

УДК 579.61

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-445>

Научная статья | Scientific article



Исследование пробиотической активности метаболитов бактерий *Bacillus subtilis* при экспериментальном дисбиозе у мышей

С.А. Лазарев✉, Н.О. Вартанова, А.В. Поддубиков, Н.А. Михайлова

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Малый Казенный пер., д. 5а, Москва, 105064, Российская Федерация

✉ Лазарев Сергей Александрович; lazarevsr1@gmail.com

Резюме

Актуальность. Перспективные средства для коррекции дисбиоза – метабитики, препараты на основе метаболитов пробиотических микроорганизмов. В опытах *in vitro* бактерии *Bacillus subtilis* (штаммы 3Н и 1719) в процессе культивирования синтезируют метаболиты, обладающие пробиотическими свойствами. Представляет интерес исследование влияния данных метаболитов *in vivo* на мукозную микробиоту толстого кишечника в условиях экспериментального дисбиоза (у мышей) и оценка возможности их применения в качестве метабитиков в медицине.

Цель. Изучить пробиотическую активность метаболитов бактерий *B. subtilis* 3Н и *B. subtilis* 1719 в сравнении с показателями коммерческого метабитика при антибиотик-ассоциированном дисбиозе у мышей.

Материалы и методы. Работа проводилась на мышах линии BALB/c, массой 18–20 г. Экспериментальный дисбиоз моделировали при помощи внутрибрюшинного введения гентамицина. Для коррекции развившихся нарушений животным опытных групп в течение 21 сут интрагастрально вводили метаболиты штаммов *B. subtilis*, иммобилизованные на сорбенте, а в группе сравнения – коммерческий метабитик, содержащий метаболиты штамма *B. subtilis* ВКПМ № В-2335(3)З. Мукозную микробиоту толстого кишечника мышей качественно и количественно оценивали посредством бактериологического метода. Выросшие колонии микроорганизмов идентифицировали при помощи масс-спектрометрии MALDI-TOF.

Результаты. Экспериментальный антибиотик-ассоциированный дисбиоз толстого кишечника мышей проявился в снижении количества доминантной микробиоты и росте условно-патогенных микроорганизмов. Введение исследуемых метаболитов в течение 7 сут привело во всех опытных группах к нормализации содержания бактерий *Lactobacillus*; наилучшие показатели выявлены у животных, которым вводили штамм *B. subtilis* 3Н, видовой состав лактобацилл соответствовал интактным мышам. Восстановление содержания лактозопозитивной кишечной палочки (*E. coli* lac+) достигло 100%. После 21 сут применения метаболитов *B. subtilis* 3Н зафиксирована элиминация бактерий *Rodentibacter* spp., *Aerococcus* spp., грибов *Trichosporon* spp., *Kazachstania* spp. Метаболиты штамма *B. subtilis* 1719 способствовали элиминации грибов *Trichosporon* spp., однако не влияли на количество *Kazachstania* spp. При введении коммерческого метабитика выявлена элиминация *Enterococcus* spp., *Kazachstania* spp. и *Trichosporon* spp., при этом не отмечено воздействия на *Rodentibacter* spp. и *Aerococcus* spp.

Выводы. Метаболиты штаммов *B. subtilis* 3Н и 1719 способствовали восстановлению качественного и количественного состава микробиоценоза толстого кишечника в условиях антибиотик-ассоциированного дисбиоза у мышей. Выявленные различия в процессах нормализации микробиоценоза в разных группах животных указывают на вариативность специфической активности бактерий *B. subtilis*.

Ключевые слова: *Bacillus subtilis* 3H, *Bacillus subtilis* 1719; метаболиты *B. subtilis*; антибиотик-ассоциированный дисбиоз; коррекция дисбиоза; дисбиоз кишечника; метабитоики; мукозная микробиота

Для цитирования: Лазарев С.А., Вартанова Н.О., Поддубиков А.В., Михайлова Н.А. Исследование пробиотической активности метаболитов бактерий *Bacillus subtilis* при экспериментальном дисбиозе у мышей. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(3–1):431–442. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-445>

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Минобрнауки России (Соглашение № 075-15-2021-676 от 28.07.2021) с использованием научного оборудования Центра коллективного пользования ФГБНУ «НИИВС им. И.И. Мечникова».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Probiotic activity of *Bacillus subtilis* metabolites in experimentally induced dysbiosis in mice

Sergei A. Lazarev✉, Nune O. Vartanova, Alexander V. Poddubikov, Natalia A. Mikhailova

I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, 5A Maly Kazenny Ln., Moscow 105064, Russian Federation

✉ Sergei A. Lazarev; lazarevsr1@gmail.com

Abstract

Scientific relevance. A promising option for dysbiosis correction is the use of metabiotics, products based on metabolites of probiotic microorganisms. During fermentation, *Bacillus subtilis* bacteria (strains 3H and 1719) produce metabolites that exhibit probiotic properties *in vitro*. These observations *in vitro* motivate an *in vivo* investigation of *B. subtilis* metabolite effects on colonic mucosal microbiota in mice in experimentally induced dysbiosis and an assessment of the potential of *B. subtilis* metabolites as metabiotics.

Aim. The authors aimed to compare the probiotic activity of *B. subtilis* 3H and *B. subtilis* 1719 metabolites and a commercial metabiotic in antibiotic-induced dysbiosis in mice.

Materials and methods. The authors induced experimental dysbiosis in BALB/c mice weighing 18–20 g by intraperitoneal injection of gentamicin. For subsequent correction, the test groups received sorbent-bound *B. subtilis* metabolites, and the comparison group received a commercial metabiotic containing *B. subtilis* metabolites (VKPM B-2335(3)3) via intragastric injection for 21 days. The quantitative and qualitative analysis of colonic mucosal microbiota included microbial culturing and colony identification by MALDI-TOF mass spectrometry.

Results. Antibiotic-induced colonic dysbiosis in mice manifested itself as a decrease in the dominant microbiota and an increase in opportunistic pathogens. After 7 days of metabolite administration, the *Lactobacillus* population returned to normal in all treatment groups. The mice that received *B. subtilis* 3H metabolites showed the best results: their *Lactobacillus* spp. composition corresponded to that of intact animals. The content of Lac+ *Escherichia coli* returned to 100% in all treatment groups. After 21 days of metabolite administration, the authors observed the elimination of bacteria (*Rodentibacter* spp., *Aerococcus* spp.) and fungi (*Trichosporon* spp., *Kazachstania* spp.) in the *B. subtilis* 3H group; *Trichosporon* spp. (no effect on *Kazachstania* spp.) in the *B. subtilis* 1719 group; and *Enterococcus* spp., *Kazachstania* spp., and *Trichosporon* spp. (no effect on *Rodentibacter* spp. and *Aerococcus* spp.) in the commercial metabiotic group.

