

На правах рукописи

РУБАЛЬСКИЙ Евгений Олегович

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ПРОБИОТИЧЕСКИХ КОМПОЗИЦИЙ
НА ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПУЛА ГИСТАМИНА
И ГУМОРАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА**

03.02.03 – микробиология

Автореферат диссертации
на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Астрахань

2016

Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Астраханский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные руководители:

Заслуженный деятель науки РФ, доктор медицинских наук, профессор, Афанасьев Станислав Степанович
доктор биологических наук, Алешкин Андрей Владимирович

Официальные оппоненты:

Николаева Елена Николаевна, доктор медицинских наук, профессор, Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московский государственный медико-стоматологический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, профессор кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии
Ганина Вера Ивановна, доктор технических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет технологий и управления имени К.Г. Разумовского (Первый казачий университет)», профессор кафедры «Технология молочных продуктов»

Ведущая организация:

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «__» _____ 2016 г. в __ч на заседании диссертационного совета Д 350.002.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации по адресу: 142279, Московская обл., Серпуховский район, пос. Оболенск.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Автореферат разослан «__» _____ 2016 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета

кандидат биологических наук

Фурсова Надежда Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Роль гистамина в регуляции физиологических функций здорового и больного организма многообразна (Вайсфельд И.Л., Г.Н. Кассиль, 1981; Воропаева Е.А., 2002; Горкин В.З., 1993; Гуцин И.С., 2010; Зарудий Ф.С., 1995; Ключева Л.А., 2008; Куяров А.В. с соавт. 2008; Куяров А.В. с соавт., 2013). Повышенный уровень гистамина в организме может изменять его функциональное состояние. Например, посредством H1 и H2 рецепторов гистамин стимулирует сокращение гладких мышц желудочно-кишечного тракта и секрецию желудочного сока соответственно, что приводит к метеоризму, диарее, коликам. Посредством H4 рецепторов гистамин регулирует гемопоэз, в том числе за счет повышения цГМФ и цАМФ обеспечивает продукцию тучных клеток. Описано значение гистамина в регуляции иммунокомпетентных клеток и антителообразовании (Jutel M. et al., 2001; Maintz L., Novak N., 2007).

Гистамин содержится в большинстве органов и тканей (Зарудий Ф.С., 1995; Ключева Л.А., 2008; Nomura H. et al., 2001). В значительном количестве гистамин может синтезироваться в желудочно-кишечном тракте (Горкин В.З., 1993). Вместе с тем, гистамин в организме человека могут продуцировать и бактерии, способные декарбоксилировать гистидин (Алешукина А.В., 2012; Воропаева Е.А., 2002; Зарудий Ф.С., 1995; Ключева Л.А., 2008; Кулакова Ю.В., 2013). При наиболее часто встречаемых вариантах дисбактериоза кишечника увеличивается частота высева штаммов, декарбоксилирующих гистидин (Куяров А.В. с соавт., 2013). Доказано, что микроорганизмы не только синтезируют гистамин, но могут осуществлять и деструкцию данного биогенного амина (Ключева Л.А., 2008; Куяров А.В. с соавт., 2013; Ткаченко Е.И., Успенский Ю.П., 2006).

Из всего перечня бактерий биотопов организма человека особый интерес как наиболее вероятные физиологические регуляторы уровня гистамина в макроорганизме представляют лактобациллы. Поэтому именно эта группа микроорганизмов наиболее перспективна для производства противоаллергических продуктов функционального питания с пробиотическими свойствами.

Степень разработанности темы исследования. Основанием для начала исследований влияния пробиотических композиций на основе лактобацилл на снижение уровня гистамина в организме *Mus musculus* послужили опубликованные данные о том, что лактобациллы, кроме декарбоксилаз, могут быть источником для промышленного получения гистаминаз (Underberg E., Lembke A., 1991).

Важной информацией для обеспечения наиболее выраженного превалирования гистаминазной активности над декарбоксилазными свойствами лактобацилл в физиологических условиях явились данные о возможности использования двухвалентных катионов меди (Cu^{2+}) в качестве ингибитора активности гистидиндекарбоксилаз, как компонента активных центров диаминооксидаз и как катализатора дальнейшего окисления продуктов гистамина (Born G.V.R., 1953; Saysell C.G. et al., 2002; Shepard E.M. et al., 2002; Muraki T. et al., 2003).

Помимо участия в регуляции уровня гистамина было учтено иммуномодулирующее действие лактобацилл (Ермоленко Е.И., 2009; Nemařajata P., Versalovic J., 2013; Rask C. et al., 2013). В частности тот факт, что лактобациллы обеспечивают улучшение иммунологического барьера различных отделов

пищеварительного тракта, влияя при этом на уровень и соотношение классов и подклассов иммуноглобулинов, а также уменьшая воспалительные реакции (Isolauri E., 2001; Kotani Y., 2010; Bosch M. et al., 2012). Таким образом, создаются дополнительные условия для эффективного противоаллергического действия ряда пробиотических лактобацилл (Даудова А.Д., Григорьева И.Н., 2014; Ouwehand A.C., 2007; Isolauri E., Salminen S., 2008).

До наших исследований не проводилось изучение физиологических механизмов взаимодействия организма человека и его микробиоты, предотвращающих развитие аллергических реакций, не исследовались возможности их физиологической коррекции, в том числе при профилактике заболеваний. Это требовало выбора наиболее информативной модели *in vivo*. При анализе известных моделей физиологического взаимодействия организма человека и микробиоты было установлено, что необходимой информативной моделью могут быть обезьяны (Дарсания М.Ш., 2000; McKenna P. et al., 2008), так как согласно данным многолетних исследований обезьяны близки к человеку по показателям физиологии пищеварительного тракта, по восприимчивости к большинству свойственных человеку кишечных инфекций, а в условиях снижения естественной резистентности часто страдают клинически выраженными формами дисбактериозов (Джикидзе Э.К. с соавт., 1986; Лапин Б.А. с соавт., 1987; Дарсания М.Ш., 2000; Кебу Т.И. с соавт., 2000).

Однако для оценки на обезьянах наличия такого дополнительного условия эффективного противоаллергического действия штаммов лактобацилл как достижение необходимого уровня и соотношения классов и подклассов иммуноглобулинов, следовало учитывать высокую внутривидовую вариабельность антител этих животных (Scinicariello F. et al., 2001; Scinicariello F. et al., 2004; Sumiyama K. et al., 2002; Rogers K.A. et al., 2008; Nguyen D.C., 2012). Следовательно необходимо было принимать во внимание возможные отличия показателей физиологической нормы иммуноглобулинов для изолированной популяции животных, а также молекулярно-биологические отличия иммуноглобулинов обезьян от иммуноглобулинов человека (Thullier P. et al., 2010; Nguyen D.C., 2012), способные влиять на тонкие физиологические изменения показателей содержания классов и подклассов иммуноглобулинов обезьян.

Цель исследования. Разработать пробиотические композиции, физиологически снижающие пул гистамина и регулирующие иммуноглобулиновое звено гуморального иммунитета при коррекции микробиоценозов слизистых оболочек желудочно-кишечного тракта.

Задачи исследования:

1. Разработать пробиотические композиции на основе штаммов *Lactobacillus helveticus NKJC*, *Lactobacillus helveticus JCH*, *Lactobacillus casei KAA*, снижающие уровень гистамина *in vitro* при их культивировании в средах с различным содержанием данного биогенного амина.

2. Установить *in vivo* отсутствие общетоксического действия разработанных пробиотических композиций с оценкой морфофункционального состояния печени, слизистых оболочек кишечника и концентрации в кишечнике гистамина.

3. Изучить физиологические показатели пула уровня гистамина в кишечнике и периферической крови, а также иммуноглобулинового звена гуморального иммунитета у интактных *Macaca mulatta*.

4. Выявить изменения физиологических показателей пула гистамина в содержимом толстого кишечника, периферической крови и иммуноглобулинового звена гуморального иммунитета с оценкой информативности методов исследования уровня иммуноглобулинов на основании их молекулярно-генетических особенностей при коррекции пробиотическими композициями метаболизма гистамина микробиоценозов желудочно-кишечного тракта *Macaca mulatta*.

5. Изучить влияние пробиотических композиций на микробиоценозы желудочно-кишечного тракта с учетом регуляции уровня гистамина в организме.

Научная новизна и теоретическая значимость. Впервые разработаны композиции на основе штаммов лактобацилл для коррекции уровня гистамина в организме *Macaca mulatta* – физиологической модели организма человека. Следует отметить, что автор настоящей диссертации первым в России начал выполнять инициативные исследования влияния пробиотических композиций на основе лактобацилл на снижение уровня гистамина в организме *Macaca mulatta*.

Впервые оценены диагностические возможности различных тест-систем для измерений концентрации сывороточных иммуноглобулинов макак резусов биоинформатическим анализом Fc фрагментов IgG1, IgA и IgM.

Впервые установлены физиологические показатели пула гистамина в фекалиях и в периферической крови; уточнены физиологические концентрации иммуноглобулинов в сыворотке крови интактных низших обезьян (*Macaca mulatta*).

Впервые доказано, что физиологическое снижение уровня гистамина в содержимом кишечника *Macaca mulatta*, связанное с коррекцией микробиоценозов слизистых оболочек желудочно-кишечного тракта, не приводит к изменению уровня гистамина в периферической крови этих приматов, что свидетельствует о поддержании гомеостаза в организме на примере физиологической регуляции уровня гистамина ферментами микробиоценозов слизистых оболочек желудочно-кишечного тракта во взаимодействии с ферментными системами организма.

Выявлено, что в крови *Macaca mulatta* повышается уровень IgG за счет IgG1 на фоне отсутствия достоверных изменений содержания IgA и IgM в результате перорального введения пробиотических композиций, содержащих вместе с лактобациллами среду их культивирования.

Полученные результаты исследований по регуляции пула гистамина позволяют разрабатывать пробиотические композиции для снижения аллергической настроенности организма.

Получено экспериментальное обоснование для использования низших обезьян на примере *Macaca mulatta* в качестве модели для доклинических исследований физиологического действия пробиотических композиций, направленных на коррекцию показателей пула уровня гистамина и гуморального иммунитета человека.

Практическая значимость работы. Доказана перспективность включения в рацион *Macaca mulatta* пищевых добавок в виде пробиотических композиций, физиологически снижающих уровень гистамина в кишечнике и повышающих уровень IgG и IgG1 в крови животных, а также разработаны наиболее эффективные варианты таких пробиотических композиций (патент № 2393214). Для создания и предварительной оценки свойств пробиотических композиций, предназначенных для физиологической коррекции метаболизма гистамина в желудочно-кишечном

тракте *Maca mulatta*, разработано информативное сочетание экспериментальных моделей *in vitro* (патент № 2441066) и *in vivo*.

