На правах рукописи

СОЛОВЬЕВА
ИРИНА ВЛАДЛЕНОВНА

МИКРОЭКОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ КОРРЕКЦИИ «ДИСБИОЗНОЙ» МИКРОБИОТЫ ЧЕЛОВЕКА

03.02.08 – экология (биология)
03.02.03 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ
на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Нижний Новгород
2013

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н.Блохиной» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека и Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждением высшего профессионального образования «Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского» – Национальный исследовательский университет (ННГУ)

Научные консультанты: доктор биологических наук, профессор
Гелашвили Давид Бежанович

доктор медицинских наук, профессор
Ефимов Евгений Игоревич

Официальные оппоненты: Зав. отделом биологических исследований НИИ Химии ННГУ,
доктор биологических наук, профессор
Смирнов Василий Филиппович

Директор ФБУН «ННИИГП» Роспотребнадзора,
доктор медицинских наук, профессор
Рахманов Рофаиль Салыхович

профессор кафедры микробиологии и иммунологии НижГМА,
доктор биологических наук
Заславская Майя Исааковна

Ведущая организация: ГНЦ РФ Институт медико-биологических проблем РАН, (г. Москва)

Защита диссертации состоится **«16» октября 2013 г. в 13^{00}** часов на заседании диссертационного совета Д 212.166.12 при ННГУ по адресу: 603950 г. Нижний Новгород, пр. Гагарина, д. 23, корп. 1, ауд. 321, биологический факультет.

E-mail: dis212.166.12@gmail.com факс: (831) 462-30-85

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ННГУ, с авторефератом - в сети Интернет на сайте ННГУ по адресу: http://www.unn.ru, на сайте ВАК России – http://vak2.ed.gov.ru/catalogue

Автореферат разослан «30» августа 2013 года

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук М.С. Снегирева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Изучение микробной эндоэкологии человека (микроэкологии) относится к одному из наиболее актуальных направлений прикладных и фундаментальных исследований в области экологии, биологии, и медицины. Это связано с важной ролью, которую играет микробиота в жизнедеятельности макроорганизма, а также с повсеместно наблюдаемыми изменениями экологии микроорганизмов, повлекшими нарастание удельного веса заболеваний, вызываемых микробами-оппортунистами. В связи с этим большой интерес представляет изучение видового разнообразия и структуры сообщества симбиотических микроорганизмов человека. В организме человека наибольшим видовым богатством характеризуется микробное сообщество толстой кишки. Известно, что нет ни одной функции макроорганизма, на которую прямо или косвенно не влиял бы микробиоценоз этого биотопа (Ткаченко, 2009).

Следует отметить, что, несмотря на большое количество работ, посвященных микробиоценозам кишечника, изучением качественного и количественного состава микрофлоры толстой кишки у «здоровых» людей разных возрастных групп занималось не так много исследователей, а выбранные группы «здоровых» были довольно малочисленны. Это обусловлено тем, что понятие «здоровье» не имеет четкого определения и носит, скорее, философский характер, в связи с чем затруднительно формировать группы «действительно здоровых» людей для определения «нормальных» показателей микрофлоры. Фактически это десять крупных исследований (Перетц, 1955; Геймберг, 1964; Гончарова, Вильшанская, 1968; Ленцнер, 1968; Haenel, 1970; Марко, 1970; Лизько, 1970; Куваева,1976; Эпштейн-Литвак, Вильшанская, 1977; Козлова, 1978). В большое количество монографий по этой тематике, выпущенных в последние годы, включены результаты именно этих исследований, они же обобщены в ОСТ 91500.11.0004-2003 «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника». Другой аспект этой темы сводится к частным вопросам: частоте обнаружения того или иного вида микроорганизмов в микробиоте, изучению микрофлоры определенных возрастных групп при различной патологии и т.п. В этих исследованиях за показатели «нормы» до сих пор принимают данные 50-70гг. прошлого века.

В настоящее время появились новые доступные высокотехнологичные методы исследований, позволяющие более подробно изучать видовую структуру симбиотических сообществ микробиоты организма человека. Современные информационные технологии дают возможность структурировать обширные базы данных, оценивать как множество единичных показателей, так и их совокупность в многомерном пространстве показателей, проводить статистический и экологический

анализ. В частности, экологический анализ успешно применен при изучении эндоэкологии симбиотических сообществ микробиоценоза миндалин человека (Бухарин и др., 2011). Однако масштабные исследования видовой структуры симбиотических сообществ микробиоценозов толстой кишки человека до настоящего времени не проводились. В связи с этим актуальным вопросом является изучение закономерностей, управляющих динамикой численности популяций микроорганизмов в составе микробиоты, ее пространственной и видовой структурой, изучение разнообразных типов межпопуляционных отношений, обеспечивающее образование сообществ как систем с относительно стабильным видовым составом. Понимание и теоретическое осмысление экологических закономерностей функционирования симбиотической микрофлоры является необходимой предпосылкой для развития и совершенствования способов влияния на ее формирование и нормализацию с помощью различных форм пробиотиков из представителей резидентной микрофлоры. Широкое распространение дисбиотических нарушений ставит на повестку дня важность разработки методов комплексной коррекции микробиоты, направленных не только на восстановление эволюционно обусловленных микробных популяций, но и обеспечивающих воздействие на макроорганизм в целом.

Цель работы: на основании изучения экологических закономерностей формирования сообществ симбиотических микроорганизмов толстой кишки «здоровых» и «больных» людей разных возрастных групп, проживающих на территории крупного промышленного мегаполиса, создать новые пробиотики в форме бактериальных концентратов, восстанавливающие эволюционно обусловленную микробиоту человека.

Задачи исследования:

1. Изучить видовую структуру сообществ симбиотических микроорганизмов толстой кишки «здоровых» и «больных» людей разных возрастных групп (от периода новорожденности до старости), проживающих на территории города Нижнего Новгорода.
2. Провести выбор параметров оценки состояния микробиоценозов толстой кишки.
3. Создать базу данных результатов исследования качественного и количественного состава микрофлоры толстой кишки «больных» и «здоровых» людей разных возрастных групп, и систему управления базой данных для сбора, хранения, статистической обработки и графического представления данных.
4. На основе анализа результатов структурирования базы данных произвести отбор видов микроорганизмов, перспективных в качестве стартерных культур пробиотиков.

5. Изучить биологические и молекулярно-генетические свойства микроорганизмов продуцентов пробиотиков с целью подбора производственно перспективных штаммов.

6. Сконструировать новые пробиотики для коррекции микробиоты человека и отработать технологии их производств.

7. Оценить эффективность введения новых пробиотиков в комплексы профилактических, лечебно-оздоровительных и реабилитационных мероприятий у разных возрастных групп населения с различными нозологическими формами заболеваний, протекающих на фоне «дисбиозной» микробиоты.

8. Разработать алгоритмы комплексной коррекции микробиоты желудочно-кишечного тракта разных возрастных групп населения.

Научная новизна. Впервые создана база данных результатов бактериологических исследований качественного и количественного состава микрофлоры толстой кишки «здоровых» и «больных» людей разных возрастных групп, проживающих на территории г. Нижнего Новгорода, и система управления базой данных, позволившая провести синэкологический анализ сообществ симбиотических микроорганизмов (Свидетельство о госрегистрации № 2011614233 РФ). Доказано, что в процессе формирования микрофлоры кишечника человека участвуют как аэробные, так и анаэробные микроорганизмы, причем в равных соотношениях с первого часа жизни, процесс нарастания анаэробной компоненты (представители родов *Lactobacillus, Lactococcus* и *Bifidobacterium*) идет параллельно с ростом условно-патогенных микроорганизмов и кишечной палочки, минуя стадию «трансформации». С наибольшей частотой 92% оппортунистические микроорганизмы в значимых количествах ($\geq 10^5$ КОЕ/г) выделяются в группе «здоровых» детей в возрасте от одного месяца до года. Частота обнаружения УПМ в микрофлоре толстой кишки здорового человека начинает снижаться после первого года жизни и составляет 18% в возрастной группе 60 лет и старше. Доказано, что общее количество симбиотических микроорганизмов различных видов, выделяемых из толстой кишки «здоровых» людей во всех возрастных группах, на один-два порядка выше, чем у больных ($p<0,05$), за исключением группы 60 лет и старше.

Впервые на основе гнездовой ПЦР гена 16S рРНК разработана методика индикации и идентификации симбиотических видов бактерий родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* и алгоритм контроля динамики роста стартерных культур при совместном периодическом и непрерывном культивировании (патент РФ № 2375459, 2008).

Впервые выявлен феномен симбиоза по типу мутуализма двух штаммов *L. plantarum 8 RA-3* и *L. fermentum 39*, обуславливающий более высокую анти-микотическую активность штаммов, выращенных в совместной культуре, чем при монокультивированиии (Патент РФ №2280465, 2004).

В результате углубленного изучения биологических свойств штаммов-продуцентов впервые создан ряд гипоаллергенных жидких сим- и синбиотиков на основе гидролизатов белка: «LL-комплекс», «LB-комплекс» и «LB-комплекс S» (Патент РФ №2280465, 2004; патент РФ №2192269, 2000 г), причем микробный консорциум стартерных культур подобран с учетом хромосомно опосредованной резистентности отдельных штаммов к антибиотикам 14 фармакологических групп, наиболее часто используемых в клинической практике, что делает возможным применение пробиотиков на фоне антибактериальных препаратов в комплексной терапии различных нозологических форм заболеваний.

Впервые разработан алгоритм коррекции дисбиоза желудочно- кишечного и репродуктивного трактов человека, осложняющего течение основного заболевания. Сформулированы основные направления комплекса мероприятий, направленных на коррекцию нарушений видовой структуры и восстановление численности популяции симбиотической резидентной микрофлоры (патент РФ №2193398, 2002).

Научно-практическая значимость работы. В ходе выполнения работы получены новые знания о формировании симбиотической микробиоты желудочно-кишечного тракта человека, выявлены возрастные особенности качественного и количественного состава микрофлоры толстой кишки «здоровых» людей, проживающих на территории мегаполиса. Полученные данные о формировании и особенностях микрофлоры людей разных возрастных групп при различных функциональных состояниях могут быть использованы для коррекции существующих критериев оценки состояния микробиоценозов человека.

Результаты работы востребованы научными, учебными, лечебно-профилактическими учреждениями и организациями медико-биологического профиля. Полученные теоретические данные используются в учебном процессе на кафедре профилактической медицины ФПКВ ГБОУ ВПО «Нижегородской медицинской академии» Минздрава РФ в циклах усовершенствования и повышения квалификации врачей.

В результате изучения комплекса биологических и молекулярно-генетических свойств культур лакто- и бифидобактерий отобраны штаммы-продуценты пробиотиков и использованы в качестве стартерных культур во вновь разработанных жидких сим- и синбиотиках «LL-комплекс», «LB-комплекс», «LB-комплекс S». Разработаны технологии, оформлены пакеты нормативно-технической документации и создано производство. Алгоритм комплексной коррекции микробиоты с включением в качестве пробиотической составляющей диетотерапии новых жидких бактериальных концентратов используется в девяти лечебно-профилактических учреждениях г. Н.Новгорода в программах лечения больных с различными нозологическими формами заболеваний, осложненных дисбиозом.

Утверждены и используются на местном уровне методические рекомендации «Совершенствование санитарно-эпидемиологического надзора в акушерско-педиатрических стационарах с целью снижения младенческой заболеваемости», 1999г. и пособие для врачей «Использование бактериальных препаратов и продуктов лечебного питания», 2000 г.

Положения, выносимые на защиту:

1. В период постнатального онтогенеза здорового человека (0-60 лет) происходят статистически значимые изменения видовой структуры микрофлоры толстой кишки, характерные для определенных возрастных групп, требующие для правильной оценки состояния микрофлоры подразделение каждой из крупных возрастных групп (0-1 год и 1год – 60 лет по ОСТ 91500.11.0004-2003) минимум на 3 подгруппы: 24 часа – 6 суток, 7 – 29 суток, 1 – 11 месяцев и 1год – 6 лет, 7-17 лет, 18-60 лет.

2. В процессе формирования микрофлоры кишечника человека, начиная с первого часа жизни, в равных соотношениях участвуют как аэробные (*E.coli, Enterococcus spp.,* УПМ семейств *Staphylococcaceae, Enterobacteriaceae*), так и анаэробные микроорганизмы (*Bifidobacterium spp., Lactobacillus spp., L.lactis*), минуя стадию «трансформации».

3. С наибольшей частотой оппортунистические микроорганизмы в значимых количествах ($\geq 10^5$ КОЕ/г) выделяются у «здоровых» детей в возрастной группе 1-11 месяцев с последующим резким снижением в возрасте от года до 17 лет, с дальнейшим сохранением стабильно невысокой частоты выделения у взрослых.

4. Численность бактерий родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*, а также *E. coli, Enterococcus spp, S.epidremidis, S. aureus, Klebsiella spp., Citrobacter spp., Proteus spp., Enterobacter spp*. относится к «информационно-значимым показателям», поскольку их численность статистически значимо различается у «здоровых» и «больных» людей одного возраста и между возрастными группами, что позволяет верифицировать классификационные решения по разделению пациентов на категории «здоровые» и «больные» с учетом возраста в многомерном пространстве показателей.

5. Видовая структура сообществ симбиотических микроорганизмов толстой кишки человека, представленных фиксированным набором клинически значимых культивируемых видов, может быть описана в рамках экологического анализа при помощи канонических индексов и показателей экологического разнообразия, что свидетельствует о применимости положений современной теоретической экологии к характеристике микробиоценозов макроорганизма.

6. Выявлен феномен усиления антагонистической активности по отношению к грибам вида *C. albicans* совместно выращенной композиции штаммов лактобацилл *L.plantarum 8RA-3* и *L. fermentum 39* по сравнению с их аксеничными культурами.

7. Для контроля динамики роста стартерных культур при совместном периодическом и непрерывном культивировании целесообразно использовать метод

индикации и идентификации симбиотических видов бактерий рода *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* на основе гнездовой ПЦР гена 16S рРНК.

8. Высокая эффективность дополнения базовой терапии различных нозологических форм заболеваний, осложненных дисбиозами, новыми жидкими мультиштаммовыми пробиотиками из лакто- и бифидобактерий доказывает лидирующее значение последних в обеспечении образования сообществ как систем с относительно стабильным видовым составом у людей разного возраста.

Апробация работы и публикации. Основные положения диссертации доложены на всероссийской конференции с международным участием «Пробиотики и пробиотические продукты в профилактике и лечении наиболее распространенных заболеваний человека» (г. Москва, 1999); всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Гигиена детей и подростков на пороге третьего тысячелетия. Основные направления развития» (г. Москва, 1999); IV международном симпозиуме «Биологически активные добавки к пище: XXI век (г. Москва, 2000); международной конференции, посвященной памяти академика РАМН и АМТН И.Н.Блохиной (г. Москва, 2001); I-м всероссийском конгрессе «Современные технологии в педиатрии и детской хирургии» (г. Москва, 2002); XI Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство». г. Москва, 19-23 апреля, 2004г.; Международной конференция «Пробиотики, пребиотики, синбиотики и функциональные продукты питания. Современное состояние и перспективы». Форум «Новые технологии. Экология и здоровье». г. Москва, 2-4 июня, 2004.; III съезде Всероссийского общества биотехнологов России. г. Москва, 25-27.10.2005.; 6-м съезде научного общества гастроэнтерологов России, г. Москва, 1-3 февраля 2006; 4-м съезде биотехнологов России, г. Пущино. 5-7.12.2006; Международном конгрессе «Пробиотики, пребиотики, синбиотики и функциональные продукты питания. Фундаментальные и клинические аспекты», г.Санкт-Петербург, 15-18.05 2007; Международном форуме «Современные технологии на службе охраны здоровья россиян» в рамках выставки «Медицина+», г. Нижний Новгород, 27.04.2010; круглом столе в рамках конференции, посвященной долгожителям Грузии в Сендайском университете (г.Сендай, Япония), 24.07.2010; конференции Японского общества по молочнокислым бактериям (г.Сендай, Япония), 26-27.07.2010; кафедре микробиологии университета Киорин (Токио), 28.07.2010; международной конференции «Пробиотики и здоровье», г. Ереван, Армения, 05-07.10.2010; Международная конференция «Пробиотики и бактериофаги как альтернатива антибиотиков», Тбилиси, Грузия, 29.06.-04.07.2012; Научно-практический конгресс с международным участием «Актуальные вопросы детской гастроэнтерологии», Киев, 28-29 ноября 2012; XIV Международном медицинском форуме «Технологии профилактики – современный путь развития здравоохранения», Н.Новгород, 28-30 мая 2013.