Conclusions. Metabolites of *B. subtilis* strains 3H and 1719 help to restore the diversity and abundance of colonic microbiota in antibiotic-induced dysbiosis. The differences observed in microbiota re-establishment in the treatment groups indicate that there is interstrain variability in the probiotic activity of *B. subtilis* metabolites.

Key words: *Bacillus subtilis* 3H; *Bacillus subtilis* 1719; *B. subtilis* metabolites; antibiotic-induced dysbiosis; dysbiosis correction; intestinal dysbiosis; metabiotics; mucosal microbiota

For citation: Lazarev S.A., Vartanova N.O., Poddubikov A.V., Mikhailova N.A. Probiotic activity of *Bacillus subtilis* metabolites in experimentally induced dysbiosis in mice. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(3–1):431–442. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-445>

Funding. The study was carried out with the financial support of the Ministry of Science and Higher Education of Russia (Agreement No. 075-15-2021-676 of 28 July 2021), using the equipment of the Research Equipment Sharing Center of the I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Введение

Организм человека и его микробиота – единая экологическая система, которая находится в состоянии динамического равновесия. Нормальная (индигенная) микробиота выполняет разнообразные жизненно важные функции, в том числе обеспечивает колонизационную резистентность, принимает участие в метаболических процессах, синтезе иммуноглобулинов и в морфогенезе иммунной системы [1–3]. Качественные и количественные нарушения нормального микробного состава биотопов организма (дисбиоз) – предрасполагающие факторы развития широкого спектра заболеваний [4]. Особенный интерес представляет дисбиоз толстого кишечника с его сложным, разнообразным и метаболически активным микробиомом, оказывающим глобальное воздействие на здоровье. Причиной дисбиоза может быть воздействие на организм различных факторов эндогенного и экзогенного характера: возраста, образа жизни, характера питания, инфекционных заболеваний, приема лекарственных препаратов, окружающей среды и др. [5–8].

В настоящее время становятся все более востребованными метабиотики (постбиотики) – препараты для коррекции дисбиотических нарушений, содержащие не живые клетки, а продукты жизнедеятельности пробиотических микроорганизмов. В отличие от классических пробиотиков метабиотики имеют более длительный период сохранности, четкие мишени приложения, их легче дозировать и контролировать, они лучше абсорбируются, распределяются по организму, тканям и органам, быстрее и в большей степени элиминируются из организма [2, 9–11].

Пробиотические штаммы бактерий рода *Bacillus* продуцируют большое количество биологически активных низкомолекулярных соединений, полезных для человека; считаются вторыми (после *Lactobacillus*) по масштабам продуцентами антибиотических веществ, отличающихся широким антимикробным спектром и подавляющих рост патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. Род *Bacillus* также

характеризуется высокой биохимической активностью, положительным влиянием на иммунную систему и индигенную микробиоту [12–14]. В настоящее время препараты на основе живых бацилл находят широкое и разнообразное применение, в том числе в качестве пробиотиков в медицине. Метаболиты пробиотических штаммов бацилл – перспективные компоненты для создания метабиотиков.

В настоящее время в клинической практике применяется коммерческий метабиотик (КМ) Бактистатин®, созданный на основе продуктов жизнедеятельности бактерии *Bacillus subtilis* ВКПМ № В-2335(3)3 [15]. Однако его биологическая активность ограничивается свойствами одного штамма-продуцента. С учетом того что спектр веществ, продуцируемых бактериями *B. subtilis*, штаммоспецифичен, изучение функциональных свойств метаболитов других штаммов позволит расширить номенклатуру препаратов для эффективной терапии дисбиотических нарушений.

Штамм *B. subtilis* 3Н (ГИСК № 248), полученный в результате селекции *B. subtilis* 534 на устойчивость к антибиотику рифампицину, обладает антагонистическими свойствами в отношении возбудителей заболеваний желудочно-кишечного тракта человека и применяется в клинической практике в качестве пробиотика [16].

Штамм бактерий *B. subtilis* 1719 (ГИСК № 277), выделенный в естественных условиях, обладает широким спектром антагонистической активности, иммуномодулирующей активностью, продуцирует комплекс гидролитических ферментов [17].

Ранее установлено, что при глубинном периодическом культивировании *in vitro* штаммы *Bacillus subtilis* 3Н и 1719 продуцируют внеклеточные метаболиты, обладающие противомикробными свойствами в отношении условно-патогенных микроорганизмов [18]. Представляется важным изучение пробиотической активности метаболитов данных штаммов *in vivo*.

Цель работы – изучить пробиотическую активность метаболитов бактерий *B. subtilis* 3Н и *B. subtilis* 1719 в сравнении с показателями коммерческого метабиотика при антибиотик-ассоциированном дисбиозе у мышей.

Задачи исследования:

- смоделировать экспериментальный антибиотик-ассоциированный дисбиоз у мышей;
- провести сравнительную оценку пробиотического эффекта метаболитов исследуемых штаммов *B. subtilis* и коммерческого варианта *B. subtilis* ВКПМ № В-2335(3)3.

Материалы и методы

Работу проводили на мышах линии BALB/c массой 18–20 г. Животных содержали в идентичных условиях (температура, относительная влажность, освещение и рацион питания) вивария в соответствии с ГОСТ 33216-2014¹. Исследование с использованием лабораторных животных одобрено локальным советом по этике при ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова (протокол № 6 от 13.07.2022).

Для приготовления экспериментальных препаратов выполняли глубинное периодическое культивирование штаммов *B. subtilis* 3Н и *B. subtilis* 1719 на ранее подобранной питательной среде, оптимальной для цели исследования [18]. Полученную биомассу отделяли от среды центрифугированием с последующей микрофилтрацией. В качестве иммобилизующей матрицы использовали цеолит Холинского месторождения (НПО «Новь», Новосибирск, Россия) [15].

Экспериментальных животных разделили на пять групп. Группа 1 (контрольная) состояла из интактных мышей. В группу 2 входили животные, у которых моделировали антибиотик-ассоциированный дисбиоз путем внутрибрюшинного введения в течение 5 сут раствора гентамицина в концентрации 80 мг/мл, в пересчете на массу тела животного [19]. Мышам групп 3 и 4 по окончании введения антибиотика интрагастрально вводили препараты на основе метаболитов штаммов *B. subtilis* 3Н и *B. subtilis* 1719 соответственно. В группе 5 после формирования дисбиоза мыши интрагастрально получали КМ, содержащий метаболиты штамма *B. subtilis* ВКПМ № В-2335(3)3.