Установленные физиологические показатели пула гистамина в фекалиях, в периферической крови и уточненные физиологические концентрации иммуноглобулинов в сыворотке крови интактных *Maca mulatta* популяции ФГБНУ «НИИ МП» имеют важное значение при проведении доклинических исследований лекарственных средств, пробиотических композиций, разработки новых кормов и кормовых добавок для *Maca mulatta*.

Продемонстрирована высокая информативность анализа биоинформатических данных аминокислотных последовательностей иммуноглобулинов человека и обезьян в сочетании с феноменологическим подходом при подборе иммунохимических тест-систем для определения физиологического содержания иммуноглобулинов *Maca mulatta*.

Для идентификации бактериальных компонентов микробиоценозов и пробиотических композиций разработаны способы мультиплексного ПЦР-анализа (патенты № 2470997, № 2496883). Данные способы можно также использовать при профилактическом обследовании животных и диагностики инфекционных заболеваний.

Внедрение разработанных пробиотических композиций в пищевую рацион обезьян Научно-исследовательского института медицинской приматологии позволит эффективно корректировать микробиоценоз кишечника этих животных при их подготовке к планируемым экспериментам.

Внедрение в практику подхода к конструированию пробиотических композиций будет способствовать более эффективному применению пробиотиков для снижения аллергической реактивности организма.

Методология и методы исследования

На первом этапе диссертационного исследования разработали пробиотические композиции на основе штаммов *Lactobacillus helveticus NKJC*, *Lactobacillus helveticus JCH*, *Lactobacillus casei KAA*, снижающие уровень гистамина *in vitro*; на втором этапе изучили морфофункциональное состояние печени, слизистых оболочек кишечника, концентрацию гистамина в кишечнике и массу тела мышей для подтверждения отсутствия общетоксического действия разработанных пробиотических композиций; на третьем этапе исследовали уровни гистамина в кишечнике и периферической крови, а также концентрацию сывороточных иммуноглобулинов у интактных *Maca mulatta*, а также выбрали информативный метод оценки уровня иммуноглобулинов макак резусов; на четвертом этапе исследовали состояние микробиоценоза кишечника, показатели пула гистамина в кишечнике, периферической крови и иммуноглобулиновое звено гуморального иммунитета при коррекции пробиотическими композициями метаболизма гистамина микробиоценозов слизистых оболочек желудочно-кишечного тракта *Maca mulatta*. В диссертационной работе использовали микробиологические, биотехнологические, биологические, иммунологические, биохимические и гистологические экспериментальные методы исследования, а также методы биоинформатики и статистической обработки результатов. Для проведения экспериментов, представленных в диссертационной работе, использовали следующее оборудование: рН-метр Piccolo plus (Hanna Instruments, Германия), анализатор иммуноферментных реакций УНИПЛАН (ЗАО «ПИКОН», Россия), колориметр фотоэлектрический концентрационный КФК-2 (Загорский

оптико-механический завод, Россия), гематологический анализатор COULTER AC•T 5diff Hematology Analyzer (Beckman Coulter, США); микротом санный МС-2 (Россия); микроскоп МИКМЕД-6 (ОАО «ЛОМО», Россия).

Материалы и методы исследования

Микробиологические методы

Микроорганизмы. В работе использовали штаммы лактобацилл *Lactobacillus helveticus* NKJС, *Lactobacillus helveticus* JСН и *Lactobacillus casei* КАА (депонированы в Государственной коллекции микроорганизмов нормальной микрофлоры ФБУН МНИИЭМ имени Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора под №№ 220, 221 и 223 соответственно).

Питательные среды. В качестве известной промышленно применимой питательной среды для приготовления жидких пробиотических композиций на основе лактобацилл была исследована гидролизатно-молочная среда (ГМС).

Оценку состояния микробиоценоза кишечника макак резусов осуществляли в соответствии с рекомендациями по оценке дисбактериоза кишечника (Зверев В.В. с соавт., 2011; ОСТ 91500.11.0004-2003).

Биотехнологические методы

Исследование пробиотических композиций *in vitro*. Определение содержания лактобацилл проводилось по ГОСТ 10444.11-89. Санитарно микробиологические исследования – с учетом ГОСТ 10444.12-88, ГОСТ 30347-97, ГОСТ Р 52814-2007, ГОСТ Р 52816-2007 и МУК 2.3.2.721-98. Определение активной и титруемой кислотности образцов композиций проводилось по ГОСТ 30648.5-99 и ГОСТ 30648.4-99 соответственно. Исследование концентрации гистамина проводилось методом ИФА при помощи набора Histamine Research ELISA BA E-5800 (Labor Diagnostika Nord GmbH, Германия).

Биологические методы

Мыши инбредной линии BALB/c. В испытаниях было задействовано 50 мышей (40 опытных животных и 10 контрольных).

Введение пробиотических композиций мышам опытных групп проводили с помощью насадки на шприц однократно перорально в объеме 0,5 мл в соответствии с Методическими рекомендациями по изучению общетоксического действия фармакологических средств от 29.12.1997. Через один час после введения композиций 5 животных из каждой группы умерщвляли эфиром и проводили макроскопическое исследование внутренних органов, а также отбирали образцы печени, тонкого и толстого кишечника для гистологических исследований и получали гомогенаты тонкого и толстого кишечника для определения содержания гистамина. В течение 5 суток наблюдали за состоянием остальных мышей.

Макаки резусы (*Macaca mulatta*). В эксперименте на макаках резусах использовали клинически здоровых самцов в возрасте от 5,1 до 8,4 лет, весом от 7 200 до 10 500 г. В исследовании было задействовано 20 обезьян в качестве интактных животных (контрольная группа) и 26 обезьян для исследования влияния пробиотических композиций (4 опытные группы).

Введение пробиотических композиций обезьянам. Животным опытных групп давали выпить образцы разработанных композиций на основе ГМС или ЛКМС после предварительной фиксации по 10 мл за один час до еды 1 раз в день в течение 7 суток. За обезьянами опытных групп проводилось ежедневное клиническое наблюдение в течение 14 суток. Перед дачей композиций, на 7 и 14 сутки после начала дачи композиций проводилось исследование крови и фекалий.

Иммунологические методы

Концентрацию гистамина в периферической крови и фекалиях обезьян исследовали методом ИФА при помощи наборов фирмы Labor Diagnostika Nord GmbH (Германия): Histamine ELISA BA E-1000, Histamine Stool ELISA BA E-1200.

Уровни сывороточных иммуноглобулинов обезьян. Постановку метода радиальной иммунодиффузии в геле (РИД) осуществляли с использованием диагностических моноспецифических сывороток против IgG(H+L), IgA(H), IgM(H) человека (Филиал «МЕДГАМАЛ» ГУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Российская Федерация). Исследование концентраций IgG, IgG1, IgA, IgM, IgE методом ИФА проводили с использованием наборов фирмы Life Diagnostics Inc. (США): Monkey IgG ELISA Kit, Monkey IgG1 ELISA Kit, Monkey IgA ELISA Kit, Monkey IgM ELISA Kit, Monkey IgE ELISA Kit соответственно.

Содержание базофилов в периферической крови проводили на анализаторе COULTER AC•T 5diff Hematology Analyzer (Beckman Coulter, США).

Гистологическое исследование печени, тонкого и толстого кишечника мышей проводили с использованием стандартных методов окраски: гематоксилином и эозином; по Ван Гизон; прочным зеленым.

Методы биоинформатики

Выравнивание аминокислотных последовательностей Fc фрагментов IgG1, IgA, IgM человека и макак резусов выполняли с использованием матриц аминокислотных замен BLOSUM, построение филогенетических деревьев выполняли с использованием модели Джукса-Кантора и использованием метода присоединения соседей (Лукашов В.В., 2009; Saitou N., Nei M., 1987) в программном обеспечении Geneious 9.1 (Biomatters Ltd., Новая Зеландия).

Методы статистической обработки результатов

Для оценки достоверности различий между показателями использовали t-критерий Стьюдента. Для иммунологических, биохимических, микробиологических показателей производили расчет среднего арифметического (M) и ошибки репрезентативности (m). Достоверность отличий вычисленных средних арифметических определялась с использованием трех уровней значимости и по критерию Фишера. Проводилось определение показателя силы влияния (η_x^2) фактора (перорального введения пробиотических композиций) на формируемые признаки: уровень гистамина в фекалиях и цельной периферической крови, концентрацию иммуноглобулинов в сыворотке крови (Лакин Г.Ф., 1990; Плохинский Н.А., 1970). Математическая и статистическая обработка результатов проводилась в программной среде Microsoft Excel.

Положения, выносимые на защиту.

1. Методологический подход для разработки на основе пробиотических лактобацилл композиций направленного действия, включающий в себя подбор штаммового состава консорциума, питательных сред и их компонентов на основании мониторинга уровня гистамина как *in vitro* в среде культивирования, так и *in vivo* в содержимом толстого кишечника испытуемых лабораторных животных, позволяет создавать пробиотические продукты, оказывающие корригирующее влияние на аллергическую реактивность организма и перспективные для профилактики и лечения аллергических состояний.

2. Предложенный биоинформатический анализ данных аминокислотных последовательностей иммуноглобулинов человека и обезьян в сочетании с феноменологическим подходом при сравнительном анализе специфичности

применяемых иммунохимических тест-систем позволяет установить структурную основу их межвидовой общности и различия.

3. Разработанные композиции на основе штаммов пробиотиков при попадании на слизистые кишечника изменяют микробную популяцию микробиоценозов, подавляя условно-патогенные микроорганизмы, обладают отсроченным регулирующим действием на уровень гистамина в желудочно-кишечном тракте, содержание базофилов, IgG и IgG1 в крови *Mascas mulatta*.

Апробация работы. О достоверности результатов работы свидетельствует достаточный объем исследований с применением современных, высокочувствительных и специфичных методов с автоматизированным учетом и оценкой результатов, адекватных методов статистической обработки полученных данных.

Основные положения диссертационной работы изложены и обсуждены на IX Московском международном салоне инноваций и инвестиций во Всероссийском выставочном центре 26-29 августа 2009 года (получена серебряная медаль), XIII Московском международном Салоне изобретений и инновационных технологий «Архимед-2010» 30 марта – 2 апреля 2010 года (получена золотая медаль), XIV Московском международном Салоне изобретений и инновационных технологий «АРХИМЕД» 5-8 апреля 2011 года (получена серебряная медаль), на Форуме «Дни инноваций Астраханской области» 11-22 апреля 2011 года и 23-27 апреля 2012 года (получены дипломы двух межрегиональных конкурсов за лучший инновационный проект в номинации «Медицина и биотехнологии»), на заседании Астраханского отделения Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов в 2015 году.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 14 печатных работ, в том числе 5 – в рецензируемых изданиях (в том числе 3 – в периодических изданиях из перечня ведущих рецензируемых научных журналов, утвержденных ВАК Министерства образования и науки России и рекомендованных для публикации основных научных результатов диссертации на соискание ученой степени), 6 патентов Российской Федерации на изобретения, 1 учебное пособие, 2 монографии.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 147 страницах печатного текста и состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка использованных литературных источников и списка работ, опубликованных по теме диссертации. Диссертация иллюстрирована 36 таблицами и 9 рисунками. Список литературы содержит 206 источников, в том числе 79 отечественных публикаций и 127 зарубежных публикаций.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка композиций на основе лактобацилл

Были разработаны жидкие пробиотические композиции, снижающие уровень гистамина *in vitro*. Разработка композиций осуществлялась с учетом концентрации гистамина в используемых питательных средах и способности пробиотических штаммов ее изменять. При этом оптимальным критерием питательных сред являлся уровень гистамина, сопоставимый с концентрацией в основных биологических образцах экспериментальных животных. Пробиотические

штаммы или их консорциум должны были обеспечивать снижение гистамина в среде культивирования.