По материалам диссертации опубликовано 53 работы, из них 28 в изданиях, рекомендованных ВАК.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, 7 глав, заключения, выводов, списка цитированной литературы и приложения. Диссертация иллюстрирована 123 рисунками и 63 таблицами. Основной текст изложен на 396 страницах. Библиографический указатель включает 373 источника литературы (282 отечественных и 91 иностранных).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

СОВРЕМЕННЫЕ АСПЕКТЫ СИНЭКОЛОГИИ СИМБИОТИЧЕСКИХ МИКРООРГАНИЗМОВ ТОЛСТОЙ КИШКИ ЧЕЛОВЕКА И ПРИНЦИПЫ КОРРЕКЦИИ МИКРОБИОТЫ С ПОМОЩЬЮ ПРЕПАРАТОВ ИЗ ШТАММОВ-СИМБИОНТОВ

В главе на основе данных отечественной и зарубежной литературы приведены сведения о видовой структуре биотических сообществ как объекта биоэкологических исследований, о роли симбиотической микробиоты в процессе жизнедеятельности макроорганизма, представлена структурная организация микробиоценоза пищеварительного тракта. Приведена информация о качественном, количественном составе и функциях «нормальной» микрофлоры желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), о процессе ее формирования в младенческом и раннем детском возрасте, а также о факторах и механизмах развития дисбиоза. Даны представления о средствах и принципах коррекции «дисбиозной» микрофлоры различных биотопов организма человека. Освещены вопросы конструирования пробиотических препаратов, продуктов питания и БАД к пище и методов их контроля.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Дизайн исследования

Исходя из цели настоящей работы был определен дизайн исследования:

1. Обозначены возрастные группы.

2. Определены критерии оценки состояния здоровья для каждой возрастной группы для выделения категорий «здоровых» и «больных».

3. Изучен качественный и количественный состав микрофлоры просвета толстой кишки и определен характеризующий его перечень показателей.

4. Создана электронная база данных и система управления базой данных (СУБД).

5. Проведено структурирование базы данных.

6. В результате структурирования базы данных определены *информационно-значимые виды* микроорганизмов с точки зрения понятий «здоровье» и «болезнь» для каждой возрастной группы.

7. *Из информационно-значимых видов* выбраны представители индигенной микрофлоры, безусловные пробиотические микроорганизмы – представители родов *Bifidobacterium* и *Lactobacillus*.

8. В результате изучения биологических и молекулярно-генетических свойств культур в соответствии с требованиями, предъявляемыми к пробиотическим микроорганизмам, отобраны производственно-перспективные штаммы лакто- и бифидобактерий.

9. Сконструирована гипоаллергенная питательная основа, в качестве полупродукта которой использован гидролизат белка, позволяющая проводить культивирование как лакто-, так и бифидобактерий с достаточной степенью выхода биомассы и сохранностью готового продукта в течение 60 суток.

10. Сконструированы новые жидкие пробиотики в форме бактериальных концентратов, содержащие в качестве стартерных культур отобранные штаммы-продуценты, разработаны технологии производства, оформлены пакеты нормативно-технической документации и налажен выпуск пробиотиков.

11. Изучена эффективность коррекции микробного симбиоза с помощью вновь сконструированных пробиотиков у больных с различными нозологическими формами заболеваний, а также использования их для профилактики дисбиоза у лиц из контингента риска по его формированию.

12. Созданы алгоритмы коррекции «дисбиозной» микробиоты.

2.2. Объем экспериментальных данных

Таблица 1

Количество обследованных людей по возрастным группам

Возрастные группы	Обозначение групп	Количество человек (абс.)		
		здоровых	больных	всего
Дети				
0 - 23ч. 59мин.	0ч. – 23ч.	86	87	173
24ч. - 167ч.	24ч. – 6с.	194	250	444
7дн. - 29дн.	7с. – 29с.	180	178	358
1мес. - 11мес. 29дн.	1мес. – 11мес.	245	290	535
1год - 6 лет 11мес. 29дн	1г. – 6л.	209	236	444
7лет - 17лет 11мес. 29дн.	7л. – 17л.	192	203	395
Взрослые				
18лет - 59лет 11мес. 29дн.	18л. – 59л.	236	234	470
60лет и старше	60л. и >	180	269	449
ИТОГО		1522	1746	3268

1. Изучен качественный и количественный состав микрофлоры толстой кишки 3268 «здоровых» и «больных» людей разных возрастных групп, всего проведено 5837 анализов (табл. 1).

2. В процессе исследования выделено 32 784 культуры, идентифицировано до вида 23 497 штаммов микроорганизмов, как представителей облигатной микрофлоры, так и условно-патогенных и патогенных микроорганизмов различных родов. Из них выбрано для изучения антагонистической активности производственно-перспективных штаммов 453 штамма патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, 314 культур *C. albicans*, а также эталонные штаммы *S. flexneri 170, S. flexneri 337, S. sonnei 5063, E. coli 157, S. aureus 209, P. mirabilis H-237, P. vulgaris 177, E. coli M-17* из коллекции ФГБУ НЦЭСМП. В исследовании использовали 53 штамма лактобацилл из ВКПМ ФГУП «ГосНИИгенетика», коллекции ФГБУ НЦЭСМП, ВКМ ИБФМ РАН, ГК лактобацилл ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной, а также штаммы бифидобактерий: *B. bifidum 1, B. bifidum 791, B. longum 379* из ГКНМ ФБУН МНИИЭМ имени Габричевского.

2.3. Методы изучения видового состава и численности симбиотических микроорганизмов

Изучение микрофлоры толстой кишки проводилось в соответствии с Методическими указаниями «Бактериологическая диагностика дисбактериоза кишечника», по методу разработанному Р.В. Эпштейн-Литвак и Ф.Л. Вильшанской (1969) и модифицированному в ННИИЭМ (Диагностика и биокоррекция, 2004). Оценку результатов бактериологического исследования проводили в соответствии с ОСТ 91500.11.0004-2003.Протокол ведения больных…, (2003).

Изучение микрофлоры репродуктивного тракта проводилось по методу, разработанному ранее в лаборатории кишечных инфекций ГНИИЭМ (Соловьева, 1987).

Идентификация патогенных и условно-патогенных микроорганизмов проводилась в соответствии с Приказом Минздрава СССР от 22.04.1985 №535 «Об унификации микробиологиченских (бактериологических) методов исследования, применяемых в клнико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений»; методическими рекомендациями Минздрава РСФСР "Методы бактериологического исследования условно-патогенных микроорганизмов в клинической микробиологии", от 19.12.1991, а также с рекомендованными Лабораторным Советом Государственной санитарно-эпидемиологической службы РФ методиками (Пивоваров, Королик, 2000; Донецкая, 2011; Поздеев, Федоров, 2007.)

Для выделения Candida spp. использовали соскобы с кожи или слизистых оболочек, ногтевые чешуйки, мочу, фекалии, полученные от больных различных возрастных групп с разнообразными заболеваниями кандидозной этиологии и кандидоносителей (Реброва, 1989; Егорова, Минскер, 1988; Андреев и др., 2008).

Биохимическую идентификацию бактерий рода Lactobacillus и Bifidobacterium проводили классическим методом с использованием дисков с углеводами и бульона с бромкрезоловым пурпурным производства «HiMedia Laboratories Pvt. Limited», Индия, и тест-систем Api-20CHL, Api-50CHL производства bioMerieux, Франция.

Биосовместимость штаммов-продуцентов изучали методом наложенных капель на твердой среде МРС-4 (Глушанова, 2005, МУ 2.3.2.2789-10).

Антагонистическую активность штаммов-продуцентов в отношении УПМ выявляли методом отсроченного антагонизма на плотной среде по методу Фредерика в модификации А.А. Ленцнера (Ленцнер, 1964; ФС Лактобактерин сухой, 2000).

Изучение антибиотикорезистентности штаммов-продуцентов проводили в соответствии с МУК 4.2.1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам» и МУ 2.3.2.2789-10. В исследовании использовали препараты 14 фармакологических групп – по одному антибиотику из каждой группы.

Выживаемость штаммов-продуцентов пробиотиков в кислой среде и способности к деканьюгации желчных солей изучали in vitro по МУ 2.3.2.2789-10 «Методические указания по санитарно-эпидемиологической оценке безопасности и функционального потенциала пробиотических микроорганизмов, используемых для производства пищевых продуктов».

Установление сроков годности пробиотиков проводили в соответствии с МУК 4.2.1847-04 от 20 июня 2004 года «Санитарно-эпидемиологическая оценка обоснования сроков годности и условий хранения пищевых продуктов», причем устанавливали количество живых микроорганизмов каждого входящего в композицию штамма с помощью классической идентификации по биохимическим свойствам.

Методика молекулярно-генетического анализа. Пробоподготовка к проведению полимеразно-цепной реакции, ПЦР и ее модификации, электрофорез в агарозном геле, учет результатов электрофореза, выделение и очистка амплифицированной ДНК, секвенирование фрагментов генов проводились по стандартным методикам (МУ 2.3.2.2789-10).

В работе использованы праймеры, предложенные в научной литературе, (Ward, Timmins, 1999; Walter, Tannock, Tilsava-Timisjarvi, 2000 Chagnaud, 2001), а также родовые праймеры для индикации лактобацилл и бифидобактерий и видовой

праймер специфичный для *L. delbrueckii,* сконструированные в рамках работы Точилиной (2009).

Исследована динамика роста бактерий в условиях раздельного и совместного культивирования (Точилина,2009).

Выбор показателей, учитываемых в данной работе при характеристике качественного и количественного состава микрофлоры ЖКТ человека осуществлялся с помощью метода экспертных оценок (Орлов, 2002).

Статистическая обработка полученных результатов. Проверка данных на нормальность распределения проводилась с применением статистических критериев Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Уилка. Дальнейший статистический анализ проводился с помощью непараметрических критериев Манна-Уитни и Крускала-Уоллиса (Гланц, 1998; Сергиенко, Бондарева, 2006; Банержи, 2007). В работе использован многомерный кластерный анализ методом Варда, данные кластеризации проанализированы с помощью метода К-средних. Статистическая обработка материала была проведена с использованием прикладной программы STATISTICA 8.0 фирмы StatSoft и созданной нами программы для ЭВМ «Автоматизированная система микробиологического мониторинга микробиоценозов желудочно-кишечного тракта (ЖКТ)» (свидетельство о государственной регистрации программы № 2011614233, зарегистрировано в реестре программ для ЭВМ 30.05.2011). Критический уровень значимости принимали p=0,05. В случае множественных сравнений производилась корректировка критического уровня значимости с помощью поправки Бонферрони (Гланц, 1998).

Для описания ранговых распределений симбиотических микроорганизмов толстой кишки человека применялась гиперболическая модель, адекватность которой оценивали при помощи коэффициента детерминации (Левич и др., 2009).

Для сравнительного анализа перестройки ранговых распределений численности микрофлоры толстой кишки человека в возрастном аспекте был использован прием с фиксацией порядка показателей для «референс-группы» «здоровых» и «больных», который сохранялся для последующих возрастных групп, так называемые ранговые профили (Гелашвили и др., 2001).

Экологический анализ исходных данных. Для количественного описания видового разнообразия сообществ симбиотических микроорганизмов толстой кишки человека проведены расчеты с использованием общепринятых в экологии индексов: видового разнообразия Шеннона (Мэгарран, 1992; Одум, 1975), доминирования Симпсона (Одум, 1975), видового богатства Маргалефа (Маргалеф, 1992) и выравненности Пиелу (Мэгарран, 1992; Одум, 1975). Для подтверждения сделанных обобщений и получения статистически корректных оценок различий (t-критерий Стьюдента) в видовом разнообразии микрофлоры толстой кишки разновозрастных

групп здоровых и больных людей, был применен индекс Шеннона, для которого разработаны соответствующие алгоритмы (Мэгарран, 1992).

ГЛАВА 3. СИНЭКОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СИМБИОТИЧЕСКОЙ МИКРОБИОТЫ ТОЛСТОЙ КИШКИ ЛЮДЕЙ РАЗНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУПП

В процессе проведения исследования проведен выбор параметров оценки состояния микробиоценозов толстой кишки, создана база данных результатов бактериологических анализов и система управления базой данных для сбора, хранения, статистической обработки и графического представления данных. позволившая провести синэкологический анализ видовых сообществ симбиотических микроорганизмов толстой кишки «здоровых» и «больных» людей разных возрастных групп.

Все обследованные люди были разделены на возрастные группы.
Группы «здоровых» людей были сформированы по критериям здоровья, определенным для каждой возрастной группы в отдельности (Вельтищев, Ветров, 2002; Казин, Блинова, Литвинова, 2000). Критерии подробно описаны в диссертации в разделе «Особенности возрастной динамики численности симбиотических микроорганизмов толстой кишки «здоровых» людей».

Группы «больных» в возрасте от 7 дней и более были сформированы по следующим критериям: «больные» – лица, в анамнезе которых на момент обследования отмечались хронические заболевания в стадии обострения или клинические проявления острой формы, на фоне применения антибактериальных и/или других лекарственных средств, так и при первичном обращении до назначения этиотропной терапии, а также все не вошедшие в группу «здоровые».

К группам «больных» детей в возрасте 0 ч. - 23 ч. и 24 ч. – 6 с. были отнесены доношенные дети без врожденных уродств и выраженной патологии, отнесенные к подгруппе риска по развитию гнойно-воспалительных заболеваний по клиническим показателям состояния здоровья новорожденного по шкале Апгар (менее 8 баллов) и факторам пренатального риска у матери.

3.1. Выбор параметров оценки состояния микробиоценоза толстой кишки

Правильная трактовка результата бактериологического исследования имеет исключительное значение для эпидемиолога и клинициста при решении вопроса о природе кишечного заболевания и соответствующих методах лечения. Однако, несмотря на то, что в упоминавшемся отраслевом стандарте «Протокол ведения

больных. Дисбактериоз кишечника» представлены унифицированные критерии оценки состояния микробиоценозов, большую роль при диагностике нарушений микрофлоры по-прежнему играет фактор субъективности.