Коррекцию микробиоты проводили в течение 21 сут. Животных выводили из эксперимента на 1, 7, 14, 21-е сутки после окончания курса гентамицина декапитацией под легким эфирным наркозом с соблюдением принципов Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных или в иных научных целях².

Микробиологические исследования пристеночного муцина проводили согласно методике, предложенной Л.И. Кафарской и Н.А. Коршуновым [20]. Освобожденные от химуса биоптаты слизистой оболочки толстого кишечника взвешивали в асептических условиях, помещали в стерильный фосфатный буфер (соотношение 1:10) и выдерживали в течение 2 ч для разжижения муцина. По 0,1 мл каждого приготовленного 10-кратного разведения (10^{-3} – 10^{-5}) материала взвеси засекали газомом на поверхность питательных сред, инкубировали 1–2 сут при температуре +37°C в аэробных и анаэробных условиях.

Использовались следующие питательные среды (№ 1–4 производства ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Россия (ФБУН ГНЦ ПМБ):

- питательная среда № 10 ГРМ (для выделения *Staphylococcus aureus*) с добавлением яичного желтка;
- агар Эндо-ГРМ, питательная среда для выделения *Enterobacteriales*;
- Лактобакагар, питательная среда для выделения и культивирования *Lactobacillus*;
- питательная среда № 2 ГРМ (Сабуро) для выращивания и подсчета грибов;
- ГРМ-агар, питательный агар для культивирования микроорганизмов, с добавлением 5% стерильной дефибрированной лошадиной крови (ЗАО «ЭКОлаб», Россия);
- UriSelect 4, хромогенный агар для выделения уропатогенных бактерий (Bio-Rad, Франция);
- Bifidobacterium Agar, для выделения бифидобактерий (HiMedia, Индия);
- Schaedler Agar, для выделения строгих или факультативных анаэробных бактерий (HiMedia, Индия).

Для выделения бифидобактерий дополнительно проводили посев 30 мкл из разведений исходного материала в пробирки с 3 мл полужидкой печеночно-цистеиновой среды Блаурокка (ФБУН ГНЦ ПМБ).

Чистые культуры микроорганизмов идентифицировали при помощи матрично-активированной лазерной десорбционно/ионизационной времяпролетной масс-спектрометрии (далее – MALDI-TOF MS, от matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry)

¹ ГОСТ 33216–2014. Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами. <https://docs.cntd.ru/document/1200127506>

² ETS 123. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes. Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (с изменениями на 15.06.2006). <https://docs.cntd.ru/document/901909691>

на приборе MALDI Biotyper sirius RUO System (Bruker, США).

Удельное содержание выделенных из биопроб жизнеспособных микроорганизмов выражали в lg КОЕ/г массы биологического материала [21]. Статистическую обработку данных проводили после проверки нормальности распределения при помощи программы Microsoft Excel с использованием параметрических критериев. Результаты представили в виде среднего арифметического с ошибкой репрезентативности ($M \pm m$). Достоверность различий средних величин вычисляли по *t*-критерию Стьюдента. Значения $p \leq 0,05$ считали статистически значимыми.

Результаты и обсуждение

На протяжении эксперимента ни в одной из групп животных не наблюдали гибели, неожиданных изменений в потреблении пищи или в другом поведении, не зафиксировали статистически значимых различий по массе животных. Основные микроорганизмы, которые выделяли из биопроб мышей, идентифицировали по родам и сравнивали по их содержанию исследуемые группы. При изучении мукозной микрофлоры толстого кишечника контрольных (интактных) мышей на всех этапах эксперимента идентифицированы бактерии *Lactobacillus* (*L. gasseri*, *L. murinus*, *L. reuteri*, *L. intestinalis*) (рис. 1), *Escherichia coli* (lac+), *Enterococcus* (*E. gallinarum gallinarum*, *E. faecalis*), *Rodentibacter* (*R. pneumotropicus*, *R. heylii*), *Streptococcus* (*S. hyointestinalis*, *S. suis*), а также грибы *Kazachstania* (*K. pintolopesii*, *K. telluris*).

Введение гентамицина ожидаемо привело к уменьшению и (или) исчезновению бактериальной микрофлоры (табл. 1). У мышей группы 2 (дисбиоз) отмечали отсутствие роста бактерий *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Rodentibacter*,

Streptococcus, увеличение содержания грибов *Kazachstania* (*K. pintolopesii*, *K. telluris*) примерно в 1,5 раза по отношению к показателям контрольных животных, а также появление грибов *Trichosporon* (*T. asahii*). Не выявили достоверных различий между группами по общему содержанию кишечной палочки, при этом в группе 2 отмечали снижение содержания лактозопозитивной кишечной палочки (*E. coli* lac+) от 100 до 75%, а также появление и рост лактозонегативных вариантов (lac-) – от 0 до 25%. Гемолитические *E. coli* не обнаружили. В единичных случаях фиксировали рост бактерий *Cytobacillus oceanisediminis* (4 lg КОЕ/г), *Staphylococcus warneri* (7 lg КОЕ/г), *Stenotrophomonas maltophilia* (5 lg КОЕ/г).

После моделирования дисбиоза в группах 3–5 вводили с целью коррекции состава микробиоты исследуемые метаболиты бактерий *B. subtilis* 3Н и *B. subtilis* 1719, а также коммерческий препарат-метабиотик с метаболитами *B. subtilis*. Мышей группы 2 (дисбиоз) использовали для отрицательного контроля.

Через 7 сут после окончания введения гентамицина (табл. 2) у животных группы 2 отметили отсутствие бактерий *Lactobacillus*, *Rodentibacter*, *Streptococcus*. Содержание *Enterococcus* и грибов *Kazachstania* увеличилось в 1,3 и 1,5 раза соответственно. Выделены отсутствующие у интактных животных бактерии *E. coli* lac- (20%), *Aerococcus* (*A. viridans*) и грибы *Trichosporon* (*T. asahii*). В единичных случаях наблюдали рост *R. pneumotropicus* (4,5±0,5 lg КОЕ/г).

Применение метабиотиков в течение 7 сут способствовало нормализации содержания лактобацилл, при этом по видовому разнообразию *Lactobacillus* группы различались между собой (рис. 2).