Нами была разработана и исследована новая питательная среда с пониженной концентрацией гистамина, не превышающей физиологическую концентрацию этого биогенного амина в цельной крови: молочная лимоннокислотная казеиновая сыворотка (ЛКМС), полученная из сырья – натурального или восстановленного коровьего молока.

Питательные среды имели подходящие для дальнейших исследований уровни гистамина: ГМС – $256,5 \pm 6,4$ нг/мл (сопоставимый с физиологической концентрацией этого биогенного амина в кале), среда на основе молочной казеиновой сыворотки – ЛКМС – $13,9 \pm 0,8$ нг/мл (сопоставимый с физиологической концентрацией этого биогенного амина в цельной крови).

При исследовании моноштаммовых композиции на основе лактобацилл было установлено, что только два штамма (*L. helveticus NKJC* и *L. helveticus JCH*) не повышали уровень гистамина в среде культивирования вне зависимости от питательной среды закваски и питательной среды композиции. Кроме того, в одном случае при культивировании *L. helveticus JCH* с использованием ГМС в качестве питательной среды закваски и композиции отмечено статистически достоверное снижение уровня гистамина ($P < 0,05$). Самый низкий уровень гистамина в среде культивирования отмечен при использовании ЛКМС в качестве питательной среды для закваски и композиции.

В настоящее время все большее предпочтение отдается пробиотическим композициям третьего поколения, которые в своем составе содержат несколько штаммов микроорганизмов нормофлоры (Ющук Н.Д., Бродов Л.Е., 2001). Поэтому для *in vitro* и последующего *in vivo* моделирования коррекции метаболизма гистамина микробиоценозов перспективны композиции на основе консорциумов. В качестве подходящей *in vitro* модели были исследованы композиции на основе консорциумов штаммов *L. helveticus NKJC*, *L. casei KAA*, *L. helveticus JCH* и питательных сред ГМС и ЛКМС.

Были исследованы варианты консорциумов всех трех штаммов лактобацилл при двукратном увеличении содержания хотя бы одного из двух штаммов, эффективно снижающих уровень гистамина в среде культивирования.

Статистически достоверные различия содержания гистамина в образцах пробиотических композиций были отмечены при их получении с использованием ГМС и одного из вариантов консорциума (таблица 1).

Таблица 1 – Влияние соотношения штаммов лактобацилл в консорциуме на содержание гистамина в пробиотической композиции

Соотношение в консорциуме штаммов лактобацилл (<i>L. helveticus NKJC</i> : <i>L. helveticus JCH</i> : <i>L. casei KAA</i>)	Содержание гистамина в среде культивирования консорциума лактобацилл до и после культивирования, нг/мл ($M \pm m$)			
	ГМС		ЛКМС	
	до	после	до	после
2 : 1 : 1	$265,6 \pm 10,2$	$225,6 \pm 10,6^*$	$17,5 \pm 2,9$	$16,8 \pm 3,1$
2 : 2 : 1	$269,5 \pm 11,8$	$238,8 \pm 14,9$	$17,2 \pm 2,4$	$17,1 \pm 2,7$
1 : 2 : 1	$268,1 \pm 11,9$	$232,7 \pm 14,5$	$17,7 \pm 2,7$	$17,3 \pm 2,6$

Примечания

1 число образцов в каждой группе – $n=5$

2 * – $P < 0,05$

При исследовании всех полученных образцов пробиотических композиций отмечено высокое содержание лактобацилл – 10^9 КОЕ/мл. Нами не было выявлено статистически достоверных различий активной кислотности в образцах всех трех пробиотических композиций.

Следовательно, наиболее перспективным является консорциум трех штаммов лактобацилл, обеспечивающий низкий уровень гистамина в среде культивирования на основе ГМС при использовании как ГМС, так и ЛКМС, в котором соотношение *L. helveticus NKJC*, *L. helveticus JCH* и *L. casei KAA* равно 2 : 1 : 1.

Для прогнозирования физиологического воздействия композиций *in vivo* было проведено исследование динамики уровня гистамина, титра лактобацилл, активной и титруемой кислотности в процессе культивирования.

Для получения заквасок использовалась ЛКМС как среда с низким уровнем гистамина, обеспечивающая необходимые показатели композиции (низкий уровень гистамина, оптимальную активную кислотность и высокое содержание лактобацилл). Инокуляты вносились в количестве 5% от общего объема среды. Продолжительность культивирования композиции составляла 18 часов. Выбор используемых интервалов между контрольными точками отбора проб определялся культуральными свойствами штаммов лактобацилл, информативностью определения особенностей динамики изучаемых показателей и необходимостью более частого забора материала во время предполагаемой экспоненциальной фазы роста исследуемых штаммов (Амерханова А.М., 2009; Точилина А.Г., 2009; Або-Амер А.Е., 2007; Klaenhammer T.R., Kleeman E.G., 1981). Поэтому контрольными точками отбора проб были: 1 час, 2 часа, 3 часа, 4 часа, 5 часов, 6 часов, 7 часов, 8 часов, 10 часов, 12 часов, 14 часов, 16 часов и 18 часов.

При исследовании динамики показателей композиций, включающей консорциум трех штаммов в сочетании с ГМС и ЛКМС, отмечено, что увеличение числа лактобацилл в биомассе происходило в течение первых шести часов культивирования штаммов.

Снижение значений активной и титруемой кислотности происходило во время всего периода культивирования исследуемых композиций.

Тенденция к снижению уровня гистамина в среде культивирования исследуемой композиции на основе ГМС наблюдалась уже через 2-3 часа после начала культивирования, однако статистически достоверное ($P < 0,05$) снижение содержания гистамина в среде культивирования по сравнению с этим показателем в нулевой контрольной точке произошло только через 5-6 часов после начала культивирования. В более поздние сроки культивирования дальнейшего снижения уровня гистамина не происходило.

При культивировании композиции на основе консорциума лактобацилл и ЛКМС не наблюдалось статистически достоверного снижения содержания гистамина ($P > 0,05$).

Проведенные другими авторами исследования показали, что следует не только использовать подбор штаммов лактобацилл по генетически обусловленной активности гистидин-декарбоксилаз и диаминооксидаз, но и учитывать возможности изменения активности данных ферментов в зависимости от условий роста лактобацилл (Lucas P.M. et al., 2005; Nemarajata P. et al., 2013; Spinler J.K. et al., 2014).

Анализ источников литературы позволил сделать заключение о возможности использования Cu^{2+} как ингибитора активности гистидиндекарбоксилаз,

компонента активных центров диаминооксидаз и катализатора дальнейшего окисления продуктов гистамина (Born G.V.R., 1953; Muraki T.N. et al., 2003; Sellsell C.G. et al., 2002; Shepard E.M. et al., 2002). Поэтому для поддержания и усиления стабильных свойств консорциума по снижению уровня гистамина в варианты композиций добавлялись ионы Cu^{2+} в концентрации, поддерживающей и не превышающей суточную норму потребления Cu^{2+} , которая составляла 300 мкмоль/л. Включение в композиции заданной концентрации Cu^{2+} осуществлялось добавлением в питательные среды стерильного раствора сульфата меди пятиводного ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) до конечной массовой доли растворенного вещества 0,00075%. Содержание Cu^{2+} в концентрации 300 мкмоль/л также исключает влияние Cu^{2+} на результаты количественного определения гистамина.

При исследовании динамики показателей композиций, включающих консорциум трех штаммов, питательные ГМС и ЛКМС в сочетании с Cu^{2+} , отмечено, что увеличение числа лактобацилл в биомассе также происходило в течение первых шести часов культивирования штаммов.

Добавление в питательную среду Cu^{2+} не оказывало влияния на содержание лактобацилл, активную и титруемую кислотность ($P > 0,05$) при культивировании исследованных вариантов пробиотических композиций. Однако добавление Cu^{2+} способствовало статистически достоверному снижению концентрации гистамина при использовании питательных сред ЛКМС и ГМС ($P < 0,05$).

Для дальнейших исследований *in vivo* были использованы следующие варианты пробиотических композиций:

композиция №1 – на основе консорциума штаммов *L. helveticus* NKJC, *L. casei* КАА и *L. helveticus* JCH в соотношении 2 : 1 : 1, содержащая ГМС;

композиция №2 – на основе консорциума штаммов *L. helveticus* NKJC, *L. casei* КАА и *L. helveticus* JCH в соотношении 2 : 1 : 1, содержащая ЛКМС.

композиция №3 – на основе консорциума штаммов *L. helveticus* NKJC, *L. casei* КАА и *L. helveticus* JCH в соотношении 2 : 1 : 1, содержащая ГМС и 300 мкмоль/л Cu^{2+} ;

композиция №4 – на основе консорциума штаммов *L. helveticus* NKJC, *L. casei* КАА и *L. helveticus* JCH в соотношении 2 : 1 : 1, содержащая ЛКМС и 300 мкмоль/л Cu^{2+} .

Исследование физиологических показателей уровня гистамина в кишечнике у мышей

При исследовании физиологических эффектов пробиотических композиций необходимо было исключить возможность стимуляции под их влиянием синтеза и высвобождения гистамина в кишечнике. Поэтому в качестве интегрального показателя совокупной активности гистидин-декарбоксилаз и гистаминаз было исследовано содержание гистамина в гомогенатах тонкого и толстого кишечника после однократной дачи пробиотических композиций.

В качестве наиболее доступной и всесторонне изученной *in vivo* модели были выбраны мыши инбредной линии BALB/c. Выбор этого объекта исследований был также обоснован в связи с более высоким содержанием гистамина в кишечнике у этих животных по сравнению с другими линейными мышами (Zimmermann A.S. et al., 2011), что позволило повысить информативность анализа концентрации гистамина.

За все дни наблюдения за животными средняя масса тела во всех группах не уменьшалась по сравнению с данными до дачи образцов композиций, также не

изменилось состояние животных, они были здоровы, активны, их поведенческие реакции не были нарушены, что свидетельствовало о хорошей переносимости композиций.

Не было отмечено каких-либо патологических изменений при изучении макропрепаратов органов животных.