На основании углублённого анализа литературных данных, опыта работы ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н.Блохиной Роспотребнадзора, других ведущих НИИ в России и за рубежом по проблеме микроэкологии человека методом экспертных оценок из числа клинически значимых родов и видов микроорганизмов, определяющих качественный и количественный состав микрофлоры, были выделены 29 показателей, наиболее полно отражающих состояние микробиоценоза ЖКТ человека (это микроорганизмы родов *Bifidobacterium spp., Lactobacillus spp., Clostridium spp., Fusobacterium spp., Peptococcus spp, Peptostreptococcus spp., Eubacterium spp., Bacteroides spp.*, все роды семейства *Enterobacteriaceae, Staphylococcus spp., Enterococcus spp., Pseudomonas spp., Acinetobacter spp., Alcaligines spp*. и др., грибы родов *Candida spp*. и др.), включающих 70 родов, 376 клинически значимых видов. Полный перечень 29-ти показателей представлен в тексте диссертации. В соответствии с выбранными показателями результаты бактериологических анализов (количества микроорганизмов в 1г субстрата) были занесены в электронные таблицы, создана электронная база данных; разработан программный продукт, позволяющий обрабатывать и систематизировать результаты бактериологических исследований качественного и количественного состава микрофлоры желудочно-кишечного тракта из базы данных – система управления базой данных (СУБД) «Автоматизированная система микробиологического мониторинга микробиоценозов желудочно-кишечного тракта (ЖКТ)», которая написана на языке FoxPro в среде программирования Microsoft Visual FoxPro 8.0 (файл-серверная реляционная СУБД) в рамках операционной системы Windows.

На этапе инфологического проектирования было выделено 5 основных сущностей: человек, возрастная группа, лечебное учреждение, в котором обследовался пациент, микроорганизм, анализ. Для проектирования был выбран метод сущность-связь. Доступ к базе программно организован таким образом, что пользователь может модифицировать и обрабатывать данные на уровне доступного и понятного ему графического интерфейса. Для удобства работы в программный продукт также встроено руководство пользователя, где можно найти всю необходимую информацию о работе с программой.

Следует отметить, что для пополнения базы данных наличие СУБД не обязательно. Данные можно экспортировать из таблиц Microsoft Excel 2003, организованных по определённым правилам. Возможен и импорт результатов анализов для последующего хранения и обработки. Получено свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ №2011614233 от 30 мая 2011г.

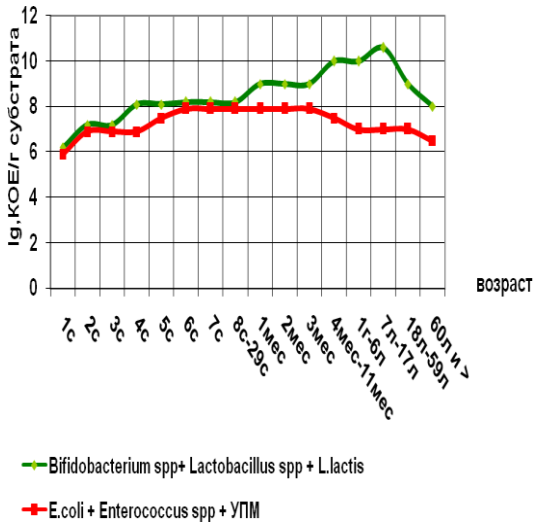
3.2. Особенности возрастной динамики численности симбиотических микроорганизмов толстой кишки «здоровых» людей

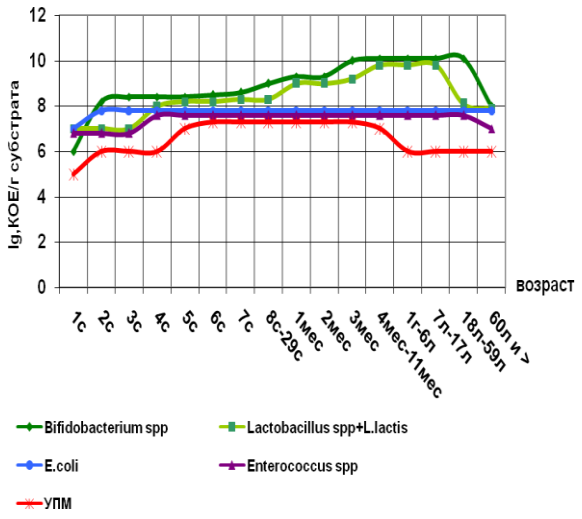
Кишечная микрофлора, в частности бактерии толстой кишки, рассматривается как основная детерминанта здоровья и заболевания людей (Тутельян, Попова, 2002). Первичная колонизация бактериями новорожденного в раннем неонатальном периоде является важным и определяющим звеном в процессе формирования микробиоценоза, так как в дальнейшем состояние здоровья индивидуума, и резистентность к целому ряду заболеваний во многом зависит от характера кишечной микрофлоры и ее активности (Нетребенко, 2005).

По данным литературы известно, что колонизация кишечника человека определенным набором родов и видов микроорганизмов обуславливает этапность становления микрофлоры желудочно-кишечного тракта в онтогенезе (Ткаченко Е.И., 2009). Внутриутробно развивающийся плод не является стерильным, а получает от матери какое-то количество индигенных микроорганизмов in utero (Глушкова, 2000; Бочков и др., 2004; Martin R, 2004). Далее до семидневного возраста микрофлора претерпевает три стадии становления: первая – «условно-асептическая» начинается с момента рождения; вторая – «нарастающей колонизации» наступает через 10-20 часов после родов. В этот период колонизация осуществляется гетерогенными микроорганизмами, в первую очередь аэробными и факультативно аэробными бактериями, такими как *E.coli, Staphylococcus spp., Klebsiella spp., Enterococcus spp.* и др. Третья стадия - «трансформации микрофлоры» - наступает с 5-7 дня после родов, в результате которой происходит вытеснение бифидофлорой других микроорганизмов.

Обобщив данные, полученные по каждой возрастной группе, можно представить процесс изменения микрофлоры «здоровых» людей в течение жизни, от рождения до старости.

В период формирования микрофлоры во вторую стадию «нарастающей колонизации» у «здоровых» младенцев идет активный рост как анаэробных микроорганизмов (лактобацилл, лактококков и бифидобактерий), так и аэробных (кишечной палочки, энтерококка и группы УПМ) в количествах 10^5 – 10^7 КОЕ/г. (рис. 1 А, Б)





А Б

Рис. 1. Характеристика численности аэробной и анаэробной симбионтной микрофлоры толстой кишки "здоровых" людей различных возрастных групп (количество микроорганизмов приведено в усредненных значениях).

На вторые сутки до 10^8КОЕ/г увеличивается количество *E.coli*, на третьи сутки количество облигатных анаэробов, а на пятые количество УПМ. К шестым суткам, то есть к моменту выписки из родильного дома в микрофлоре устанавливается равновесие аэробной и анаэробной части флоры, далее происходит нарастание лакто- и бифидофлоры, и к 2 месяцам жизни ребенка ее численность достигает значений 10^9-10^{10}КОЕ/г. На таком уровне количество анаэробов сохраняется и в более старшие возрастные периоды. Снижение количества лакто- и бифидобактерий начинается ближе к 60 годам. Количество нормальной *E.coli* со вторых суток не изменяется и остается на уровне 10^8КОЕ/г на протяжении практически всей жизни человека. Падение количества УПМ начинается с трехмесячного возраста, к шести годам снижается до уровня 10^6КОЕ/г и далее не изменяется.

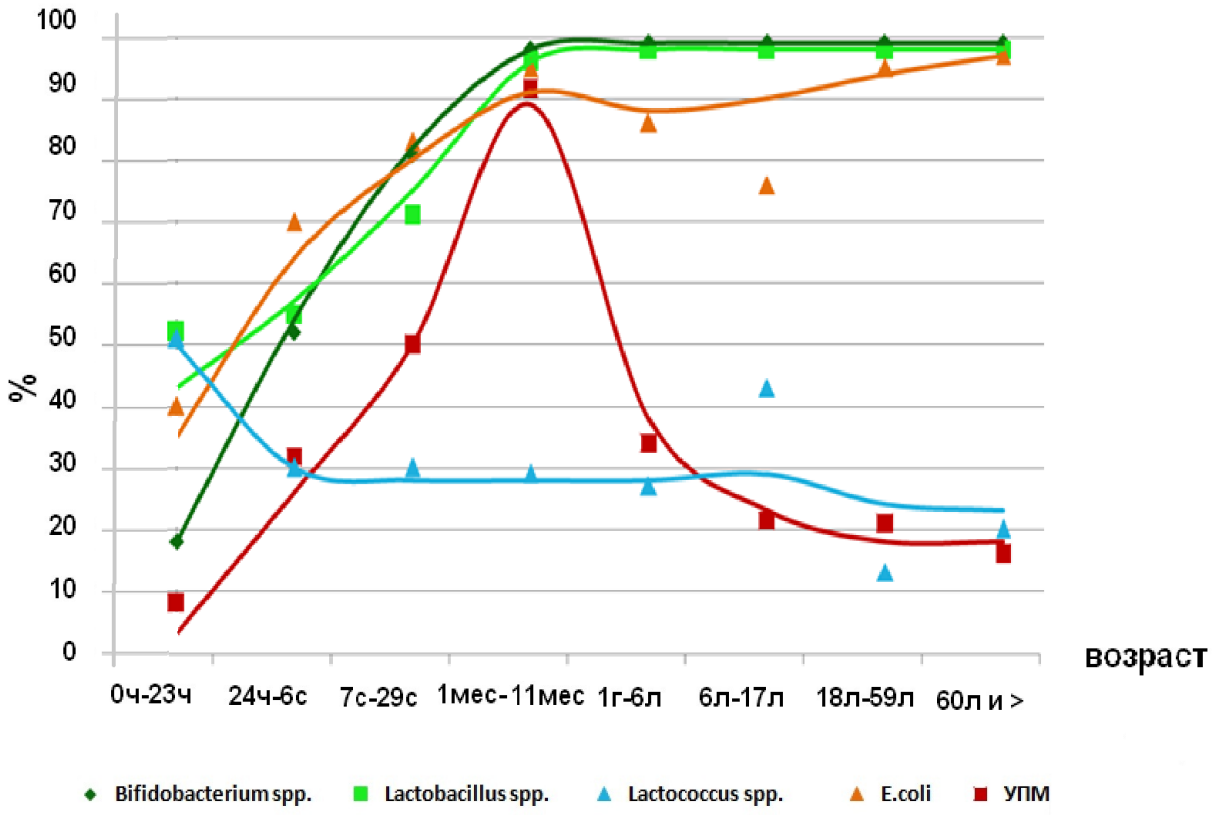


Рис. 2. Распределение частоты выделения (по оси ординат) облигатной микрофлоры и УПМ из кишечника «здоровых» людей разных возрастных групп.

Анализ тенденции распределения частоты выделения представителей микробиоценоза толстой кишки в микрофлоре «здоровых» людей разных возрастных групп позволяет выделить три типа распределения частоты выделения по возрастным группам. К первому типу (распределение с насыщением) относятся зависимости для *Lactobacillus spp, Bifidobacterium spp* и *E. coli*, характеризующиеся нарастанием частоты выделения в первые часы и сутки с последующим насыщением, выходящим на стационарный уровень в период от одного года жизни и до 60 лет и более. Второй тип – трехфазная зависимость частоты выделения по возрастным группам характерная для *Lactococcus spp.* Эта зависимость имеет максимальное значение частоты выделения в первые сутки жизни с последующим снижением и выходом на стационарный уровень у детей. Вторичное снижение частоты выделения наблюдается уже у взрослых. Наконец, третий тип – колоколообразная функция отклика, характеризующая возрастание частоты выделения УПМ от первых часов до одного года жизни, с последующим резким снижением частоты выделения в возрасте от одного года до 17 лет, затем переходящая в стационарную фазу. Обращает на себя внимание тот факт, что третий тип распределения частоты выделения по возрастным группам, характерный для УПМ, подчиняется одному из фундаментальных законов теоретической экологии – закону толерантности Шелфорда (Одум, 1975). (рис. 2)

Следует также отметить, что в 93,8% дети рождаются с бактериальной флорой ЖКТ, причем в первые 24 часа жизни преобладающей флорой являются микроаэрофильные бактерии родов *Lactobacillus* и *Lactococcus*, а также факультативно-анаэробные микроорганизмы родов *Staphylococcus* и *Escherichia* (рис. 2).

Условно-патогенные формы уже присутствуют в микрофлоре здоровых новорожденных, причем в 8,1% случаев в количествах $\geq 10^5$КОЕ/г. Далее, во время пребывания в родильном доме (1-6 суток) и в домашних условиях (от 7 суток до года) происходит нарастание количества как анаэробной, так и аэробной компонент микрофлоры (рис. 2). Частота выделения, видовое разнообразие условно-патогенной флоры в значимых количествах ($\geq 10^5$КОЕ/г) и обнаружение их в ассоциациях по три, четыре и более вида нарастает в период сукцессий и достигает своего пика в возрасте от одного месяца до одного года.

Бифидобактерии и лактобациллы, начиная с одного месяца жизни, встречаются в 100% случаев. Кишечная палочка выделяется у 95% детей (10^5 – 10^7КОЕ/г) в возрасте от одного месяца до года. В возрасте 7 – 17 лет частота обнаружения E.coli снижается до 76% (10^5 – 10^7КОЕ/г), а затем снова повышается, и достигает 100% у людей пожилого и старческого возраста. Частота обнаружения УПМ в микрофлоре толстой кишки здорового человека начинает снижаться после первого года жизни, и составляет 18% в возрастной группе 60 лет и старше.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что в процессе формирования микрофлоры с первых часов жизни участвуют как аэробные, так и анаэробные микроорганизмы, причем в равных соотношениях. Процесс нарастания анаэробной компоненты (лакто- и бифидофлоры) идет параллельно с ростом УПМ и кишечной палочки, минуя стадию «трансформации». Уменьшение количества УПМ в микрофлоре «здоровых» детей начинается после года. С наибольшей частотой УПМ ($\geq 10^5$ КОЕ/г) выделяются в группе «здоровых» детей в возрасте от одного месяца до года.

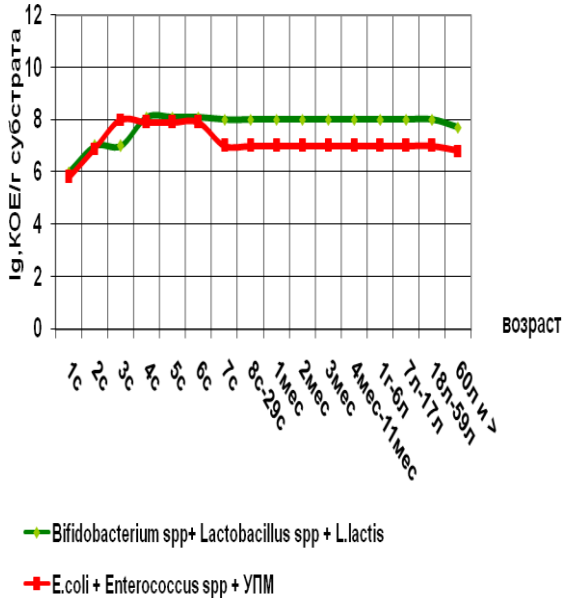
3.3. Особенности возрастной динамики численности симбиотических микроорганизмов толстой кишки «больных» людей

Обобщив полученные данные, мы смогли представить процесс изменения микрофлоры «больных» людей выбранных возрастных групп.