У мышей группы 3 (*B. subtilis* 3Н) выделено четыре вида лактобацилл: *L. gasseri*, *L. murinus*, *L. reuteri*, *L. intestinalis*; у представителей группы 4

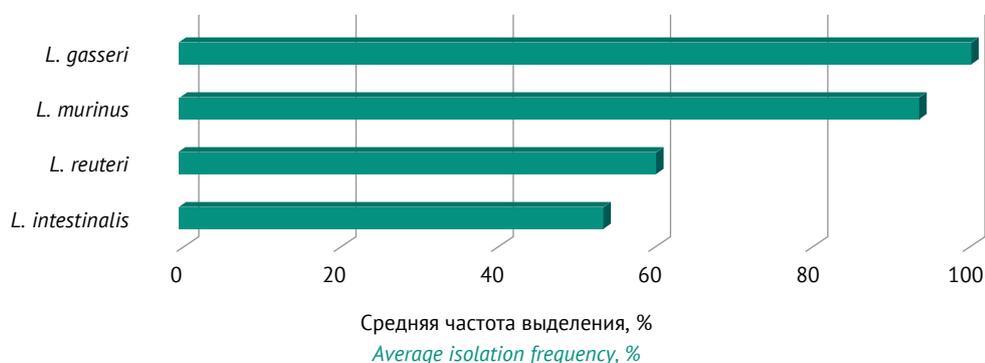


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 1. Средняя частота выделения *Lactobacillus* spp. в контрольной группе (интактные мыши) на всех этапах эксперимента.

Fig. 1. Average frequency of *Lactobacillus* spp. isolation in the control group (intact mice) at all stages of the experiment.

Таблица 1. Качественный и количественный состав мукозной микробиоты толстого кишечника мышей в условиях экспериментального дисбиоза**Table 1.** Qualitative and quantitative composition of colonic mucosal microbiota in mice under experimental dysbiosis conditions

Выделенные микроорганизмы <i>Isolated microorganisms</i>	Содержание в разведениях 10^{-3} – 10^{-5} , lg КОЕ/г ($M \pm m$), в группе <i>Content in 10^{-3}–10^{-5} dilutions, log₁₀ CFU/g ($M \pm m$), by group</i>	
	1 (контроль, интактные мыши) <i>1 (control, intact mice)</i>	2 (дисбиоз) <i>2 (dysbiosis)</i>
<i>Lactobacillus</i> spp.	6,25±0,32	–
<i>E. coli</i> : lac+/lac–, %	5,67±0,88 100/0	4,75±0,48 75/25*
<i>Enterococcus</i> spp.	4,33±0,33	–
<i>Rodentibacter</i> spp.	5,25±0,25	–
<i>Streptococcus</i> spp.	6,00±0,41	–
<i>Aerococcus</i> spp.	–	–
<i>Kazachstania</i> spp.	4,33±0,33	6,20±0,58*
<i>Trichosporon</i> spp.	–	5,25±0,48*

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. «–» – отсутствие роста. * $p \leq 0,05$ (по сравнению с контрольной группой).Note. –, no growth. * $p \leq 0.05$ (compared with the control group).**Таблица 2.** Качественный и количественный состав мукозной микробиоты толстого кишечника мышей после 7-дневной коррекции дисбиоза**Table 2.** Qualitative and quantitative composition of colonic mucosal microbiota in mice after 7 days of dysbiosis correction

Выделенные микроорганизмы <i>Isolated microorganisms</i>	Содержание в разведениях 10^{-3} – 10^{-5} , lg КОЕ/г ($M \pm m$), в группе <i>Content in 10^{-3}–10^{-5} dilutions, log₁₀ CFU/g ($M \pm m$), by group</i>				
	1 (контрольная, интактные мыши) <i>1 (control, intact mice)</i>	2 (дисбиоз) <i>2 (dysbiosis)</i>	3 (<i>B. subtilis</i> 3H) <i>3 (B. subtilis 3H)</i>	4 (<i>B. subtilis</i> 1719) <i>4 (B. subtilis 1719)</i>	5 (КМ) <i>5 (CM)</i>
<i>Lactobacillus</i> spp.	6,50±0,34	–	6,71±0,52**	5,80±0,47**	6,11±0,31**
<i>E. coli</i> : lac+/lac–, %	5,67±0,33 100/0	5,67±0,88 80/20*	5,67±0,33 100/0**	4,33±0,33 100/0**	5,00±0,58 100/0**
<i>Enterococcus</i> spp.	5,00±0,58	6,50±0,29*	5,00±0,40**	4,75±0,48**	–
<i>Rodentibacter</i> spp.	4,25±0,25	–	–	–	4,67±0,33**
<i>Streptococcus</i> spp.	5,25±0,48	–	4,67±0,33**	5,40±0,24**	5,50±0,65**
<i>Aerococcus</i> spp.	–	5,00±0,58*	4,33±0,33	5,00±0,40	5,00±0,58
<i>Kazachstania</i> spp.	4,25±0,25	6,67±0,33*	4,67±0,66**	5,67±0,33**	4,25±0,25**
<i>Trichosporon</i> spp.	–	4,67±0,33*	–	–	4,33±0,33

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. «–» – отсутствие роста; КМ – коммерческий метабитик (Бактистатин®). * $p \leq 0,05$ (по сравнению с контрольной группой); ** $p \leq 0,05$ (по сравнению с группой 2 (дисбиоз)).Note. –, no growth; CM, commercial metabiotic (Bactistatin®). * $p \leq 0.05$ (compared with the control group); ** $p \leq 0.05$ (compared with group 2 (dysbiosis)).

(*B. subtilis* 1719) и 5 (КМ) идентифицировали только два вида: *L. gasseri*, *L. murinus*.

Применение метабитиков в течение 7 сут приводило во всех опытных группах к восстановлению содержания кишечной палочки и исчезновению вариантов lac–. От животных, по-

лучавших метабитики (группы 3–5), выделяли стрептококки (*S. hyointestinalis*), отсутствующие у мышей группы 2, а также бактерии *A. viridans* – без достоверных различий по их содержанию. У животных в группах 3 и 4 фиксировали снижение общего содержания *Enterococcus* и гри-

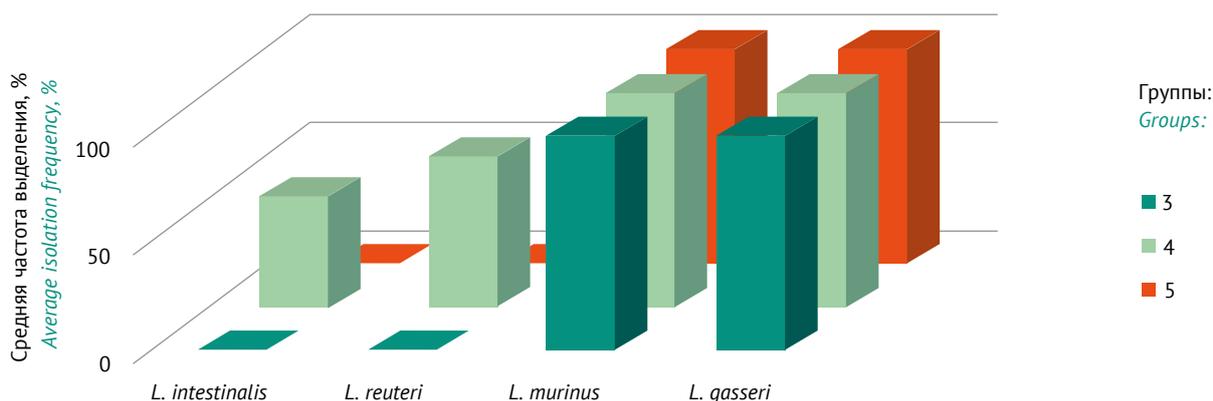


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 2. Средняя частота выделения *Lactobacillus* spp. после 7-дневной коррекции дисбиоза у мышей.