При гистологическом исследовании печени было установлено, что однократное введение всех вариантов разработанных пробиотических композиций не отражается на структуре печени, на содержании и распределении общего белка в гепатоцитах и не усиливает формирование соединительной ткани как между дольками, так и внутри них. Кроме того, не отмечено влияния вводимых образцов композиций на структуру микроциркуляторного русла печени.

Также выявлено, что при введении *per os* в организм мышей разработанных композиций тонкий кишечник сохранил классическую структуру. После однократного введения эпителиальная выстилка была представлена стандартным набором клеток: каемчатые, лишенные каемки, бокаловидные, аргентафинные и клетки с ацидофильной зернистостью. Причем, если первые три типа находились в свободной части ворсинки, то два последних – в криптах. Не было выявлено нарушения структуры микроциркуляторного русла. При определении общего (суммарного) белка в эпителиоцитах различного типа нами не было обнаружено существенной разницы по сравнению с нормой.

При однократном введении животным всех вариантов разработанных композиций – структура толстого кишечника у мышей не претерпевала морфологических изменений. Соотношение столбчатых (каемчатых), бокаловидных и бескаемчатых клеток сохранялась. Не подвергалась какому-либо отрицательному воздействию и подслизистая основа слизистой кишечника. Об этом свидетельствовали сохранность и количество коллагеновых волокон и мощность аморфного вещества соединительнотканной основы слизистой оболочки. Определение общего (суммарного) белка в эпителиоцитах различного типа опытных животных не выявило у них существенных различий по сравнению с аналогичными показателями интактных (контрольных) животных. Но следует отметить, что содержание общего белка в эпителии толстого кишечника было ниже по сравнению с тонким из-за большего количества бокаловидных клеток.

По данным Zimmermann A.S. с соавторами (Zimmermann A.S. et al., 2011) концентрация гистамина в тонком кишечнике мышей инбредной линии BALB/c увеличивается с возрастом и составляет на 5-9 неделе жизни – $1,3 \pm 0,3$, на 10-14 – $2,5 \pm 1,0$, на 15-19 – $4,7 \pm 2,2$, на 20-24 – $7,0 \pm 2,1$ пмоль/мг, что в пересчете на единицы массы составляет $144,5 \pm 33,3$, $277,9 \pm 111,2$, $522,4 \pm 244,5$, $778,1 \pm 233,4$ нг/г, соответственно.

Количественное определение гистамина в образцах гомогенатов кишечника мышей по колориметрическому определению продуктов, образующихся при реакции с диазотированным п-нитроанилином, проводили по адаптированному нами методу Харевой А.Г. с соавторами (2008) и предложенного нами способа. Концентрация гистамина в тонком и толстом кишечнике мышей контрольной группы по нашим данным составляла $221,4 \pm 16,2$ нг/г и $167,4 \pm 10,4$ нг/г, соответственно. Все исследуемые композиции на основе латобацилл, не вызывали в течение часа, после их введения мышам, повышения содержания гистамина в тонком и толстом кишечнике опытных групп животных (уровень значимости различий с контрольной группой $P > 0,05$).

Исследование физиологических показателей уровня гистамина в кишечнике и периферической крови *Macaca mulatta*

В ходе проведенных исследований нами были установлены физиологические показатели концентрации гистамина в периферической крови ($19,14 \pm 2,00$ нг/мл) и в фекалиях ($153,37 \pm 20,10$ нг/г) здоровых интактных макак резусов, содержащихся в Научно-исследовательском институте медицинской приматологии.

По заключению ветеринарного врача за все дни клинического наблюдения (до и после скармливания пробиотических композиций) обезьяны оставались активными, хорошо ели, стул был оформленный. Отклонений от нормы в состоянии здоровья животных выявлено не было. Не выявлено повышения температуры тела как показателя общей реактивности организма обезьян.

Следует отметить, что композиции на основе ЛКМС принимались обезьянами более охотно, чем композиции на основе ГМС.

С учетом большого разброса содержания гистамина в фекалиях и в цельной периферической крови, установленного при обследовании контрольной группы макак резусов, была проведена целевая выборка обезьян и сформированы четыре опытные группы. В эти группы отбирались животные с содержанием гистамина в фекалиях, превышающим средние значения этого показателя в контрольной группе, но не выходящим за пределы рассчитанных максимальных физиологических значений данных показателей в соответствии с рекомендуемым для физиологических исследований правилом двух-трех средних квадратических отклонений – $M \pm 2\sigma$, ($M \pm 3\sigma$) (Макаров П.О., 1959). Таким образом, животные опытных групп были сопоставимы по содержанию гистамина в фекалиях и в цельной периферической крови ($P > 0,05$), но с уменьшенным по сравнению с контрольной группой разбросом его содержания гистамина и соответственно с меньшими значениями коэффициентов вариации этих показателей.

Содержание гистамина в фекалиях

При сравнении содержания гистамина в фекалиях разных опытных групп обезьян до введения пробиотических композиций и в фекалиях группы контрольных животных было установлено отсутствие статистически значимых различий ($P > 0,05$) (таблица 2).

Таблица 2 – Средние показатели уровня гистамина в фекалиях обезьян до и после введения пробиотических композиций

Контрольная точка	Средняя концентрация гистамина, нг/г ($M \pm m$)			
	Опытная группа № 1	Опытная группа № 2	Опытная группа № 3	Опытная группа № 4
До введения	$173,8 \pm 20,3$	$165,8 \pm 15,4$	$173,1 \pm 12,1$	$170,6 \pm 14,7$
После 7 суток	$168,9 \pm 8,4^*$	$152,1 \pm 14,7^*$	$134,6 \pm 12,3^*$	$134,5 \pm 14,3^*$
После 14 суток	$153,9 \pm 10,8^*$	$143,7 \pm 8,7^*$	$133,7 \pm 1,7^{**}$	$134,1 \pm 0,8^{**}$

* – уровень значимости различий с животными до введения пробиотических композиций и достоверность влияния этого фактора по Фишеру – $P > 0,05$

** – уровень значимости различий с животными до введения пробиотических композиций и достоверность влияния этого фактора по Фишеру – $P < 0,05$

Через 7 суток ежедневного введения пробиотических композиций было установлено снижение концентрации гистамина в фекалиях во всех опытных группах животных, которое являлось статистически недостоверным ($P > 0,05$). Данная тенденция была более выражена у обезьян опытных групп № 3 и № 4

(средние показатели уровня гистамина $134,6 \pm 12,3$ нг/г, CV=22,4%, и $134,5 \pm 14,3$ нг/г, CV=26,0%, соответственно), чем у обезьян опытных групп № 1 и № 2 (средняя концентрация гистамина $168,9 \pm 8,4$ нг/г, CV=11,1%, и $152,1 \pm 14,7$ нг/г, CV=21,65, соответственно).

Сходная тенденция по снижению уровня гистамина сохранялась у всех животных, получавших композиции № 1 и № 2, через 7 суток после отмены пробиотиков (через 14 суток после начала эксперимента). Концентрации гистамина в фекалиях достигали $153,9 \pm 10,8$ нг/г (CV=15,7%) и $143,7 \pm 8,7$ нг/г (CV=13,6%) соответственно.

Однако в опытных группах *Macaca mulatta* № 3 и № 4, получавших пробиотические композиции на основе ГМС с добавлением Cu^{2+} и ЛКМС с добавлением Cu^{2+} , соответственно, через 14 суток после начала эксперимента наблюдалось статистически достоверное ($P < 0,05$) снижение уровня гистамина в фекалиях ($133,7 \pm 1,7$ нг/г, CV=3,1%, и $134,1 \pm 0,8$ нг/г, CV=1,5%, соответственно).

Показатель силы влияния фактора в виде перорального введения пробиотических композиций на содержание гистамина в фекалиях макак резусов увеличивался в течение эксперимента, то есть доля влияния этого фактора через 14 дней после начала эксперимента была значительно выше, чем через 7 дней после начала эксперимента: в опытной группе № 1 через 7 дней определяемое факториальное влияние составило 0,6%, через 14 дней – 8,2%; в опытной группе № 2 через 7 дней определяемое факториальное влияние составило 4,8%, через 14 дней – 15,8%. Наиболее сильное влияние перорального введения пробиотических композиций на содержание гистамина в фекалиях макак резусов выявлено в опытных группах № 3 и № 4: в опытной группе № 3 через 7 дней определяемое факториальное влияние составило 32,8%, через 14 дней – 50,5%; в опытной группе № 2 через 7 дней определяемое факториальное влияние составило 23,2%, через 14 дней – 37,4% (таблица 3).

Таблица 3 – Сила влияния фактора перорального введения вариантов пробиотических композиций на уровень гистамина в фекалиях обезьян

Контрольная точка	Показатель силы влияния фактора $\left(\eta_x^2 \pm m_{\eta_x^2} \right)$			
	Опытная группа № 1	Опытная группа № 2	Опытная группа № 3	Опытная группа № 4
После 7 суток	$0,006 \pm 0,099$	$0,048 \pm 0,095$	$0,328 \pm 0,056$	$0,232 \pm 0,064$
После 14 суток	$0,082 \pm 0,092$	$0,158 \pm 0,084$	$0,505 \pm 0,041^*$	$0,374 \pm 0,052^*$

* – достоверность влияния фактора по Фишеру – $P < 0,05$

Тем не менее во всех группах экспериментальных животных во всех контрольных точках уровень гистамина в фекалиях снижался в пределах физиологической нормы (уровень значимости различий с группой интактных животных и достоверность влияния фактора по Фишеру – $P > 0,05$).

Содержание гистамина в периферической крови

Исходная концентрация гистамина в цельной периферической крови макак резусов опытных групп № 1, № 2, № 3 и № 4 не имела значимых различий ($P > 0,05$) и соответствовала физиологической норме содержания гистамина в крови, установленной для контрольной группы животных ($P > 0,05$).

Статистически недостоверное ($P>0,05$) снижение уровня гистамина в крови было установлено во всех опытных группах макак резусов после 7 суток ежедневного введения композиций, достигавшие у животных опытной группы № 1 – $19,6\pm 0,9$ нг/мл ($CV=10,5\%$), опытной группы № 2 – $19,9\pm 0,7$ нг/мл ($CV=8,6\%$), опытной группы № 3 – $18,2\pm 1,4$ нг/мл ($CV=18,2\%$) и опытной группы № 4 – $18,3\pm 0,5$ нг/мл ($CV=7,1\%$). Однако эта тенденция к снижению не наблюдалась через 7 суток после прекращения дачи пробиотических композиций, как это отмечалось в фекалиях. Напротив, средние значения концентрации гистамина в крови возвращались к уровням, близким к исходным: в опытной группе № 1 – $21,0\pm 1,9$ нг/мл ($CV=20,3\%$), в опытной группе № 2 – $20,8\pm 1,0$ нг/мл ($CV=10,4\%$), в опытной группе № 3 – $19,8\pm 0,8$ нг/мл ($CV=10,0\%$) и в опытной группе № 4 – $19,7\pm 1,7$ нг/мл ($CV=20,9\%$).

