника под влиянием различных факторов и стрессовых ситуаций необходимо, ввиду низкой эффективности существующих пробиотиков, использовать современные препараты, оказывающие прямое положительное влияние на нормализацию кишечной микробиоты.

Литература

1. Ардатская, М.Д. Дисбактериоз кишечника: понятие, диагностика, принципы лечебной коррекции / М.Д. Ардатская // *Consilium medicum*. — 2008. — № 10 (8). — С. 86–92.
2. Осипов, Г.А. Невидимый орган — микрофлора человека / Г.А. Осипов. — www.rusmedserv.com.
3. Николаев, Ю.А. Биопленка — «город микробов» или аналог многоклеточного организма / Ю.А. Николаев, В.К. Плакунов // *Микробиология*. — 2007. — № 76 (2). — С. 149–163.
4. Реймерс, Н.Ф. Экология (теории, законы, правила, принципы и гипотезы) / Н.В. Реймерс. — М.: Россия Молодая, 1994. — 367 с.
5. Дармов, И.В. Выживаемость микроорганизмов пробиотиков в желудочно-кишечном тракте экспериментальных животных / И.В. Дармов [и др.] // *Журн. инфектол.* — 2012. — Т. 4, № 1. — С. 68–74.
6. Погорельский, И.П. Экологическая и функциональная маргинальность пробиотических микроорганизмов / И.П. Погорельский, И.Ю. Чичерин, И.А. Лундовских // *Общество, наука, инновации (НТК-2012): ежегод. открыт. всерос. науч.-техн. конф. 16-27 апреля 2012 г.: сб. материалов Вят. гос. ун-т / отв. ред. С.Г. Литвиненц*. — Киров, 2012. — 1 электрон. опт. диск (CD-ROM) (Биологический факультет. Секция «Микробиология»).
7. Шендеров, Б.А. Нормальная микрофлора и ее роль в поддержании здоровья человека / Б.А. Шендеров // *Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол., колопрокт.* — 1998. — № 8 (1). — С. 61–65.
8. Suvorov, A. Gut microbiota, probiotics and human health / A. Suvorov // *Bioscience of microbiota, food and health*. — 2013. — № 32 (3). — С. 81–93.
9. Глушанова, Н.А. Взаимоотношения пробиотических и индигенных лактобацилл хозяина в условиях совместного культивирования *in vitro* / Н.А. Глушанова, Б.А. Шендеров // *Журн. микробиол.* — 2003. — № 2. — С. 56–61.
10. Патент РФ 2139070 А 61 К35/74, С12 N 1/20. Способ получения аутопробиотика, содержащего живые бифидобактерии и лактобактерии / Б.А. Шендеров, М.А. Манвелова; заявитель и патентообладатель Б.А. Шендеров; опубл. 10.10.1999. — <http://www.freepatent.ru/patents/2139070>.
11. Патент РФ 2126043 С12 N 1/20, А 61 35/74. Способ получения банка аутоштаммов микроорганизмов для восстановления кишечного микробиоценоза человека / А.П. Хачатрян, Р.Г. Хачатрян; заявители и патентообладатели А.П. Хачатрян, Р.Г. Хачатрян; опубл. 10.02.1999. — <http://www.findpatent.ru/patent/212/2126043.html>.
12. Патент РФ 2460778 С12 N 1/20, А 61 К35/74, А 23С9/127. Способ получения аутопробиотика на основе *Enterococcus faecium*, представителя индигенной микрофлоры кишечника хозяина / А.Н. Суворов, В.И. Симаненков, З.Р. Сундукова, Е.И. Ермоленко, А.Н. Цапиева, В.Н. Донец, О.И. Соловьева; заявители и патентообладатели А.Н. Суворов, В.И. Симаненков. — <http://www.findpatent.ru/patents/246/2460778.html>.
13. Патент РФ 2428468 С12 N 1/20, А 61 35/74. Способ индивидуального подбора пробиотических препаратов, содержащих лактобактерии и/или бифидобактерии для элиминации условно-патогенных микроорганизмов, выделенных от пациента при исследовании на дисбактериоз кишечника. Е.А. Оришак, А.Г. Бойцов, Л.Ю. Нилова; заявитель и патентообладатель ГОУ ВПО «Санкт-Петербургская государственная медицинская академия им. И.И. Мечникова ФАЗСР»; опубл. 03.06.2010. http://www1.fips.ru/fips_serv1/fips_serv1et.
14. Мельников, В.А. Аутопересадка аутобацилл в восстановлении индивидуального биоценоза влагалища женщины / В.А. Мельников [и др.] // *Фундаментальные исследования*. — 2012. — № 1. — С. 64–67.
15. Эксперимент. Пробиовита. Биоэмульсия. Космическая биология и биотехнология. — http://knts.tsniimash.ru/site/Experiment_q.aspx?idE=121, http://knts.tsniimash.ru/site/Experiment_q.aspx?idE=277&id=4
16. Чичерин И.Ю. Пробиотики: вектор развития / И.Ю. Чичерин [и др.] // *Практическая медицина*. — 2012. — № 3 (58). — С. 180–188.