Fig. 2. Average frequency of *Lactobacillus* spp. isolation after 7 days of dysbiosis correction in mice.

Таблица 3. Качественный и количественный состав мукозной микробиоты толстого кишечника мышей после 14-дневной коррекции дисбиоза

Table 3. Qualitative and quantitative composition of colonic mucosal microbiota in mice after 14 days of dysbiosis correction

Выделенные микроорганизмы <i>Isolated microorganisms</i>	Содержание в разведениях 10^{-3} – 10^{-5} , lg КОЕ/г ($M \pm m$), в группе <i>Content in 10^{-3}–10^{-5} dilutions, log₁₀ CFU/g ($M \pm m$), by group</i>				
	1 (контрольная, интактные мыши) <i>1 (control, intact mice)</i>	2 (дисбиоз) <i>2 (dysbiosis)</i>	3 (<i>B. subtilis</i> 3H) <i>3 (B. subtilis 3H)</i>	4 (<i>B. subtilis</i> 1719) <i>4 (B. subtilis 1719)</i>	5 (КМ) <i>5 (CM)</i>
<i>Lactobacillus</i> spp.	6,60±0,40	–	6,27±0,33**	6,17±0,48**	6,60±0,24**
<i>E. coli</i> lac+/lac–, %	5,67±0,88 100/0	6,33±0,33 80/20*	4,33±0,33** 100/0	4,33±0,33** 100/0	4,67±0,33** 100/0
<i>Enterococcus</i> spp.	4,25±0,25	6,40±0,24*	4,75±0,48**	4,67±0,67**	–
<i>Rodentibacter</i> spp.	5,25±0,48	–	–	–	5,25±0,63**
<i>Streptococcus</i> spp.	4,75±0,48	–	5,00±0,40**	5,67±0,88**	4,75±0,48**
<i>Aerococcus</i> spp.	–	5,00±0,57*	–	4,33±0,33	4,67±0,67
<i>Kazachstania</i> spp.	4,25±0,25	6,20±0,58*	–	4,75±0,25**	–
<i>Trichosporon</i> spp.	–	4,33±0,33*	–	–	–

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. «–» – отсутствие роста; КМ – коммерческий метабиотик (Бактистатин®). * $p \leq 0,05$ (по сравнению с контрольной группой); ** $p \leq 0,05$ (по сравнению с группой 2 (дисбиоз)).

Note. –, no growth; CM, commercial metabiotic (Bactistatin®). * $p \leq 0.05$ (compared with the control group); ** $p \leq 0.05$ (compared with group 2 (dysbiosis)).

бов *Kazachstania* примерно в 1,3 раза, а также отсутствие грибов *T. asahii*. В группе 5 отмечали элиминацию *Enterococcus*, снижение количества грибов *Kazachstania* в 1,6 раза, но появление бактерий *Rodentibacter* и наличие грибов *T. asahii*.

После 14-дневного приема метабиотиков тенденция к нормализации микробиоты продолжалась во всех опытных группах (табл. 3). В биопробах мышей из групп 3–5 содержание и видовой состав лактобацилл соответствовали показателям контрольных животных (рис. 1). Частота

обнаружения *E. coli* lac+ составила 100%. Отсутствовал рост дрожжей *T. asahii*. В группах 3 и 5 зафиксировали элиминацию грибов *Kazachstania*; в группе 4 содержание этих грибов оказалось ниже в 1,3 раза по сравнению с показателями в группе 2. В биопробах мышей группы 3 отмечено отсутствие роста *A. viridans*.

У представителей группы 2, не получавших метабиотики, микробный пейзаж не изменился по сравнению с предыдущими сроками наблюдения в этой же группе. Однако в единичных

Таблица 4. Качественный и количественный состав мукозной микробиоты толстого кишечника мышей после коррекции дисбиоза в течение 21 сут**Table 4.** Qualitative and quantitative composition of colonic mucosal microbiota in mice after 21 days of dysbiosis correction

Выделенные микроорганизмы <i>Isolated microorganisms</i>	Содержание в разведениях 10^{-3} – 10^{-5} , lg КОЕ/г ($M \pm m$), в группе <i>Content in 10^{-3}–10^{-5} dilutions, log₁₀ CFU/g ($M \pm m$), by group</i>				
	1 (контрольная, интактные мыши) <i>1 (control, intact mice)</i>	2 (дисбиоз) <i>2 (dysbiosis)</i>	3 (<i>B. subtilis</i> 3H) <i>3 (B. subtilis 3H)</i>	4 (<i>B. subtilis</i> 1719) <i>4 (B. subtilis 1719)</i>	5 (КМ) <i>5 (CM)</i>
<i>Lactobacillus</i> spp.	6,17±0,48	4,50±0,50*	6,70±0,37**	6,00±0,40**	6,38±0,62**
<i>E. coli</i> : lac+/lac-, %	4,75±0,48 100/0	5,67±0,88 90/10	4,67±0,33 100/0	4,33±0,33 100/0	4,75±0,25 100/0
<i>Enterococcus</i> spp.	4,25±0,25	5,25±0,48*	4,40±0,24**	4,33±0,33**	–
<i>Rodentibacter</i> spp.	4,25±0,25	–	–	–	4,33±0,33**
<i>Streptococcus</i> spp.	5,25±0,48	–	4,25±0,25**	5,00±0,58**	6,80±0,20**
<i>Aerococcus</i> spp.	–	4,50±0,29*	–	–	4,67±0,33
<i>Kazachstania</i> spp.	4,33±0,33	5,17±0,30*	–	4,75±0,25	–
<i>Trichosporon</i> spp.	–	4,33±0,33*	–	–	–

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. «–» – отсутствие роста; КМ – коммерческий метабиотик (Бактистатин®). * $p \leq 0,05$ (по сравнению с контрольной группой); ** $p \leq 0,05$ (по сравнению с группой 2 (дисбиоз)).

Note. –, no growth; CM, commercial metabiotic (Bactistatin®). * $p \leq 0.05$ (compared with the control group); ** $p \leq 0.05$ (compared with group 2 (dysbiosis)).

случаях в составе мукозной микробиоты зафиксирован рост *L. gasseri* ($4,5 \pm 0,5$ lg КОЕ/г).