Это подтверждается отсутствием значимого показателя силы влияния фактора перорального введения пробиотических композиций на содержание гистамина в цельной периферической крови, аналогичного влиянию перорального введения пробиотических композиций на содержание гистамина в фекалиях, так как доля влияния этого фактора на исследуемый показатель была низкой, преимущественно снижалась в конце эксперимента. Через 7 и 14 суток после начала эксперимента в опытной группе № 1 эта доля факториального влияния соответственно составила 6,6% и 0,02%, в опытной группе № 2 – 21,3% и 0,3%, в опытной группе № 3 – 3,4% и 1,8%, в опытной группе № 4 – 1,9% и 2,8%.

Таким образом, при сравнении содержания гистамина в цельной крови обезьян опытных групп во всех контрольных точках уровень гистамина достоверно не отличался и сохранялся в пределах физиологической нормы (уровень значимости различий с группой интактных животных – $P>0,05$). Концентрация гистамина в плазме крови опытных групп животных находилась ниже порога чувствительности использованного набора реагентов (0,12 нг/мл), что отмечалось и при исследовании уровня этого биогенного амина у интактных макак резусов.

Содержание базофилов в периферической крови

С учетом того, что основным депо гистамина в крови являются базофилы, было проведено исследование динамики содержания этих клеток иммунной системы в ответ на введение животным пробиотических композиций.

Статистически недостоверное ($P>0,05$) снижение концентрации базофилов было установлено во всех опытных группах животных: в группах № 1 и № 2 через 14 суток после начала эксперимента, в группе № 3 через 7 суток после начала эксперимента и в группе № 4 – во всех контрольных точках после начала введения пробиотических композиций.

Процентное содержание базофилов в периферической крови макак резусов опытных групп № 1, № 2, № 3 и № 4 до введения пробиотических композиций составляло $0,63\pm 0,06\%$ ($CV=22,1\%$), $0,60\pm 0,05\%$ ($CV=18,3\%$), $0,60\pm 0,07\%$ ($CV=28,3\%$), $0,59\pm 0,01\%$ ($CV=12,0\%$) соответственно (таблица 4).

Содержание базофилов в % в периферической крови животных, получавших пробиотические композиции на основе ГМС (опытные группы № 1 и № 3), статистически достоверно не изменялось ($P>0,05$) в ходе эксперимента. Статистически достоверное снижение процентного содержания базофилов по сравнению с исходным уровнем этого показателя было установлено через 14 суток после начала эксперимента у обезьян, получавших пробиотические композиции на основе ЛКМС: опытная группа № 2 – $P<0,05$, $\eta^2=38,5\%$, опытная группа № 4 – $P<0,001$.

Таблица 4 – Динамика процентного содержания базофилов в периферической крови обезьян до после введения пробиотических композиций

Контрольная точка	Среднее содержание базофилов, % (M±m)			
	Опытная группа № 1	Опытная группа № 2	Опытная группа № 3	Опытная группа № 4
До введения	0,63±0,06	0,60±0,05	0,60±0,07	0,59±0,01
После 7 суток	0,72±0,11*	0,52±0,04*	0,56±0,05*	0,53±0,02*
После 14 суток	0,55±0,04*	0,43±0,05**	0,57±0,07*	0,44±0,01***

* – уровень значимости различий с животными до введения пробиотических композиций и достоверность влияния этого фактора по Стьюденту – P>0,05

** – уровень значимости различий с животными до введения пробиотических композиций и достоверность влияния этого фактора по Стьюденту – P<0,05

*** – уровень значимости различий с животными до введения пробиотических композиций и достоверность влияния этого фактора по Стьюденту – P<0,001

Анализ динамики микрофлоры продуцирующей гистамин

Посев фекалий обезьян опытных групп во всех контрольных точках позволяет проследить динамику изменений кишечной микрофлоры (таблица 5).

Таблица 5 – Динамика кишечной микрофлоры у макак резусов на фоне дачи пробиотических композиций

Контрольные точки	Средняя концентрация бактерий в фекалиях обезьян, lg КОЕ/г (M ± m) ¹⁾											
	<i>Bifidobacterium spp.</i> ²⁾	<i>Lactobacillus spp.</i> ²⁾	<i>Escherichia coli</i> ²⁾	<i>Staphylococcus spp.</i> ²⁾	<i>S. aureus</i>	<i>Enterococcus spp.</i> ²⁾	<i>Citrobacter spp.</i>	<i>Proteus spp.</i>	<i>Enterobacter spp.</i>	<i>Klebsiella spp.</i>	<i>Clostridium spp.</i>	<i>Candida spp.</i>
Опытная группа № 1												
До введения	8,6±0,4	9,8±0,2	5,8±0,7	5,8±0,2	-	6,8±0,4	4,3 ⁵⁾	3,3 ⁵⁾	6,0 ⁴⁾	6,0 ⁵⁾	4,8 ⁶⁾	-
После 7 суток	10,0±0,1	9,8±0,2	5,4±0,7	4,2±0,2	-	7,4±0,3	2,0 ⁵⁾	5,0 ³⁾	4,5 ⁴⁾	4,0 ⁵⁾	-	-
После 14 суток	9,0±0,5	9,8±0,2	5,2±0,6	4,0±0,1	-	6,4±1,0	-	-	-	-	-	-
Опытная группа № 2												
До введения	9,2±0,4	10,0±0,1	5,7±0,5	5,3±0,4	5,0 ⁴⁾	7,0±0,0	6,0 ⁴⁾	3,0 ³⁾	7,0 ³⁾	5,3 ⁶⁾	5,8 ⁶⁾	7,0 ³⁾
После 7 суток	10,0±0,1	10,0±0,1	5,3±0,5	4,4±0,3	-	7,8±0,3	2,0 ³⁾	-	-	4,3 ⁵⁾	5,0 ³⁾	6,0 ³⁾
После 14 суток	10,0±0,1	9,7±0,4	6,3±0,4	4,0±0,1	-	7,3±0,2	-	-	-	3,5 ⁴⁾	-	-
Опытная группа № 3												
До введения	9,0±0,5	8,9±0,6	5,4±0,6	5,7±0,5	4,0 ³⁾	6,6±0,5	4,0 ³⁾	-	-	4,3 ⁵⁾	5,5 ⁴⁾	7,0 ³⁾
После 7 суток	9,9±0,2	9,3±0,3	5,1±0,4	4,3±0,2	-	7,4±0,2	-	-	-	-	-	-
После 14 суток	10,0±0,1	9,7±0,3	6,9±0,4	4,1±0,2	-	8,0±0,0	5,0 ³⁾	4,0 ³⁾	-	4,0 ⁴⁾	-	-
Опытная группа № 4												
До введения	9,1±0,4	9,3±0,5	5,7±0,6	5,6±0,7	5,0 ⁴⁾	7,1±0,4	3,0 ⁴⁾	4,0 ⁴⁾	-	5,3 ⁵⁾	8,0 ³⁾	-
После 7 суток	9,0±0,5	8,7±0,4	5,6±0,5	4,1±0,2	-	7,9±0,2	2,0 ³⁾	3,0 ⁴⁾	-	7,0 ³⁾	-	-
После 14 суток	10,0±0,1	9,7±0,3	6,4±0,3	3,4±0,2	-	8,0±0,0	2,0 ³⁾	2,5 ⁴⁾	-	4,0 ³⁾	-	-

Примечания:

1) – бактерии рода *Pseudomonas* не выделялись

2) – микроорганизм выделялся у всех особей

3) – микроорганизм выделялся только у 1 особи из опытной группы в данной контрольной точке

4) – микроорганизм выделялся только у 2 особей из опытной группы в данной контрольной точке

5) – микроорганизм выделялся только у 3 особей из опытной группы в данной контрольной точке

6) – микроорганизм выделялся только у 4 особей из опытной группы в данной контрольной точке

На протяжении всего эксперимента средние значения количественного состава нормальной микрофлоры в фекалиях обезьян опытных групп не опускался ниже показателей, характерных для клинически здоровых обезьян семейства мартышковых (Дарсания М.Ш., 2000). Тем не менее, в результате дачи пробиотических композиций у животных всех опытных групп наблюдалась полная элиминация или значительное снижение титра бактерий, способных продуцировать гистамин, а именно – *Staphylococcus spp.*, *S. aureus*, *Proteus spp.*, *Clostridium spp.* Этот антагонистический эффект, вероятно, обеспечивал тенденцию к снижению концентрации гистамина в фекалиях у животных 1 и 2 опытных групп. Важное значение для обеспечения достоверного снижения уровня этого биогенного амина, которое наблюдалось у макак 3 и 4 опытных групп, имело поддержание стабильных свойств консорциума по снижению уровня гистамина.

Исследование физиологических показателей иммуноглобулинового звена гуморального иммунитета *Macaca mulatta*

Концентрация сывороточных IgG, IgA и IgM у животных контрольной группы по данным РИД составляла 26,69±1,34 г/л (CV=21,9%), 3,46±0,18 г/л (CV=22,8%) и 1,39±0,13 г/л (CV=40,5%), соответственно. Уровень иммуноглобулинов в сыворотке крови обследованных интактных макак резусов (контрольная группа) по данным ИФА сильно варьировал и составлял: IgG – 13,92±2,2 г/л (CV=68,9%), IgG1 – 9,19±1,45 г/л (CV=68,9%), IgA – 2,6±0,5 г/л (CV=84,7%), IgM – 1,37±0,3 г/л (CV=96,0%) и IgE – 1,9±0,5 мг/л (CV=115,9%). То есть, уровень IgG, IgA и IgM в крови макак резусов в контрольной группе по данным ИФА и РИД соответствовал физиологической норме этих животных, ранее описанной Miller C.J. с соавторами и Матуа А.З. (Miller C.J. et al., 1992; Матуа А.З., 2010).

Для повышения информативности оценки физиологического влияния пробиотических композиций на концентрацию иммуноглобулинов в крови у обезьян данного вида были отобраны животные таким образом, чтобы в формируемых группах был минимально возможный разброс концентраций определяемых иммуноглобулинов.

Обезьяны опытных групп имели уровни иммуноглобулинов, не выходящие за пределы рассчитанных максимальных физиологических значений данных показателей в контрольной группе, что также соответствовало норме согласно рекомендуемым для иммунологических исследований кратным отношением среднего квадратического отклонения ($M \pm 1,5\sigma$) (Караулов А.В. с соавт., 1999).

Средние концентрации IgG в сыворотке крови макак резусов из опытных групп по данным ИФА и РИД во всех контрольных точках не имели статистически значимых различий с уровнем этого иммуноглобулина у контрольной группы животных ($P > 0,05$) (таблицы 6 и 7).

Таблица 6 – Средние показатели уровня IgG в сыворотке крови обезьян по данным ИФА

Контрольная точка	Средняя концентрация IgG, г/л ($M \pm m$)			
	Опытная группа № 1	Опытная группа № 2	Опытная группа № 3	Опытная группа № 4
До введения	11,58±0,65	14,43±1,86	12,23±0,51	14,79±1,67
После 7 суток	14,06±1,09*	14,52±1,47*	13,64±0,65*	14,15±1,29*
После 14 суток	15,34±1,48**	15,14±1,02*	15,81±1,12**	15,33±0,88*

* – уровень значимости различий с животными до введения – $P > 0,05$

** – уровень значимости различий с животными до введения – $P < 0,05$

Как следует из таблицы 6, до введения пробиотических композиций средние показатели концентрации IgG у животных опытных групп № 1, № 2, № 3 и № 4 составляли 11,58±0,65 г/л, 14,43±1,86 г/л, 12,23±0,51 г/л и 14,79±1,67 г/л, соответственно. Через 7 суток ежедневной дачи пробиотиков у животных опытных групп № 1 и № 3 наблюдалась тенденция к увеличению концентрации IgG до значений 14,06±1,09 г/л и 13,64±0,65 г/л, соответственно (уровень значимости различий с животными до введения P>0,05). Статистически достоверное повышение содержания IgG у этих групп животных, получавших пробиотические композиции на основе ГМС, наблюдалось через 14 суток после начала эксперимента, достигая значений 15,34±1,48 г/л и 15,81±1,12 г/л, соответственно (P<0,05). Уровень IgG в опытных группах № 2 и № 4 не имел статистически достоверных изменений (P>0,05) как на фоне введения пробиотиков, так и после их отмены.

Таблица 7 – Средние показатели уровня IgG в сыворотке крови обезьян по данным РИД

Контрольная точка	Средняя концентрация IgG, г/л (M±m)			
	Опытная группа № 1	Опытная группа № 2	Опытная группа № 3	Опытная группа № 4
До введения	25,02±2,23	26,49±2,9	28,66±2,4	24,67±2,14
После 7 суток	26,27±2,04*	27,75±3,07*	30,85±3,84*	23,26±1,82*
После 14 суток	26,44±2,32*	25,21±2,78*	30,46±3,56*	22,78±1,97*

* – уровень значимости различий с животными до введения – P>0,05

** – уровень значимости различий с животными до введения – P<0,05

По данным РИД, как следует из таблицы 7, не было обнаружено статистически достоверных изменений уровня IgG в сыворотке крови макаков резусов, получавших пробиотические композиции.

Показатели силы влияния фактора в виде перорального введения пробиотических композиций на содержание IgG в сыворотке крови опытных животных соответствовали значениям и динамике средних показателей концентрации данного иммуноглобулина (по данным ИФА) (таблица 8).

Таблица 8 – Сила влияния фактора перорального введения пробиотических композиций на уровень IgG в сыворотке крови обезьян

Контрольная точка	Показатель силы влияния фактора $\left(\eta_x^2 \pm m_{\eta_x^2}\right)$			
	Опытная группа № 1	Опытная группа № 2	Опытная группа № 3	Опытная группа № 4
После 7 суток	0,315±0,068	0,0002±0,1	0,221±0,065	0,009±0,083
После 14 суток	0,393±0,061*	0,013±0,099	0,449±0,046*	0,008±0,083

* – достоверность влияния фактора по Фишеру – P<0,05

Статистически достоверное влияние перорального введения пробиотических композиций на содержание IgG в сыворотке крови (P<0,05) установлено только в опытных группах № 1 и № 3 через 14 суток после начала эксперимента (39,3% и 44,9% соответственно). В данных группах обезьян влияние перорального введения пробиотических композиций на содержание IgG в сыворотке крови определялось и через 7 суток (в опытной группе № 1 – 31,5%, в опытной группе № 3 – 22,1%), но было статистически недостоверным (P>0,05). В остальных опытных группах

показатели факториального влияния были очень низкими и статистически недостоверными ($P>0,05$) как через 7, так и через 14 суток после начала эксперимента (в опытной группе № 2 – 0,02% и 1,3% соответственно, в опытной группе № 4 – 0,9% и 0,8% соответственно).

Динамика средних показателей концентрации IgG1 в сыворотке крови макак из опытных групп № 1 и № 3, а также динамика показателей влияния перорального введения пробиотических композиций на содержание IgG1 в сыворотке крови животных в данных группах и статистическая достоверность этих показателей совпадали с аналогичными показателями концентрации суммарного IgG (таблицы 9 и 10). В опытной группе № 1 содержание IgG1 в сыворотке крови увеличилось через 7 суток после начала эксперимента с $7,65\pm 0,43$ г/л до $9,28\pm 0,72$ г/л при факториальном влиянии пробиотической композиции 31,5% ($P>0,05$), через 14 суток – до $10,12\pm 0,97$ г/л при факториальном влиянии пробиотической композиции 39,3% ($P<0,05$). В опытной группе № 3 содержание IgG1 в сыворотке крови увеличилось через 7 суток после начала эксперимента с $8,07\pm 0,34$ г/л до $9,0\pm 0,42$ г/л при факториальном влиянии пробиотической композиции 22,1% ($P>0,05$), через 14 суток – до $10,45\pm 0,73$ г/л при факториальном влиянии пробиотической композиции 45,7% ($P<0,05$).

Таблица 9 – Средние показатели уровня IgG1 в сыворотке крови обезьян

Контрольная точка	Средняя концентрация IgG1, г/л ($M\pm m$)			
	Опытная группа 1	Опытная группа 2	Опытная группа 3	Опытная группа 4
До введения	$7,65\pm 0,43$	$9,52\pm 1,23$	$8,07\pm 0,34$	$9,76\pm 1,11$
После 7 суток	$9,28\pm 0,72^*$	$9,58\pm 0,97^*$	$9,0\pm 0,42^*$	$9,36\pm 0,87^*$
После 14 суток	$10,12\pm 0,97^{**}$	$9,99\pm 0,68^*$	$10,45\pm 0,73^{**}$	$10,14\pm 0,58^*$

* – уровень значимости различий с животными до введения – $P>0,05$

** – уровень значимости различий с животными до введения – $P<0,05$

Таблица 10 – Сила влияния фактора перорального введения пробиотических композиций на уровень IgG1 в сыворотке крови обезьян

Контрольная точка	Показатель силы влияния фактора $\left(\eta_x^2 \pm m_{\eta_x^2} \right)$			
	Опытная группа № 1	Опытная группа № 2	Опытная группа № 3	Опытная группа № 4
После 7 суток	$0,315\pm 0,068$	$0,0002\pm 0,1$	$0,221\pm 0,065$	$0,008\pm 0,083$
После 14 суток	$0,393\pm 0,061^*$	$0,013\pm 0,099$	$0,457\pm 0,045^*$	$0,009\pm 0,083$

* – достоверность влияния фактора по Фишеру – $P<0,05$

Уровень IgG1 в опытных группах № 2 и № 4 не имел статистически достоверных изменений ($P>0,05$) как на фоне введения пробиотиков, так и после их отмены.

При этом в опытных группах средние показатели концентрации IgG1 в сыворотке крови у животных во всех контрольных точках не имели статистически значимых различий с уровнем иммуноглобулина этого подкласса у контрольной группы животных ($P>0,05$) (таблица 9).

Количественный анализ IgA, IgM и IgE в сыворотке крови обезьян из опытных групп во всех контрольных точках показал отсутствие статистически

значимых различий с уровнем иммуноглобулинов этих классов контрольной группы интактных животных ($P > 0,05$).

Статистически достоверных изменений количества сывороточных IgA, IgM и IgE не наблюдалось как на фоне введения пробиотических композиций, так и после их отмены ($P > 0,05$).

Таким образом, лактобациллы выполняют в организме функцию физиологического регулятора уровня гистамина в желудочно-кишечном тракте, содержания IgG1 и базофилов в крови. Такое физиологическое влияние композиций на основе лактобацилл является замедленным (отсроченным).

Филогенетический анализ аминокислотных последовательностей Fc фрагментов IgG1, IgA и IgM человека и макак резусов.

В ходе исследования концентраций сывороточных иммуноглобулинов *Macaca mulatta* было обнаружено, что использование наборов для количественного ИФА IgG и IgG1 обезьян Старого Света позволяет выявить минорные физиологические изменения этого звена гуморального иммунитета, что не было возможным при использовании диагностикума на основе антител к IgG человека. Тем не менее использование обоих типов наборов (ИФА и РИД) одинаково показывает отсутствие достоверных различий в концентрации IgA и IgM в сыворотке крови обезьян при введении пробиотических композиций. Для изучения обнаруженного феномена было проведено сравнительное филогенетическое исследование аминокислотных последовательностей Fc фрагментов IgG1, IgA и IgM человека и макак резусов, которые кодируются известными аллелями генов IGHC, депонированных в Международной информационной системе иммуногенетики IMGT (<http://www.imgt.org>) (рисунки 2-4).

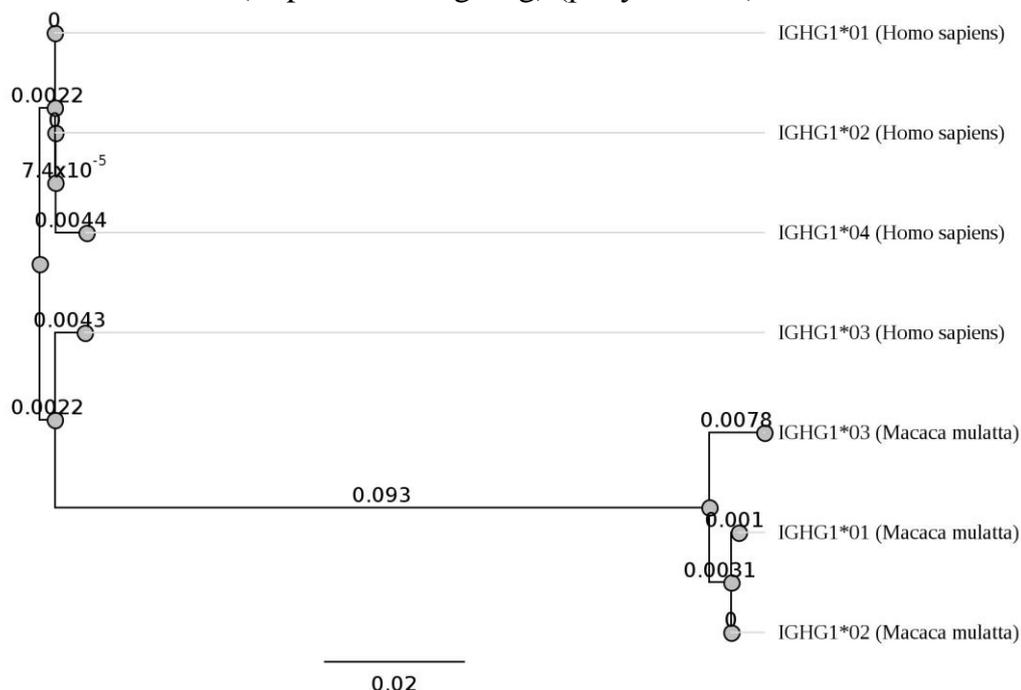


Рисунок 2 – Филогенетическое дерево Fc фрагментов IgG1

Аминокислотная дистанция между группой Fc фрагментов IgG1 макак резусов и группой человека составила 0,093 замены (рисунок 2). При этом аминокислотные дистанции внутри этих групп не превышают 0,0078 (у макак резусов) и 0,0088 (у человека).