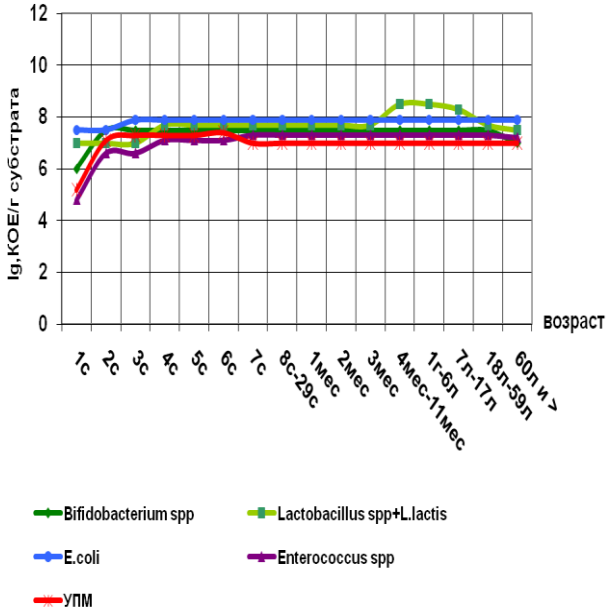
В первые 24 часа жизни процесс формирования микрофлоры в группе «больных» детей не отличается от такового у «здоровых» (рис. 3 А,Б).

На вторые сутки до 10^8 КОЕ/г увеличивается количество бифидобактерий и *E.coli*, количество лактобацилл и лактококков остается на уровне 10^7 КОЕ/г. Уже к третьим-четвертым суткам пребывания в родильном доме устанавливается равновесие аэробной и анаэробной части флоры на уровне 10^8КОЕ/г. К седьмым

суткам (к моменту выписки из родильного дома) отмечается незначительное снижение количества УПМ до 10^7 КОЕ/г.



А



Б

Рис. 3. Характеристика численности аэробной и анаэробной симбионтной микрофлоры толстой кишки "больных" людей различных возрастных групп (количество микроорганизмов приведено в усредненных значениях).

Количество кишечной палочки и облигатных анаэробов остается на уровне 10^8КОЕ/г. Затем, вплоть до трех месяцев, количественное соотношение микроорганизмов не меняется, и только на четвертый месяц увеличивается количество лактобацилл и лактококков до 10^9 КОЕ/г. Далее количественное соотношение микроорганизмов не меняется до шестилетнего возраста. С шести лет количество лактобацилл и лактококков начинает постепенно снижаться, и в возрастной группе 60 лет и более составляет 10^7 КОЕ/г. Количество бифидобактерий, кишечной палочки, энтерококка и УПМ остается постоянным.

3.4. Сравнение возрастной динамики численности симбиотических микроорганизмов толстой кишки «здоровых» и «больных» людей

Характер распределения тенденции частоты выделения облигатных представителей микробиоценоза толстой кишки по возрастным группам в микрофлоре «больных» людей имеет отличия от «здоровых». Так, несмотря на сохранение тенденции для *Lactobacillus spp, Bifidobacterium spp* и *E. coli к* распределению с насыщением, они реже встречаются у «больных» детей. Однако наиболее резкие изменения частоты выделения у «больных» людей касаются УПМ:

типичная колоколообразная кривая заметно уплощается, демонстрируя резко сниженную и упрощенную возрастную динамику. И только трехфазная зависимость частоты выделения по возрастным группам, характерная для *Lactococcus spp.* сохраняется и у «больных» детей.(рис. 4)

По сравнению с детьми из подгруппы «здоровых», у «больных» детей в возрасте от одного месяца до года наблюдается резкое снижение частоты выделения представителей анаэробной части флоры (лактобацилл и бифидобактерий), а также условно-патогенных видов в значимых количествах ($\geq 10^5$ КОЕ/г). Особенно это заметно в возрастных группах 7 - 29 суток и от 1 - 11 месяцев (37% и 50%, 29.5 и 91.6% соответственно) (рис. 4). У детей от года до 17 лет и у взрослых частота обнаружения УПМ в группе «больных» достоверно выше, чем у «здоровых», частота выделения анаэробов снижена.

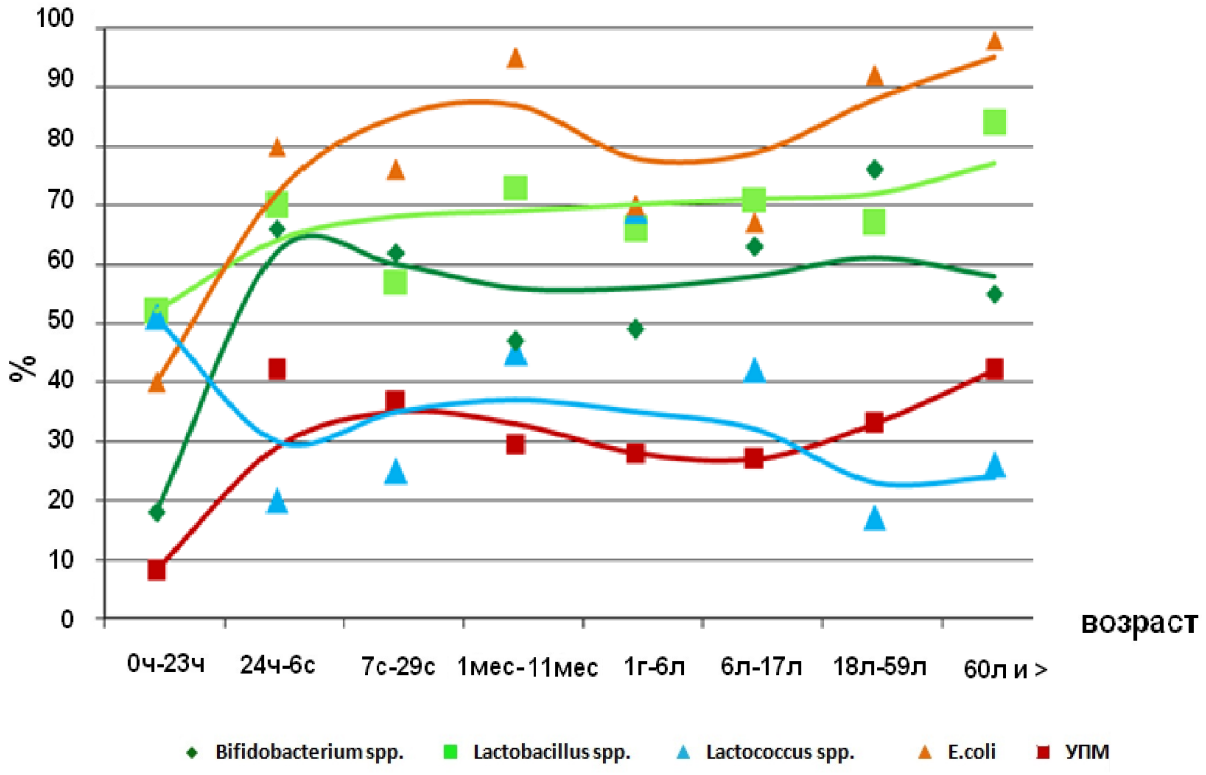


Рис. 4. Распределение частоты выделения (по оси ординат) облигатной микрофлоры и УПМ из кишечника «больных» людей разных возрастных групп.

В ассоциациях УПМ выделяются чаще у «больных» людей, чем у «здоровых» во всех возрастных группах, кроме группы детей от 1 - 11 месяцев (рис. 5).

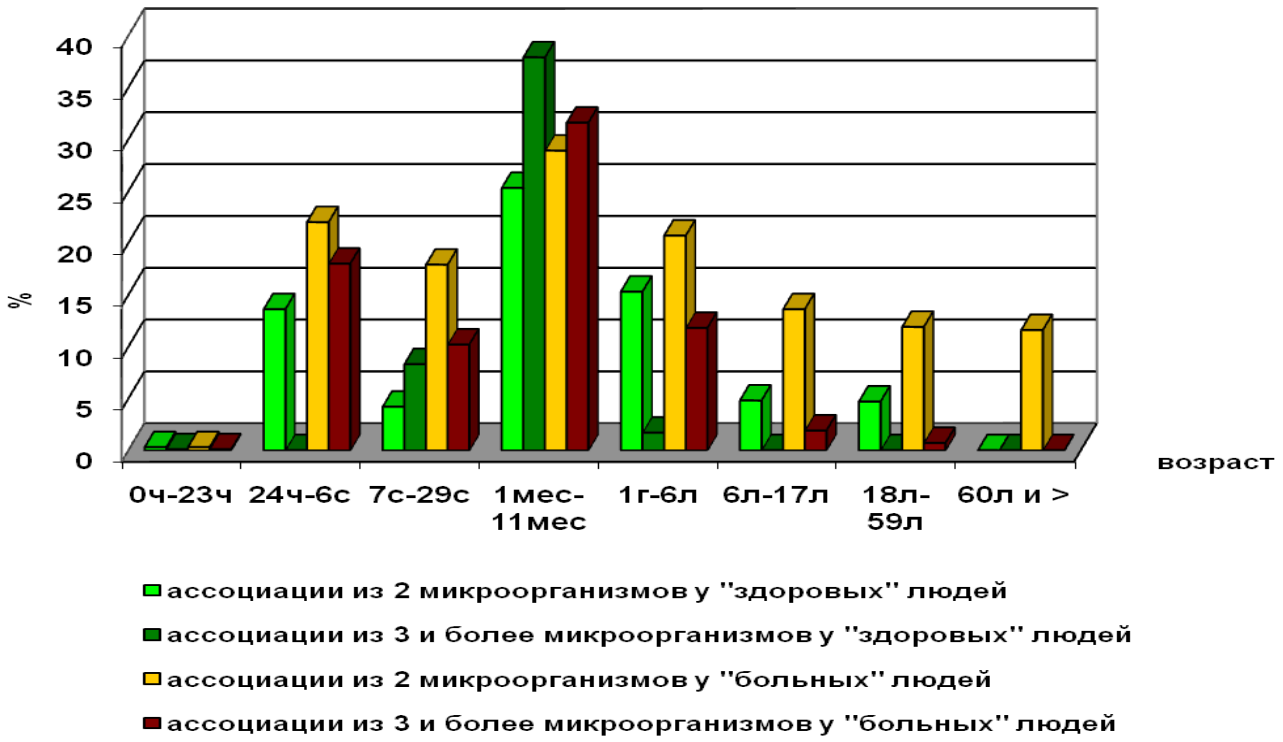


Рис.5. Частота обнаружения (по оси ординат) ассоциаций УПМ у «здоровых» и «больных» людей разного возраста.

Полученные результаты можно объяснить с точки зрения процесса формирования местной толерантности к резидентной микрофлоре и существующей теорией эндогенного инфицирования, описанных в трудах зарубежных и отечественных ученых. В результате воздействия на резидентную флору неблагоприятных факторов – самого заболевания, химиотерапевтических и антибактериальных средств, применяемых для лечения, изменяются антигенные свойства микроорганизмов за счет образования стресс-индуцибельных белков, то есть белков теплового шока или стресс-белков. Микроорганизмы, приобретшие новые свойства и набор антигенов, воспринимаются организмом человека как чужеродные. Как следствие, снижается местная толерантность клеток хозяина к представителям резидентной микрофлоры. В эпителиальных клетках резко возрастает продукция хемокинов, запускается воспалительный процесс с повреждением слизистой кишечника, что окончательно снимает местную толерантность клеток хозяина. В связи с этим, возникновение патологического процесса можно объяснить не количеством выделяемых УПМ, а их измененными свойствами и подавлением лакто- и бифидобактерий (Бондаренко, 2007).

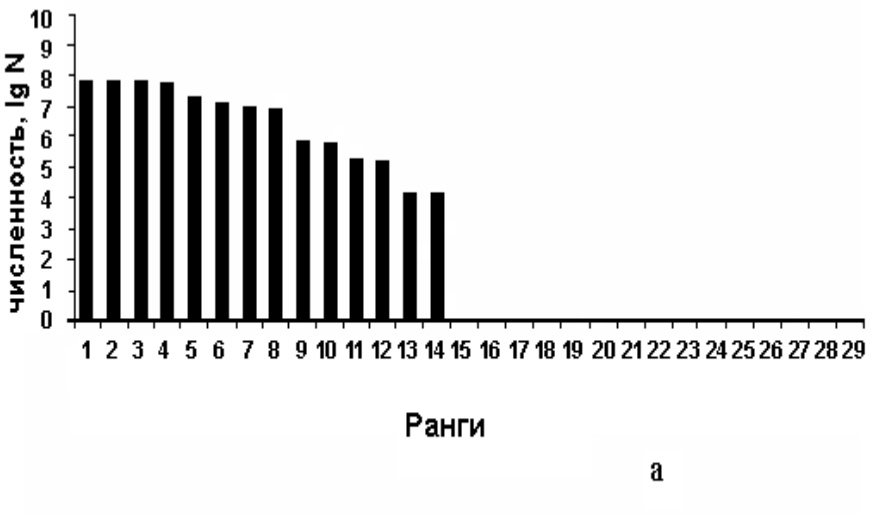
3.5. Синэкологический анализ микробиоценозов толстой кишки «здоровых» и «больных» людей разных возрастных групп

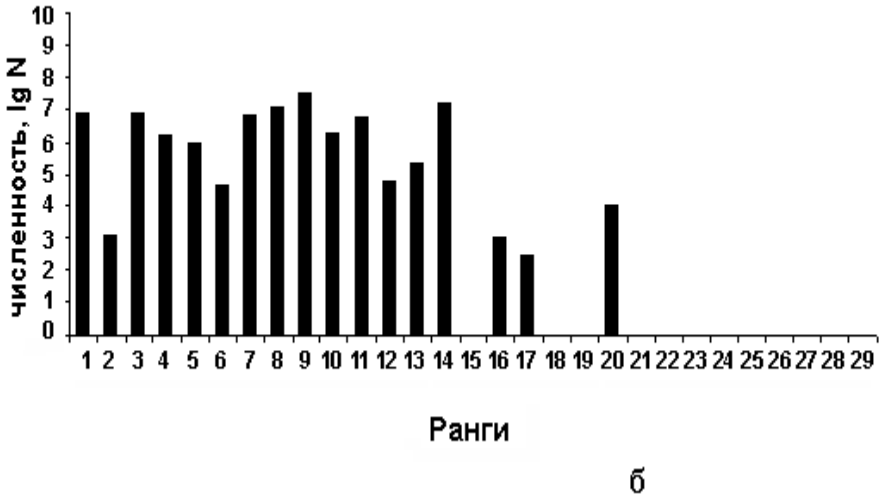
Применение синэкологического анализа видовой структуры сообществ симбиотических микроорганизмов толстой кишки «здоровых» и «больных» людей разных возрастных групп позволило количественно оценить видовую структуру исследуемых сообществ при помощи индексов видового богатства Маргалефа, видового разнообразия Шеннона, выравненности Пиелу, доминирования Симпсона и др. (Животовский, 1980; Мэгарран, 1992; Маргалеф, 1992), а также ранговых распределений численностей видов (Левич, 1980; Мэгарран, 1992; Пузаченко, Пузаченко, 1996).

Анализ ранговых распределений. Сравнительная характеристика видовой структуры сообществ симбиотических микроорганизмов толстой кишки «здоровых» и «больных» людей разных возрастных групп проводилась путем анализа ранговых распределений. В работе апробированы две модели ранговых распределений: экспоненциальная $n_i = n_1 z^{i-1}$ и гиперболическая $n_i = n_1 / i^{\beta}$. Полученные параметры обеих моделей (z и β) для всех возрастных групп «здоровых» и «больных» людей, были использованы для расчета теоретических значений численностей микроорганизмов толстой кишки человека и оценки адекватности исследованных моделей. С целью более точной визуализации результатов анализируемых параметров (показателей) были использованы ранговые профили, предложенные Гелашвили и соавторами (Гелашвили и др., 2001).