17. Ильин В.К. Аутопробиотики как средство профилактики инфекционно-воспалительных заболеваний у человека в искусственной среде обитания / В.К. Ильин [и др.] // Вестник РАМН. — 2013. — № 2. — С. 56–62.
18. Проекты для инвестиций // The ANGEL Investor. — 2008. — № 2 (8). — С. 63. — <http://zv.innovaterussia.ru/attach/24977>.
19. Бондаренко, В.М. Микробиологическая диагностика дисбактериоза кишечника : методические рекомендации / В.М. Бондаренко, В.Г. Лихоед. — М.: ГУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН, 2007. — 70 с.
20. Миллер, Дж. Эксперименты в молекулярной генетике / Дж. Миллер; пер. с англ. Ю.Н. Зографа, Т.С. Ильиной. — М: Мир, 1976. — 436 с.
21. Патент РФ 2477894 G 09B 23/28. Способ моделирования дисбактериоза кишечника у лабораторных животных / И.В. Дармов, И.Ю. Чичерин, А.С. Ердякова, И.П. Погорельский, И.А. Лундовских; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВПО «Вятский государственный университет»; опубл. 20.03.2013; бюл. № 8.
22. Грачева, Н.М. Сравнительная оценка клинико-лабораторной эффективности современных про- и пребиотических препаратов в коррекции дисбиотических нарушений желудочно-кишечного тракта: отчет о клинико-лабораторном исследовании / Н.М. Грачева [и др.]. — М.: Московский НИИЭМ им. Г.Н. Габричевского, 2010. — 23 с.
23. Ашмарин, И.П. Статистические методы в микробиологических исследованиях / И.П. Ашмарин, А.А. Воробьев. — Л: Медгиз, 1962. — 280 с.
24. Определитель бактерий Берджи. В 2 т. — Т. 2 / под ред. Дж. Хоулта [и др.]; пер. с англ. под ред. Г.А. Заварзина. — 9-е изд. — М.: Мир, 1997. — 368 с.
25. Патент РФ 2425576 A23 C9/123, A61 K35/74. Сухой пробиотически активный биопрепарат и способ получения кисломолочного напитка на его основе / И.А. Кобатов, О.В. Добролеж, Н.Б. Вербицкая, Л.Н. Петров, В.П. Добрица; заявитель и патентообладатель ФГУП «Гос. НИИ ОЧБ» ФМБА России; опубл. 10.08.2011.
26. Стрелкова, Е.А. Роль внеклеточного полимерного матрикса в устойчивости бактериальных биопленок к экстремальным факторам среды / Е.А. Стрелкова [и др.] // Микробиология. — 2013. — № 82 (2). — С. 131–138.
27. Чичерин, И.Ю. Заместительное действие пробиотиков: миф или реальность / И.Ю. Чичерин [и др.] // Журн. международной медицины. — 2013. — № 4 (5). — С. 52–58.
28. Shenderov, V.A. Metabiotics: novel idea or natural development of probiotic conception / V.A. Shenderov // Microbial Ecology in Health & Disease. — 2013. — V. 24. — С. 20399. — <http://dx.doi.org/10.3402/mehd.v24i0.20399>.

Авторский коллектив:

Чичерин Игорь Юрьевич — президент научного общества «Микробиота», к.м.н.; тел.: 8(496)547-53-00, e-mail: patron@mail.ru;

Погорельский Иван Петрович — профессор кафедры микробиологии биологического факультета Вятского государственного университета, д.м.н., профессор; тел.: 8(8332) 32-16-50, e-mail: ipogorelsky@inbox.ru;

Лундовских Ирина Александровна — доцент кафедры микробиологии биологического факультета Вятского государственного университета, к.х.н., доцент; тел.: 8(8332) 32-16-50, e-mail: lundovskih@vyatsu.ru;

Гаврилов Константин Евгеньевич — доцент кафедры микробиологии биологического факультета Вятского государственного университета, к.б.н.; тел. 8(8332)32-16-50, e-mail: kaf_mb@vyatsu.ru

Шабалина Марина Робертовна — доцент кафедры высшей математики факультета прикладной математики и телекоммуникаций Вятского государственного университета, к.пед.н., доцент; тел.: 8(8332) 64-21-19, e-mail: kaf_mb@vyatsu.ru;

Дармов Илья Владимирович — заведующий кафедрой микробиологии биологического факультета Вятского государственного университета, д.м.н., профессор; тел.: 8(8332) 32-16-50, e-mail: darmov@vyatsu.ru