На 21-й день после окончания курса гентамицина (табл. 4) выявили следующие изменения. В группе 2 наблюдалась тенденция к восстановлению доминантной флоры. У мышей обнаружены лактобациллы, представленные одним видом: *L. gasseri*. Частота выделения *E. coli* lac- составила 10%. В группах 3 и 5 изменений не отмечено. У животных группы 4 рост бактерий *A. viridans* не зафиксирован.

При исследовании биопроб муцинового слоя толстого кишечника на разных этапах во всех группах показано, что рост бактерий рода *Bifidobacterium*, представляющих доминантную флору толстого кишечника, отсутствовал. Однако в пробирках с дифференциально-диагностической средой Блаурокка после 24–48 ч инкубации биопроб визуально обнаруживали «типичные» колонии бифидобактерий. Тем не менее морфологическое изучение выросших микроорганизмов и масс-спектрометрия MALDI-TOF не подтвердили наличие *Bifidobacterium*. В работе Н. Qiao с соавт. [22] представлены схожие результаты: бифидобактерии не высевались из биоматериала большинства экспериментальных групп и лишь изредка выявлялись в био-

пробах мышей, получавших лечение препаратами бифидобактерий, наличие *Bifidobacterium* подтверждалось и другими методами. Можно предположить, что бактериологический метод не подходит для выделения бифидобактерий из муцинового слоя толстого кишечника.

Результаты свидетельствуют, что метабиотики *B. subtilis* нормализуют микробиоценоз толстого кишечника в случае антибиотик-ассоциированного дисбиоза. Так, нормализовалось содержание лактобацилл, а также состав (варианты lac- и lac+) *E. coli*, снизилось количество условно-патогенной флоры.

Выявлены различия в показателях между животными, получавшими метабиотики. Лучшие результаты по восстановлению содержания лактобактерий обеспечили метаболиты штамма *B. subtilis* 3H, о чем свидетельствуют содержание и разнообразие видов лактобацилл после 7-дневной коррекции дисбиоза (рис. 2), а также нормализация содержания кишечной палочки с исчезновением вариантов lac-. Толстый кишечник интактных мышей колонизировали бактерии *Rodentibacter* (*R. pneumotropicis*, *R. heylii*), вызывающие оппортунистические инфекции у грызунов. Применение гентамицина привело к исчезновению вышеуказанных микроорганиз-

мов во всех опытных группах. При коррекции дисбиоза метаболитами штаммов *B. subtilis* 3Н и *B. subtilis* 1719 отсутствовали в мукозной микрофлоре *Rodentibacter*, однако у животных из группы КМ их количество вновь возросло до уровня показателей интактных мышей. В отношении *Enterococcus* (*E. gallinarium*, *E. faecalis*) большей эффективностью отличался КМ: данные бактерии полностью отсутствовали в микробиоте толстого кишечника. Коррекция дисбиоза исследуемыми метаболитами приводила к снижению количества энтерококков до уровня показателей контрольных животных. Условно-патогенные бактерии *A. viridans*, появившиеся в микробиоте мышей после моделирования дисбиоза, элиминировали при введении метаболитов в следующие сроки: *B. subtilis* 3Н – в течение 14 сут коррекции; *B. subtilis* 1719 – после 21 сут применения. У животных, получавших КМ, количество *Aerococcus* spp. не изменялось.

Грибы рода *Kazachstania* (*K. pintolopesii*, *K. telluris*), вызывающие инфекции у лабораторных мышей, обнаружены в микробиоте толстого кишечника контрольной группы. Введение гентамицина способствовало росту содержания этих грибов в 1,5 раза. Применение метаболитов *B. subtilis* 3Н и КМ привело к элиминации данного вида дрожжей в течение 14 сут коррекции. Метаболиты *B. subtilis* 1719 обладали слабой активностью по отношению к *Kazachstania*, при этом содержание данных грибов снижалось до уровня показателей интактных мышей. Грибы рода *Trichosporon* (*T. asahii*) обнаруживались в биопробах мышей после моделирования дисбиоза; лечение метаболитами как *B. subtilis* 3Н, так и *B. subtilis* 1719 в течение 7 сут приводило к элиминации указанных грибов. У животных из группы КМ грибы *Trichosporon* spp. исчезли из состава микробиоты после 14 сут коррекции дисбиоза.

Обобщенные результаты исследования *B. subtilis* 3Н. Отмечен ряд позитивных процессов, которые были инициированы действием метаболитов *B. subtilis* 3Н:

- 1) после 7-дневной коррекции дисбиоза:
 - восстановление видового разнообразия и более быстрая нормализация содержания бактерий *Lactobacillus* spp. ($6,71 \pm 0,52$ lg КОЕ/г) по сравнению с метаболитами других штаммов;
 - восстановление количественного и качественного состава кишечной палочки (*E. coli* lac+ 100%);
 - элиминация бактерий *Rodentibacter* spp. и грибов *Trichosporon* spp.;
 - нормализация содержания *Enterococcus* spp. ($5,0 \pm 0,4$ lg КОЕ/г);

- 2) через 14 сут коррекции дисбиоза: элиминация *Aerococcus* spp. и *Kazachstania* spp.

При этом метаболиты *B. subtilis* 3Н не влияли на содержание *Streptococcus* spp. ($4,75 \pm 0,25$ lg КОЕ/г) в течение 21-дневного применения.

Обобщенные результаты исследования *B. subtilis* 1719. Зафиксированы положительные изменения на фоне воздействия метаболитов штамма *B. subtilis* 1719:

- 1) после 7-дневной коррекции дисбиоза:
 - нормализация содержания бактерий *Lactobacillus* spp. ($5,8 \pm 0,47$ lg КОЕ/г);
 - нормализация количественного и качественного состава кишечной палочки (*E. coli* lac+ 100%);
 - элиминация грибов *Trichosporon* spp.;
 - нормализация содержания *Enterococcus* spp. ($4,75 \pm 0,48$ lg КОЕ/г);

- 2) через 21 день коррекции дисбиоза: исчезновение *Aerococcus* spp.

Метаболиты штамма *B. subtilis* 1719 не оказывали влияния на содержание *Streptococcus* spp. ($5,0 \pm 0,58$ lg КОЕ/г) и *Kazachstania* spp. ($4,75 \pm 0,25$ lg КОЕ/г).

Обобщенные результаты исследования коммерческого метабиотика. Отмечено положительное воздействие препарата, содержащего метаболиты *B. subtilis* (штамм ВКПМ № В-2335(3)3), на микробиоценоз толстого кишечника:

- 1) после 7-дневного применения:
 - нормализация содержания бактерий *Lactobacillus* spp. ($5,8 \pm 0,47$ lg КОЕ/г) и кишечной палочки (*E. coli* lac+ 100%);
 - элиминация *Enterococcus* spp.;

- 2) через 14 сут коррекции дисбиоза: исчезновение грибов *Kazachstania* spp. и *Trichosporon* spp.