В качестве примера на рис. 6 *а* представлено каноническое ранговое распределение численностей симбиотических микроорганизмов толстой кишки детей в возрасте от 0 часов до шести суток. Для сравнительного анализа перестройки ранговых распределений численностей микрофлоры толстой кишки человека в возрастном и функциональном аспекте был применен прием с фиксацией последовательности показателей, задаваемой вектор-строкой выбранной «референс-группы» (рис. 6 *а*) и сохраняемой для последующей исследуемой группы (рис. 6 *б*). Так, например, если последовательность показателей для «референс-группы» группы «здоровых» детей в возрасте 0 ч. - 6 с. (рис. 6 *а*) сохраняется и для «больных» детей этого же возраста, то можно получить наглядную картину (ранговый профиль) (рис. 6 *б*), демонстрирующий как перестройку численностей показателей (количественный аспект), так и появления новых, либо исчезновения имевшихся показателей (качественный аспект). Например, в данном случае, у «больных» детей в возрасте 0ч. - 6 с. (рис. 6 *б*) по сравнению со «здоровыми» (рис. 6 *а*) этой же возрастной группы наблюдается появление новых видов

микроорганизмов. Появляется 3 новых вида: *Bacteroides spp.*, *E. coli* (гем+) (позиции 16, 17, соответственно) и *P. vulgaris* (позиция 20). Подобные выпадения или появления новых микроорганизмов наблюдаются во всех возрастных группах людей. Соответствующие ранговые профили приведены в тексте диссертации.





Ранги (показатели)

1. Количество *Escherichia coli* (всего)
2.Количество *E. coli* лактозодефективных
3. Количество *E. coli* лактозопозитивных
4. Количество *Enterococcus spp.*
5. Количество *Klebsiella spp.*
6. Количество *E. coli* лактозонегативных
7. Количество *M. morganii*
8. Количество *P. mirabilis*
9. Количество *Lactobacillus spp.*
10.Количество *Bifidobacterium spp.*
11.Количество *S. epidermidis*
12.Количество *S. aureus*
13.Количество *Enterococcus spp.* гемолитических
14.Количество *L. lactis*
15.Количество *Clostridium spp.* и других анаэробных микроорганизмов (*Fusobacterium spp., Peptococcus spp., Peptostreptococcus spp., Eubacterium spp.*)
16. Колиество *Bacteroides spp.*
17. Количество *E. coli* гемолитических
18. Количество *Enterobacter spp., Pantoea spp.*
19. Количество *Citrobacter spp.*
20. Количество *P. vulgaris*
21.Количество *Providencia spp. и* других редко встречающихся видов семейства *Enterobacteriaceae (Budvicia spp., Buttiauxella spp., Cedecea spp., Edwardsiella spp., Ewingella spp., Kluyvera spp., Leclercia spp. и др.)*
22. Количество *Hafnia spp., Serratia spp.*
23. Количество *P. aeruginosa*
24. Количество микроорганизмов группы неферментирующих грамотрицательных бактерий (*Pseudomonas spp., Burkcholderia spp., Acinetobacter spp., Alcaligenes spp., Stenotrophomonas spp., Chryseobacterium spp.* и др.)
25. Количество *Candida spp.*
26.Количество дрожжевых клеток – дрожжеподобных грибов, не относящихся к роду *Candida* (*Saccharomyces spp., Kluiveromyces spp.* и др.)
27. Количество *Shigella spp.*
28. Количество *Salmonella spp.*
29.Количество энтеропатогенных, энтеротоксигенных, энтероинвазивных и энтерогеморрагических *E. coli*

Рис. 6. Сравнение профилей 29 показателей, характеризующих микрофлору толстой кишки у «здоровых» (а) и «больных» (б) детей в возрасте 0ч. – 6с. Порядок показателей задается вектор-строкой для «референс-группы» «здоровых» детей и сохраняется для «больных».

Кластерный анализ. Далее для верификации правильности и полноты экспертного разбиения исходного массива данных на категории «здоровые» и «больные» был применен многомерный кластерный анализ по методу Варда (рис. 7).

Многомерный кластерный анализ не только подтвердил, что микрофлора толстой кишки различается у «здоровых» и «больных» людей по фиксированному набору 29-ти показателей, но также позволил разбить и упорядочить объекты (пациенты) по микробиологическим данным внутри каждого из двух крупных кластеров на непересекающиеся подмножества – кластеры, соответствующие выбранным возрастным группам (табл. 2).

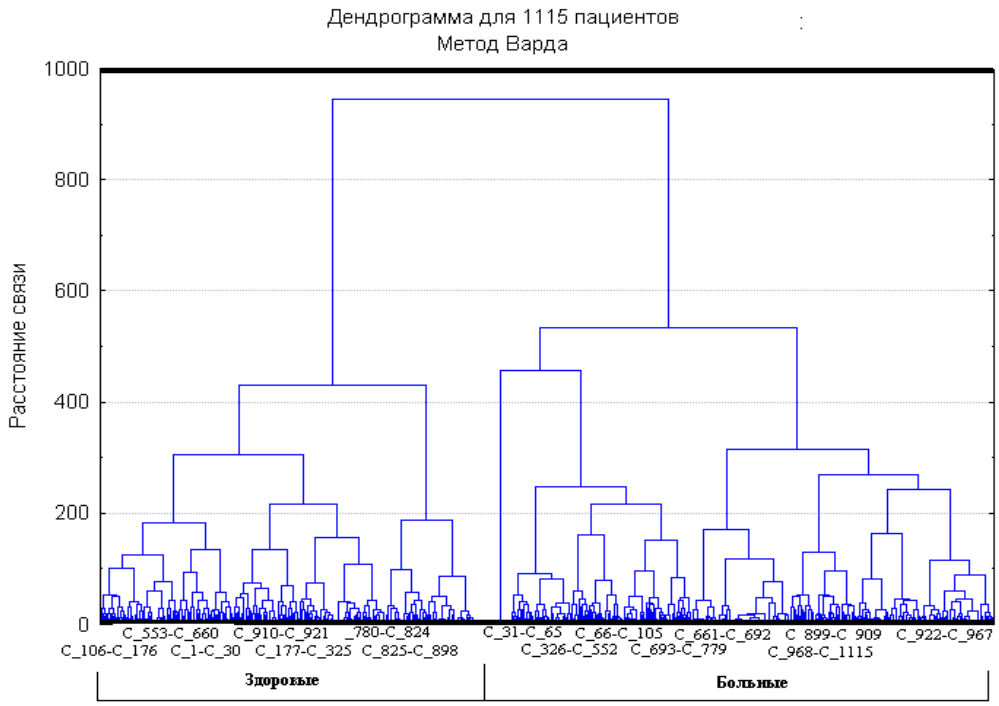


Рис. 7. Многомерный кластерный анализ методом Варда сообществ симбиотических микроорганизмов толстой кишки здоровых и больных людей разных возрастных групп (n=1115).

Таблица 2

Расшифровка результатов многомерного кластерного анализа методом Варда микрофлоры толстой кишки (n=1115)

Возрастные группы	Здоровые	Больные
0ч.–6 с.	C_1 – C_30	C_31 - 65
7с.–29с.	C_106 – C_176	C_66 – C_105
1мес. – 11мес.	C_177 – C_325	C_326 – C_552
1г. – 6л.	C_553 – C_660	C_661 – C_692
7л. – 17л.	C_780 – C_824	C_693 – C_779
18л. – 59л.	C_825 – C_898, C_910 – C_921	C_899 – C_909, C_922 – C_967
60л. и >	–	C_968 – C_1115

Метод К-средних подтвердил результаты, полученные многомерным кластерным анализом.

Таким образом, в период постнатального онтогенеза здорового человека (0-60 лет) происходят статистически значимые изменения видовой структуры микрофлоры толстой кишки, характерные для определенных возрастных групп, требующие для правильной оценки состояния микрофлоры подразделение каждой из крупных возрастных групп (0-1 год и 1год – 60 лет по ОСТ 91500.11.0004-2003) минимум на 3 подгруппы: 24 часа – 6 суток, 7 – 29 суток, 1 – 11 месяцев и 1год – 6 лет, 7-17 лет, 18-60 лет.

Статистический анализ методом Манна-Уитни. Для ответа на вопрос о наличии или отсутствии различий в численности симбиотических микроорганизмов толстой кишки между «здоровыми» и «больными» людьми, относящимися к одной возрастной группе, был проведен статистический анализ попарных различий с применением критерия Манна-Уитни. В анализ были включены 29 показателей – роды и виды симбиотических микроорганизмов толстой кишки, встречающиеся одновременно у здоровых и больных людей 7-ми возрастных групп.

В ходе анализа в каждой возрастной группе пациентов были выявлены «информационно значимые показатели» - виды микроорганизмов, численность которых статистически значимо различается как у «здоровых» и «больных» людей одного возраста, так и между возрастными группами. (табл. 3)

Таблица 3

Информационно-значимые показатели микрофлоры толстой кишки человека, выявляемые при попарном сравнении на основе критерия Манна-Уитни между больными и здоровыми людьми, относящимися к одной возрастной группе

№ п/п	Возрастные группы	Показатели и значения уровня значимости
1	0ч.–6 с.	*Staphylococcus epidermidis* (p<0,001)
2	7с.–29с.	*Klebsiella spp.* (p<0,001), *S. aureus*(p<0,001)
3	1мес. – 11мес.	*Bifidobacterium spp.* (p<0,001); *Lactobacillus spp.*(p=0,004); *Enterococcus spp* (гем+) (p<0,001); *Enterobacter, Pantoea spp.* (p=0,002);*Proteus mirabilis* (p<0,001)
4	1г. – 6л.	*Lactobacillus spp.* (p=0,001); *Citrobacter spp.* (p=0,009)
5	7л. – 17л.	*Bifidobacterium spp.* (p<0,001),*Lactobacillus spp.* (p<0,001); *Escherichia coli* (всего) (p=0,007)
6	18л. – 59л.	*Lactobacillus spp.* (p=0,004),*Enterococcus spp.* (p<0,001)
7	60л. и более	Информационно-значимые показатели не выявлены

Статистический анализ продемонстрировал возможность применения выбранных «информационно-значимых показателей» в процедурах скрининга и диагностики дисбиотических состояний.

Анализ видового разнообразия. Видовая структура биотического сообщества характеризуется не только показателями видового богатства, но и видового разнообразия, учитывающего представленность каждого вида. Левич (1980) подчеркивает, что видовая структура представляет собой экологическую «систему отсчета», поскольку именно изменения в численностях видов дают информацию о структуре и функционировании сообщества. Удобную форму свертывания информации о сообществе представляют собой индексы разнообразия: видового разнообразия Шеннона, доминирования Симпсона, видового богатства Маргалефа и выравненности Пиелу. Полученные результаты показывают, что, начиная со второй недели жизни и до 60 лет и более значение суммарной численности сообществ симбиотических микроорганизмов толстой кишки «здоровых» людей по критерию Манна-Уитни статистически значимо превышает таковую у «больных». Следует подчеркнуть, что во всех возрастных группах, как у «здоровых», так и у «больных» людей, при увеличении видового разнообразия сообществ симбиотических микроорганизмов толстой кишки, оцениваемого по индексу Шеннона, закономерно снижается доминирование (индекс Симпсона) и возрастает выравненность (индекс Пиелу) (табл. 4). Эти факты полностью согласуются с основными положениями теоретической экологии. В качестве примера приведем рассчитанные значения показателей видовой структуры сообществ симбиотических микроорганизмов толстой кишки для трех возрастных групп: «здоровых» и «больных» детей в возрасте 24 ч. – 6с., 1 мес. – 11 мес. и взрослых 18л. – 59л. (табл. 4). Расчеты индексов по остальным возрастным группам представлены в тесте диссертации.

Далее был проведен статистический анализ различий в видовом разнообразии сообществ микроорганизмов толстой кишки, оцениваемого по индексу Шеннона, у «здоровых» и «больных» людей разных возрастных групп. Анализ проводили в два этапа. На первом этапе изучались межгрупповые различия, обусловленные возрастом, отдельно у «здоровых» и «больных» людей.

Статистически значимые различия с учетом поправки Бонферрони в группе «больных» людей были выявлены между несколькими возрастными группами: 1г. – 6л. и 7л. – 17л.; 7л.-17л. и 18л. – 59л.; 18л.-59л. и 60л. и >. В то же время в группе «здоровых» людей статистически значимых различий в видовом разнообразии сообществ симбиотических микроорганизмов толстой кишки по индексу Шеннона выявлено не было. Это можно объяснить тем, что «нормальная флора» кишечника здорового человека довольно постоянна, даже если ее исследовать через большие интервалы времени, при условии что в бытовых условиях жизни обследуемого не наступило существенных изменений (Малкоч, Бельмер, 2009). Таким образом, получено экологическое объяснение известным эмпирическим фактам.

На втором этапе проведен статистический анализ различий в видовом разнообразии сообществ симбиотических микроорганизмов толстой кишки, оцениваемого по индексу Шеннона, между «здоровыми» и «больными» людьми в одних и тех же возрастных группах. Статистически значимые различия с учетом поправки Бонферрони в видовом разнообразии сообществ микроорганизмов толстой кишки между здоровыми и больными людьми выявлены только у детей в возрасте до года в двух возрастных группах: 7с. – 29с. и 1 мес. – 11 мес.

Таблица 4

Показатели видовой структуры сообществ симбиотических микроорганизмов толстой кишки здоровых и больных людей разных возрастных групп

Показатели	Формула (обозначение)	Здоровые			Больные		
		Возрастные группы			Возрастные группы		
		24 ч.–6 с.	1 м.–11 м.	18–59 лет	24 ч.–6 с.	1 м.–11 м.	18–59 лет
Общая численность	$N \cdot 10^{10}$	11,14	462,26	143,29	11,03	70,89	133,09
Видовое богатство	S	13	22	21	17	19	15
Индекс видового разнообразия Шеннона	$H = -\sum_{i=1}^{S} p_i \cdot \ln p_i$	1,64	1,03	0,64	1,54	2,03	0,98
Индекс доминирования Симпсона	$C = \sum_{i=1}^{S} p_i^2$	0,25	0,47	0,72	0,35	0,17	0,43
Индекс видового богатства Маргалефа	$d = \frac{S-1}{\ln N}$	0,47	0,72	0,71	0,63	0,66	0,50
Индекс выравненности Пиелу	$e = H/\ln S$	0,64	0,33	0,21	0,54	0,67	0,36

Таким образом, видовая структура сообществ симбиотических микроорганизмов толстой кишки человека, представленных выбранными 29 показателями, учитывающими количества различных видов микроорганизмов в одном грамме субстрата, может быть описана в рамках экологического анализа при помощи канонических индексов и показателей экологического разнообразия.

В результате проведенного синэкологического анализа сообществ симбиотических микроорганизмов показаны новые закономерности формирования микрофлоры кишечника «здоровых» и «больных» людей, а именно доказано, что в этом процессе в равных соотношениях с первого часа жизни, участвуют аэробные и анаэробные микроорганизмы, минуя стадию «трансформации», причем нарастание анаэробной компоненты (представители родов *Lactobacillus, Lactococcus* и *Bifidobacterium*) идет параллельно с ростом *E.coli*, бактерий рода *Enterococcus* и УПМ.