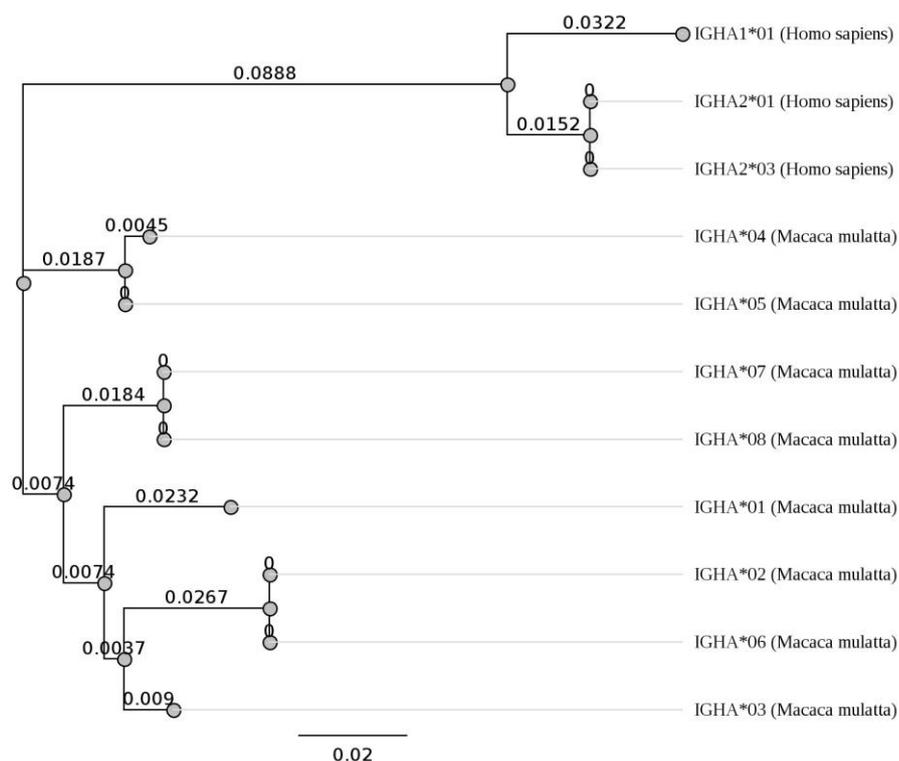


Рисунок 3 – Филогенетическое дерево Fc фрагментов IgA

Генетическая дистанция между группами аминокислотных последовательностей Fc фрагментов IgA человека и макак резусов составляет 0,0888 замены (рисунок 3). Однако аминокислотные дистанции внутри этих групп достигают 0,0322 (у человека) и 0,0452 (у макак резусов).

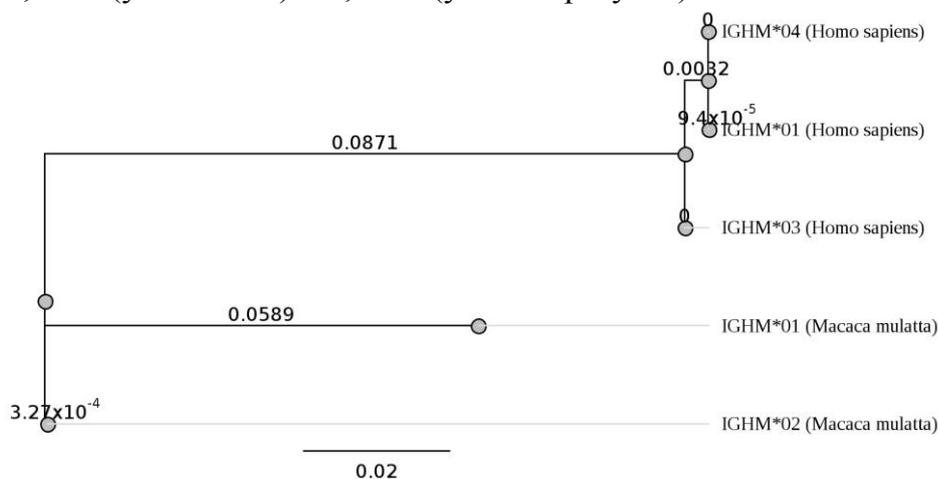


Рисунок 4 – Филогенетическое дерево Fc фрагментов IgM

Генетическая дистанция первичной структуры Fc фрагментов IgM между последовательностями человека и обезьян составляет 0,0871 аминокислотных замены (рисунок 4). Однако аминокислотные дистанции между Fc фрагментами обезьян достигают 0,0589, в то время как у человека не превышают 0,0032.

Таким образом, можно сделать заключение о гораздо более высокой внутривидовой вариабельности Fc фрагментов IgA человека и макак резусов, а также IgM макак по сравнению с IgG1. Следовательно исследование физиологических изменений концентрации сывороточных IgG1 целесообразно с использованием родоспецифических диагностикумов, а IgA и IgM – при помощи наборов с более широкой специфичностью.

ВЫВОДЫ

1. Предложены пробиотические композиции на основе консорциума штаммов *L. helveticus NKJC*, *L. helveticus JCH* и *L. casei KAA*:

- композиция №1, содержащая гидролизатно-молочную среду;

- композиция №2, содержащая молочную лимоннокислотную казеиновую сыворотку;

- композиция №3, содержащая гидролизатно-молочную среду и 300 мкмоль/л Cu^{2+} ;

- композиция №4, содержащая молочную лимоннокислотную казеиновую сыворотку и 300 мкмоль/л Cu^{2+} .

Композиции №3 и №4 на экспериментальных моделях *in vitro* вызывали снижение уровня гистамина, соответственно, с $259,5 \pm 11,2$ нг/мл до $211,7 \pm 11,7$ нг/мл и с $14,0 \pm 2,1$ нг/мл до $8,0 \pm 1,8$ нг/мл.

2. Пробиотические композиции при пероральном введении их мышам инбредной линии BALB/c не стимулировали у животных синтеза эндогенного гистамина и не вызывали макро- и микроморфологических изменений тонкого и толстого кишечника.

3. Установлено, что в обследованной экспериментальной популяции интактных *Mascaca mulatta* физиологические показатели пула гистамина в фекалиях составляют $153,37 \pm 20,10$ нг/г, а в периферической крови – $19,14 \pm 2,00$ нг/мл. Концентрация иммуноглобулинов в сыворотке крови у обследованных *Mascaca mulatta* по данным радиальной иммунодиффузии с использованием диагностикума для *Homo sapiens* соответственно составляла: для IgG – $26,69 \pm 1,34$ г/л, IgA – $3,46 \pm 0,18$ г/л и IgM – $1,39 \pm 0,13$ г/л. По данным родоспецифических иммуноферментных тест-систем эти показатели соответственно составляли: для IgG – $13,92 \pm 2,2$ г/л, для IgG1 – $9,19 \pm 1,45$ г/л, для IgA – $2,6 \pm 0,5$ г/л, для IgM – $1,37 \pm 0,3$ г/л и для IgE – $1,9 \pm 0,5$ мг/л.

4. Установлено статистически недостоверное снижение пула гистамина в фекалиях *Mascaca mulatta* опытных групп через 14 суток после начала введения пробиотических композиций №1 и № 2. Достоверное уменьшение концентрации гистамина в фекалиях *Mascaca mulatta* опытных групп через 14 суток после начала введения пробиотических композиций №3 и №4. Выявлено, что концентрация гистамина в периферической крови при введении композиций не имела статистически достоверных различий от пула гистамина у интактных *Mascaca mulatta*. Однако отмечена тенденция снижения пула связанного гистамина в периферической крови макак резусов за счет снижения процентного содержания базофилов в крови животных через 14 суток после начала введения пробиотических композиций №2 и №4.

5. С помощью родоспецифических ИФА тест-систем показано повышение концентрации IgG и IgG1 в сыворотке крови *Mascaca mulatta* спустя 14 суток после начала введения пробиотических композиций № 1 и № 3. При этом концентрация IgG и IgG1 в сыворотке крови *Mascaca mulatta* из групп, получавших композиции № 2 и № 4, не имела статистически достоверных различий, что доказывает более выраженное влияние на иммуноглобулиновое звено гуморального иммунитета пробиотических композиций, содержащих гидролизатно-молочную среду. Однако не выявлено статистически достоверных изменений уровня IgG в сыворотке крови макак резусов по данным радиальной иммунодиффузии с использованием диагностикума для *Homo sapiens*.

6. Установлены следующие закономерности вариабельности аминокислотных последовательностей Fc фрагментов иммуноглобулинов человека и макак резусов, подтверждающие искажение результатов радиальной иммунодиффузии с

использованием диагностикума для Homo sapiens и информативность родоспецифических ИФА тест-систем:

- межвидовые генетические дистанции IgG1, IgA и IgM человека и макак резусов составляют 0,093, 0,0888 и 0,0871 аминокислотных замен соответственно;

- внутривидовые генетические дистанции IgG1 человека и макак резусов достигают 0,0088 и 0,0078 замен;

- внутривидовые генетические дистанции IgA человека и макак резусов достигают 0,0322 и 0,0452 замен;

- внутривидовые генетические дистанции IgM человека и макак резусов достигают 0,0032 и 0,0589 замен.