Коммерческий метабиотик в течение 21-дневного применения не влиял на содержание в мукозной микробиоте бактерий *Rodentibacter* spp. ($4,33 \pm 0,33$ lg КОЕ/г), *Streptococcus* spp. ($6,80 \pm 0,20$ lg КОЕ/г) и *Aerococcus* spp. ($4,67 \pm 0,33$ lg КОЕ/г).

Заключение

Установлено, что метаболиты пробиотических штаммов *B. subtilis* 3Н и *B. subtilis* 1719 положительно влияют на микробиоценоз толстого кишечника в ходе коррекции после смоделированного антибиотик-ассоциированного дисбиоза у мышей линии BALB/c. Однако биологическая активность коммерческого метабиотика ограничивается свойствами одного штамма-производителя *B. subtilis*, следовательно, изучение метаболитов других штаммов *B. subtilis*, а тем более в комплексе, позволит расширить номенклатуру применяемых

препаратов и спектр комплексного воздействия при дисбиозе.

Можно предположить, что выявленные различия в процессах нормализации микробиоты толстого кишечника мышей связаны с индивидуальными особенностями штаммов *B. subtilis*, используемых в работе.

Литература/References

1. Бухарин ОВ, Перунова НБ. Роль микробиоты в регуляции гомеостаза организма человека при инфекции. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2020;97(5):458–67. Bukharin OV, Perunova NB. The role of microbiota in the regulation of homeostasis in the human body during infection. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2020;97(5):458–67 (In Russ.). <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-5-8>
2. Shenderov BA, Sinitza AV, Zakharchenko MM, Lang C. *Metabiotics: Present state, challenges and perspectives*. Springer International Publishing; 2020. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-34167-1>
3. Михайлова НА, Воеводин ДА, Лазарев СА. Современные представления о про-/эукариотических взаимодействиях организма человека – основа создания нового поколения пробиотических препаратов. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2020;97(4):346–55. Mikhailova NA, Voevodin DA, Lazarev SA. A modern view of pro-/eukaryote interactions in the human body as the basis for development of next-generation probiotics. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2020;97(4):346–55 (In Russ.). <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-4-7>
4. Hou K, Wu ZX, Chen XY, Wang JQ, Zhang D, Xiao C, et al. Microbiota in health and diseases. *Signal Transduct Target Ther*. 2022;7(1):135. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00974-4>
5. Kato I, Sun J. Microbiome and diet in colon cancer development and treatment. *Cancer J*. 2023;29(2):89–97. <https://doi.org/10.1097/PP0.0000000000000649>
6. Несвижский ЮВ. Изучение изменчивости кишечного микробиоценоза человека в норме и патологии. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2003;(1):49–54. Nesvizhsky YuV. Study of changes in the human intestinal micro-biocenosis in health and in disease. *Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2003;(1):49–54 (In Russ.). EDN: [OHAQDI](https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-4-7)
7. Успенский ЮП, Барышников НВ. Дисбиоз кишечника и антибиотик-ассоциированная диарея в условиях стационара: профилактика и коррекция. *Врач*. 2019;(12):81–85. Uspensky YuP, Baryshnikova NV. Intestinal dysbiosis and antibiotic-associated diarrhea in a hospital setting: prevention and correction. *Vrach*. 2019;(12):81–5 (In Russ.). <https://doi.org/10.29296/25877305-2019-12-21>
8. Weiss GA, Hennet T. Mechanisms and consequences of intestinal dysbiosis. *Cell Mol Life Sci*. 2017;74(16):2959–77. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2509-x>
9. Żółkiewicz J, Marzec A, Ruszczyński M, Feleszko W. Postbiotics – a step beyond pre- and probiotics. *Nutrients*. 2020;12(8):2189. <https://doi.org/10.3390/nu12082189>
10. Шендеров БА, Ткаченко ЕИ, Лазебник ЛБ, Ардатская МД, Синица АВ, Захарченко ММ. Метабиотики – новая технология профилактики и лечения заболеваний, связанных с микрoэкологическими нарушениями в организме человека. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2018;151(3):83–92. Shenderov BA, Tkachenko EI, Lazebnik LB, Ardat'skaya MD, Sinitza AV, Zakharchenko MM. Metabiotics – novel technology of protective and treatment of diseases associated with microecological imbalance in human being. *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2018;151(3):83–92 (In Russ.).
11. Олескин АВ, Шендеров БА. Пробиотики, психобиотики и метабиотики: проблемы и перспективы. *Физическая и реабилитационная медицина, медицинская реабилитация*. 2020;2(3):233–43. Oleskin AV, Shenderov BA. Probiotics, psychobiotics, and metabiotics: problems and prospects. *Physical and Rehabilitation Medicine, Medical Rehabilitation*. 2020;2(3):233–43 (In Russ.). <https://doi.org/10.36425/rehab25811>
12. Забокрицкий НА. Биологически активные вещества, синтезируемые пробиотическими микроорганизмами родов *Bacillus* и *Lactobacillus*. *Журнал научных статей «Здоровье и образование в XXI веке»*. 2015;17(3):80–90. Zabokritskiy NA. The biologically active substances produced probiotic microorganisms of the genera *Bacillus* and *Lactobacillus*. *The Journal of scientific articles "Health and Education Millennium"*. 2015;17(3):80–90 (In Russ.).
13. Ilinskaya ON, Ulyanova VV, Yarullina DR, Gataullin IG. Secretome of intestinal bacilli: a natural guard against pathologies. *Front Microbiol*. 2017;(8):1666. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01666>
14. Stein T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol Microbiol*. 2005;56(4):845–57. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04587.x>
15. Волков МЮ, Васильев ПГ, Воробейчиков ЕВ, Синица АВ, Рогожин АЗ, Котельников РВ. Препарат для лечения заболеваний желудочно-кишечного

- тракта «Бактистатин». Патент Российской Федерации № 2287335;2006.
Volkov MYu, Vasilev PG, Vorobejchikov EV, Sinitza AV, Rogozhin AZ, Kotelnikov RV. Preparation "Bactistatin" for treating diseases of gastrointestinal tract. Patent of the Russian Federation No. 2287335;2006 (In Russ.).
EDN: [OUOWIH](#)
16. Михайлова НА, Кузнецова ТН, Кунягина ОВ. Штамм бактерий *Bacillus subtilis*, несущий свойство антибиотикорезистентности, используемый для получения препарата «Бактиспорин». Патент Российской Федерации № 2067616;1996.
Mikhaylova NA, Kuznetsova TN, Kunyagina OV. Strain of bacteria *Bacillus subtilis* carrying property antibioticoresistance used for preparation "Bactisporin" making. Patent of the Russian Federation No. 2067616;1996 (In Russ.).
EDN: [ZALBXX](#)
17. Михайлова НА, Гатауллин АГ. Штамм бактерий *Bacillus subtilis* 1719 – продуцент антагонистически активной биомассы в отношении болезнетворных микроорганизмов, а также протеолитических, амилитических и липолитических ферментов. Патент Российской Федерации № 2298032;2007.
Mikhailova NA, Gataullin AG. *Bacillus subtilis* 1719 bacterium strain as producer of antagonistically active biomass in relates to pathogenic microorganisms, as well as proteolytic, amylolytic, and lipolytic enzymes. Patent of the Russian Federation No. 2298032;2007 (In Russ.).
EDN: [TPVIMS](#)
18. Лазарев СА, Арзуманян ВГ, Михайлова НА. Влияние состава питательной среды на прирост биомассы и синтез противомикробных метаболитов пробиотических штаммов *Bacillus subtilis*. *Бактериология*. 2021;6(2):38–42.
Lazarev SA, Arzumanyan VG, Mikhailova NA. Influence of nutrient medium composition on biomass growth and antimicrobial metabolites synthesis of *Bacillus subtilis* probiotic strains. *Bacteriology*. 2021;6(2):38–42 (In Russ.).
EDN: [KGFVMI](#)
19. Авдеева ЮА, Калуцкий ПВ, Королев ВА, Медведева ОА, Веревкина НА, Калуцкий АП. Коррекция последствий окислительного стресса в условиях экспериментального дисбиоза с применением мексидола. *Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация*. 2017;(4):43–7.
Avdeeva YA, Kalucki PV, Korolev VA, Medvedeva OA, Verevkin NA, Kalucki AP. Use of mexidol for correction effects of oxidative stress in experimental dysbiosis. *Proceedings of Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy*. 2017;(4):43–7 (In Russ.).
EDN: [ZVEWCF](#)
20. Ефимов БА, Кафарская ЛИ, Коршунов ВМ. Современные методы оценки качественных и количественных показателей микрофлоры кишечника и влагалища. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2002;(4):72–8.
Efimov BA, Kafarskaia LI, Korshunov VM. Modern methods for the evaluation of qualitative and quantitative changes in the characteristics of intestinal and vaginal microflora. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2002;(4):72–8 (In Russ.).
EDN: [MPKMLJ](#)
21. Несвижский ЮВ, Богданова ЕА, Зверев ВВ, Воробьев АА. Микробиоценоз пристеночного муцина желудочно-кишечного тракта крыс с индуцированным дисбиозом. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2007;(3):57–60.
Nesvizhsky YuV, Bogdanova EA, Zverev VV, Vorobyev AA. Microbiocenosis of parietal mucin in gastrointestinal tract of rats with induced dysbiosis. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2007;(3):57–60 (In Russ.).
EDN: [HFNMCSE](#)
22. Qiao H, Duffy LC, Griffiths E, Dryja D, Leavens A, Rossman J, et al. Immune responses in rhesus rotavirus-challenged BALB/c mice treated with bifidobacteria and prebiotic supplements. *Pediatr Res*. 2002;51(6):750–5.
<https://doi.org/10.1203/00006450-200206000-00015>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **С.А. Лазарев** – разработка дизайна и концепции экспериментального исследования (формулирование идеи, исследовательских целей и задач); сбор, анализ, интерпретация результатов; анализ и обобщение данных литературы; применение статистических методов для анализа данных; написание, редактирование, оформление текста рукописи, работа с графическим материалом; **Н.О. Вартанова** – сбор исследовательских данных; сбор, анализ, интерпретация результатов; **А.В. Поддубиков, Н.А. Михайлова** – разработка дизайна и концепции экспериментального исследования (формулирование идеи, исследовательских целей и задач), критический пересмотр содержания текста; утверждение окончательной версии статьи для публикации.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **S.A. Lazarev** designed and conceptualised the research (idea, aim, and objectives); collected, analysed, and interpreted the results; analysed and consolidated literature data; carried out the statistical analysis; drafted, edited, and formatted the manuscript; worked with the graphical material. **N.O. Vartanova** accumulated research data; collected, analysed, and interpreted the results. **A.V. Poddubikov** designed and conceptualised the research (idea, aim, and objectives); critically revised the manuscript; approved the final version for publication. **N.A. Mikhailova** designed and conceptualised the research (idea, aim, and objectives); critically revised the manuscript; approved the final version for publication.

Соответствие принципам этики. Все исследования проводились в соответствии с рекомендациями Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях, принципами этического кодекса CIOMS «Международные рекомендации по проведению биомедицинских исследований с использованием животных», Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ГОСТ 33216–2014).

Исследование с использованием лабораторных животных одобрено локальным советом по этике при ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова (протокол № 6 от 13.07.2022).

Благодарности. Исследование выполнено при финансовой поддержке Минобрнауки России (Соглашение № 075-15-2021-676 от 28.07.2021) с использованием научного оборудования ЦКП ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова.

Ethics approval. All the experiments were performed according to the recommendations of Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22.09.2010 on the protection of animals used for scientific purposes, the CIOMS International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals, and the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Russian Standard GOST 33216–2014). The study was approved by the Local Ethics Council at the I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera (Approval No. 6 of 13.07.2022).

Acknowledgements. The study was carried out with the financial support of the Ministry of Science and Higher Education of Russia (Agreement No. 075-15-2021-676 of 28 July 2021), using the equipment of the Research Equipment Sharing Center of the I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia.

Об авторах / Authors

Лазарев Сергей Александрович

ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-3206-6015>
lazarevsr1@gmail.com

Вартанова Нунэ Оганесовна, канд. биол. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6372-9910>
labmicr@mail.ru

Поддубиков Александр Владимирович,

канд. мед. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8962-4765>
poddubikov@yandex.ru

Михайлова Наталья Александровна, д-р мед. наук, проф.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6652-2093>
n_michailova@inbox.ru

Sergei A. Lazarev

ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-3206-6015>
lazarevsr1@gmail.com

Nune O. Vartanova, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6372-9910>
labmicr@mail.ru

Alexander V. Poddubikov, Cand. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8962-4765>
poddubikov@yandex.ru

Natalia A. Mikhailova, Dr. Sci. (Med.), Professor

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6652-2093>
n_michailova@inbox.ru

Поступила 13.07.2022

После доработки 04.07.2023

Принята к публикации 13.09.2023

Online first 25.09.2023

Received 13 July 2022

Revised 4 July 2023

Accepted 13 September 2023

Online first 25 September 2023