В результате проведенных исследований доказано, что в период постнатального онтогенеза здорового человека (0-60 лет) происходят статистически значимые изменения видовой структуры микрофлоры толстой кишки, характерные для определенных возрастных групп, требующие для правильной оценки состояния микрофлоры подразделение каждой из крупных возрастных групп (0-1 год и 1год – 60 лет по ОСТ 91500.11.0004-2003) минимум на 3 подгруппы: 24 часа – 6 суток, 7 – 29 суток, 1 – 11 месяцев и 1год – 6 лет, 7-17 лет, 18-60 лет.

Доказано, что в группе «здоровых» людей оппортунистические микроорганизмы в значимых количествах ($\geq 10^5$ КОЕ/г) с наибольшей частотой в 92% случаев выделяются в группе детей в возрасте от одного месяца до года. Частота обнаружения УПМ в микрофлоре толстой кишки здорового человека начинает снижаться после первого года жизни, и составляет 18% в возрастной группе 60 лет и старше. Доказано, что суммарная численность сообществ симбиотических микроорганизмов, выделяемых из толстой кишки здоровых людей на один - два порядка выше, чем у больных ($p<0,05$) во всех возрастных группах за исключением группы 60 лет и старше, где таких различий не обнаруживается.

Выявлено, что численность бактерий родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*, а также *E. coli, Enterococcus spp, S.epidremidis, S. aureus, Klebsiella spp., Citrobacter spp., Proteus spp., Enterobacter spp.* относится к «информационно-значимым показателями», то есть их численность статистически значимо различается у «здоровых» и «больных» людей одного возраста и между возрастными группами, что позволяет верифицировать классификационные решения по разделению пациентов на категории «здоровые» и «больные» с учетом возраста в многомерном пространстве показателей.

Результаты синэкологического анализа микробиоты «здоровых» и «больных» людей послужили теоретическими предпосылками и обоснованием для разработки пробиотиков.

ГЛАВА 4. ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ ОТБОРА ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ ШТАММОВ - ПРОДУЦЕНТОВ ПРОБИОТИКОВ

В настоящее время доказано, что любые нозологические формы заболеваний сопровождаются нарушениями микроэкологии желудочно-кишечного тракта, требующими коррекции. В связи с этим, пробиотические препараты являются неотъемлемой частью общего комплекса лечебно-оздоровительных и реабилитационных мероприятий. При создании пробиотиков необходимо решить две основные проблемы: подбор штаммов, характерных для микробиоценоза кишечника человека, соответствующих предъявляемым технологическим требованиям, и разработка питательных сред, состоящих из биологически близких организму человека компонентов и обеспечивающих высокий выход биомассы.

В связи с этим, в ходе данного раздела работы были поставлены следующие задачи: на основе анализа результатов структурирования базы данных произвести отбор видов микроорганизмов, перспективных в качестве пробиотических стартерных культур и изучить биологические и молекулярно-генетические свойства микроорганизмов продуцентов пробиотиков с целью подбора производственно перспективных штаммов.

Высокая значимость и лидирующие позиции в численности сообществ симбиотических микроорганизмов «здоровых» людей всех возрастных групп лактобацилл и бифидобактерий обусловили выбор микроорганизмов этих родов для дальнейшего изучения.

В ходе исследования биологических свойств установлено, что все штаммы рода *Lactobacillus* обладают высокой степенью антагонистической активности по отношению к тест-штаммам патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, полученным из коллекции ФГБУ НЦЭСМП, ПМ и УПМ, циркулирующим на территории Приволжского федерального округа, причем очень высокую антагонистическую активность проявили все тестируемые штаммы видов *L.plantarum* и *L.fermentum*.

Показано, что изученные культуры лактобацилл и бифидобактерий биосовместимы как в пределах одного рода, так и между родами, что нивелирует проблему межбактериального антагонизма и обеспечивает достаточный выход биомассы всех потенциальных штаммов-продуцентов в процессе совместного культивирования и высокую выживаемость всех стартерных культур при хранении. К группе биосовместимых бактерий, перспективных в отношении создания многокомпонентных пробиотиков, были отнесены следующие штаммы: *L. plantarum 8 RA-3, L. fermentum 39, L. fermentum 90 TC-4, B. bifidum 1, B. bifidum 791, B. longum 379*. Кроме того, выявлен феномен симбиоза по типу мутуализма *L. plantarum 8 RA-*

3 и *L. fermentum 39*, обуславливающий более высокую противокандидозную активность штаммов, выращенных при совместном культивировании, что является предпосылкой для создания пробиотика с выраженным антимикотическим действием.

Изучение кислотоустойчивости лактобацилл и бифидобактерий в модели in vitro позволило сделать вывод, что выбранные штаммы обладают относительно высоким уровнем кислотоустойчивости, что гарантирует успешное прохождение их через кислую среду желудка и поступление в достаточном количестве в толстый кишечник даже при гиперацидном состоянии.

Согласно результатам работы по изучению антибиотикорезистентности отобранных штаммов к 14 группам антибактериальных препаратов было установлено, что все они устойчивы к гентамицину, цефотаксиму, ципрофлоксацину, фуразолидону и сульфаниламидам. В отношении других антибиотиков отмечены различные уровни антибиотикорезистентности как между лактобациллами и бифидобактериями, так и между штаммами одного вида. Все лактобациллы устойчивы к тетрациклину и ванкомицину, а бифидобактерии к ампициллину, эритромицину, полимиксину, рифампицину. Оба штамма *L.fermentum* устойчивы к эритромицину, различаясь между собой по устойчивости к цефалотину, цефепиму, полимиксину. *B.longum 379* устойчивы к цефепиму и цефотаксиму. Штаммы *B.bifidum* различаются между собой по устойчивости к цефотаксиму. Таким образом, установлено, что выбранные в результате исследований штаммы бактерий рода *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* обладают устойчивостью к широкому спектру антибактериальных препаратов, причем всегда два-три штамма разных родов устойчивы к действию конкретного антибиотика, что обосновывает использование этой композиции в составе пробиотических препаратов, так как в настоящее время считается необходимым применение пробиотиков с первого дня антибиотикотерапии. Предыдущие исследования показали, что данные штаммы микроорганизмов обладают хромосомно опосредованной резистентностью к антибактериальным препаратам (Леванова, Ефимов, 2009).

На основании проведенных теоретических и прикладных исследований, был отобран консорциум биосовместимых культур: *L.plantarum 8RA-3, L.fermentum 39, L. fermentum 90 TC-4, B. bifidum 1, B. bifidum 791, B. longum 379.* Определены нуклеотидные последовательности фрагмента гена 16S рРНК отобранных штаммов, полученные последовательности депонированы в международной базе данных GenBank/EMBL.

В процессе выполнения данной работы нами создана универсальная методика индикации и идентификации лактобацилл и бифидобактерий на основе гнездовой мультиплексной ПЦР и системы специально подобранных олигонуклеотидных праймеров, которая позволяет осуществлять точную видовую идентификацию

пробиотических культур, а также проводить динамический контроль роста популяции лактобацилл в монокультуре и при совместном выращивании, как в лабораторных условиях, так и при использовании реакторного метода периодического или непрерывного культивирования. Разработана методология валидации процесса контроля динамики роста стартерных культур с использованием гнездовой ПЦР гена 16S рРНК при совместном периодическом и непрерывном культивировании симбиотических видов бактерий рода *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*.

Таким образом, в ходе проведенной работы выявлен феномен усиления антагонистической активности по отношению к грибам вида *C. albicans* совместно выращенной композиции штаммов лактобацилл *L.plantarum 8RA-3* и *L.fermentum 39* по сравнению с их аксеничными культурами (патент №2280465). Доказано, что для контроля динамики роста стартерных культур при совместном периодическом и непрерывном культивировании целесообразно использовать метод индикации и идентификации симбиотических видов бактерий рода *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* на основе гнездовой ПЦР гена 16S рРНК (патент №2375459 РФ).

ГЛАВА 5. КОНСТРУИРОВАНИЕ НОВЫХ ЖИДКИХ ПРОБИОТИКОВ КАК СРЕДСТВ КОРРЕКЦИИ МИКРОБНОЙ ЭКОСИСТЕМЫ ЧЕЛОВЕКА

Полученные на предыдущем этапе исследований результаты позволили создать три новых жидких пробиотика в форме БАД к пище: синбиотик с выраженной антимикотической активностью «LL-комплекс», мультипробиотик «LB-комплекс S», симбиотик «LB-комплекс». Разработана промышленная технология производства пробиотика «LB-комплекс», оформлена и утверждена на Федеральном уровне технологическая документация ТУ и ТИ 9291-002-01966979-05 с изменением №1 по требованиям ЕврАзЭС, получено свидетельство о государственной регистрации №RU.77.99.11.003.E.045248.11.11 от 02.11.2011, способ приготовления защищен патентом №2192269 от 03.07.2000. Разработана технология лабораторного производства синбиотика «LL-комплекс» и мультипробиотика «LB-комплекс S», оформлена и утверждена на местном уровне технологическая документация ТУ и ТИ 929100-003-01966979-10 и ТУ и ТИ 929100-004-01966979-10. Способ приготовления пробиотика «LL-комплекс» защищен патентом №2280465 от 25.10.2004.

В процессе создания жидких пробиотиков были сконструированы питательные основы, обеспечивающие одинаково высокий выход биомассы штаммов-продуцентов родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium,* их жизнеспособность и

активность в течение длительного времени (не мене 60 суток), а также сохранность и накопление ценных метаболитов, что является необходимым условием для достижения высокой клинической эффективности препаратов. Состав основ тщательно выверен с учетом требований, предъявляемым к основам пробиотиков, и включает только те компоненты и субстанции, которые разрешены для применения в пищевой промышленности.

Штаммовые композиции новых пробиотиков составлены исходя из конкретных задач получения препаратов с заданными свойствами на основании результатов исследований, описанных в главе 4 настоящей работы.

Таким образом, в ходе работы создан ряд новых жидких препаратов – сим- и синбиотиков из пробиотических микроорганизмов родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*, что обусловлено их достоверно высокой значимостью и лидирующими позициями в численности сообществ симбиотических микроорганизмов здоровых людей всех возрастных групп.

ГЛАВА 6. БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКАЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ СОЗДАННЫХ ЖИДКИХ ПРОБИОТИКОВ

Эффективность введения новых пробиотиков в комплексы профилактических, лечебно-оздоровительных и реабилитационных мероприятий у разных возрастных групп населения с различными нозологическими формами заболеваний, протекающих на фоне «дисбиозной» микробиоты, оценивалась по данным бактериологических и клинических исследований.

Препарат «LL-комплекс» применялся в качестве пробиотической компоненты диетотерапии в схемах лечения гастродуоденальной и аллергологической патологии у детей, находящихся на лечении в МЛПУ ДГКБ №27 «Айболит». Пробиотик получали 66 детей в возрасте от 2 до 15 лет. В комплексных программах лечения ВЗОМТ, осложненных кандидозом, «LL-комплекс» принимали 60 женщин в возрасте от 17 до 40 лет, находящихся на лечении в отделении гинекологии МЛПУ ГКБ №12. В лечебных программах выхаживания недоношенных новорожденных «LB-комплекс» получали 475 младенцев в МЛПУ ДГКБ№27 «Айболит». В выполнении программы оздоровления детей и беременных женщин на территории г. Нижнего Новгорода участвовали родильные дома №№ 1,2,3,4,6,7, женские консультации №№2,3,5,20, больницы №№ 33, 1, 27. В комплексных схемах лечения в качестве пробиотической компоненты использовались «LB-комплекс» и «LL-комплекс». Всего пробиотики получили 1036 человек, находящихся в различных лечебных учреждениях города. «LB-комплекс» также использовали при реализации программы оздоровительно-реабилитационных мероприятий в 14 ДОУ

Автозаводского района, где пробиотик получали 850 детей в возрасте от 3 до 6 лет. При лечении хеликобактер-ассоциированной патологии в диету также включали «LB-комплекс». В МЛПУ ГКБ №5 и гастроэнтерологическом центре отделенческой больницы станции Горький-сортировочный пробиотики был назначен 70 больным, в ООО «Санаторий им. ВЦСПС» - 182 пациентам. «LB-комплекс S» в качестве пробиотической составляющей диеты использовали в комплексе лечения туберкулезной инфекции у 74 детей в возрасте от 3 до 14 лет, находящихся на лечении в НОКПТД, а также в программе оздоровления студентов старших курсов медицинского ВУЗа – у 60 учащихся. Всего пробиотики получили 2 873 человека.

Опыт использования жидких пробиотиков в алгоритмах лечения различных нозологических форм заболеваний показал их выраженную клиническую эффективность: улучшилось общее состояние микрофлоры, зафиксировано снижение количества и частоты выделения оппортунистических микроорганизмов, восстановление основного компонента нормальной микрофлоры – бифидо- и лактобактерий, отмечено более быстрое купирование клинических проявлений основных заболеваний по сравнению с контрольными группами, снизилось количество осложнений токсического и токсико-аллергического характера после базовой терапии. Во всех случаях отмечена хорошая переносимость новых жидких пробиотиков, полное отсутствие каких-либо побочных эффектов.

Результаты клинической апробации пробиотиков приведены в тексте диссертации. Акты внедрения прилагаются.

Доказанная высокая клиническая эффективность созданных пробиотиков при использовании их в качестве специализированных продуктов питания в диетотерапии при комплексном лечении различных нозологических форм заболеваний, осложненных дисбиозами, свидетельствует о правильности обозначенных ранее теоретических закономерностей. Во-первых, в результате проведенных клинических и лабораторных исследований подтверждена гипотеза доминирующей роли симбионтной микрофлоры ЖКТ в процессе жизнедеятельности макроорганизма и ключевого значения лакто- и бифидобактерий в симбиозе аутохтонной флоры и их достоверно высокая значимость в численности сообщества симбиотических микроорганизмов здоровых людей всех возрастных групп. Во-вторых, доказана целесообразность использования в составе пробиотиков консорциума биосовместимых стартерных культур с выраженной антибиотикорезистентностью, кислотоустойчивостью и высоким уровнем антагонизма по отношению к оппортунистическим и патогенным микроорганизмам. В-третьих, подтверждено наличие противокандидозного действия пробиотика «LL-комплекс», обусловленного феноменом мутуализма двух штаммов - *L. plantarum 8 RA-3* и *L. fermentum 39*, проявляющемся при совместном культивировании.

Высокая эффективность дополнения базовой терапии различных нозологических форм заболеваний, осложненных дисбиозами, новыми жидкими мультиштаммовыми пробиотиками из лакто- и бифидобактерий подтверждает лидирующее значение последних в обеспечении образования сообществ как систем с относительно стабильным видовым составом у людей разного возраста.

ГЛАВА 7. РАЗРАБОТКА АЛГОРИТМА КОМПЛЕКСНОЙ КОРРЕКЦИИ ДИСБИОЗНОЙ МИКРОБИОТЫ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО И РЕПРОДУКТИВНОГО ТРАКТА ЧЕЛОВЕКА

Основной задачей данного раздела работы является разработка алгоритма комплексной коррекции микробиоты желудочно-кишечного и урогенитального тракта человека. Сформулированы и подробно описаны в диссертации основные положения комплекса мероприятий, направленных на коррекцию дисбиотических нарушений при различных нозологических формах заболеваний, осложненных дисбиозом. Предложено использование в качестве пробиотической составляющей диетотерапии специализированных продуктов лечебного питания в форме БАД к пище группы «LB-комплекс» с учетом фармакокинетики и фармакодинамики препаратов базовой терапии, в том числе антибактериальных. Доказана необходимость комплексного подхода и одновременное назначение целостной программы терапевтических и профилактических мероприятий, в том числе назначение препаратов, оказывающих общее терапевтическое воздействие, направленное на поддержание собственных защитных сил организма (витамины, микроэлементы, ферменты, органические кислоты, олиго- и полисахариды, жирные кислоты и т.д.), детоксицирующей терапии, направленной на восстановление внутренней среды организма(сорбенты, фитотерапия).