7. Применение всех вариантов разработанных пробиотических композиций позволило полностью элиминировать или значительно снизить титр бактерий, способных синтезировать гистамин. При этом использование композиций № 3 и № 4 обеспечивает снижение аллергической настроенности организма с дисбиотическими нарушениями микробиоценозов открытых полостей организма как за счет гидролитического дезаминирования гистамина ферментными системами штаммов консорциума, так и благодаря антагонистической активности пробиотического продукта в отношении *Staphylococcus spp.*, *S. aureus*, *Proteus spp.*, *Clostridium spp.*, способных продуцировать гистамин.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ГМС –	гидролизатно-молочная среда
ИФА –	иммуноферментный анализ
КОЕ –	колониеобразующая единица
ЛКМС –	лимоннокислотная молочная сыворотка
МРС –	среда Мозера-Рогоза-Шарпа
РИД –	радиальная иммунодиффузия
Cu ²⁺ –	катионы меди двухвалентной (II)
CV –	коэффициент вариации
Fab –	fragment antigen binding – антигенсвязывающий фрагмент
Fc –	fragment cristallizable – кристаллизующийся фрагмент
H –	тяжелая цепь иммуноглобулина
IgA –	иммуноглобулин класса А
IgA1 –	иммуноглобулин подкласса А1
IgA2 –	иммуноглобулин подкласса А2
IgE –	иммуноглобулин класса Е
IgG –	иммуноглобулин класса G
IgG1 –	иммуноглобулин подкласса G1
IGHA –	ген, кодирующий константные домены тяжелой цепи IgA
IGHA1 –	ген, кодирующий константные домены тяжелой цепи IgA1
IGHA2 –	ген, кодирующий константные домены тяжелой цепи IgA2
IGHC –	ген, кодирующий константные домены тяжелой цепи иммуноглобулина
IGHG1 –	ген, кодирующий константные домены тяжелой цепи IgG1
IGHM –	ген, кодирующий константные домены тяжелой цепи IgM
IgM –	иммуноглобулин класса М
L –	легкая цепь иммуноглобулина
L. –	Lactobacillus
M –	среднее арифметическое
m –	ошибка репрезентативности

- n – число образцов
 P – уровень значимости
 S. – Staphylococcus
 η_x^2 – показатель силы влияния фактора
 σ – среднее квадратическое отклонение

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в реферируемых научных журналах ВАК РФ

1. Алешкин, В.А. Нарушения микробиоценозов у детей: многоцентровое исследование. Сообщение III. Микробиоценоз и дисбактериоз кишечника / В.А. Алешкин, Х.М. Галимзянов, С.С. Афанасьев, А.В. Караулов, Ю.В. Несвижский, Е.А. Воропаева, М.С. Афанасьев, **Е.О. Рубальский** // **Астраханский медицинский журнал.** – 2011. – Т. 6, № 2. – С. 124-128.

2. **Рубальский, Е.О.** Влияние пробиотических композиций на физиологические показатели пула гистамина *Masaca mulatta* / **Е.О. Рубальский**, К.Н. Смирнова, С.С. Афанасьев, В.А. Алешкин, Д.Л. Теплый, А.В. Караулов, С.В. Орлов, Б.А. Лапин, А.В. Алешкин, А.Д. Даудова, Э.К. Джикидзе, И.М. Аршба, М.С. Афанасьев, А.Х. Ахминеева // **Астраханский медицинский журнал.** – 2015. – Т. 10, № 4. – С. 67-78.

3. **Рубальский, Е.О.** Сравнительная характеристика особенностей иммуноглобулинового профиля человека и макак резусов / Е.О. Рубальский, К.Н. Смирнова, В.А. Алешкин, С.С. Афанасьев, С.В. Орлов, А.В. Караулов, Б.А. Лапин, А.В. Алешкин, О.В. Рубальский, Е.Е. Рубальская, А.Д. Даудова, М.С. Афанасьев, В.В. Усков // **Астраханский медицинский журнал.** – 2016. – Т. 11, № 1. – С. 38-48.

Патенты

1. Алешкин, В.А. Способ установления неспецифического противоинфекционного действия иммуномодулирующего иммунобиологического препарата: пат. 2394559 Рос. Федерация / В.А. Алешкин, Б.А. Лапин, С.С. Афанасьев, Э.К. Джикидзе, К.В. Симавонян, О.В. Рубальский, Е.А. Воропаева, В.Ю. Давыдкин, И.Ю. Давыдкин, Л.И. Холодилова, А.В. Мелихова, Т.И. Кебу, А.Л. Байракова, М.С. Афанасьев, Т.П. Егорова, **Е.О. Рубальский**, Т.О. Голикова, Е.А. Егорова, А.А. Куракова. – № 2008102621/14; заявл. 28.01.2008; опубл. 20.07.2010; Бюл. № 20.

2. Алешкин, В.А. Основа питательной среды для селекционирования штаммов лактобацилл по признаку снижения уровня гистамина в среде культивирования: пат. 2441065 Рос. Федерация / В.А. Алешкин, С.С. Афанасьев, **Е.О. Рубальский**, А.М. Амерханова, А.В. Алешкин, А.Х. Ахминеева, Л.А. Сайгушева, А.А. Куяров, М.С. Афанасьев, Д.С. Афанасьев, М.О. Рубальский. – № 2010128307/10; заявл. 09.07.2010; опубл. 27.01.2012; Бюл. № 3.

3. Алешкин, В.А. Основа питательной среды для селекционирования штаммов лактобацилл по признаку снижения уровня гистамина в среде культивирования: пат. 2441066 Рос. Федерация / В.А. Алешкин, С.С. Афанасьев, **Е.О. Рубальский**, А.М. Амерханова, А.В. Алешкин, А.Х. Ахминеева, Л.А. Сайгушева, А.А. Куяров, М.С. Афанасьев, Д.С. Афанасьев, М.О. Рубальский. – № 2010130771/10; заявл. 22.07.2010; опубл. 27.01.2012; Бюл. № 3.

4. Лазько, М.В. Кисломолочный газированный продукт «Астраханский шубат» (варианты): пат. 2437542 Рос. Федерация / М.В. Лазько, В.А. Алешкин, С.С. Афанасьев, А.М. Амерханова, А.В. Алешкин, **Е.О. Рубальский**. – № 2010128563/10; заявл. 12.07.2010; опубл. 27.12.2011; Бюл. № 36.

5. Лазько, М.В. Кисломолочный газированный продукт «Астраханский кумыс» (варианты): пат. 2452187 Рос. Федерация / М.В. Лазько, В.А. Алешкин,

Х.М. Галимзянов, С.С. Афанасьев, А.М. Амерханова, А.Е. Лазько, А.В. Алешкин, **Е.О. Рубальский**. – № 2010135767/10; заявл. 27.08.2010; опубл. 10.06.2012; Бюл. № 16.

6. Черепанова, Ю.В. Иммунобиологическое противоаллергическое средство (варианты), штамм *Lactobacillus acidophilus* NKJC, штамм *Lactobacillus acidophilus* JCH, штамм *Lactobacillus acidophilus* КАА: пат. 2393214 Рос. Федерация / Ю.В. Черепанова, В.В. Поспелова, В.А. Алешкин, С.С. Афанасьев, В.М. Лахтин, А.М. Амерханова, А.В. Куяров, О.В. Рубальский, Л.П. Ульянова, А.В. Алешкин, Е.В. Волкова, М.В. Лахтин, А.Х. Ахминеева, **Е.О. Рубальский**, А.А. Куяров, М.С. Афанасьев, Д.С. Афанасьев. – № 2009102950/13; заявл. 29.01.2009; опубл. 27.06.2010; Бюл. № 18.

Монографии

1. Алешкин, В.А. Микробиоценозы и здоровье человека / В.А. Алешкин, С.С. Афанасьев, А.В. Караулов, Е.А. Воропаева, М.С. Афанасьев, А.В. Алешкин, Ю.В. Несвижский, В.К. Гостищев, И.А. Дятлов, И.В. Евсегнеева, В.В. Фирстова, Л.А. Леванова, Л.И. Кафарская, А.М. Амерханова, О.В. Макаров, О.Ю. Борисова, Е.П. Селькова, В.М. Лахтин, И.Г. Шемякин, Л.В. Феклисова, Е.Р. Мескина, О.В. Калюжин, О.Н. Ершова, Х.М. Галимзянов, О.В. Рубальский, Э.А. Светоч, Т.Н. Савченко, А.А. Терентьев, С.Ю. Пчелинцев, Б.А. Ефимов, А.В. Куяров, А.Г. Лютов, В.В. Решетник, А.Л. Байракова, О.Г. Гречишникова, О.Г. Жиленкова, В.А. Метельская, Ю.В. Захарова, Т.Н. Гренкова, Э.А. Есяян, Углеша Станоевич, Е.А. Егорова, Н.В. Воложанцев, А.М. Затевалов, Ю.М. Голубцова, Н.К. Фурсова, Ю.Н. Урбан, О.А. Воронина, **Е.О. Рубальский**, М.В. Лахтин, О.М. Кострова, А.Д. Воропаев, А.А. Калмыков, Е.Е. Рубальская, В.Б. Бондаренко, Д.Д. Воропаев, А.Н. Оганесян, Н.Л. Бондаренко / под ред. В.А. Алешкина, С.С. Афанасьева, А.В. Караулова – М.: Династия, 2015. – 548 с. – ISBN 978-5-98125-099-6.

2. Караулов, А.В. Новое в физиологии мукозального иммунитета / А.В. Караулов, Ю.В. Несвижский, В.А. Алешкин, М.С. Афанасьев, Е.А. Воропаева, С.С. Афанасьев, А.В. Алешкин, И.В. Евсегнеева, Н.Л. Бондаренко, О.Ю. Борисова, В.М. Лахтин, В.И. Кочеровец, О.В. Калюжин, Т.Н. Савченко, А.Л. Байракова, В.А. Метельская, О.Г. Гречишникова, Е.А. Егорова, **Е.О. Рубальский**, М.В. Лахтин, О.М. Кострова, А.Д. Воропаев, А.Н. Оганесян, Т.С. Грачева, Е.С. Толстова / под ред. А.В. Караулова, Ю.В. Несвижского, В.А. Алешкина. – М.: Медицина, 2016. – 169 с. – ISBN 978-5-7396-0358-6.

Учебное пособие

1. Зверев, В.В. Микрoэкология и гуморальный иммунитет слизистых открытых полостей человека в норме и при патологических состояниях: учебное пособие для системы послевузовского профессионального образования врачей / В.В. Зверев, Ю.В. Несвижский, Е.А. Воропаева, С.С. Афанасьев, В.А. Алешкин, А.В. Караулов, Х.М. Галимзянов, О.В. Макаров, Е.А. Богданова, О.В. Рубальский, М.С. Афанасьев, Н.С. Матвеевская, Д.С. Афанасьев, Т.Н. Савченко, В.А. Метельская, Е.Е. Рубальская, **Е.О. Рубальский**. – Астрахань – М.: Изд-во АГМА, 2011. – 80 с. – ISBN 978-5-9902543-1-2.

Другие публикации

1. Галимзянов, Х.М. Лактобациллы как перспективные ингредиенты медицинских иммунобиологических препаратов и биологически активных добавок к пище / Х.М. Галимзянов, Т.О. Голикова, С.Н. Зязин, Н.С. Мамонтова, **Е.О. Рубальский**, Е.К. Янченко // **Астраханский медицинский журнал**. – 2007. – Т. 2, № 4. – С. 77-81.

2. Алешкин, В.А. Микробиоценоз кишечника / В.А. Алешкин, А.В. Алешкин, С.С. Афанасьев, А.В. Караулов, Е.А. Воропаева, М.С. Афанасьев, Ю.В. Несвижский, **Е.О. Рубальский** // **Вопросы диетологии**. – 2015. – Т. 5, № 4. – С. 15-52.