При дисбиозе репродуктивного тракта женщин специфическая терапия должна назначаться с учетом стадии, распространенности процесса, общих и локальных симптомов, длительности течения заболевания, чувствительности возбудителей к антибиотикам и другим химиотерапевтическим препаратам, у беременных с учетом срока гестации не только перорально, но и итравагинально.

При специфической местной терапии целесообразно использование бактериофагов: стафилококкового, стрептококкового, протейного, коли-протейного, клебсиеллезного и др. Бактериофаги назначают только после исследования фаголизабельности выделенных культур. Целесообразно интравагинальное введение фагов на тампоне два раза в сутки на два часа. Курс лечения 5-7 дней. Для коррекции микробиоценозов гениталий женщин, в том числе беременных, назначается местное применение интравагинальных форм пробиотиков в сочетании с пероральным применением средств, нормализующих микрофлору кишечника

(пре-, про-, мультипробиотиков). Особую значимость приобретает коррекция нарушений менструального цикла, сопутствующих эндокринопатий и обязательное лечение полового партнера при наличии заболеваний, передаваемых половым путем. Все положения алгоритма комплексной коррекции защищены патентами №2193398 от 24.03.2000 и № 2184558 от 07.08.2000.

Такой подход позволяет не только снизить частоту возникновения побочных эффектов, но и способствует достижению лучших результатов лечения основного заболевания, профилактике последующих обострений. Включение средств коррекции дисбиоза кишечника в программы терапии различных заболеваний преследует следующие основные цели:

- Улучшение клинического течения основного заболевания — снижение выраженности и длительности существования клинических симптомов, улучшение ближайших и отдаленных результатов лечения, профилактика осложнений, снижение частоты рецидивирования хронических заболеваний.
- Повышение эффективности других методов лечения.
- Профилактика побочных эффектов фармакотерапии.
- Сокращение сроков реабилитации
- Повышение качества жизни

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обобщая полученный экспериментальный материал, необходимо отметить, что вопрос изучения видового структуры сообществ микроорганизмов кишечника человека и коррекции дисбиозной микробиоты, несмотря на уделяемое к нему внимание научного сообщества, сохраняет актуальность по сей день. Созданная в процессе выполнения работы база данных результатов бактериологических исследований и файл-серверная реляционная СУБД, позволила провести синэкологический анализ сообществ симбиотических микроорганизмов. В представленной работе впервые с помощью ранговых распределений, кластерного анализа, классических индексов видового разнообразия и методов многомерной статистики даны синэкологические характеристики микрофлоры толстой кишки 3268 человек различного возраста, проживающих на территории г. Нижнего Новгорода. Нами подробно рассмотрен и проиллюстрирован процесс формирования микрофлоры толстой кишки у детей с первых часов жизни, а также особенности микробиоты в различных возрастных группах.

Структурирование базы данных видового и количественного состава микрофлоры толстой кишки позволило установить, что анаэробные и аэробные микроорганизмы в равных соотношениях участвуют в процессе формирования

микрофлоры кишечника человека, начиная с момента рождения. Показано, что с первого часа жизни процесс нарастания анаэробной компоненты (представители родов *Lactobacillus, Lactococcus* и *Bifidobacterium*) идет параллельно с ростом условно-патогенных микроорганизмов, E.coli и бактерий рода Enterococcus, минуя стадию «трансформации».

Проведена обширная работа по изучению биологических свойств анаэробных симбиотических микроорганизмов, отнесенных по результатам статистического анализа к «информационно-значимым показателям» и отобрано 6 штаммов бактерий рода *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* для использования их в качестве стартерных культур жидких многокомпонентных пробиотических препаратов. Все исследуемые штаммы характеризовались высоким уровнем антагонистической активности по отношению к оппортунистическим и патогенным микроорганизмам, кислотоустойчивостью, атибиотико-резистентностью и были биосовместимы между собой.

Результатом экспериментальных исследований и теоретических обобщений стала разработка технологии и создание ряда новых жидких многокомпонентных пробиотиков: жидкий бактериальный концентрат из двух штаммов лактобацилл «LL-комплекс» с выраженной антимикотической активностью и жидкие консорциумы из лактобацилл и бифидобактерий «LB-комплекс» и «LB-комплекс S». Выводы о ведущей роли бактерий родов Bifidobacterium и Lactobacillus в видовом разнообразии симбиотической микрофлоры толстой кишки были подтверждены высокой эффективностью применения алгоритма комплексной коррекции дисбиозной микробиоты человека с использованием вновь созданных жидких многокомпонентных пробиотиков в программах лечения и реабилитации пациентов в 22 МЛПУ и программах оздоровления 14 ДОУ и 1 ВУЗа г. Н.Новгорода.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что в процессе формирования микрофлоры кишечника человека участвуют как аэробные, так и анаэробные микроорганизмы, причем в равных соотношениях с первого часа жизни, процесс нарастания анаэробной компоненты (представители родов *Lactobacillus, Lactococcus* и *Bifidobacterium*) идет параллельно с ростом условно-патогенных микроорганизмов, *E.coli* и бактерий рода *Enterococcus*, минуя стадию «трансформации», что подтверждено результатами синэкологического анализа базы данных видового состава симбиотических микроорганизмов толстой кишки проведенного с использованием разработанной программы для ЭВМ «Автоматизированная система микробиологического мониторинга микробиоценозов желудочно-кишечного тракта (ЖКТ)».

2. Установлено, что с наибольшей частотой – в 92% случаев - оппортунистические микроорганизмы в значимых количествах ($\geq 10^5$ КОЕ/г) выделяются в группе «здоровых» детей в возрасте от одного месяца до года. Частота обнаружения УПМ в микрофлоре толстой кишки здорового человека начинает снижаться после первого года жизни, и составляет 18% в возрастной группе 60 лет и старше. Доказано, что суммарная численность сообществ симбиотических микроорганизмов, выделяемых из толстой кишки здоровых людей во всех возрастных группах на один - два порядка выше, чем у больных ($p<0,05$) за исключением группы 60 лет и старше.

3. Доказано, что все экологические законы и зависимости, свойственные другим природным биотопам и популяциям, справедливы и в отношении микробиоты человека. Кроме того, все выявленные закономерности, характерные для части микробного сообщества микрофлоры толстой кишки, представленной фиксированным набором 29 показателей, учитывающих количества различных видов микроорганизмов в одном грамме субстрата, сохраняются и развиваются также и для популяции в целом.

4. Выявлено, что количество бактерий родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*, а также *E. coli, Enterococcus spp, S.epidremidis, S. aureus, Klebsiella spp., Citrobacter spp., Proteus spp., Enterobacter spp*. относится к «информационно-значимым показателям», то есть их численность статистически значимо различается у здоровых и больных людей одного возраста и между возрастными группами, что позволяет верифицировать классификационные решения по разделению пациентов на категории «здоровые» и «больные» с учетом возраста в многомерном пространстве показателей.

5. Разработан ряд новых жидких сим- и синбиотиков из пробиотических микроорганизмов родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*, что обусловлено их достоверно высокой значимостью и лидирующими позициями в численности сообществ симбиотических микроорганизмов здоровых людей всех возрастных групп ($p\leq 0,001$).

6. Доказана необходимость использования в составе жидких мультиштаммовых пробиотиков консорциума биосовместимых культур с выраженной хромосомно опосредованной антибиотикорезистентностью, кислотоустойчивостью и высоким уровнем антагонизма по отношению к оппортунистическим и патогенным микроорганизмам, что подтверждается эффективностью применения пробиотиков на их основе в комплексных программах оздоровления и лечения заболеваний, отягощенных дисбиозом.

7. Выявлен феномен симбиоза по типу мутуализма двух штаммов *L. plantarum 8 RA-3* и *L. fermentum 39*, обуславливающий более высокую противокандидозную активность штаммов, выращенных при совместном культивировании, что явилось

основанием для создания нового синбиотика «LL-комплекс». Выраженное антимикотическое действие этого препарата подтверждается высокой эффективностью его применения в комплексной терапии заболеваний, осложненных дисбиозом с преимущественным выделением грибов вида *Candida albicans*.

8. Разработана методика валидации процесса контроля динамики роста стартерных культур с использованием гнездовой ПЦР гена 16S рРНК при совместном, периодическом и непрерывном культивировании симбиотических видов бактерий рода *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*.

СПИСОК ОСНОВНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Работы, опубликованные в ведущих рецензируемых научных журналах и изданиях, определенных ВАК.

1. Соколова К.Я. Применение новой формы многокомпонентного эу-биотика в лечении язвенной болезни, асоциированной с H.pylori. / К.Я.Соколова, **И.В.Соловьева**, Е.И.Ефимов, А.А. Бокарев, К.М. Перфилова, И.В.Шутова, Н.В.Неумоина // Российский журнал гастроэнторологии, колопроктологии. – 2001. – т. 35. приложение № 15 – С. 3-7.

2. Соколова К.Я. Усовершенствование оздоровительно- реабилитационных мероприятий в акушерско-педиатрической практике на экологически депрессивных территориях. / К.Я.Соколова, **И.В. Соловьева**, Е.И. Борисовская, Т.П. Иванова // Вестник Нижегородского университета им. Н.И.Лобачевского, серия Биология. – 2001. – №1(3). – С.16-20.

3. Соловьева И.В. Изучение влияния низкоинтенсивного ЭМИ КВЧ с шумовым спектром на бактерии-продуценты пробиотиков / **И.В. Соловьева,** А.Г.Точилина, К.Я.Соколова, И.В.Белова, О.В.Ерискина, С.И.Анисимов, А.В. Карнаухов // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. Серия Биология. – 2004. – №1 (7). – С.101-110

4. Точилина А.Г. Индикация и идентификация бактерий рода Lactobacillus с использованием полимеразной цепной реакции / А.Г.Точилина, Н.А.Новикова, К.Я.Соколова, **И.В. Соловьева**, И.В.Белова, Т.П.Иванова, Л.Б.Луковникова, Л.Н.Голицына // ЖМЭИ – 2008. – №3. – С.69-72.

5. **Соловьева И.В.** Туберкулезная инфекция у детей: дополнение алгоритма лечения новым пробиотиком / И.В. Соловьева, К.Я. Соколова, И.В. Белова, Н.Б. Репина, Т.П. Иванова, А.Г.Точилина // Медицинский альманах. – 2009. – №2(7). – С.56-58.

6. **Соловьева И.В.** Коррекция микробиоты как неотъемлемая часть педиатрической практики / И.В. Соловьева, И.В. Белова, Г.И. Григорьева, К.Я.

Соколова, Т.П. Иванова, А.Г. Точилина // Медицинский альманах. – 2010. –№ 2 (11). – С.277-280.

7. **Соловьева И.В.** Изучение биологических свойств новых штаммов рода Lactobacillus / И.В. Соловьева, А.Г. Точилина, Н.А.Новикова, И.В. Белова, Т.П. Иванова, К.Я. Соколова // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. – 2010. – №2 (2). – С. 462-468.

8. Варичев А.Н. Статистический анализ видового состава сообществ симбиотических микроорганизмов биопленки толстого кишечника здоровых и больных людей различных возрастных групп / А.Н. Варичев, Д.Б. Гелашвили, **И.В. Соловьева** // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. – 2010. – №2 (2). – С. 383-387.

9. **Соловьева И.В.** Совершенствование алгоритма лечения туберкулеза у детей / И.В. Соловьева, И.В. Белова, Н.В. Васильева, Н.Б. Репина, Т.П. Иванова, А.Г. Точилина // Туберкулез и болезни легких. – 2011. – №1. – С.22-25.

10. **Соловьева И.В.** Профилактика формирования устойчивых дисбиотических состояний микрофлоры желудочно-кишечного тракта студентов с помощью нового симбиотика / И.В.Соловьева, И.В.Белова, А.Г. Точилина, Г.И. Григорьева, А.В. Леонов, Г.Е. Воробьев, Т.П. Иванова, В.А. Жирнов // Медицинский альманах. – 2011. – №2 (15). – С.112-114.

11. Белова И.В. Авторский синбиотик с антимикотической активностью: основные биологические свойства, эффективность применения / И.В. Белова, А.Г. Точилина, **И.В. Соловьева,** Е.И. Ефимов, Г.И. Григорьева, Н.А. Новикова, Л.Г. Лазарева, Л.В. Сидоренко, В.М.Лазарев, Н.И.Малахова, Т.П. Иванова // Медицинский альманах. – 2011. – №4 (17). – С. – 84-88.

12. **Соловьева И.В.** Видовая структура биопленки толстой кишки здоровых и больных детей различных возрастных групп / И.В. Соловьева, Д.Б. Гелашвили, А.Н. Варичев, Л.А. Солнцев, Г.И. Григорьева, И.В. Белова, А.Г. Точилина, А.С. Пожидаева // Медицинский альманах. – 2011. – №4 (17). – С. 89-93.

13. Гелашвили Д.Б. Видовая структура сообществ симбиотических микроорганизмов биопленки толстой кишки здоровых и больных детей разных возрастных групп / Д.Б. Гелашвили, А.Н. Варичев, **И.В. Соловьева**, Л.А. Солнцев // Экология человека. – 2011. – №6. – С. 55-60.

14. **Соловьева И.В.** Пробиотики как неотъемлемая часть комплексного лечения детей с туберкулезной инфекцией / И.В. Соловьева, И.В. Белова, Н.Б. Репина, А.Г.Точилина, Н.В. Васильева, Т.П. Иванова // Вестник РГМУ. – 2011. – №4. – С. 53-58.

15. **Соловьева И.В.** Применение полимеразной цепной реакции для изучения динамики развития популяции лактобацилл (L.plantarum и L.fermentum) / **И.В.**

Соловьева, А.Г. Точилина, Н.А. Новикова, И.В. Белова, И.С. Горлова, Т.П. Иванова, В.А. Жирнов // Биотехнология.– 2011. – №4. – С.82-87.

16. **Соловьева И.В.** Опыт применения нового жидкого мультипробиотика для профилактики дисбиоза у студентов / **И.В. Соловьева,** А.Г. Точилина, И.В. Белова, А.В. Леонов, Г.Е . Воробьев, С.А.Быкова, Т.К. Балавина, А.С. Пожидаева // Профилактическая и клиническая медицина. – 2012. – №2. – С. 87-90.

17. **Соловьева И.В.** Формирование микрофлоры толстой кишки у детей/ **И.В. Соловьева**, И.В. Белова, А.Г. Точилина, Е.И. Ефимов, А.С. Пожидаева // Вестник Нижегородского государственного университета им. Н.И.Лобачевского. – 2012 – .№2(3).– С.93-100.

18. **Соловьева И.В.** Новый жидкий симбиотический биокомплекс в алгоритме восстановления микробиоценоза при хеликобактер-ассоциированных заболеваниях / **И.В. Соловьева**, И.В. Белова, А.Г. Точилина, Г.И. Григорьева, Т.П. Иванова, В.А. Жирнов. // Вестник Нижегородского государственного университета им. Н.И.Лобачевского. – 2012. – №2(3) – С.100-106.

19. **Соловьева И.В.** Конструирование иммобилизованной формы жидкого пробиотика/ **И.В. Соловьева**, А.Г. Точилина, И.В. Белова, Е.И. Ефимов, Н.А. Новикова, Т.П. Иванова. // Вестник Нижегородского государственного университета им. Н.И.Лобачевского. – 2012. – №2(3). – С. 85-92.

20. Варичев А.Н. Ранговые распределения численности сообществ симбиотических микроорганизмов толстой кишки здоровых и больных людей разных возрастных групп/ А.Н. Варичев, **И.В. Соловьёва**, Д.Б. Гелашвили // Вестник Нижегородского университета им. Н.И.Лобачевского. 2012. – №2(3) – С. 34-40.

21. Соловьева И.В. Микроэкологические основы коррекции «дисбиозной» микробиоты человека /**И.В. Соловьева**, И.В. Белова, А.Г. Точилина, В.А. Жирнов, Т.П. Иванова // Медицинский альманах. – 2013. - №2(26). – С. 60-65.

Патенты:

22. Патент на изобретение №2193398 Российская Федерация, МПК 7 А 61 К 31/00, 35/00, 35/74, А 61 Р 1/00, заявка 2000107271/14 от 24.03.2000, публикация патента 27.11.2002 г., бюллетень №33. Способ лечения дисбактериозов / **И.В. Соловьева,** К.Я. Соколова, В.А. Княжев Заявитель и патентообладатель ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н Блохиной Роспотребнадзора.

23. Патент на изобретение № 2192269 Российская Федерация, МПК С2 7А61 К 35/74, А 23 С 9/127, С12 N 1/20//(С12 N1/20, С 12 R 1:07, 1:225, 1:25, заявка 20001175/13, от 03.07.2000, публикация патента 10.11.2002 г., бюллетень №31. Способ приготовления лечебно-профилактического препарата на основе живых

штаммов микроорганизмов «LB-комплекс» / **И.В. Соловьева**, К.Я. Соколова. Заявитель и патентообладатель **Соловьева И.В.**, Соколова К.Я.

24. Патент на изобретение № 2184558 Российская Федерация, МПК 7 А 61 К 35/74, А 61 Р 1/04, заявка 2000121246/14 от 07.08.2000, публикация патента 10.07.2002 г., бюллетень №19. Способ лечения язвенной болезни двенадцати перстной кишки / М.Г. Яковлев, В.Б. Кузин, В.В. Дугина, П.П. Потехин, К.Я. Соколова, **И.В. Соловьева** Заявитель и патентообладатель ФБОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академия» Минздрасоцразвития.

25. Патент на изобретение № 2280465 Российская Федерация, МПК A61K 35/74 A23C 9/12 C12N 1/20 C12R 1/225 C12R 1/25, заявка 2004131097/13 от 25.10.2004, публикация патента 27.07.2006 г., бюллетень №21. Способ приготовления пробиотика / **И.В. Соловьева**, К.Я. Соколова, Е.И. Ефимов, Т.П. Иванова, А.Г.Точилина, И.В. Белова Заявитель и патентообладатель ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н Блохиной Роспотребнадзора.

26. Патент на изобретение № №2375459 Российская Федерация, МПК C12Q 1/68 C12P 19/34, заявка 2008113591/13 от 07.04.2008, публикация патента 10.12.2009 г., бюллетень №. 34. Способ индикации бактерий рода Lactobacillus / Н.А. Новикова, А.Г. Точилина, **И.В. Соловьева** Заявитель и патентообладатель ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н Блохиной Роспотребнадзора.

27. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2011614233 Российская Федерация, заявка 2011612551 от 13.04.2011, зарегистрировано в Реестре программ для ЭВМ 30.05.2011 г. Автоматизированная система микробиологического мониторинга микробиоценозов желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) / Д.В. Ломакин, А.Н. Вигура, В.П. Губернаторов, А.С. Пожидаева, **И.В. Соловьева**, Е.И. Ефимов, И.В. Белова Заявитель и патентообладатель ГОУ ВПО «Нижегородский государственный технический университет им. Р.И. Алексеева», ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н Блохиной Роспотребнадзора.

28. Патент на изобретение № 2441907 Российская Федерация, МПК C12N 1/20 A61K 35/74 A23C 9/127, заявка 2010132024/10 от 29.07.2010, публикация патента 10.02 2012 г., бюллетень №4. Способ приготовления лечебно-профилактического препарата из живых штаммов микроорганизмов лакто- и бифидобактерий «LB-комплекс Л» / **И.В. Соловьева**, И.В. Белова, А.Г.Точилина, Е.И.Ефимов, Т.П.Иванова, Н.А.Новикова, Т.И.Новоселова, Я.Б. Новоселов Заявитель и патентообладатель ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н Блохиной Роспотребнадзора.

Монографии и главы из монографий:

1. Соколова К.Я., **Соловьева И.В.** Дисбактериозы. Теория и практика / под ред. В.А. Княжева. – Н. Новгород, 1999. – 198 с.
2. Современные проблемы дисбактериозов, дисбиозов / Л.Н.Ладыгина, К.Я.Соколова, **И.В. Соловьева** // В кн.: «Здоровое питание и качество жизни человека: учебно-научное издание» / Н.А.Добротина, Т.А. Ускова – Н. Новгород: ННГУ, 2003. – С. 194-207.
3. Диагностика и биокоррекция нарушений антиинфекционного гомеостаза в системе «Мать-дитя»: книга практического врача / К.Я.Соколова, Е.И.Ефимов, А.И.Волков и др. – Н. Новгород: НижГМА, 2004. – 376 с.

Методические рекомендации

4. Дифференцированное применение биологических препаратов для предупреждения инфекционно-воспалительных заболеваний и дисбактериозов у беременных женщин и детей раннего возраста / Н.С. Захарьевская, К.Я. Соколова, **И.В. Соловьева**, С.Ю. Усачева, О.Л. Глушкова // Информационно-методическое письмо. – Н. Новгород, 1994. – 39 с.
5. Совершенствование санитарно-эпидемиологичес-кого надзора в акушерско-педиатрических стационарах с целью снижения младенческой заболеваемости / Н.С.Захарьевская, К.Я.Соколова, **И.В.Соловьева**, О.В.Миловидова, Г.А.Черняева // Методические рекомендации. – Н. Новгород, 1999. – 32 с.
6. Использование бактериальных препаратов и продуктов лечебного питания / К.Я.Соколова, **И.В.Соловьева**, М.Н. Седельникова // Методические рекомендации. – Использование бактериальных препаратов и продуктов лечебного питания / К.Я.Соколова, **И.В.Соловьева**, М.Н. Седельникова // Методические рекомендации. – Н. Новгород, 2000. – 36 с.

Статьи, тезисы и материалы докладов региональных и всероссийсиких конференций и семинаров:

7. **Соловьева И.В.** Новые подходы к профилактике формирования ранних дисбиотических состояний в перинатологии / **И.В. Соловьева**, О.А. Глушкова, К.Я. Соколова, Н.Г. Харжевская, Е.М. Мирошниченко // Материалы VII Конгресса педиатров России. Детская гастроэнтология: настоящее и будущее. – Москва, 2002. – С.64.
8. **Соловьева И.В.,** Глушкова О.А. Микрофлора кишечника и иммунный гомеостаз беременной женщины в системе мать-дитя. // Материалы III

Всероссийской конференции «Гомеостаз и инфекционный процесс». – М., 2002. – С. –

9. **Соловьева И.В.** Новая питательная среда для культивирования лакто- и бифидобактерий / **И.В.Соловьева,** Е.И.Ефимов, И.В.Белова, К.Я.Соколова, Н.К.Конькова, Т.П.Иванова, А.Г.Мочалова // Материалы Международной юбилейной научно-практической конференции «Разработки и стандартизация микробиологических питательных сред и тест-систем», посвященную 50-летию ФГУП НПО « Питательные среды» МЗ РФ. – г. Махачкала, 2003. –. С.22-23.

10. **Соловьева И.В.** Основные направления развития медицинской биотехнологии в Нижегородском регионе / **И.В.Соловьева,** К.Я.Соколова, И.В.Белова, А.Г.Мочалова, Л.Г. Лазарева // Материалы научно-практической конференции «Современное состояние Российской биотехнологии». – Пущино, 2003. – С. 32-33.

11. **Соловьева И.В.** Новая медико-экологическая система профилактики формирования ранних форм хронической патологии у детей в условиях промышленного мегаполиса / **И.В.Соловьева,** А.Г.Мочалова, К.Я.Соколова, И.В.Белова, Т.П. Иванова // Сборник материалов III сессии молодежной школы-семинара «Экологическая и промышленная безопасность». – Саров, 2003. – С. 34-36.

12. **Соловьева И.В.** Создание компьютерной программы оценки состояния микрофлоры толстого кишечника / **И.В.Соловьева,** И.В.Белова, Т.П.Иванова, Т.К.Балавина, Е.М.Мирошниченко, К.Я.Соколова, А.Г.Точилина, С.А.Измалкова // Материалы научной конференции, посвященной 85-летию со дня рождения Блохиной «Новые технологии в профилактике, диагностике, эпиднадзоре и лечении инфекционных заболеваний».- Н.Новгород, 2006. – С. 223-227.

13. **Соловьева И.В.** Разработка нового пробиотика на основе штаммов лактобацилл с выраженным антимикотическим действием / **И.В.Соловьева**, Т.П.Иванова, И.В.Белова, К.Я.Соколова, А.Г. Точилина // Материалы научной конференции, посвященной 85-летию со дня рождения Блохиной «Новые технологии в профилактике, диагностике, эпиднадзоре и лечении инфекционных заболеваний».- Н.Новгород, 2006. – С. 237-241.

14. **Соловьева И.В.** Перспективы применения ПЦР для индикации промышленно-значимых штаммов молочнокислых бактерии / А.Г.Точилина, Н.А.Новикова, К.Я.Соколова, И.В. Соловьева // Материалы научной конференции, посвященной 85-летию со дня рождения Блохиной «Новые технологии в профилактике, диагностике, эпиднадзоре и лечении инфекционных заболеваний».- Н.Новгород, 2006. – С. 241-245.

15. **Соловьева И.В.** Конструирование питательной среды для совместного культивирования лактобацилл и бифидобактерий / И.В.Соловьева, И.В. Белова, Т.П. Иванова // Материалы международного конгресса «Пробиотики, пребиотики,

синбиотики и функциональные продукты питания. Фундаментальные и клинические аспекты». Журн. Клиническое питание. – СПб, 2007. -№1-2. – С. А67.

16. **Соловьева И.В.** О некоторых биотехнологических проблемах при создании многокомпонентных жидких пробиотиков / И.В.Соловьева, К.Я.Соколова, Е.И.Ефимов, Г.И. Григорьева // Материалы международного конгресса «Пробиотики, пребиотики, синбиотики и функциональные продукты питания. Фундаментальные и клинические аспекты». Журн. Клиническое питание. – СПб, 2007. -№1-2. – С. А67.

17. **Соловьева И.В.** Применение пробиотического препарата «LB-комплекс S» при туберкулезной инфекции у детей / И.В.Соловьева, А.В.Шкарин, Н.Б.Репина, К.Я. Соколова, И.В.Белова, Т.П.Иванова, А.Г. Точилина // Материалы международного форума «Фундаментальные и прикладные проблемы питания». Вестник Санкт-Петербургской государственной медицинской академии им. И.И. Мечникова. -2007. - №2 (2). - С.154-155.

18. **Соловьева И.В.** Новые биотехнологические аспекты конструирования жидких форм симбиотиков / И.В.Соловьева, К.Я.Соколова, Г.И.Григорьева, А.Г.Точилина, И.В.Белова, Т.П. Иванова // Доклады Всероссийской научно-технической конференции «Приоритетные направления развития науки и технологии». – Тула, 2007. – С. 50-52.

19. **Соловьева И.В.** Биотехнологические аспекты конструирования нового пробиотика на основе лактобацилл / И.В.Соловьева, К.Я.Соколова, А.Г.Точилина, И.В.Белова, Т.П. Иванова // Материалы пятого съезда Общества биотехнологов России им. Ю.А.Овчинникова. – М., 2008. – С.288-289.

20. **Соловьева И.В.** Конструирование нового многокомпонентного пробиотика и включение его в алгоритм лечения туберкулезной инфекции у детей / И.В. Соловьева, И.В. Белова, К.Я. Соколова, Т.П. Иванова, А.Г. Точилина // Материалы 6-й объединенной научной сессии и 2-го Международного конгресса по пробиотикам «Санкт-Петербург – Пробиотики – 2009». Журнал Гастроэнтерология Санкт-Петербург. –2009. – №4. – С. М-37.

21. **Соловьева И.В.** Новый жидкий пробиотик в алгоритме противоэпидемических мероприятий в родильном доме / И.В. Соловьева, И.В. Белова, К.Я. Соколова, Т.П. Иванова, А.Г.Точилина // Материалы II ежегодного Всероссийского конгресса по инфекционным болезням. – М.,2010. – С. 298.

22. Леонов А.В. Оценка эффективности дополнения рациона питания питания студентов новым пробиотиком / А.В. Леонов, **И.В. Соловьева**, Г.Е. Воробьев, И.В. Белова, А.Г. Точилина, Т.П. Иванова // Сборник научных трудов конференции «Социально-гигиенический мониторинг здоровья населения». – Рязань, 2010 – С.329-333.

23. **Соловьева И.В.** Особенности видового состава микрофлоры толстого кишечника студентов / И.В. Соловьева, И.В. Белова, А.Г. Точилина, А.В. Леонов, Г.Е. Воробьев, Т.П. Иванова, В.А. Жирнов // Всероссийский симпозиум с международным участием «Автотрофные микроорганизмы». – М., 2010. –С.91.

24. **Соловьева И.В.** Включение пробиотиков в рацион питания студентов / И.В. Соловьева, Г.Е. Воробьев, А.В. Леонов, И.В. Белова, А.Г. Точилина, Т.П. Иванова // Сборник материалов Первой межрегиональной научно-практической конференции ПФО «Актуальные вопросы питания населения». – Н. Новгород, 2011. – С. 26-27.

25. **Соловьева И.В.** Экспресс-метод контроля динамики накопления биомассы L. plantarum и L. fermentum в условиях совместного культивирования / И.В. Соловьева, А.Г. Точилина, И.В. Белова, Н.А. Новикова, Т.П. Иванова, В.А. Жирнов // Материалы научно-практической конференции Роспотребнадзора «Научное обеспечение противоэпидемической защиты населения». – Н. Новгород, 2012. – с. 136-144.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт
ПМ – патогенные микроорганизмы
УПМ – условно-патогенные микроорганизмы
ГИСК – Государственный институт стандартизации и контроля
СУБД – система управления базой данных
КОЕ/г – колониеобразующая единица в грамме субстрата
МЛПУ – муниципальное лечебно-профилактическое учреждение
ВЗОМТ– воспалительные заболевания органов малого таза
ДГКБ– детская городская клиническая больница
ГКБ– городская клиническая больница
ДОУ– детское общеобразовательное учреждение
НОПТД– Нижегородский областной противотуберкулезный диспансер
ПЦР– полимеразная цепная реакция
рРНК – рибосомная РНК
БАД – биологически активные добавки
ФГБУ НЦЭСМП - ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
ВКПМ ФГУП «ГосНИИгенетика» – Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов»
ВКМ ИБФМ РАН – Всероссийская коллекция микроорганизмов ФГБУ «Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина» Российской академии наук
ГК лактобацилл ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной – Государственная коллекция лактобацилл ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора
ГКНМ ФБУН МНИИЭМ имени Габричевского – Государственная коллекция микроорганизмов – представителей нормальной микрофлоры человека и животных ФБУН «Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора