

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

На правах рукописи

Рубальский Евгений Олегович

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

03.02.03 – микробиология

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научные руководители:

Заслуженный деятель науки РФ,
доктор медицинских наук, профессор,
Афанасьев Станислав Степанович

доктор биологических наук,
Алешкин Андрей Владимирович

Астрахань 2016

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
Актуальность проблемы	5
Степень разработанности темы исследования	6
Цель и задачи исследования	7
Научная новизна и теоретическая значимость	8
Практическая значимость работы	9
Методология и методы исследования	10
Объекты исследования	11
Материалы и методы исследования	21
Личное участие автора в получении результатов	25
Положения, выносимые на защиту	26
Апробация работы	27
Публикации	28
Объем и структура диссертации	28
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	29
1.1. Взаимосвязь физиологического пула гистамина с микрофлорой желудочно-кишечного тракта	29
1.2. Основные биологические свойства лактобацилл, реализуемые при физиологических и патологических состояниях организма	41
1.3. Макаки резусы как модель физиологического функционирования желудочно-кишечного тракта человека при взаимодействии с микрофлорой	46
1.4. Физиологические особенности иммуноглобулинового профиля Macaca mulatta	50
Глава 2. РАЗРАБОТКА КОМПОЗИЦИЙ НА ОСНОВЕ ЛАКТОБАЦИЛЛ	59
2.1. Исследование содержания гистамина в питательных средах	59

2.2. Исследование свойств моноштаммовых композиций на основе лактобацилл от используемой закваски	60
2.3. Исследование зависимости свойств композиции от соотношения штаммов лактобацилл в консорциуме	61
2.4. Исследование в процессе культивирования лактобацилл динамики показателей уровня гистамина в среде культивирования, роста лактобацилл, активной и титруемой кислотности композиций	63
2.5. Исследование влияния катионов меди (II) на свойства композиции	66
Глава 3. ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ УРОВНЯ ГИСТАМИНА В КИШЕЧНИКЕ У МЫШЕЙ	69
3.1. Гистологические исследования образцов печени	72
3.2. Гистологическое исследование тонкого кишечника	73
3.3. Гистологическое исследование толстого кишечника	74
3.4. Исследование содержания гистамина в тонком кишечнике	76
3.5. Исследование содержания гистамина в толстом кишечнике	76
Глава 4. ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ УРОВНЯ ГИСТАМИНА В КИШЕЧНИКЕ И ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ИНТАКТНЫХ МАСАСА МУЛАТТА И ПРИ КОРРЕКЦИИ ПРОБИОТИЧЕСКИМИ КОМПОЗИЦИЯМИ МЕТАБОЛИЗМА ГИСТАМИНА МИКРОБИОЦЕНОЗОВ СЛИЗИСТЫХ ОБОЛОЧЕК ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА	78
4.1. Исследование показателей уровня гистамина у интактных обезьян	78
4.1.1. Состояние здоровья обезьян	78
4.1.2. Содержание гистамина в образцах от интактных обезьян	78
4.2. Исследование показателей уровня гистамина у обезьян при коррекции пробиотическими композициями метаболизма гистамина микробиоценозов слизистых оболочек желудочно-кишечного тракта	79
4.2.1. Состояние здоровья обезьян	80

4.2.2. Содержание гистамина в фекалиях	82
4.2.3. Содержание гистамина в периферической крови	84
4.2.4. Содержание базофилов в периферической крови	89
4.2.5. Анализ динамики микрофлоры продуцирующей гистамин	90
Глава 5. ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ИММУНОГЛОБУЛИНОВОГО ЗВЕНА ГУМОРАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА У ИНТАКТНЫХ МАСАСА МУЛАТТА И ПРИ КОРРЕКЦИИ ПРОБИОТИЧЕСКИМИ КОМПОЗИЦИЯМИ МЕТАБОЛИЗМА ГИСТАМИНА МИКРОБИОЦЕНОЗОВ СЛИЗИСТЫХ ОБОЛОЧЕК ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА	94
5.1. Исследование уровней иммуноглобулинов у интактных животных	94
5.2. Исследование уровней иммуноглобулинов при коррекции пробио- тическими композициями метаболизма гистамина микробиоцено- зов слизистых оболочек желудочно-кишечного тракта	95
5.2.1. Уровни сывороточных иммуноглобулинов по данным РИД	95
5.2.2. Уровни сывороточных иммуноглобулинов по данным ИФА	98
5.3. Филогенетический анализ аминокислотных последовательностей Fc фрагментов IgG1, IgA и IgM человека и макак резусов	104
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	107
ВЫВОДЫ	113
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	116
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	118
СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ	144

ВВЕДЕНИЕ

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; Гушин 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 гемопоез, 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 микоорга-

низмов 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 *Musca mulatta* 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; Sellsell 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; Hemarajata 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, снижа-

ющие 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 *Macaca 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 *Macaca mulatta* популяции ФГБНУ «НИИ МП» имеют важное значение при проведении доклинических исследований лекарственных средств, пробиотических композиций, разработки новых кормов и кормовых добавок для *Macaca 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 *Macaca 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 пищевой 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

Методология диссертационной работы спланирована в соответствии со структурой и задачами исследования. Предметом исследования стало изучение особенностей пула гистамина в кишечнике, в сыворотке крови и в содержимом кишечника, а также уровня антител в сыворотке крови при исследовании влияния

пробиотических композиций. Объектами исследования выступали штаммы *Lactobacillus spp.*, а также экспериментальные животные: мыши инбредной линии BALB/c и макаки резусы. Научная литература, посвященная исследованиям физиологических показателей гуморального иммунитета и пула гистамина, была проанализирована формально-логическими методами. На первом этапе диссертационного исследования разработали пробиотические композиции на основе штаммов *L. helveticus NKJC*, *L. helveticus JCH*, *L. 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 *Macaca mulatta*, а также подобрали 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 *Macaca mulatta*. В диссертационной работе использовали микробиологические, биотехнологические, биологические, иммунологические, биохимические и гистологические экспериментальные методы исследования, а также методы биоинформатики и статистической обработки результатов.

Объекты исследования

Штаммы лактобацилл

Штамм *Lactobacillus helveticus NKJC* (предыдущие наименования: *L. acidophilus NKJC*, *L. acidophilus NK-1*) получен из содержимого кишечника здорового взрослого человека, депонирован в Государственной коллекции микроорганизмов нормальной микрофлоры ФБУН МНИИЭМ имени Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора под № 220 и характеризуется следующими свойствами.

Морфологические свойства. Прямые, неподвижные, бесспорные, грамположительные палочки с закругленными краями, размером 5-10 мкм, располагающиеся в мазке единично или в виде цепочек по две-четыре клетки.

Культуральные свойства. Микроаэрофил, оптимальные условия для культивирования – анаэробные. Температура культивирования – 38-40°C. На полужидких средах вырастает в течение 20-22 часов, на агаризованных – 48 часов.

Сквашивает молоко с образованием плотного сметанообразного сгустка.

При культивировании на полужидких средах происходит равномерное помутнение среды по всему ее объему. Единичные колонии при выращивании в течение 18-24 часов имеют вид шариков, диаметром 2-3 мм или комет длиной 0,7 мм. При выращивании в течение 18-24 часов число КОЕ/мл лактобацилл составляет 10^8 - 10^9 .

На агаре с гидролизованным молоком образуют темные локонообразные колонии на поверхности и в виде «паучков» в глубине. При выращивании на поверхности агаризованных сред образуют полупрозрачные морщинистые мелкие колонии с неровными краями. Диаметр колонии 1-2 мм. Время культивирования 48 часов.

Биохимическая активность. Штамм гомоферментативен. Каталазу не продуцирует, нитрат не редуцирует. Желатину не разжижает. Штамм ферментирует без образования газа глюкозу, лактозу, галактозу, маннозу, декстрозу, фруктозу, трегалозу, N-ацетилглюкозамин, ликсозу, маннит, замедленно ферментирует раффинозу, арабинозу, ксилозу. Штамм не повышает содержание гистамина в среде МРС. Продуцирует лектины, связывающие в гликоконъюгатах остатки N-ацетил-D-галактозамина с α -связью (GalNAc- α -), D-маннозы с α -связью (Man- α -) и D-маннозы-6-фосфата с α -связью (Man-6P- α -). Продуцирует биосурфактанты, в том числе липидосодержащие и пенообразующие вещества.

Антагонистическая активность. Штамм антагонистически активен в отношении тест-культур (*Shigella flexneri* – 2 штамма, *Shigella sonnei*, энтеропатоген-

ной *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*): зона угнетения роста тест-штаммов должна быть не менее 20 мм.

Устойчивость к антибиотикам. Штамм высоко устойчив к полимиксину, пefлоксацину, налидиксовой кислоте, устойчив к рифампицину, гентамицину, амикацину, промежуточно устойчив к клиндамицину, неомицину, канамицину, линкомицину, ципрофлоксацину и ломефлоксацину.

Содержание гуанина и цитозина в ДНК составляет 36 мол. %.

Генотипирование. По особенностям структуры гена 16S рРНК, полученным с помощью секвенирования ДНК лактобацилл по Сенгеру, определена принадлежность штамма к виду *L. helveticus* (Ботина С.Г. с соавт., 2010).

Штамм *Lactobacillus helveticus* JCH (предыдущие наименования: *L. acidophilus* JCH, *L. acidophilus 100au*) получен из содержимого кишечника здорового взрослого человека, депонирован в Государственной коллекции микроорганизмов нормальной микрофлоры ФБУН МНИИЭМ имени Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора под № 221 и характеризуется следующими свойствами.

Морфологические свойства. Прямые, крупные, длинные, неподвижные, бесспорные, грамположительные палочки, размером 5-10 мкм, располагающиеся поодиночке или в виде цепочек по две-четыре клетки.

Культуральные свойства. Микроаэрофил, оптимальные условия для культивирования – анаэробные. Температура культивирования – 38-40°C. На полужидких средах вырастает в течение 20-24 часов, на агаризованных – 48 часов. Сквашивает молоко с образованием плотного ровного сгустка.

На полужидких средах растут равномерно по всему объему, без зоны аэробноза. Единичные колонии имеют форму шариков диаметром 1-2 мм, или кометелочек длиной 0,7-1,2 см. При выращивании на полужидких средах и в течение 18-24 часов число КОЕ/мл лактобацилл достигает 10^8 - 10^9 .

На поверхности агаризованной среды МРС в анаэробных условиях через 24 часа роста образуются полупрозрачные шероховатые колонии с неровными краями. Диаметр колонии 2-4 мм. На агаре с гидролизированным молоком образуют

темные локонообразные колонии на поверхности и в виде «паучков» в глубине. Время культивирования 24 - 48 часов.

Биохимическая активность. Штамм гомоферментативен. Каталазу не продуцирует. Желатину не разжижает. Ферментирует без образования газа глюкозу, галактозу, фруктозу, маннозу, N- ацетилглюкозамин, лактозу, трегалозу, замедленно ферментирует арабинозу, ксилозу. Штамм не повышает содержание гистамина в среде МРС. Продуцирует лектины (преимущественно кислые лектины), связывающие в гликоконъюгатах остатки D-маннозы с α -связью (Man- α -), D-маннозы-6-фосфата с α -связью (Man-6P- α -) и N-ацетил-D-галактозамина с α -связью (GalNAc- α -). Продуцирует биосурфактанты, в том числе липидосодержащие и пенообразующие вещества.

Антагонистическая активность. Штамм антагонистически активен в отношении тест-культур (*Shigella flexneri* – 2 штамма, *Shigella sonnei*, энтеропатогенной *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*): зона угнетения роста тест-штаммов должна быть не менее 20 мм.

Устойчивость к антибиотикам. Штамм высокоустойчив к канамицину, устойчив к амикацину, промежуточно устойчив к неомицину, линкомицину, клиндамицину, стрептомицину.

Содержание гуанина и цитозина в ДНК составляет 36 мол.%.

Генотипирование. По особенностям структуры гена 16S рРНК, полученным с помощью секвенирования ДНК лактобацилл по Сенгеру, определена принадлежность штамма к виду *L. helveticus* (Ботина С.Г. с соавт., 2010).

Штамм *Lactobacillus casei* КАА (предыдущие наименования: *L. acidophilus* КАА, *L. acidophilus* К₃Ш₂₄) получен из содержимого кишечника здорового взрослого человека, депонирован в Государственной коллекции микроорганизмов нормальной микрофлоры ФБУН МНИИЭМ имени Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора под № 223 и характеризуется следующими свойствами.

Морфологические свойства. Прямые, крупные, длинные, неподвижные, бесспорные, грамположительные палочки, размером 3-14×1,0-1,5 мкм, располагающиеся поодиночке или в виде цепочек по две-четыре клетки.

Культуральные свойства. Микроаэрофил, оптимальные условия для культивирования – анаэробные. Температура культивирования – 38-40°C. На полужидких средах вырастает в течение 20-24 часов, на агаризованных – 48 часов.

Скваживает молоко с образованием плотного ровного сгустка. На полужидких средах растут равномерно по всему объему, без зоны аэриоза. Единичные колонии имеют форму шариков диаметром 1-2 мм, или комет-елочек длиной 0,7-1,2 см. При выращивании в течение 18-24 часов число КОЕ/мл составляет 10⁸.

На поверхности агаризованной среды МРС в анаэробных условиях через 24 часа роста образуются плотные однородные белые, выпуклые, круглые колонии с ровными краями. Диаметр колонии 2-4 мм. На агаре с гидролизированным молоком образуют темные локонообразные колонии на поверхности и в виде «паучков» в глубине. Время культивирования 24- 48 часов.

Биохимическая активность. Штамм гомоферментативен. Каталазу не продуцирует. Желатину не разжижает. Ферментирует без образования газа глюкозу, арабинозу, рибозу, галактозу, фруктозу, маннозу, сорбозу, манит, сорбитол, эскулин, целлобиозу, сахарозу, трегалозу, мелецитозу, туранозу, тагатозу, L-арабит, замедленно ферментирует N-ацетилглюкозамин, амигдалин, арбутин, мальтозу, лактозу, мелибиозу, инулин, гентиобиозу, ликсозу, калия глюконат. Штамм повышает содержание гистамина в среде МРС не более чем в 1,5 раза. Продуцирует лектины (преимущественно кислые лектины), связывающие в гликоконъюгатах остатки D-маннозы с α -связью (Man- α -), D-маннозы-6-фосфата с α -связью (Man-6P- α -) и N-ацетил-D-галактозамина с α -связью (GalNAc- α -). Продуцирует биофлокулянты, биосурфактанты, в том числе пенообразующие вещества.

Антагонистическая активность. Штамм антагонистически активен в отношении тест-культур (*Shigella flexneri* – 2 штамма, *Shigella sonnei*, энтеропатоген-

ной *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*): зона угнетения роста тест-штаммов должна быть не менее 20 мм.

Устойчивость к антибиотикам. Штамм устойчив к гентамицину, амикацину, промежуточно устойчив к бензилпенициллину, стрептомицину, неомицину, канамицину, тетрациклину.

Содержание гуанина и цитозина в ДНК составляет 36 мол. %.

Генотипирование. По особенностям структуры гена 16S рРНК, полученным с помощью секвенирования ДНК лактобацилл по Сенгеру, определена принадлежность штамма к виду *L. casei* (Ботина С.Г. с соавт., 2010).

Экспериментальные животные

Мыши инбредной линии BALB/c

Доклинические испытания на здоровых самцах мышей инбредной линии BALB/c проводили в лаборатории и виварии на базе кафедры биологии ГБОУ ВПО Астраханский ГМУ Минздрава России при нормальных условиях: температура окружающей среды – (20 ± 2) °С; относительная влажность воздуха (30-80) %; атмосферное давление (740-765) мм рт. ст.; в дневное время при естественном освещении.

Содержание экспериментальных животных соответствовало СП 1045-73 и «Правилам проведения работ и использованием экспериментальных животных», утвержденным приказом МЗ СССР № 755 от 12.08.1977.

Животные опытных и контрольных групп подбирались методом свободной выборки и были репрезентативны по возрасту и весу. После двухнедельного карантина для эксперимента отбирали клинически здоровых мышей с хорошей упитанностью, активных, подвижных, с гладкой ровной шерстью, нормальной окраской слизистых оболочек и оформленным стулом. Все животные содержались в одинаковых условиях, размещались в стандартных клетках по 5 особей, получали брикетированные корма и воду. За 24 часа до испытаний и во время их проведения животные находились в помещении с постоянной температурой. За 6 часов до

взвешивания и отбора животных для проведения испытаний у них отбирали корм и воду.

Каждую композицию испытывали на группе из 10 мышей. В испытаниях было задействовано 50 мышей (40 опытных животных и 10 контрольных). В качестве контрольной группы использовались здоровые животные, не получавшие композиции и содержащиеся в тех же условиях, что и опытные мыши.

В связи с запланированным исследованием уровня гистамина в тонком и толстом кишечнике экспериментальных животных образцы композиций вводились опытным животным с помощью насадки на шприц однократно перорально в максимально возможном 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. Одновременно с этим у умерщвленных животных отбирали образцы печени, тонкого и толстого кишечника для гистологических исследований и получали гомогенаты тонкого и толстого кишечника для определения содержания гистамина.

В течение 5 дней проводили наблюдение за состоянием остальных мышей, а также за изменением массы их тела.

Объем исследований.

Всего было исследовано 90 окрашенных микропрепаратов, 25 гомогенатов тонкого кишечника.

Макаки резусы

Доклинические испытания на приматах проводились в ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинской приматологии» (НИИ МП) при нормальных условиях: температура окружающей среды – (20 ± 2) °С; относительная влажность воздуха (30-80) %; атмосферное давление (740-765) мм рт. ст.; в дневное время при естественном освещении.

Содержание экспериментальных животных соответствовало СП 1045-73 и «Правилам проведения работ и использованием экспериментальных животных», утвержденным приказом МЗ СССР № 755 от 12.08.1977.

В эксперименте использовались макаки резусы (*Macaca mulatta*), самцы в возрасте от 5,1 до 8,4 лет, весом от 7200 г до 10500 г. Были отобраны клинически здоровые, хорошо обволощенные (с гладкой, блестящей шерстью), с розовыми видимыми слизистыми оболочками, активные животные, которые хорошо принимали предлагаемую пищу. При их физикальном обследовании отклонений от нормы выявлено не было.

За три недели перед началом исследований животные для адаптации к условиям эксперимента были высажены в специальный изолятор и размещены в индивидуальных приматологических клетках, где они имели свободный доступ к питьевой воде.

В этот период осуществлялось зооветеринарное наблюдение за обезьянами, а также были проведены предварительные бактериологические и паразитологические исследования фекалий животных.

В фекалиях были обнаружены преимущественно представители нормальной микрофлоры кишечника.

При паразитологическом исследовании у всех обезьян было выявлено носительство условно-патогенных, потенциально диареогенных простейших – *Balantidium coli* (Лапин Б.А. с соавт., 1987; Егорова Т.П., Кебу Т.И., 2007) – в различной степени интенсивности, в связи с чем была проведена санация животных.

Гематологические показатели (число эритроцитов, лейкоцитов, количество гемоглобина и СОЭ) были в пределах нормы. Биохимические показатели сывороток крови макак резусов, также были в пределах нормы.

Во время подготовки и проведения исследований экспериментальные животные 2 раза в день получали гранулированный корм – из расчета 200 г гранул на 1 голову в сутки. Гранулы содержали следующие ингредиенты (на 1000 кг гранул): соевый жмых – 200 кг, сухое молоко – 150 кг, яичный порошок – 10 кг, ку-

куруза – 204 кг, пшеница – 300 кг, сахар – 60 кг, витамин С – 2 кг, фосфат кальция – 30 кг, премикс – 36 кг, растительное масло – 3 кг, соль – 5 кг. В составе гранул использовался премикс для обезьян, рецепт 1561 (ООО «Агровит»), имеющий следующие показатели:

содержание витаминов в 1 кг: А – 400000 МЕ, D₃ – 32000 МЕ, Е – 2 г, К₃ – 0,08 г, В₁ – 0,49 г, В₂ – 0,32 г, В₃ – 1,59 г, В₄ – 26 г, В₅ – 0,98 г, В₆ – 0,2 г, В_с – 0,1 г, С – 34,93 г, В₁₂ – 0,64 мг, Н – 2,6 мг;

содержание микроэлементов в 1 кг: железо – 2,998 г, марганец – 0,96 г, медь – 0,3 г, цинк – 1,31 г, йод – 22,59 г;

содержание макроэлементов в 1 кг: магний – 40 г, кальций – 208 г, фосфор – 117 г, натрий – 40,15 г;

антиоксидант – 0,2 г/кг;

наполнитель – до 1 кг.

Кроме гранул животные получали следующие корма, утвержденные НИИ МП для подопытных обезьян (на 1 голову в сутки): хлеб – 200 г, крупа овсяная – 50 г, рис – 50 г, молоко – 300 г, яйцо – 60 г, фрукты и овощи – 400 г, сахар-песок – 30 г, кисель-концентрат – 50 г, черника сухая – 20 г, масло подсолнечное – 10 г.

В исследовании было задействовано 20 обезьян в качестве интактных животных (контрольная группа) и 26 обезьян для исследования физиологических показателей при коррекции пробиотическими композициями метаболизма гистамина микробиоценозов слизистых оболочек желудочно-кишечного тракта. Последние особи были разделены на 4 опытные группы:

1) 6 животных, получавших композиции на основе консорциума штаммов лактобацилл и ГМС – опытная группа № 1;

2) 6 животных, получавших композиции на основе консорциума штаммов лактобацилл и ЛКМС – опытная группа № 2;

3) 7 животных, получавших композиции на основе консорциума штаммов лактобацилл и ГМС с добавлением 300 мкмоль/л Cu²⁺ – опытная группа № 3;

4) 7 животных, получавших композиции на основе консорциума штаммов лактобацилл и ЛКМС с добавлением 300 мкмоль/л Cu^{2+} – опытная группа № 4.

Все животные подбирались методом свободной выборки и были репрезентативны по возрасту и весу.

У животных контрольной группы проводился забор венозной крови и образцов фекалий для определения физиологической нормы содержания иммуноглобулинов в сыворотке крови и пула гистамина в популяции *Mascaca mulatta* НИИ МП.

Для коррекции метаболизма гистамина микробиоценозов слизистых оболочек желудочно-кишечного тракта животным опытных групп давали выпить образцы разработанных композиций на основе ГМС или ЛКМС после предварительной фиксации (рисунок 1). Данные образцы принимались обезьянами в оптимальной терапевтической дозе – по 10 мл за один час до еды 1 раз в день в течение 7 суток.



Рисунок 1 – Прием обезьяной образца пробиотической композиции.

Для оценки влияния композиций на основе консорциума штаммов лактобацилл за обезьянами проводилось ежедневное клиническое наблюдение в течение

14 суток. Кроме того, перед дачей композиций, на 7 и 14 сутки после начала дачи композиций производился забор венозной крови для общего анализа, биохимического исследования, анализа концентрации гистамина и иммуноглобулинов, а также образцов фекалий для исследования микробиологических показателей и содержания гистамина.

Объем исследований.

Всего было исследовано 196 образцов фекалий, 392 образца крови обезьян.

Материалы и методы исследования

Питательные среды

Гидролизатно-молочная среда

В качестве известной среды, широко используемой при приготовлении жидких пробиотических композиций на основе лактобацилл, была исследована гидролизатно-молочная среда (ГМС) (Гончарова Г.И. с соавт., 1987).

Лимоннокислотная молочная сыворотка

Нами были разработаны и исследованы новые питательные среды с пониженной концентрацией гистамина, не превышающей физиологическую концентрацию этого биогенного амина в цельной крови: молочная солянокислотная казеиновая сыворотка, молочная молочнокислотная казеиновая сыворотка, молочная лимоннокислотная казеиновая сыворотка, полученные из сырья – натурального или восстановленного коровьего молока.

Для получения основы питательной среды, представляющей собой молочную лимоннокислотную казеиновую сыворотку (ЛКМС), обезжиренное натуральное или восстановленное молоко доводилось первоначально 20% раствором лимонной кислоты до рН 4,5-4,8 при температуре 18-38°C, выдерживалось 50-120 минут, периодически перемешивая и устанавливая рН на уровне 4,5-4,8, фильтровали, фильтрат нагревался до 39-41°C и сепарированием отделялась молочная сыворотка. Полученная молочная лимоннокислотная казеиновая сыворотка раскислялась 20% раствором гидроксида натрия до рН 6,8-7,7, при этом после стерилизации рН основы питательной среды составляла 6,5-7,4. Раскисленную молочную

лимоннокислотную казеиновую сыворотку стерилизовали автоклавированием и использовали для получения пробиотических композиций.

Исследование пробиотических композиций

Определение содержания лактобацилл проводилось по методу, изложенному в ГОСТ 10444.11-89.

Санитарно-микробиологические исследования образцов биомассы лактобацилл проводились с учетом ГОСТ 10444.12-88, ГОСТ 30347-97, ГОСТ Р 52814-2007, ГОСТ Р 52816-2007 и МУК 2.3.2.721-98.

При санитарно-микробиологическом исследовании всех образцов продукции выявлялась только технологически значимая микрофлора (лактобациллы) и не высевались индикаторные, условно патогенные и патогенные микроорганизмы.

Определение активной кислотности образцов биомассы лактобацилл проводилось по ГОСТ 30648.5-99 с использованием рН-метра Piccolo plus (Hanna Instruments, Германия).

Определение титруемой кислотности в градусах Тернера (°Т) образцов биомассы лактобацилл проводилось по ГОСТ 30648.4-99.

Количественное определение гистамина

Исследование концентрации гистамина в пробиотических композициях проводилось методом ИФА при помощи набора реагентов Histamine Research ELISA BA E-5800 (Labor Diagnostika Nord GmbH, Германия).

Исследование экспериментальных животных

Количественное определение гистамина в гомогенатах кишечника мышей

Количественное определение гистамина в образцах по колориметрическому определению продуктов, образующихся при реакции с диазотированным п-нитроанилином, проводили по упрощенному нами методу, адаптированному для определения гистамина при микробиологических исследованиях, с учетом данных Руководства Р 4.1.1672-03, разработки специалистов ГОУ ВПО Сургутского государственного университета ХМАО – Югры (Харева А.Г. с соавт., 2008) и предложенного нами способа.

Диазотированный п-нитроанилин готовили перед употреблением. Для этого взвешивали 20 мг п-нитроанилина, добавляли 20 мл 0,1 Н раствора соляной кислоты (получают недиазотированный 0,1% раствор п-нитроанилина в 0,1 Н соляной кислоте). Приготовленный раствор охлаждали на льду. К 10 мл охлажденного раствора п-нитроанилина добавляли 1 мл 4% раствора нитрита натрия.

Для приготовления стандартного раствора гистамина (200 мкмоль/л) взвешивали 3,68 мг гистамина дигидрохлорида и добавляли 100 мл 10% трихлоруксусной кислоты.

В образцы добавляли раствор 10% трихлоруксусной кислоты в соотношении 1:9, и выдерживали в течение суток при +4°C. Обработанный трихлоруксусной кислотой образец фильтровали через бумажный фильтр и центрифугировали при 1500 об/мин в течение 10 минут. Образцы гомогенатов кишечника мышей дополнительно разводили в 10 раз раствором 10% трихлоруксусной кислоты. В первую пробирку (опытная проба) отмеряли 2 мл очищенного от нерастворимых примесей экстракта образца. Во вторую, третью, четвертую и пятую пробирки (стандартные пробы) отмеряли, соответственно, 0,2 мл, 0,3 мл, 0,4 мл и 0,5 мл стандартного раствора гистамина и доводили объем стандартных проб до 2 мл 10% трихлоруксусной кислотой. В шестую пробирку (контрольная проба) вносили 2 мл 10% трихлоруксусной кислоты и 3 мл дистиллированной воды. В первую и вторую пробирки доливали по 3 мл дистиллированной воды. Затем во все пробирки прибавляли по 1 мл раствора 4% нитрита натрия, тщательно встряхивали, ставили пробирки на 15 минут на водяную баню при 60°C, а затем охлаждали в воде со льдом до комнатной температуры. К охлажденным пробам добавляли по 1,0 мл диазотированного п-нитроанилина и тщательно перемешивали пробы. После этого к пробам прибавляли раствор 20% карбоната натрия, доводя рН раствора до 10,0, используя универсальную индикаторную бумагу. Содержимое пробирок перемешивали и охлаждали под струей водопроводной воды. Измеряли экстинкцию опытной и стандартных проб против контроля на реактивы при длине световой волны 490 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

По показателям экстинкции стандартных проб строили калибровочную кривую и определяли концентрацию гистамина в образцах.

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

Количественное определение гистамина в крови и фекалиях макак резусов

Исследование концентрации гистамина в крови и фекалиях обезьян проводили методом ИФА при помощи наборов реагентов фирмы Labor Diagnostika Nord GmbH (Германия) Histamine ELISA BA E-1000 и Histamine Stool ELISA BA E-1200 соответственно.

Бактериологическое исследование фекалий

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).

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

Исследование уровней 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 специализированных для обезьян Старого Света 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.

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

Статистическая обработка полученных данных проведена с использованием методов вариационной и описательной статистики. Для оценки достоверности различий между показателями использовали t-критерий Стьюдента. Для иммунологических, биохимических, микробиологических показателей производили расчет среднего арифметического (M) и ошибки репрезентативности (m). Таким образом данные представлены в таблицах в виде $M \pm m$. Достоверность отличий вычисленных средних арифметических определялась с использованием трех уровней значимости, при которых вероятность ошибочной оценки:

- менее 5% ($P < 0,05$);
- менее 1% ($P < 0,01$);
- менее 0,1% ($P < 0,001$) (Лакин Г.Ф., 1990).

Достоверность полученных данных также определяли по критерию Фишера (Плохинский Н.А., 1970).

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 (Плохинский Н.А., 1970).

Математическая и статистическая обработка результатов проводилась в программной среде Microsoft Excel.

Личное участие автора в получении результатов. Автор диссертации лично участвовал в постановке задач, разработке идеи научных исследований. Исследованы динамика показателей уровня гистамина в среде культивирования, титра лактобацилл, активной и титруемой кислотности пробиотических композиций. Соискателем самостоятельно проведена постановка экспериментов на 50 мышах инбредной линии BALB/c, 46 особях *Mus musculus* с использованием 4

вариантов пробиотических композиций. По упрощенному автором колориметрическому методу проведено количественное определение гистамина в образцах кишечника мышей. Изготовлены и окрашены гистологические препараты печени, толстого и тонкого кишечника мышей. Проведено исследование концентрации гистамина в периферической крови и фекалиях *Macaca mulatta*. Выполнено исследование IgG, IgA, IgM в сыворотке крови макак резусов с использованием метода радиальной иммунодиффузии в геле. С использованием иммуноферментного анализа выполнено сравнительное исследование уровней IgG, IgA, IgM и исследование уровней IgG1, IgE в сыворотке периферической крови *Macaca mulatta*. Проведено выравнивание аминокислотных последовательностей Fc фрагментов IgG1, IgA, IgM человека и макак резусов с построением филогенетических деревьев. Проведена статистическая обработка полученных данных проведена с использованием методов вариационной и описательной статистики в программной среде Microsoft Excel.

Микробиологический посев фекалий обезьян осуществляли в сотрудничестве с заведующей лабораторией инфекционной патологии к.б.н. Аршбой И.М. (ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинской приматологии»). Исследование содержания базофилов в периферической крови макак резусов осуществляли в сотрудничестве с научным сотрудником лаборатории иммунологии и биологии клетки Деменковой Н.П. (ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинской приматологии»).

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 корректирующее

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 *Macaca 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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Взаимосвязь физиологического пула гистамина с микрофлорой желудочно-кишечного тракта

Роль гистамина в регуляции физиологических функций многообразна и впервые наиболее подробно описана И.Л. Вайсфельд и Г.Н. Кассилем (1981). В течение последних 20 лет многочисленные исследования были посвящены его участию в жизнедеятельности здорового и больного организма (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).

Гистамин – 4-(2-аминоэтил)-имидазол – медиатор различных физиологических функций: нейромедиатор, один из центральных эндогенных медиаторов иммунитета, основной медиатор аллергии и воспаления (Гуцин И.С., 2010; Зарудий Ф.С., 1995; Ключева Л.А., 2008).

На схеме (рисунок 2), составленной и адаптированной L. Maintz с соавторами (2007), обобщены гистамин-опосредованные симптомы.

Результаты исследований распределения, биосинтеза и метаболизма гистамина в различных тканях и органах используются при обследовании больных с различными заболеваниями (Ключева Л.А., 2008; Zachariae R. et al., 2001).

В отечественных работах описаны результаты этих исследований при изучении микробной экологии и состояния слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта у больных аллергическими заболеваниями (Грачева Н.М. с соавт., 2004; Матвеева Н.И., 2005), при оценке микрoэкологических нарушений и их коррекции при хроническом рецидивирующем афтозном стоматите (Ключева Л.А., 2008), в исследованиях нейромедиаторных аминов, их предшественников и продуктов окисления в культуре *Escherichia coli* (Шишов В.А. с соавт., 2009), при оценке роли факторов патогенности золотистых стафилококков в развитии атопического дерматита (Тюрин Ю.А., Долбин Д.А., 2008).

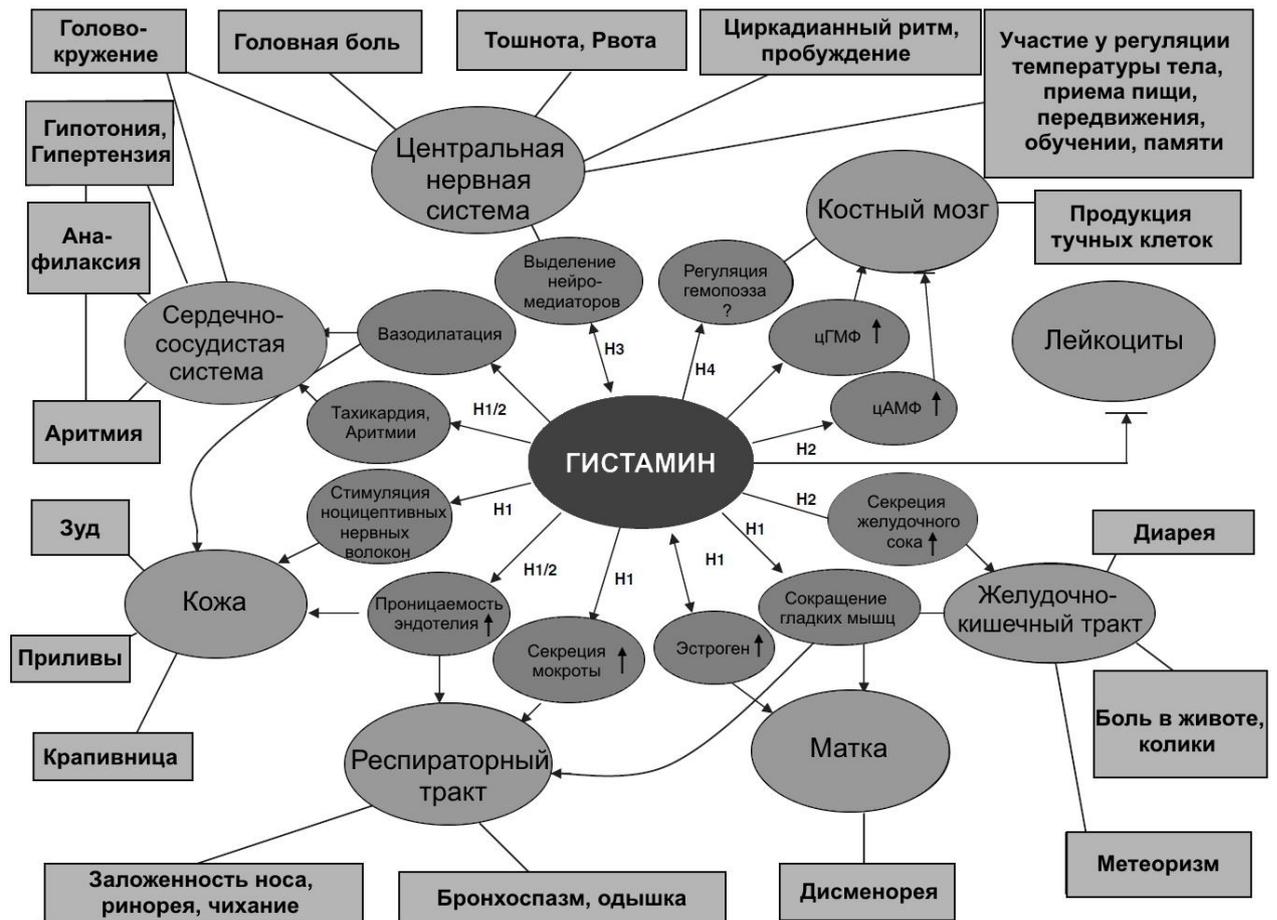


Рисунок 2 – Гистамин-опосредованные симптомы (Maintz L., Novak N., 2007)

В работах зарубежных авторов представлены: дифференциальная характеристика биогенных аминов бактериальной природы, участвующих в пищевых отравлениях (Fernández-No I.C. et al., 2010; Kim S.H., 2001), значение гистамина в регуляции иммунокомпетентных клеток и антителообразовании (Jutel M. et al., 2001), содержание гистамина в ротовой жидкости при парадонтозе у лиц с вредными привычками (Bertl K. et al., 2012).

В настоящее время очевидно, что аллергические заболевания развиваются только в результате срыва иммунорегулирующих механизмов и, прежде всего, нарушения функции иммунорегулирующих клеток (Хаитов Р.М., Ильина Н.И., 2005). В соответствии с этим рассматривают физиологические свойства гистами-

на и его участие в патологических процессах. Гистамин активирует супрессорные функции CD8 клеток через H₂-рецепторы; ингибирует цитотоксическую и хелперную активность Т-лимфоцитов; подавляет ответ на митогены, синтез антител, продукцию фактора угнетающего миграцию макрофагов (Гущин И.С., 2010; Зарудий Ф.С., 1995; Куяров А.В. с соавт., 2008; Хаитов Р.М., Ильина Н.И., 2005). Эти эффекты гистамина играют положительную роль в обратном развитии гиперчувствительности немедленного типа, однако, при нарушении механизмов инактивации и деградации гистамина эти же свойства его могут вызывать срыв иммунорегуляторных механизмов (Гущин И.С., 2010; Хаитов Р.М., Ильина Н.И., 2005).

Гистамин оказывает двойное воздействие на гены эпидермального барьера: с одной стороны, он подавляет дифференцировку кератиноцитов и дисрегулирует гены клеточного липкости, а с другой стороны, он индуцирует гены, способствующие функциям рогового слоя, а именно: обеспечивающие его увлажнение и подавляющие шелушение. В случае повреждения рогового слоя гистамин может увеличить транскутанную сенсibilизацию (Gutowska-Owsiak D. et al., 2014).

В патогенезе язвенной болезни существенную роль может играть высвобождение больших количеств гистамина при сенсibilизации домашней пылью, плесневыми грибами, пищевыми аллергенами (Ревякина В.А. с соавт., 2009). Результаты обследования больных язвенной болезнью показывают, что у 64,0% из них имеются atopические аллергические заболевания (Клюева Л.А., 2008; Ревякина В.А. с соавт., 2009).

Гистамин содержится в большинстве органов и тканей. Он может быть биорегулятором своего собственного синтеза у человека (Зарудий Ф.С., 1995; Клюева Л.А., 2008; Nomura H. et al., 2001).

У здорового человека в тканях, непосредственно соприкасающихся с внешней средой, выявлена наиболее высокая концентрация гистамина. В эпидермисе содержится этого медиатора больше, чем в других слоях кожи. Лишь костная и хрящевая ткани не содержат гистамина (Зарудий Ф.С., 1995; Клюева Л.А., 2008; Zhao Z.Z. et al., 2001).

В значительном количестве гистамин может синтезироваться в желудочно-кишечном тракте. При этом разрушается он довольно медленно. Однако имеются различные защитные механизмы от излишнего образования гистамина в желудочно-кишечном тракте и проникновения его в организм (Горкин В.З., 1993).

В желудке отмечается значительный уровень гистамина (Ревякина В.А. с соавт., 2009).

В эксперименте на изолированной слизистой оболочке желудка макак резусов гистамин вызывал как выраженную секрецию желудочного сока, так хлорид-ионов (Trout Н.Н. et al., 1985; Wang M.D., 1985).

При этом следует особо отметить, что не смотря на важное сходство между человеком и макаками резусами, заключающееся в продукции гистамина в качестве основного раннего медиатора гиперчувствительности I типа, содержание гистамина в биологических жидкостях (преимущественно в крови) макак резусов исследовалось *in vivo* только при использовании этих животных в качестве моделей аллергических, атопических заболеваний, например, аллергической астмы и атопического дерматита (Dvorak A.M. et al., 1983; Ovadia S. et al., 2005; Schelegle E.S. et al., 2001)

Подробно исследованы основные источники образования гистамина в тканях и органах: поступление с пищей, внутриклеточное декарбоксилирование гистидина с образованием «эндогенного» гистамина и декарбоксилирование гистидина из белков бактериями биотопов макроорганизма с образованием «экзогенного» гистамина (Вайсфельд И.Л., Кассиль Г.Н., 1981; Воропаева Е.А., 2002).

Более 12 производных гистамина идентифицировано в организме человека. Основным источником гистамина в организме является L-гистидин, которая декарбоксилируется тканевыми и микробными ферментами: гистидин-декарбоксилазой и L-ароматической аминокислотной декарбоксилазой (Воропаева Е.А., 2002; Зарудий Ф.С., 1995; Ключева Л.А., 2008; Ryffel В. et al., 2005; Zaman M.Z. et al., 2011).

Гистамин находится преимущественно в связанном неактивном состоянии в физиологических условиях. Основными депо связанного гистамина являются мастоциты тканей (кожи, кишечника, печени, бронхов), базофилы крови. К тканевым депо связанного гистамина относятся слизистая желудка, двенадцатиперстной кишки, где находится до 80% связанного медиатора (специфическое тканевое депо), и тучные клетки – 20% (неспецифическое тканевое депо) (Зарудий Ф.С., 1995; Ключева Л.А., 2008).

Свободный гистамин может подвергаться гидролитическому дезаминированию ферментом диаминооксидазой (гистаминазой), который находится в тканях и крови, а также инактивироваться тканевой гистамин-метилтрансферазой (Горкин В.З., 1993; Ключева Л.А., 2008).

Аналогично трем источникам образования гистамина в тканях и органах, описанным И.Л. Вайсфельд и Г.Н. Кассилем (1981), выделено три основных процесса, которые могут способствовать появлению свободного гистамина: высвобождение биогенного амина из тканевого депо за счет иммунных и неиммунных механизмов (Зарудий Ф.С., 1995; Козлов Л.В., 2002); поступление гистамина с продуктами питания (Зарудий Ф.С., 1995; Куяров А.В. с соавт., 2013); участие микроорганизмов в образовании гистамина в организме хозяина (Зарудий Ф.С., 1995; Matsui K. et al., 2010; Nakao S. et al., 2011).

Выделение свободного гистамина из депо индуцируют гемофильные бактерии, а также другие микроорганизмы, например, *E. coli* с гемолитической активностью и *C. albicans*. Важную роль при этом играют бактериальные адгезины, которые обеспечивают контакт с клетками-мишенями, и гемолизины, вызывающие функциональную и структурную дезорганизацию плазматических мембран (Гущин И.С., 2010; Зарудий Ф.С., 1995; Ключева Л.А., 2008; Gospos A. et al., 2001; Hirasawa N., Ohuchi K., 2001; Sherman M.A., 2007).

Органеллы бактериальных клеток также способны вызывать высвобождение гистамина из базофилов и тучных клеток. Наиболее активны в этом плане пептидогликаны и, в меньшей степени, тейхоевые кислоты. Высвободить гиста-

мин из депо могут также *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* (Зарудий Ф.С., 1995; Ключева Л.А., 2008; Komprda T. et al., 2010). Эндотоксины грамотрицательных бактерий могут увеличивать выход гистамина из клеточного депо (Воропаева Е.А., 2002; Ключева Л.А., 2008; Романенко Э.Е. с соавт., 2003).

Выход свободного гистамина из эукариотических клеток под действием микробного фактора возможен при удалении IgE и IgG с поверхности базофилов, что обуславливает возможность неиммунного механизма взаимодействия микроорганизмов с клетками-мишенями, в основе которого лежат лектинообусловленные реакции (Зарудий Ф.С., 1995; Ключева Л.А., 2008; Лебедев К.А., Понякина И.Д., 2013).

Высвобождение гистамина происходит в результате взаимодействия углеводов микроорганизмов с лектинами тучных клеток, макрофагов и других клеток организма с последующим нарушением целостности мембран эукариотов и (Зарудий Ф.С., 1995; Ключева Л.А., 2008). В связи с лектиноопосредованными механизмами высвобождения гистамина различные микроорганизмы могут вызывать однотипные реакции (Зарудий Ф.С., 1995; Ключева Л.А., 2008; Лебедев К.А., Понякина И.Д., 2013).

Кроме того, бактерии могут трансактивировать промотор гистидиндекарбоксилазы, как это показано на примере воздействия *Helicobacter pylori* на культуру линии клеток эпителия желудка (AGS) (Wessler S. et al., 2000).

Описаны следующие особенности участия микроорганизмов в процессе высвобождения гистамина за счет иммунных и неиммунных механизмов. Индуцированное микробными антигенами высвобождение гистамина коррелирует с уровнем сывороточных IgE (Зарудий Ф.С., 1995; Матвеева Н.И., 2005). Установлено, что в периоды обострения и ремиссии у детей с круглогодичным аллергическим ринитом имеется персистентное бактерионосительство *S. aureus* (более 60% случаев, КОЕ > 10³). При сезонном аллергическом рините доминирует бактерионосительство *S. epidermidis* с гемолитическими свойствами (более 54% случаев, КОЕ > 10³) (Матвеева Н.И., 2005).

При реакции «антиген-антитело» высвобождается не только гистамина, но и другие вещества, участвующие в реализации иммунных реакций (Гущин И.С., 2010; Зарудий Ф.С., 1995; Савченко Т.Н., 2011).

Возможно сочетание у одного патогена иммунных и неиммунных механизмов высвобождения гистамина из клеток организма хозяина. Например, базофилы больных с хроническими отитами при гиперпродукции IgE к антигенам *S. aureus* высвобождали гистамин в смеси с *S. aureus* при наличии на их поверхности специфических IgE. При этом штамм *S. aureus* Wood-46 индуцировал высвобождение гистамина вне зависимости от присутствия на поверхности этих базофилов иммуноглобулинов. Добавление смеси бактерий к базофилам, изолированных от больных или здоровых лиц, резко увеличивало выход гистамина из клеток (Зарудий Ф.С., 1995).

Вероятнее всего, что неиммунные механизмы высвобождения гистамина в естественных условиях имеют большее значение, чем иммунные, которые функционируют относительно короткий промежуток времени (Гущин И.С., 2010; Зарудий Ф.С., 1995).

Ряд обзорных работ, опубликованных в последние годы, свидетельствует о необходимости дальнейшей исследований механизмов образования, накопления и деструкции гистамина в организме (Гущин И.С., 2010; Ключева Л.А., 2008; Шишов В.А. с соавт., 2009).

«Экзогенный» гистамин в организме могут продуцировать представители родов *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, присутствующие транзитивно или постоянно на коже и слизистых оболочках, способные декарбоксилировать гистидин (Алешукина А.В., 2012; Воропаева Е.А., 2002; Зарудий Ф.С., 1995; Ключева Л.А., 2008; Кулакова Ю.В., 2013). Выявлено, что количество микроорганизмов с декарбоксилирующей активностью на слизистой оболочке носоглотки больше у больных, чем у здоровых людей (Воропаева Е.А., 2002; Горкин В.З., 1993; Кудрявцева А.В., 2010; Куяров А.В. с соавт., 2008).

У энтеробактерий, поддерживающих эубиоз и вызывающих его нарушение в кишечнике, определена сильная степень корреляционной связи частоты декарбоксилирования орнитина, лизина, аргинина, гистидина, что свидетельствует о возможной активации к декарбоксилированию одновременно разных субстратов (Куяров А.В. с соавт., 2008; Куяров А.В. с соавт., 2013).

Микроорганизмы могут продуцировать две различные группы декарбоксилаз – пиридоксальфосфат- и пируватзависимые. Пиридоксальфосфатзависимые гистидиндекарбоксилазы встречаются у грамотрицательных бактерий. Пируватзависимые гистидиндекарбоксилазы имеются у грамположительных бактерий и, в частности, у молочнокислых бактерий (Landete, J.M. et al., 2008).

Как пиридоксальфосфат-, так и пируватзависимые гистидиндекарбоксилазы, выделенные из разных видов бактерий имеют существенные отличия в аминокислотном составе, каталитической активности, физических свойствах. Установлены высокая степень гомологичности нуклеотидных последовательностей генов пиридоксальфосфатзависимых гистидиндекарбоксилаз бактерий, а также то, что пируватзависимые гистидиндекарбоксилазы имеют филогенетическое родство и сходную функциональную активность. Локусы, содержащие гены описанных пиридоксальфосфатзависимых гистидиндекарбоксилаз бактерий находятся плазмидах (Landete, J.M. et al., 2008).

Гены, кодирующие пируватзависимые гистидиндекарбоксилазы, у разных видов изученных грамположительных бактерий, в том числе лактобацилл, могут находиться как в нуклеоиде, так и в плазмидах. Способность к образованию гистамина у разных видов бактерий может быть устойчивой (при локализации гена декарбоксилазы в нуклеоиде) или неустойчивой и передающейся горизонтально (при локализации данного гена в подвижном элементе генома бактерий, например, в плазмиде) (Landete, J.M. et al., 2008).

Биологическое значение декарбоксилирования для жизнедеятельности микроорганизмов состоит в том, что оно представляет собой защитный механизм, при помощи которого бактериальная клетка предотвращает недопустимый для нее

сдвиг реакции среды в кислую сторону, неблагоприятную для развития микроорганизма (Куяров А.В. с соавт., 2013).

Декарбоксилирование аминокислот позволяет продлить период достаточно высокого внутриклеточного рН и использовать декарбоксилирование аминокислот как источник метаболической энергии (Шишов В.А. с соавт., 2009; Hung C.R., Wang P.S., 2002). Процесс декарбоксилирования может играть определенную физиологическую роль в механизмах взаимодействия бактерии-продуцента гистамина не только с другими микроорганизмами, но и с макроорганизмом при поддержании плотности продуцента гистамина (Куяров А.В. с соавт., 2013). Значение декарбоксилирования аминокислот (в том числе гистидина) заключается еще и в том, что выделяющаяся при этом углекислота необходима для участия в синтезе ряда веществ, например, дикарбоновых кислот (Куяров А.В. с соавт., 2013; Hung C.R., Wang P.S., 2002).

Выявлено, что при наиболее часто встречаемых вариантах дисбактериоза кишечника увеличивается частота высева штаммов *E. coli*, декарбоксилирующих субстрат гистидин. Увеличение декарбоксилирующей активности среди изолятов *E. coli* наблюдалось при уменьшении количества типичных *E. coli*, при снижении их ферментативной активности (*E. coli* lac-) и приобретении гемолитической активности (*E. coli* Hly+). Выраженной способностью декарбоксилировать гистидин обладали изоляты типичной *E. coli* при уменьшении их количества в кишечнике в 56,3% случаев, а изоляты *E. coli* с гемолитической активностью были способны декарбоксилировать гистидин в 68,8% случаев (Куяров А.В. с соавт., 2013).

При дисбактериозе кишечника установлено достоверное изменение содержания свободного гистамина в кале при нарастании дисбиотических нарушений. Количество гистамина повышалось при нарастании уровня нарушения биоценоза от его изменений на уровне монокультур к уровню ассоциативных изменений по трем и четырем показателям (Куяров А.В. с соавт., 2008; Куяров А.В. с соавт., 2013).

Вышеизложенные материалы обзора литературы свидетельствуют, что микробный фактор играет важную роль в физиологических механизмах регулирования содержания свободного гистамина в организме, а связанное с микробным фактором, с особенностями состояния биоценоза увеличенное количество гистамина может обуславливать патофизиологические эффекты.

С учетом роли гистамина в механизме развития различных аллергических заболеваний были проведены исследования содержания этого биогенного амина в различных пищевых продуктах (Клюева Л.А., 2008) и оценка контаминации продуктов питания бактериями с выраженной гистидиндекарбоксилирующей активностью (Куяров А.В. с соавт., 2008; Ткаченко Е.И., Успенский Ю.П., 2006).

Опубликованы результаты исследований, свидетельствующие о том, что значимые для развития патологических процессов концентрации гистамина могут создаваться в ацидофильном молоке, йогуртах, сыре, как за счет их контаминации посторонними гистаминообразующими бактериями, так и за счет использования стартерных промышленных штаммов бактерий, способных продуцировать этот и другие амины. Штаммы бактерий, применяемые в промышленных условиях для ферментации молока, получения кисломолочных продуктов и обладающие достаточно выраженной гистидиндекарбоксилирующей активностью, преимущественно принадлежат к *S. faecium*, *S. mitis*, *L. bulgaricus*, *L. plantarum*, *L. buchneri* (Куяров А.В. с соавт., 2008; Куяров А.В. с соавт., 2013).

В настоящее время доказано, что микроорганизмы не только синтезируют гистамин, но и могут осуществлять деструкцию данного биогенного амина. Первоначально была проведена оценка способности к разрушению гистамина микроорганизмов, контаминирующих пищевые продукты (Клюева Л.А., 2008; Куяров А.В. с соавт., 2013; Ткаченко Е.И., Успенский Ю.П., 2006).

Показано, что у большинства млекопитающих (кроме крыс) в слизистой оболочке желудка гистаминаза не определялась, тогда как, гистидиндекарбоксилаза обнаруживалась в различных отделах желудочно-кишечного тракта (Зарудий Ф.С., 1995).

Из перечня микроорганизмов, участвующих в продукции и деструкции гистамина, особый интерес представляют лактобациллы как физиологические регуляторы уровня гистамина в биотопах макроорганизма и поэтому перспективные для производства противоаллергических продуктов функционального питания бактерии с пробиотическими свойствами.

Следует отметить, что автор настоящей диссертации первым в России начал выполнять инициативные исследования физиологического снижения лактобациллами уровня гистамина в организме *Mascaca mulatta* – физиологической модели организма человека.

Основанием для проведения таких исследований послужили опубликованные данные о том, что лактобациллы кроме декарбоксилаз могут содержать гистаминазы (первоначально выявлены у *L. delbrueckii*, *L. leichmannii*, *L. bulgaricus*) – диаминооксидазы, метаболизирующие гистамин, и благодаря этому они могут быть основой смесей микроорганизмов, предлагаемых для использования при промышленном получении гистаминаз (Underberg E., Lembke A., 1991).

В настоящее время ферменты лактобацилл, ответственные за деградацию гистамина и других биогенных аминов идентифицированы как бактериальные мультимедные оксидазы, то есть ферменты, активные центры которых содержат атомы меди (Ляшенко А.В., 2006; Roberts S.A. et al., 2002; Sakurai T. et al., 2007; Callejón S. et al., 2014).

Продолжается поиск новых штаммов лактобацилл, обладающих способностью деградации биогенных аминов и, в том числе, гистамина за счет продукции аминоксидаз (например, выделен штамм *L. casei IFI-CA 52*) (García-Ruiz A. et al., 2011).

Перспективными для изучения являются лактобациллы, которые описываются как штаммы, не продуцирующие биогенные амины и, в том числе, гистамин (например, *L. rhamnosus GG* и *L. casei Actimel*) (Pithva S. et al., 2014). Их можно использовать для предотвращения обеднения видового и штаммового разнообра-

зия биотопов макроорганизма вместе со штаммами лактобацилл, активно деградирующими гистамин.

Следует также 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).

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

Согласно приведенному обзору литературы, микрофлора желудочно-кишечного тракта как наиболее большой, разнообразный, сложный и мобильный микробный биотоп макроорганизма играет одну из ведущих ролей в физиологическом регулировании как всего пула гистамина в организме хозяина, так и количества свободного гистамина в нем. Поэтому исследования возможностей коррекции содержания всего гистамина и его свободной части в здоровом организме путем изменения состава и соотношения компонентов бактериальных биотопов отделов желудочно-кишечного тракта можно считать наиболее физиологическим подходом поиска функциональных методов профилактики заболеваний, манифестация которых зависит от общего и локального содержания гистамина. С учетом сходства между человеком и макаками резусами, заключающемся в продукции гистамина в качестве основного раннего медиатора гиперчувствительности I типа, актуальным является исследование в физиологических условиях влияния пробиотических композиций на показатели пула гистамина у этих животных. При этом наиболее перспективным можно считать изучение пробиотических композиций,

содержащих снижающие уровень гистамина в питательной среде штаммы лактобацилл, культивируемые в условиях, обеспечивающих наиболее эффективную де-струкцию гистамина.

1.2. Основные биологические свойства лактобацилл, реализуемые при физиологических и патологических состояниях организма

В настоящее время род *Lactobacillus* объединяет 56 видов этих бактерий, из которых не менее 20 видов часто обнаруживаются в желудочно-кишечном тракте человека и обезьян, где они содержатся в наибольшем количестве и видовом разнообразии (Шендеров Б.А., 2001). Как у человека, так и у обезьян лактобациллы являются одними из основных представителей микрофлоры желудочно-кишечного тракта (Ардатская М.Д., 2011; Шендеров Б.А., 1998). Они играют главную роль в симбиотных отношениях между макроорганизмом и его микрофлорой, физиологически регулируют состояние и взаимоотношения микробиомов желудочно-кишечного тракта. Эти бактерии морфологически представляют собой грамположительные неспорообразующие палочки с выраженным полиморфизмом, располагающиеся цепочками или поодиночке (Алешкин А.В., 2011).

Лактобациллы высевались в 100% проб, полученных от обезьян семейства мартышкообразных, в том числе *Macaca mulatta* (Дарсания М.Ш., 2000). *Lactobacillus spp.* определялись во всех отделах желудочно-кишечного тракта макак, в том числе макак резусов (Ленцнер А.А. с соавт., 1989; Venno Y. et al., 1987; Strompfová V., Lauková A., 2014; Wang R.F. et al., 1996). Однако в толстом кишечнике макак резусов лактобациллы содержатся в более высокой концентрации, чем в тонком кишечнике (Bailey M.T., Coe C.L., 2002).

Следует отметить, что если общее количество бактерий нормальной микрофлоры у диких макак было ниже, чем у животных, выращенных в лабораторных условиях, то количество *Lactobacillus spp.* в фекалиях диких макак не отличалось

от значений этого показателя у животных, выращенных в лабораторных условиях (Benno Y. et al., 1987).

Бактерии рода *Lactobacillus* содержатся в молоке самок *Macaca mulatta* в период грудного вскармливания. Показано, что лактобациллы транслоцируются из кишечника самок в их молочные железы. Эта бактериальная транслокация предположительно опосредована мононуклеарными клетками крови (Jin L. et al., 2011).

Поэтому грудное вскармливание детенышей макак резусов обеспечивает более высокий уровень содержания лактобацилл в их кишечнике, а повышение уровня бактерий рода *Lactobacillus* в микробиоме кишечника является показателем улучшения состояния данного микробиома у детенышей макак резусов (O'Sullivan A. et al., 2013).

Поступление лактобацилл с грудным молоком в желудочно-кишечный тракт детенышей макак является важным фактором физиологического формирования микробиомов биотопов пищеварительной системы благодаря подавлению лактобациллами патогенных бактерий и пребиотическому действию компонентов молока (Jin L. et al., 2011).

У лактобацилл имеется широкий перечень полезных для здоровья человека и животных свойств (Глушанова Н.А., 2003; Забирова Т.М., 2001; Шендеров Б.А., 2001; Bubnov R.V. et al., 2015). К этим свойствам, проявляемым как в физиологических условиях, так и при патологических процессах, относятся: антагонистическое подавление патогенных условно-патогенных бактерий, обеспечение колонизационной резистентности биотопов, стимуляция роста лакто- и бифидофлоры, антиоксидантные свойства, вирусоцидное действие, индукция интерферогенеза, противовоспалительное действие, противоопухолевая активность, гипохолестеринемический эффект, оксалат-модифицирующее действие, антигипертензивные свойства, коррекция уровня глюкозы в крови, улучшение функционального состояния пищеварительного тракта при сахарном диабете, синтез витаминов (например, рибофлавина, фолиевой кислоты, биотина) и другие (Беляева Е.А.,

2014; Менье А. с соавт., 2015; Соловьева И.В. с соавт., 2014; Ускова М.А., 2010; Шендеров Б.А. с соавт., 1997).

Одним из важных свойств лактобацилл является их иммуномодулирующее действие. Лактобациллы влияют на клеточные и гуморальные звенья иммунитета, но это действие различается у разных видов и штаммов этих бактерий (Ермоленко Е.И., 2009; Nemaġajata P., Versalovic J., 2013; Rask C. et al., 2013).

Иммуномодулирующим действием обладают живые лактобациллы, их компоненты (например, белок поверхностного слоя – surface-layer (S-layer) protein – SlpA штамма *L. helveticus* MIMLh5, пили клеточной поверхности штамма *L. rhamnosus* GG), экзополисахариды, лектины и метаболиты (Ардатская М.Д., 2011; Лахтин М.В. с соавт., 2012; Górska S. et al., 2014; Taverniti V. et al., 2013; Vargas García C.E. et al., 2015).

Одним из основных механизмов действия лактобацилл на иммунную систему организма хозяина является модулирование продукции цитокинов (в том числе провоспалительных и противовоспалительных) или экспрессии рецепторов для восприятия цитокинов и антигенов (Ермоленко Е.И., 2009; Isolauri E., 2001; Taweechoṭipatr M. et al., 2009).

Благодаря тому, что штамм *L. rhamnosus* CRL1505 был способен индуцировать интерферон- α и интерферон- β в кишечных эпителиоцитах, а также увеличивать продукцию интерферонов I типа при стимуляции кишечных эпителицитов вирусоподобным соединением poly(I:C), высказано предположение о возможности лечения вирусных инфекций с использованием этого штамма лактобацилл в качестве нового способа панвирусной терапии, обладающей меньшими побочными эффектами, чем интерферонотерапия (Villena J. et al., 2014).

Лактобациллы обеспечивают сохранение активных иммунокомпетентных клеток. Это свойство было выявлено при исследовании макаков резусов, инфицированных вирусом иммунодефицита обезьян (SIV), у которых лактобациллы предположительно ингибировали индоламино 2,3-диоксигеназу 1, что сохраняло Th17-клетки (Vujkovic-Cvijin I., 2015).

Штамм *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* 8481 способствовал поддержанию адекватного иммунного ответа, повышая количество НК-клеток, замедляя старение субпопуляции Т-лимфоцитов и увеличивая число незрелых клеток, потенциально реагирующих на новые антигены. Это штамм также снижал концентрацию в сыворотке крови провоспалительного цитокина IL-8, но увеличивал содержание антимикробного пептида hBD-2 (Moro-García M.A. et al., 2013).

Экзогенно введенные лактобациллы стимулируют продукцию основных классов иммуноглобулинов (IgA, IgG и IgM).

В результате приема *L. plantarum* CECT 7315/7316 после вакцинации против гриппа увеличились уровни специфических IgA и IgG. Кроме того, наблюдалась тенденция к увеличению специфических IgM (Bosch M. et al., 2012).

Энтеральное введение лактобацилл при парентеральной иммунизации мышей приводит к увеличению концентрации специфических IgG1 к введенному антигену (Maassen C.V. et al., 2003; Perdigón G. et al., 2002).

Пероральное поступление лактобацилл в кишечник обеспечивает улучшение иммунологического барьера различных отделов пищеварительного тракта, одними из важных факторов которого являются достижение необходимого уровня IgA и уменьшение воспалительных реакций (Isolauri E., 2001; Kotani Y., 2010).

Одним из механизмов стимуляции продукции IgA В-клетками lamina propria слизистой оболочки может быть увеличение под влиянием пептидных производных ферментированного лактобациллами молока уровня интерлейкина 4, индуцирующего активность Th2 (показано на примере штамма *L. helveticus* R389). Дискутируется вопрос о зависимости модуляции продукции IgA от используемых штаммов лактобацилл и состава деградируемых белков (Leblanc J. et al., 2004).

В эксперименте на мышах было показано, что в жидкости кишечника у потомства от самок, получавших ферментированное молоко, содержащее штамм *L. casei* DN-114001, увеличивается количество секреторного IgA (de Moreno de LeBlanc A. et al., 2008).

Из иммуномодулирующих свойств лактобацилл особое внимание уделяется противоаллергическому действию. Это действие лактобацилл требует дальнейшего изучения для определения наиболее точного механизма сложного противоаллергического эффекта данных пробиотиков (Даудова А.Д., Григорьева И.Н., 2014; Isolauri E., Salminen S., 2008; Ouwehand A.C., 2007).

Наиболее изученными являются механизмы противоаллергического действия лактобацилл, связанные с супрессией продукции специфических IgE в результате модуляции ответов Т-хелперов 1 и 2 типа (Th1 и Th2) в сторону доминирования Th1 и изменения уровня ряда цитокинов, в том числе лактобациллы (на примере штамма *L. plantarum* NRIC0380) индуцировали продукцию макрофагами интерлейкина-12, значительно увеличивали продукцию спленоцитами интерферона- γ , увеличивали продукцию интерлейкина-10 и снижали уровень интерлейкина-4 (Enomoto M. et al., 2009). Данные результаты были подтверждены исследованиями других штаммов лактобацилл (Liu Y.W. et al., 2014).

С использованием штамма *L. plantarum* NRIC0380 был доказан еще один механизм ингибиции лактобациллами продукции IgE, связанный с индукцией Т-регуляторных клеток – CD4⁺CD25⁺ Treg клеток (Treg) (Yoshida T. et al., 2013).

Следует отметить, что в опытах *in vitro* и *in vivo* оценка индукции лактобациллами протекторного противоаллергического ответа или эффективности их использования при лечении манифестных проявлений аллергии проводилась только в условиях моделирования развивающихся или манифестирующих аллергических реакций (Марко М. с соавт., 2014; Enomoto M. et al., 2009; Holvoet S. et al., 2013; Schabussova I. et al., 2011; Yamamoto N. et al., 2009; Yoshida T. et al., 2013).

Тестирование вновь высеянных и селекционированных патентуемых штаммов лактобацилл, предназначенных для использования при профилактике и лечении аллергических заболеваний, также проводилось только на моделях развивающихся или манифестирующих аллергических реакций.

Например, штаммы *L. plantarum* CBS120663, *L. plantarum* CBS120664 и *L. fermentum* CBS120661 стимулировали Th1 и Th3 ответы (стимуляция Т-

хелперов 1 и 3 типа) и подавляли Th2 ответы (подавление Т-хелперов 2 типа) в результате изменения профилей цитокинов, индуцированных в мононуклеарных клетках периферической крови человека при совместном инкубировании с данными штаммами, что сопровождалось ингибированием продукции интерлейкинов, отвечающих за образование IgE-продуцирующих клеток (Марко М. с соавт., 2014).

Штаммы *L. acidophilus* CL0062, *L. acidophilus* CL92 и *L. fermentum* CP34 в результате их перорального введения мышам, на которых *in vivo* была создана модель аллергического ринита, уменьшали в крови экспериментальных животных уровень антигенспецифических IgE (Yamamoto N. et al., 2009).

Таким образом при тестировании противоаллергического действия штаммов лактобацилл и содержащих их композиций на моделях развивающихся или манифестирующих аллергических реакций чаще других иммунологических показателей определяется уровень IgE в крови и секретах слизистых оболочек. С учетом того, что содержание иммуноглобулинов основных классов в биологических жидкостях может быть суммарным показателем влияния лактобацилл на гуморальный иммунитет как в физиологических условиях, так и при патологических процессах, можно считать обоснованным использование динамики показателей IgA, IgG, IgM и IgE при оценке в физиологических условиях протекторного противоаллергического действия лактобациллярных пробиотиков. Дополнительная оценка динамики IgG1 перспективна для демонстрации механизма возможных изменений в концентрации IgG при исследовании влияния штаммов лактобацилл и содержащих их композиций.

1.3. Макаки резусы как модель физиологического функционирования организма человека при взаимодействии с микрофлорой желудочно-кишечного тракта

В настоящее время общепризнанным являются большое значение взаимодействия микробиоты и организма хозяина для функционирования макроорганизма (в том числе организма человека) как в физиологических условиях, так и при патологических процессах (Шендеров Б.А., 1998).

Кишечная микрофлора выполняет ряд важнейших физиологических функций для макроорганизма: играет роль барьера для патогенных микроорганизмов, создавая колонизационную резистентность; участвует в метаболизме неперевариваемых пищевых компонентов; продуцирует короткоцепочечные жирные кислоты, образующие соответствующие соли, в том числе ацетаты, пропионаты, бутираты и лактаты, которые обеспечивают до половины потребности колоноцитов в энергии, а также метаболизируются тканями хозяина (в том числе в печени, мышцах и головном мозге), дополнительно обеспечивая энергию для хозяина. Кроме того, микробиота играет важную роль в синтезе витаминов (например, биотина, фолиевой кислоты). Микрофлора толстой кишки важна для кишечно-печеночного цикла желчных кислот и метаболизма холестерина (Шендеров Б.А., 1998; Steer T. et al., 2000; O'Hara A.M., Shanahan F., 2006; Foxx-Orenstein A.E., Chey W.D., 2012).

С помощью различных механизмов микробиота влияет на моторную функцию кишечника. Эти механизмы включают продукцию бактериальных веществ или конечных продуктов бактериальной ферментации, действие медиаторов, высвобождающихся при иммунных реакциях, или кишечных нейроэндокринных факторов (Quigley E.M., 2011; Foxx-Orenstein A.E., Chey W.D., 2012).

Изучение физиологических механизмов взаимодействия организма человека и его микробиоты, исследование возможностей их коррекции, в том числе при профилактике заболеваний (инфекционных, аллергических, онкологических и других), требует выбора наиболее информативной модели *in vivo*. Такой информативной моделью для исследования взаимодействия организма человека и микробиоты являются обезьяны (Дарсания М.Ш., 2000; McKenna P. et al., 2008).

В начале XX столетия уже сложилось мнение, что принадлежность обезьян и людей к одному эволюционному отряду приматов, большое, часто уникальное

сходство их важнейших анатомо-физиологических систем и сторон дают большие преимущества при использовании обезьян в медико-биологических экспериментах, позволяя рассматривать результаты, полученные в опытах на обезьянах, как наиболее отражающие аналогичные процессы у людей. С учетом этого часть экспериментов, направленных на изучение тех или иных закономерностей функционирования физиологических систем у людей, целесообразно проводить на обезьянах (Лапин Б.А. с соавт., 2004).

Обезьяны являются наиболее информативной моделью для выяснения разных сторон жизненно важной роли симбиотической микрофлоры в организме человека. Согласно данным многолетних исследований, обезьяны близки к человеку по показателям физиологии пищеварительного тракта, восприимчивы 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).

Типичным для здоровых макак резусов являлось то, что бифидобактерии, лактобациллы, кишечные палочки с нормальной ферментативной активностью и энтерококки из их фекалий высевались со 100% частотой, бактериоиды – с частотой 60-70%, *Escherichia coli* со сниженной ферментативной активностью – 50%, бактерии рода *Proteus* – 65%, *Staphylococcus saprophyticus* – 65%, дрожжи и дрожжеподобные грибы – 22%. С невысокой частотой и в низких разведениях встречались бактерии родов *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella* (Дарсания М.Ш., 2000).

Видовой состав и количественные соотношения выделяемых микроорганизмов у здоровых обезьян приближались к таковым у здоровых взрослых людей. Исключение составило более высокое содержание у обезьян энтерококка (Дарсания М.Ш., 2000).

Следует отметить, что мукозальные противомикробные пептиды макак резусов обладают высокой степенью гомологии аминокислотных последовательно-

стей с аналогичными пептидами человека и имеют сходные функции (Bals R. et al., 2001).

Анализ полученных различными авторами результатов свидетельствует о существенных изменениях в составе облигатного бактериоценоза пищеварительного тракта обезьян в процессе акклиматизации в непривычной экологической обстановке, после курсов превентивной антибиотикотерапии или лечения по поводу перенесенных острых кишечных инфекций. Важную задачу нормализации микрофлоры обезьян определяют условия предстартовой подготовки этих животных к проведению различных медико-биологических экспериментов (Онищенко Г.Г. с соавт., 2002; McKenna P. et al., 2008).

Доказано, что резидентные микробные популяции биотопов ротоглотки и желудочно-кишечного тракта макак резусов в физиологических условиях защищаются от колонизации патогенными и условно-патогенными бактериями. Однако при воздействиях, изменяющих состояние этих микробных популяций (например, при иммуносупрессивных вмешательствах, стрессовых воздействиях), могут создаваться условия для закрепления патогенов в биотопах с последующим развитием инфекционных заболеваний вплоть до сепсиса. Поэтому при содержании макак резусов и подготовке их к экспериментам рекомендуется проводить определение в указанных биотопах преобладающих видов бактерий, чтобы проводить при необходимости соответствующую превентивную антимикробную терапию (Carrier C.A. et al., 2009).

На примере макак резусов установлено, что дисбиотические изменения в лактофлоре при проведении экспериментов снижают колонизационную резистентность организма этих животных, что может повлечь за собой развитие эндо- и экзоинфекций. В связи с чем было предложено использование штаммов лактобацилл для предупреждения дисбиотических нарушений (Ленцнер А.А. с соавт., 1991).

Новое значение приобретает использование макак резусов как физиологической модели взаимодействия организма человека с его микрофлорой в резуль-

тате экологического влияния условий жизни в развитых странах (в том числе особенностей диеты, домашней гигиены, урбанизации, малоподвижного образа жизни) на комменсальную микрофлору, колонизирующую организм хозяина (Bäckhed F. et al., 2004; Shanahan F., 2009; Foxx-Orenstein A.E., Chey W.D., 2012).

Таким образом вышеизложенное подтверждает релевантность модели макак резусов по отношению к человеку для изучения особенностей взаимодействия макроорганизма, в том числе функционирования пищеварительного тракта, и микробиоты кишечника, а также физиологических изменений, обусловленных таким взаимодействием.

1.4. Физиологические особенности иммуноглобулинового профиля *Macaca mulatta*

Иммуноглобулины (антитела, Ig) являются одним из основных гуморальных факторов защиты организма от генетически чужеродных веществ (антигенов) и продуцируются В-лимфоцитами. Мономеры иммуноглобулинов состоят из четырех пептидов: двух идентичных тяжелых цепей (H – от англ. heavy chains) и двух идентичных легких цепей (L – от англ. light chains). H-цепи ковалентно связаны друг с другом одной или несколькими дисульфидными связями. Каждая L-цепь связана с одной H-цепью одной дисульфидной связью (Кузнецов А.П., 2015; Goldsby R.A. et al., 2003). Таким образом четвертичная структура мономеров иммуноглобулинов напоминает букву Y (Зильбернагель С., Деспопулос А., 2013; Ramsland P.A. et al., 2002). L-цепи имеют по одному переменному (V_L) и константному (C_L) домену. H-цепи также имеют по одному переменному (V_H) домену, но количество константных (C_H) доменов обычно составляет 3-4. Домены V_L , V_H , C_L и C_H1 формируют у каждого антитела два одинаковых Fab (fragment antigen binding – антигенсвязывающий фрагмент) фрагмента. Остальные домены формируют Fc (fragment cristallizable – кристаллизующийся фрагмент) фрагменты.

Между C_{H1} и C_{H2} доменами находится шарнирный участок, обеспечивающий молекулам Ig гибкость (Кузнецов А.П., 2015; Goldsby R.A. et al., 2003).

Такие особенности структуры иммуноглобулинов позволяют им решать важнейшую физиологическую задачу по обеспечению гуморального иммунитета за счет функции связывания антигенов при помощи Fab фрагментов и функции Fc фрагментов, заключающейся во взаимодействии с эффекторными молекулами и клетками иммунной системы, включая систему комплемента, Fc-рецепторы на поверхности клеток, макрофаги, нейтрофилы, НК-клетки, базофилы (Nguyen D.C., 2012).

В зависимости от структуры тяжелых цепей иммуноглобулины подразделяются на классы. В-лимфоциты человека продуцируют 5 классов иммуноглобулинов: IgG, IgA, IgM, IgD и IgE, которые соответственно включают тяжелые цепи γ , α , μ , δ и ϵ типов. Иммуноглобулины всех классов могут иметь только два типа легких цепей: κ или λ . Соотношение иммуноглобулинов с κ или λ цепями в сыворотке крови человека составляет приблизительно 60:40 (Nguyen D.C., 2012). Скорость продуцирования иммуноглобулинов в норме составляет: IgG – 33, IgA – 24, IgM – 6,7, IgD – 0,4, IgE – 0,016 мг/кг массы тела в сутки (Латышева Т.В., 2005).

У человека все тяжелые цепи закодированы в хромосоме 14, а легкие κ и λ цепи в хромосомах 2 и 22 соответственно (Lefranc M.-P., Lefranc G., 2001). В зависимости от аминокислотной последовательности C_H доменов IgG и IgA подразделяются на подклассы, выполняющие различные функции. Goldsby R.A. с соавторами (2003) описывают основные физиологически значимые характеристики всех классов и подклассов иммуноглобулинов человека (Таблица 1). В таблице 2 Онищенко Г.Г. с соавторами (2002) дополнительно характеризуют особенности функций подклассов IgG, в том числе с позиций применения иммуноглобулинов в лечебных целях.

Таблица 1 – Свойства и биологическая активность классов и подклассов сывороточных иммуноглобулинов человека (Goldsby R.A. et al., 2003)

Свойство/ Активность	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgA1	IgA2	IgM ²⁾	IgE	IgD
Молекулярный вес, кДа ¹⁾	150	150	150	150	150-600	150-600	900	190	150
Компонент тяжелой цепи	γ 1	γ 2	γ 3	γ 4	α 1	α 2	μ	ϵ	δ
Нормальный уровень в сыворотке, мг/мл	9	3	1	0,5	3,0	0,5	1,5	0,0003	0,03
Период полураспада в сыворотке <i>in vivo</i> , сутки	23	23	8	23	6	6	5	2,5	3
Активация комплемента по классическому пути	+	+/-	++	-	-	-	+++	-	-
Прохождение через плаценту	+	+/-	+	+	-	-	-	-	-
Присутствие на мембранах зрелых В-клеток	-	-	-	-	-	-	+	-	+
Связывание с Fc рецепторами фагоцитов	++	+/-	++	+	-	-	?	-	-
Мукозальный транспорт	-	-	-	-	++	++	+	-	-
Индукция дегрануляции тучных клеток	-	-	-	-	-	-	-	+	-

Примечание – уровни активности указываются следующим образом: ++ = высокий; + = умеренный; +/- = минимальный; - = отсутствует; ? = под вопросом.

¹⁾ IgG, IgE и IgD всегда являются мономерами; IgA могут быть мономером, димером, тримером или тетрамером. Связанные с мембраной IgM являются мономером, но сывороточные IgM являются пентамерами.

²⁾ IgM это первый изотип, продуцирующийся у новорожденных и во время первичного иммунного ответа.

Таблица 2 – Соотношение и свойства подклассов IgG (Онищенко Г.Г. с соавт., 2002)

Подклассы IgG	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
Длительность полувыведения	25 сут.	25 сут.	7,5 сут.	25 сут.
Аффинность к белковым антигенам	+++	+	+++	++
Аффинность к полисахаридам	+	+++	+	+
Активация комплемента	+++	+	++	–
Антитело–зависимая клеточная цитотоксичность	+++	–	+++	–
Распределение в плазме у взрослых	65%	25%	4%	6%

Известна некоторая антигенная схожесть иммуноглобулинов млекопитающих. Перекрестная реактивность анти-Ig антител между различными видами животных позволило использовать диагностикумы на основе антител к иммуноглобулинам человека для идентификации гомологичных классов и подклассов Ig (Bauer K., 1970; Bauer K., 1971; Esteves M.B., Binaghi R.A., 1972; Leslie G.A., Martin L.N., 1978; Neoh S.H. et al., 1973; Vaerman J.P. et al., 1969). Такая возможность определения антител является скорее только качественной, нежели количественной. Тем не менее в настоящее время установлено, что все млекопитающие имеют все 5 классов иммуноглобулинов (Rogers K.A., 2006).

Широкое применение макак резусов как модельных животных и необходимость изучения на них иммуноглобулинового звена гуморального иммунитета потребовали определения физиологической нормы концентраций основных классов антител. Концентрация IgG, IgA и IgM в сыворотке крови здоровых макак резусов может варьировать в зависимости от используемого диагностикума и возраста животных (Таблица 3). Однако возможно показатели этих иммуноглобулинов различаются между изолированными популяциями, что можно объяснить концепцией физиологической нормы в условиях изменяющейся экологической обстановки (Черешнев В.А. с соавт., 2001).

Таблица 3 – Диапазон концентраций IgG, IgA и IgM в сыворотке крови здоровых *Maca mulatta* по данным литературы

Средние концентрации иммуноглобулинов, мг/мл			Описание животных	Диагностикум	Источник литературы
IgG	IgA	IgM			
12,43	3,5	0,87	Взрослые макаки	Моноспецифическая антисыворотка против IgG, IgA, IgM макак резусов	Monte-Wicher V. et al., 1970
9,36±0,53*	3,11±0,42*	0,49±0,11*	Взрослые макаки	Кроличьи антисыворотки против Ig обезьян	Challacombe S.J., Russell M.W., 1979
13,5±3,8*	2,45±0,7*	1,3±0,3*	Взрослые макаки	Козьи антитела против F(ab') ₂ фрагментов Ig макак резусов	Miller C.J. et al., 1992
21,21±1,1**	1,74±0,27**	н.д.	Рожавшие макаки фертильного возраста	Козьи антитела против IgG (H+L) и кроличьи антитела против Fc фрагментов IgA макак резусов	Lü F.X. et al., 1999; Lü X.S., Miller C.J., 1996
11,1±0,3**	3,3±0,2**	1,6±0,2**	Возраст макак 4-10 лет	Сыворотки моноспецифические против IgG, IgA, IgM человека фирмы «ИмБио» (Россия, г. Москва)	Матуа А.З., Шевцова З.В., 2007
16,6±0,6**	4,1±2,4**	1,2±0,01**	Возраст макак 21-29 лет		
11,84±0,57**	3,07±0,36**	2,07±0,25**	Возраст макак 1-3 года		
12,50±0,51**	3,36±0,21**	1,43±0,08**	Возраст макак 4-11 лет		
15,77±1,08**	4,18±0,36**	1,42±0,05**	Возраст макак 12-19 лет		
15,82±0,76**	4,58±0,27**	1,30±0,09**	Возраст макак 20-30 лет		
10,3	0,10	0,12	Новорожденные макаки	Козьи антитела против IgG (Rockland, США), IgA (Alpha Diagnostic, США) и IgM (Accurate Chemicals, США) макак резусов	Shen C. et al., 2014
12,6	4,2	6,4	Материнские особи после вакцинации против столбняка		

* - $M \pm \sigma$

** - $M \pm m$

Период полураспада IgG в кровеносном русле макак резусов в норме составляет $8,3 \pm 0,54$ суток, IgA – $4,5 \pm 0,46$ суток, IgM – $4,7 \pm 0,26$ суток. Показана прямая взаимосвязь между периодом полураспада этих иммуноглобулинов и весом животных (Challacombe S.J., Russell M.W., 1979). Исследования новорожден-

ных макак резусов позволили определить, что через плацентарный барьер способны проходить только IgG материнского организма (Shen C. et al., 2014).

Функции, которые выполняет IgD, в настоящее время мало изучены. Однако степень идентичности этого иммуноглобулина человека и макак резусов (идентичность аминокислотных последовательностей 76%) показывает перспективность использования *Macaca mulatta* для дальнейших исследований его свойств (Rogers K.A., 2006; Rogers K.A., et al., 2006).

Физиологические концентрации IgE в сыворотке крови у разных групп макак резусов могут иметь средние значения $81,6 \pm 5,28$ нг/мл (диапазон от 55,2 до 86,4 нг/мл), $73,2 \pm 7,9$ нг/мл (диапазон от 43,2 до 100,8 нг/мл). Эти данные были получены с использованием дагностикума на основе антител к IgE человека, которые имели по меньшей мере 70% перекрестную реактивность к этому классу иммуноглобулинов у макак резусов (Patterson R., 1976). Макаки резусы как в возрасте 1-3 года, так и 13-19 лет имеют в норме сравнительно низкие уровни IgE в сыворотке крови. Концентрация этого иммуноглобулина достоверно увеличивается при глистной инвазии только у взрослых животных (Fallon P.G. et al., 2003). Макаки резусы могут быть также использованы в качестве модели при исследованиях IgE связанного с мембраной В-клеток, например, для поиска анти-SemX средств (Wu P.C. et al., 2012).

В ранних исследованиях с использованием классических иммунологических и молекулярно-биологических методов у макак резусов были обнаружены только три подкласса IgG (Calvas P. et al., 1999; Martin L.N., 1982; Shearer M.H. et al., 1999). Однако позднее Scinicariello F. с соавторами (2004) установили, что у этих животных экспрессируются все 4 подкласса IgG по меньшей мере до уровня мРНК, при этом непосредственно IgG4 содержится в концентрации, почти не поддающейся обнаружению. Это позволяет предположить, что IgG4 у человека и макак выполняют разные функции (Nguyen D.C., 2012). Показано, что моноклональные антитела к подклассам IgG человека имеют вариабельную перекрестную реактивность с антителами обезьян, суммарно составляющую 74,1%

(Hajjighasemi F., Shokri F., 2010). IgG1 обезьян связывается с Fc γ R рецепторами также как и IgG1 человека, а также имеет сходный профиль других эффекторных функций. Однако IgG2 и IgG4 обезьян и человека могут иметь ряд функциональных несоответствий, обусловленных различиями во взаимодействии с классами Fc γ R рецепторов (Warncke M., 2012).

У обезьян Старого Света IgA в отличие от человека не подразделяется на подклассы. При этом наивысшая гомологичность аминокислотной последовательности IgA макак резусов наблюдается к IgA1 человека и составляет 81,2-83,7% (Rogers K.A. et al., 2008; Scinicariello F. et al., 2001).

Отсеквенированный и собранный геном *Macaca mulatta* позволяет определить локализацию многих изученных ранее в отдельности генов этого модельного животного (Yan G. et al., 2011). Путем выравнивания нуклеотидных последовательностей известных кДНК цепей Ig макак резусов удастся определить, что гены, кодирующие γ , α , μ , δ цепи, находятся в 7 хромосоме, а κ и λ цепи в хромосомах 13 и 10 соответственно.

Шарнирный участок IgG3 человека значительно длиннее, чем у других подклассов IgG, так как наиболее часто кодируется четырьмя экзонами (в генах IgG3 может быть от двух до пяти экзонов, в то время как у других подклассов IgG только по одному) (Lefranc M.-P., Lefranc G., 2001). Поэтому шарнирный участок IgG3 человека имеет большую подвижность и, следовательно, обеспечивает более эффективное связывание антигена и запуск эффекторных механизмов (Burton D.R., Woof J.M., 1992). Однако шарнирный участок IgG3 макак резусов кодируется только одним экзоном и имеет значительно меньшую длину, чем у человека, а значит функциональная активность этого подкласса IgG может различаться (Scinicariello F. et al., 2004). Макаки резусы отличаются относительно высокой степенью внутривидового аллельного полиморфизма генов, кодирующих C_H домены IgG, в частности IgG2 и IgG4, по сравнению с человеком (Nguyen D.C., 2012; Scinicariello F. et al., 2001; Scinicariello F. et al., 2004). При этом многие замены локализованы в C_H2 доменах, то есть в участках, взаимодействующих с ре-

цепторами на поверхности клеток и комплементом (Воробьев А.А. с соавт., 2006; Radaev S., Sun P., 2002). Уровень внутривидовой генетической гетерогенности IgA у макак резусов еще более выражен (Rogers K.A. et al., 2008; Scinicariello F. et al., 2001; Sumiyama K. et al., 2002). Значительная вариабельность генов, кодирующих иммуноглобулины, может также наблюдаться у животных этого вида из различных географических областей (Scinicariello F. et al., 2001). Возникающая вследствие этого вариабельность в структуре иммуноглобулинов *Macaca mulatta* объясняет слабую кросс-реактивность или ее отсутствие при использовании в экспериментах на этих животных диагностикумов на основе антител к подклассам IgG человека (Nguyen D.C., 2012). Такая вариабельность также потенциально может затруднить использование видоспецифических диагностикумов для определения концентрации антител при исследовании различных физиологических состояний.

В отношении вариабельных доменов H-цепей антител показано, что небольшое число IGV_H генов, кодирующих антитела к ксенотрансплантатам у человека и макак резусов является высоко консервативным. V_L домены антител макак резусов кодируются тремя подгруппами $IGKV$ генов и пятью подгруппами $IGLV$ генов, имеющих гомологию с человеком по меньшей мере $>96\%$ и $>87,1\%$ соответственно. Поэтому макаки резусы являются подходящей моделью для исследования иммуноглобулинового звена гуморального иммунитета (Howard W.A. et al., 2005; Howard W.A. et al., 2005; Zahorsky-Reeves, J.L. et al., 2006)

Однако следует учитывать, что общее количество функционирующих генов, обеспечивающих синтез вариабельных доменов иммуноглобулинов у макак резусов больше, чем у человека (в среднем 55 против 44 соответственно). Внутривидовая вариабельность последовательностей этих генов в виде средней попарной дистанции составляет 0,339 у человека и 0,311 у макак резусов (Das S. et al., 2008; Watson C.T. et al., 2013). При этом степень аллельного полиморфизма генов, кодирующих вариабельные домены антител человека, достоверно меньше, чем различия в этих генах между человеком и *Macaca mulatta*, следовательно, вероят-

ность того, что у человека и макаки будут продуцироваться антитела с полностью одинаковыми V-доменами, ничтожно мала (Thullier P. et al., 2010).

Таким образом, особенности иммуноглобулинового профиля макак резусов позволяют их использовать в качестве адекватной модели для изучения физиологических состояний, связанных с этим звеном гуморального иммунитета. Однако с учетом высокой внутривидовой вариабельности антител этих животных для получения репрезентативных результатов целесообразно проводить уточнение показателей физиологической нормы иммуноглобулинов для каждой изолированной популяции животных, в том числе их концентраций в сыворотке крови. Используемые в ряде научных работ диагностикумы на основе антител к иммуноглобулинам человека позволяют приближенно определить концентрации IgG, IgA, IgM в сыворотке крови *Macaca mulatta*. Однако такой подход является необоснованным при оценке тонких физиологических изменений классов и подклассов антител обезьян из-за имеющихся молекулярно-биологических и функциональных отличий. Поэтому необходимо использовать только видоспецифические диагностикумы при проведении исследований, направленных на изучение физиологической нормы реакции иммуноглобулинового звена иммунитета макак резусов. С учетом известной литературы перспективным в таких исследованиях является оценка концентраций сывороточных IgG, IgG1, IgA, IgM и IgE.

Глава 2. РАЗРАБОТКА КОМПОЗИЦИЙ НА ОСНОВЕ ЛАКТОБАЦИЛЛ

В качестве экспериментальных моделей коррекции метаболизма гистамина *in vitro*, а также для последующей коррекции *in vivo* были предложены жидкие пробиотические композиции. Для обеспечения релевантности разрабатываемых композиций в качестве моделей *in vitro* коррекции метаболизма этого биогенного амина необходимо учитывать концентрацию гистамина в используемых питательных средах и способность пробиотических штаммов ее изменять. При этом оптимальным критерием питательных сред является уровень гистамина, сопоставимый с концентрацией в основных биологических образцах экспериментальных животных. Пробиотические штаммы или их консорциум должны обеспечивать снижение гистамина в среде культивирования.

2.1. Исследование содержания гистамина в питательных средах

В таблице 4 приведены результаты исследования содержания гистамина в образцах исследованных питательных сред: ГМС и ЛКМС.

Таблица 4 – Содержание гистамина в питательных средах

Наименование питательной среды	Число образцов, n	Содержание гистамина, нг/мл (M±m)
ГМС	5	256,5±6,4
ЛКМС	5	13,9±0,8

Проведенное исследование показало, что ЛКМС имеет статистически достоверные ($P < 0,01$) различия содержания гистамина по отношению к ГМС. Наиболее высокий уровень гистамина (сопоставимый с физиологической концентрацией этого биогенного амина в кале) имела питательная среда ГМС, наиболее низкий (сопоставимый с физиологической концентрацией этого биогенного амина в цельной крови) – среда на основе молочной казеиновой сыворотки – ЛКМС.

2.2. Исследование свойств моноштаммовых композиций на основе лактобацилл от используемой закваски

Для получения заквасок, которые получались при культивировании маточных культур лактобацилл, были использованы ГМС и ЛКМС. Инокулянты вносились в количестве 5% от общего объема среды. Образцы биомассы и сред культивирования отбирались через пять часов после начала культивирования.

В таблицах 5, 6 и 7 приведены результаты исследования зависимости уровня гистамина в среде культивирования как ингредиента моноштаммовой продукции на основе лактобацилл, содержания лактобацилл в продукции и ее активной кислотности от используемой закваски.

Таблица 5 – Влияние закваски на содержание гистамина в моноштаммовой композиции

Наименование среды для закваски/наименование среды для композиции	Уровень гистамина в среде культивирования штамма лактобацилл до и после культивирования, нг/мл ($M \pm m$)					
	<i>L. helveticus NKJC</i>		<i>L. helveticus JCH</i>		<i>L. casei KAA</i>	
	до	после	до	после	до	после
ГМС/ГМС, n=5	247,0± ±11,0	249,7± ±12,2	251,7± ±5,7	241,7± ±5,4	261,8± ±19,8	308,8± ±23,4*
ЛКМС/ГМС, n=5	241,5± ±6,9	242,1± ±7,3	238,0± ±5,1	243,6± ±4,9	241,9± ±11,0	265,7± ±9,5*
ГМС/ЛКМС, n=5	16,7± ±4,6	15,8± ±3,2	15,5± ±3,2	14,0± ±2,7	16,1± ±3,8	23,8± ±3,8*
ЛКМС/ЛКМС, n=5	13,8± ±1,2	13,5± ±0,8	13,7± ±0,7	12,1± ±0,3*	14,2± ±0,7	21,3± ±1,2*

Примечание – * – $P < 0,05$

Таблица 6 – Влияние производственной закваски на содержание лактобацилл в моноштаммовой композиции

Наименование среды для закваски/наименование среды для композиции	Содержание лактобацилл в композиции, КОЕ/мл		
	<i>L. helveticus NKJC</i>	<i>L. helveticus JCH</i>	<i>L. casei KAA</i>
ГМС/ГМС, n=5	10 ⁹	10 ⁹	10 ⁹
ЛКМС/ГМС, n=5	10 ⁹	10 ⁹	10 ⁹
ГМС/ЛКМС, n=5	10 ⁹	10 ⁹	10 ⁹
ЛКМС/ЛКМС, n=5	10 ⁹	10 ⁹	10 ⁹

Таблица 7 – Влияние производственной закваски на активную кислотность моноштаммовой композиции

Наименование среды для закваски/наименование среды для композиции	Активная кислотность композиции на основе лактобацилл, pH ($M \pm m$)		
	<i>L. helveticus NKJC</i>	<i>L. helveticus JCH</i>	<i>L. casei KAA</i>
ГМС/ГМС, n=5	5,52±0,60	5,57±0,72	5,49±0,76
ЛКМС/ГМС, n=5	5,38±0,79	5,44±0,85	5,31±0,64
ГМС/ЛКМС, n=5	4,90±0,82	4,87±0,59	4,63±0,83
ЛКМС/ЛКМС, n=5	4,75±0,78	4,61±0,61	4,51±0,74

2.3. Исследование зависимости свойств композиции от соотношения штаммов лактобацилл в консорциуме

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.

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.

Эти же среды были использованы для получения заквасок, которые получались при культивировании маточных культур лактобацилл. Инокуляты вносились в количестве 5% от общего объема среды.

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

Образцы биомассы и сред культивирования отбирались через пять часов после начала культивирования.

Статистически достоверные различия содержания гистамина в образцах композиций были отмечены при их получении с использованием ГМС и одного из вариантов консорциума (таблица 8).

Таблица 8 – Влияние соотношения штаммов лактобацилл в консорциуме на содержание гистамина в композиции

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

Примечание – число образцов в каждой группе – n=5

* – P<0,05

Уровень гистамина после культивирования консорциумов на ЛКМС не имел статистически достоверных различий.

При исследовании всех полученных образцов композиции отмечено высокое содержание лактобацилл – 10^9 КОЕ/мл (таблица 9).

Таблица 9 – Влияние соотношения штаммов лактобацилл в консорциуме на содержание лактобацилл в композиции

Соотношение в консорциуме штаммов лактобацилл (<i>L. helveticus</i> NKJC : <i>L. helveticus</i> JCH : <i>L. casei</i> KAA)	Содержание лактобацилл в композиции, КОЕ/мл	
	ГМС	ЛКМС
2 : 1 : 1	10^9	10^9
2 : 2 : 1	10^9	10^9
1 : 2 : 1	10^9	10^9

Примечание – число образцов в каждой группе – n=5

Различие активной кислотности образцов композиции не было статистически достоверно, однако более низкий уровень рН отмечен при использовании в качестве питательной среды ЛКМС (таблица 10).

Не было выявлено статистически достоверной корреляционной связи показателей динамики уровня гистамина с содержанием в композиции лактобацилл и активной кислотностью композиции ($r < 0,2$, $P > 0,05$).

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.

Таблица 10 – Влияние соотношения штаммов лактобацилл в консорциуме на активную кислотность композиции

Соотношение в консорциуме штаммов лактобацилл (<i>L. helveticus NKJC</i> : <i>L. helveticus JCH</i> : <i>L. casei KAA</i>)	Активная кислотность композиции, рН (M±m)	
	ГМС	ЛКМС
2 : 1 : 1	4,22±0,50	3,83±0,45
2 : 2 : 1	4,50±0,61	3,84±0,42
1 : 2 : 1	4,35±0,38	3,83±0,47

Примечание – число образцов в каждой группе – n=5

2.4. Исследование в процессе культивирования лактобацилл динамики показателей уровня гистамина в среде культивирования, роста лактобацилл, активной и титруемой кислотности композиций

Для дальнейших исследований модели *in vitro* коррекции пула гистамина был выбран наиболее перспективный консорциум, в котором соотношение *L. helveticus NKJC*, *L. helveticus JCH* и *L. casei KAA* равно 2 : 1 : 1 соответственно.

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

Для получения заквасок использовалась ЛКМС как среда с низким уровнем гистамина, обеспечивающая необходимые показатели композиции (низкий уро-

вень 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; Аво-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 (таблицы 11 и 12), отмечено, что увеличение числа лактобацилл в биомассе происходило в течение первых шести часов культивирования штаммов.

Таблица 11 – Динамика показателей пробиотической композиции, включающей консорциум штаммов и ГМС

Контрольные точки отбора проб	Показатели пробиотической композиции			
	Содержание лактобацилл, lg КОЕ/мл	pH (M±m)	°T (M±m)	Содержание гистамина, нг/мл (M±m)
0 часов	7	6,63±0,72	31,3±4,8	251,9±11,1
1 час	7	6,61±0,85	32,5±4,3	247,4±12,3
2 часа	8	6,55±0,81	34,2±5,6	241,4±13,9
3 часа	8	6,35±0,78	36,8±5,1	235,9±12,7
4 часа	8	6,08±0,91	40,1±6,2	228,5±13,1
5 часов	8	5,72±0,71	42,9±7,6	223,1±10,5
6 часов	9	5,32±0,69	80,4±11,5	222,0±12,1
7 часов	9	4,73±0,65	142,3±25,7	221,5±14,1
8 часов	9	4,45±0,58	161,7±31,1	221,3±13,6
10 часов	9	4,07±0,53	164,6±29,4	220,9±14,4
12 часов	9	3,99±0,57	221,3±43,7	221,2±11,3
14 часов	9	3,88±0,52	244,9±46,9	220,4±12,5
16 часов	9	3,80±0,46	260,1±60,2	219,5±11,9
18 часов	9	3,78±0,49	264,5±59,7	220,9±14,0

Примечание – число образцов в каждой контрольной точке – n=5

Таблица 12 – Динамика показателей пробиотической композиции, включающей консорциум штаммов и ЛКМС

Контрольные точки отбора проб	Показатели пробиотической композиции			
	Содержание лактобацилл, lg КОЕ/мл	pH (M±m)	°T (M±m)	Содержание гистамина, нг/мл (M±m)
0 часов	7	5,18±0,72	20,7±3,5	13,4±1,8
1 час	7	5,08±0,69	23,2±3,7	12,9±1,6
2 часа	7	4,95±0,62	24,6±3,6	9,5±1,6
3 часа	8	4,61±0,71	30,9±5,2	10,7±1,4
4 часа	8	4,34±0,58	32,1±5,4	10,2±1,4
5 часов	8	4,24±0,65	38,4±4,9	12,6±1,8
6 часов	9	4,11±0,52	44,7±6,7	12,4±2,1
7 часов	9	3,96±0,60	52,3±7,1	10,2±1,5
8 часов	9	3,80±0,61	59,4±7,4	11,5±1,9
10 часов	9	3,73±0,51	68,7±9,2	11,5±2,3
12 часов	9	3,63±0,49	75,9±8,5	10,9±2,5
14 часов	9	3,58±0,43	77,1±10,3	10,7±2,7
16 часов	9	3,50±0,54	96,3±14,7	10,9±2,6
18 часов	9	3,48±0,46	112,5±19,4	10,8±2,9

Примечание – число образцов в каждой контрольной точке – n=5

Снижение значений активной и титруемой кислотности происходило во время всего периода культивирования исследуемых моделей *in vitro* коррекции метаболизма гистамина микробиоценозов.

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 ($P > 0,05$).

2.5. Исследование влияния катионов меди (II) на свойства композиции

Анализ источников литературы позволил сделать заключение о возможности использования катионов меди (II) – Cu^{2+} – как ингибитора активности гистидиндекарбоксилаз, компонента активных центров диаминоксидаз и катализатора дальнейшего окисления продуктов окисления гистамина (Born G.V.R., 1953; Muraki T.N. et al., 2003; Saysell 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.

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. 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, включающих консорциум трех штаммов, питательные ГМС и ЛКМС в сочетании с Cu^{2+} (таблицы 13 и 14), отмечено, что увеличение числа лактобацилл в биомассе также происходило в течение первых шести часов культивирования штаммов.

Таблица 13 – Динамика показателей пробиотической композиции, включающей консорциум штаммов, ГМС и Cu^{2+}

Контрольные точки отбора проб	Показатели пробиотической композиции			
	Содержание лактобацилл, lg КОЕ/мл	pH (M±m)	°T (M±m)	Содержание гистамина, нг/мл (M±m)
0 часов	7	6,65±0,91	30,1±5,2	259,5±11,2
1 час	7	6,59±0,87	33,7±5,6	255,8±13,3
2 часа	8	6,53±0,83	35,6±5,7	249,9±12,2
3 часа	8	6,31±0,94	38,4±6,1	241,4±13,7
4 часа	8	6,11±0,79	41,1±7,3	235,1±13,5
5 часов	8	5,78±0,74	43,6±7,1	227,5±14,7
6 часов	9	5,39±0,76	86,9±13,4	225,7±15,3
7 часов	9	4,81±0,61	145,4±26,1	222,5±14,7
8 часов	9	4,57±0,63	164,8±29,6	221,4±14,5
10 часов	9	4,16±0,67	170,5±31,2	219,6±13,5
12 часов	9	3,92±0,52	225,7±39,4	217,2±14,0
14 часов	9	3,85±0,56	241,3±38,9	216,3±12,7
16 часов	9	3,81±0,51	257,6±47,5	214,4±13,4
18 часов	9	3,74±0,49	263,9±52,3	211,7±11,7

Примечание – число образцов в каждой контрольной точке – n=5

Таблица 14 – Динамика показателей пробиотической композиции, включающей консорциум штаммов, ЛКМС и Cu^{2+}

Контрольные точки отбора проб	Показатели пробиотической композиции			
	Содержание лактобацилл, lg КОЕ/мл	pH (M±m)	°T (M±m)	Содержание гистамина, нг/мл (M±m)
0 часов	7	5,12±0,63	21,4±3,9	14,0±2,1
1 час	7	5,05±0,59	22,1±3,4	12,7±1,7
2 часа	7	4,82±0,71	27,9±3,2	12,0±1,3
3 часа	8	4,52±0,55	31,3±4,7	11,7±1,6
4 часа	8	4,38±0,62	35,1±4,9	11,2±1,7
5 часов	8	4,19±0,51	39,6±5,4	10,6±1,8
6 часов	9	4,07±0,57	45,4±6,8	9,8±1,9
7 часов	9	3,92±0,61	53,6±7,1	9,3±1,5
8 часов	9	3,83±0,49	61,7±8,9	9,2±1,7
10 часов	9	3,70±0,46	69,3±9,2	9,2±2,0
12 часов	9	3,67±0,58	71,6±9,4	9,1±1,9
14 часов	9	3,60±0,45	79,7±9,7	8,5±2,0
16 часов	9	3,53±0,48	94,1±15,4	8,0±1,7
18 часов	9	3,50±0,41	117,8±21,7	8,0±1,8

Примечание – число образцов в каждой контрольной точке – n=5

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 добавлению Cu^{2+} соответствовали статистически достоверное стабильное снижение концентрации гистамина при использовании питательной среды ЛКМС и статистически достоверное снижение уровня гистамина при использовании питательной среды ГМС ($P < 0,05$).

Глава 3. ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ УРОВНЯ ГИСТАМИНА В КИШЕЧНИКЕ У МЫШЕЙ

Известно, что между содержанием гистамина в кишечнике и его симпатическими нервными образованиями отсутствует корреляция. Однако, установлено, что слизистая оболочка кишечника содержит значительно больше гистамина, чем его мышечный слой (Вайсфельд И.Л., Кассиль Г.Н., 1981). Это позволяет предположить, что с одной стороны основу пула гистамина в стенках кишечника составляют тучные клетки, а с другой стороны возможно тесное взаимодействие эндогенного и экзогенного пула гистамина.

При исследовании физиологических эффектов пробиотических композиций необходимо исключить вероятность их способности стимуляции синтеза гистамина в кишечнике. Поэтому в качестве интегрального показателя совокупной активности гистидин-декарбоксилаз и гистаминаз было предложено исследовать 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 в норме у этих животных по сравнению с другими линейными мышами (Zimmermann A.S. et al., 2011), что позволяет повысить точность анализа концентрации гистамина. В качестве контрольной точки исследования кишечника мышей было взято время, соответствующее высокой скорости синтеза гистамина тучными клетками.

Образцы композиций на основе лактобацилл, которые вводились мышам, имели следующие показатели:

образец композиции №1 – композиция на основе консорциума штаммов *L. helveticus NKJC*, *L. casei KAA* и *L. helveticus JCH* в соотношении 2 : 1 : 1 соот-

ветственно, содержащая ГМС: содержание лактобацилл – 10^9 КОЕ/мл, pH 4,8, титруемую кислотность – $107,6^\circ\text{T}$, содержание гистамина – 225,9 нг/мл;

образец композиции №2 – композиция на основе консорциума штаммов *L. helveticus NKJC*, *L. casei KAA* и *L. helveticus JCH* в соотношении 2 : 1 : 1 соответственно, содержащая ЛКМС: содержание лактобацилл – 10^9 КОЕ/мл, pH 4,8, титруемую кислотность – $59,8^\circ\text{T}$, содержание гистамина – 11,2 нг/мл.

образец композиции №3 – композиция на основе консорциума штаммов *L. helveticus NKJC*, *L. casei KAA* и *L. helveticus JCH* в соотношении 2 : 1 : 1 соответственно, содержащая ГМС и 300 мкмоль/л Cu^{2+} : содержание лактобацилл – 10^9 КОЕ/мл, pH 4,8, титруемую кислотность – 106°T , содержание гистамина – 221,4 нг/мл;

образец композиции №4 – композиция на основе консорциума штаммов *L. helveticus NKJC*, *L. casei KAA* и *L. helveticus JCH* в соотношении 2 : 1 : 1 соответственно, содержащая ЛКМС и 300 мкмоль/л Cu^{2+} : содержание лактобацилл – 10^9 КОЕ/мл, pH 4,8, титруемую кислотность – $59,5^\circ\text{T}$, содержание гистамина – 9,1 нг/мл.

Из приведенных экспериментальных данных (таблица 15) видно, что за все дни наблюдения за животными средняя масса тела в группах не уменьшалась по сравнению с данными до дачи образцов композиции, 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 общей морфологии, содержания и распределения отдельных метаболитов (общий белок) в печени, тонком и толстом кишечнике мышей было установлено следующее.

Таблица 15 – Масса мышей в дни наблюдения

Номер животного	Масса животного (г) в день эксперимента					
	до введения	1 сутки	2 сутки	3 сутки	4 сутки	5 сутки
Контрольная группа						
1	26,1	24,7	28,0	27,7	27,0	27,4
2	26,0	25,0	25,5	24,8	25,3	26,2
3	25,2	26,4	26,0	25,8	26,1	26,5
4	31,8	33,1	32,7	33,0	32,9	32,8
5	28,3	29,2	30,5	30,2	30,7	31,7
Среднее	27,5	27,7	28,5	28,3	28,4	28,9
Опытная группа 1						
6	24,5	24,9	25,0	24,8	24,6	24,8
7	29,1	29,8	29,0	28,9	29,3	29,5
8	30,5	30,7	29,4	30,5	31,0	31,3
9	28,1	29,0	28,5	29,0	28,2	28,0
10	27,6	28,0	28,5	28,0	28,3	28,8
Среднее	27,9	28,4	28,1	28,2	28,3	28,5
Опытная группа 2						
11	29,1	30,3	30,3	29,1	28,5	29,1
12	26,5	28,1	27,6	27,6	27,3	28,3
13	30,0	31,4	30,7	30,1	30,6	30,8
14	26,6	27,8	27,4	27,0	26,8	27,7
15	29,8	28,9	29,6	29,9	30,4	31,5
Среднее	28,4	29,3	29,1	28,7	28,7	29,4
Опытная группа 3						
16	32,0	34,1	33,3	33,0	33,5	33,4
17	28,1	29,0	28,5	27,5	27,2	27,8
18	27,3	28,4	28,4	28,9	29,0	29,1
19	26,8	27,0	26,3	26,0	25,3	25,4
20	27,2	28,5	29,2	29,8	30,4	30,6
Среднее	28,3	29,4	29,1	29,1	29,1	29,3
Опытная группа 4						
21	24,0	23,1	23,8	24,0	24,3	25,0
22	25,5	24,1	25,9	26,2	26,5	27,2
23	28,4	26,9	27,1	27,5	28,1	28,5
24	26,8	26,5	27,0	26,9	26,6	26,2
25	29,3	29,0	28,8	29,7	30,6	29,4
Среднее	26,8	25,9	26,5	26,8	27,2	27,2

Примечание – номера опытных групп животных соответствуют приведенным выше номерам образцов композиций

3.1. Гистологические исследования образцов печени

При окраске гематоксилином и эозином во всех изученных образцах на срезе были видны классические печеночные дольки, образованные печеночными балками, радиально сходящимися к центральной вене. Между балками располагались внутريدольковые синусоидные капилляры нормальных размеров. Сами гепатоциты лежали плотно и имели форму многогранника. Содержали в основном по одному ядру, но встречались и двуядерные. Ядра были преимущественно округлой формы. На периферии долек можно было наблюдать овальные или даже плоские ядра соответственно форме самого гепатоцита. В ядрах были хорошо различимы минимум два ядрышка. Основная площадь ядра была занята примерно равным количеством эу- и гетерохроматина. Размеры ядер соответствовали нормальным ядерно-цитоплазменным отношениям. В цитоплазме отмечалась равномерная окраска с легкой степенью базофилии. На периферии дольки видны были триады: желчный проток, междольковая артерия и вена.

При окраске по Ван Гизон в этой зоне имелись тонкие прослойки соединительной ткани с умеренным содержанием коллагеновых волокон. В рыхлой соединительной ткани между волокнами можно было видеть немногочисленные фибробласты.

При окраске прочным зеленым при pH 2,2 во всех изученных образцах общий (суммарный) белок выявлялся в цитоплазме гепатоцитов в виде равномерно окрашенной субстанции, распределенной по всей поверхности гепатоцита. При визуальном исследовании какой-либо зональности в содержании и распределении общего (суммарного) белка не выявлено.

Следовательно, пероральное введение в организм мышей исследуемых образцов разработанных 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.

3.2. Гистологическое исследование тонкого кишечника

При окраске гематоксилином и эозином во всех изученных образцах на поперечных или косых срезах можно было видеть ворсинки тонкого кишечника обычного строения в виде овальных или округлых образований. Каждая ворсинка с поверхности была выстлана однослойным цилиндрическим эпителием, состоящим из столбчатых (каемчатых) эпителиоцитов, бокаловидных и аргентафинных клеток (клеток Кульчицкого). Больше всего в эпителии можно было видеть каемчатые эпителиоциты. Каждая клетка содержала одно ядро уплощенной формы, расположенное в основании. Все ядра были заполнены эу- и гетерохроматином, примерно в равной степени. Хорошо контурировались одно – два ядрышка. Цитоплазма каемчатых эпителиоцитов была равномерно окрашена эозином с легкими признаками базофилии. Бокаловидные клетки содержались в эпителиальном пласте в небольшом количестве. Ядра – небольшие, заполненные гетерохроматином – содержались в основании клетки. Ядрышки не контурировались. Цитоплазма выглядела оптически прозрачной. Аргентафинные клетки при выбранной окраске по структуре были близки к каемчатым эпителиоцитам, но не имели на поверхности каемки.

На продольных срезах ворсинок можно было видеть крипты тонкого кишечника. В этих участках тонкого кишечника в эпителиальной выстилке кроме описанных выше клеток, встречались еще эпителиоциты, лишенные каемки и клетки с ацидофильной зернистостью (клетки Панета). Соотношение клеточных элементов – обычное.

При окраске по Ван Гизон эпителий ворсинок во всех изученных образцах лежал на базальной мембране. Под ней выявлялись тонкие коллагеновые волокна. В прослойке рыхлой соединительной ткани можно было видеть капилляры обычного размера и умеренное количество фибробластов. У основания ворсинки можно было видеть сосуд артериального типа.

При окраске прочным зеленым при рН 2,2 у всех изученных образцов на продольных и поперечных срезах тонкий кишечник имел классическую структуру. Общий (суммарный) белок был распределен по цитоплазме эпителиальных клеток равномерно. Визуально можно было отметить, что столбчатые (каемчатые), располагающиеся в свободной части ворсинки клетки содержат большее количество белка, чем аргентафинные. А бокаловидные клетки практически были лишены белка. В криптах наблюдалась аналогичная картина. Исключение составляли очень небольшое количество мелких клеток в основании крипты практически лишенных белка. Эти клетки можно отнести к малодифференцированным.

Таким образом, выявлено, что при введении рег ос 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.

3.3. Гистологическое исследование толстого кишечника

При окраске гематоксилином и эозином на продольных и поперечных срезах были видны слизистая оболочка, подслизистая основа и частично мышечная ткань. Особого внимание в нашем исследовании заслуживала эпителиальная выстилка толстого кишечника. Она была построена во всех изученных образцах по общему плану. Это – однослойный цилиндрический эпителий. По составу он сходен с эпителием тонкого кишечника. Так, здесь присутствовали столбчатые (каемчатые), клетки, лишенные каемки, и бокаловидные клетки. Бокаловидные клетки количественно преобладали. И только в дне крипт можно было видеть единичные аргентафинные клетки и клетки с ацидофильной зернистостью. Подслизистая

основа была построена из рыхлой соединительной ткани и содержала сосуды артериального и венозного звена. Кроме того, в ней содержалось небольшое количество клеточных элементов, преимущественно фибробластов. Структура мышечной оболочки – без особенностей. Построена из гладкомышечных клеток.

При окраске по Ван Гизон можно было видеть небольшое количество коллагеновых волокон малого диаметра, окрашенных в красный цвет. Различий в структуре волокон или аморфного вещества соединительной ткани, включая количество и структуру основных клеточных элементов – фибробластов, при использованных дозировках композиций не выявлено.

При окраске прочным зеленым при рН 2,2 изученные срезы (продольные и поперечные) толстого кишечника показали, что содержание общего (суммарного) белка выше в эпителиоцитах. Причем, столбчатые эпителиоциты так же, как и в тонком кишечнике, содержали большее количество белка. Поскольку основную массу эпителиального пласта толстого кишечника составляли бокаловидные клетки, эпителий был значительно светлее. Лишь у основания клеток имелось небольшое количество белка. В основании крипт можно было видеть скопления белка в клетках. В подслизистой основе можно было видеть слабую диффузную окраску. При сравнении с таковой у животных контрольной группы не было выявлено разницы.

Следовательно, проведенное нами исследование показало, что при введении всех вариантов разработанных композиций (введенных однократно) у мышей структура толстого кишечника не претерпевала морфологических изменений. Соотношение столбчатых (каемчатых), бокаловидных и бескаемчатых клеток сохранялась. Не подвергалась какому-либо отрицательному воздействию и подслизистая основа. Об этом свидетельствовали сохранность и количество коллагеновых волокон и мощность аморфного вещества соединительнотканной основы. Определение общего (суммарного) белка в эпителиоцитах различного типа не выявило существенных различий по сравнению с нормой. Но следует отметить, что содер-

жание общего белка в эпителии толстого кишечника было ниже по сравнению с тонким из-за большего количества бокаловидных клеток.

3.4. Исследование содержания гистамина в тонком кишечнике

При сравнении содержания гистамина в гомогенатах тонкого кишечника мышей инбредной линии BALB/c из разных групп экспериментальных животных установлено, что через один час после перорального введения производственных композиций на основе лактобацилл во всех опытных группах не имел статистически достоверных различий со значениями данного показателя у животных контрольной группы ($P > 0,05$) (таблица 16).

Таблица 16 – Влияние композиций на основе лактобацилл на уровень гистамина в гомогенатах тонкого кишечника мышей BALB/c

Показатель уровня гистамина	Группы экспериментальных животных				
	контрольная	опытная 1	опытная 2	опытная 3	опытная 4
Содержание гистамина в гомогенатах тонкого кишечника, нг/г ($M \pm m$)	221,4± ±16,2	217,7± ±24,2*	227,5± ±13,9*	231,3± ±15,4*	221,7± ±13,7*

Примечания:

1 номера опытных групп животных соответствуют приведенным выше номерам образцов композиций

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

* – уровень значимости различий с контрольной группой – $P > 0,05$

Следовательно, все исследуемые композиции, не вызывали в течение часа повышения содержания гистамина в тонком кишечнике используемых экспериментальных животных.

3.5. Исследование содержания гистамина в толстом кишечнике

При сравнении содержания гистамина в гомогенатах толстого кишечника мышей инбредной линии BALB/c из разных групп экспериментальных животных установлено, что через один час после перорального введения производственных композиций на основе лактобацилл во всех опытных группах не имел статистически

ски достоверных различий со значениями данного показателя у животных контрольной группы ($P>0,05$) (таблица 17).

Таблица 17 – Влияние композиций на основе лактобацилл на уровень гистамина в гомогенатах толстого кишечника мышей BALB/c

Показатель уровня гистамина	Группы экспериментальных животных				
	контрольная	опытная 1	опытная 2	опытная 3	опытная 4
Содержание гистамина в гомогенатах толстого кишечника, нг/г ($M\pm m$)	167,4± ±10,4	163,4± ±14,3*	170,8± ±9,5*	178,3± ±18,4*	174,8± ±11,6*

Примечания:

1 номера опытных групп животных соответствуют приведенным выше номерам образцов композиций

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

* – уровень значимости различий с контрольной группой – $P>0,05$

Следовательно, все исследуемые композиции, не вызывали в течение часа повышения содержания гистамина в толстом кишечнике используемых экспериментальных животных.

**Глава 4. ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ
УРОВНЯ ГИСТАМИНА В КИШЕЧНИКЕ И ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ
У ИНТАКТНЫХ МАСАСА MULATTA И ПРИ КОРРЕКЦИИ
ПРОБИОТИЧЕСКИМИ КОМПОЗИЦИЯМИ МЕТАБОЛИЗМА
ГИСТАМИНА МИКРОБИОЦЕНОЗОВ СЛИЗИСТЫХ ОБОЛОЧЕК
ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА**

4.1. Исследование показателей уровня гистамина у интактных обезьян

Для определения физиологических показателей уровня гистамина в фекалиях и в периферической крови была обследована экспериментальная популяция интактных *Mascasa mulatta*.

4.1.1. Состояние здоровья обезьян

По заключению ветеринарного врача за все дни клинического наблюдения 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.

4.1.2. Содержание гистамина в образцах от интактных обезьян

В таблице 18 приведены физиологические уровни гистамина в группе интактных макаков резусов (контрольная группа).

Таблица 18 – Концентрация гистамина в биологических образцах интактных макаков резусов

Тип биологического образца	Концентрация гистамина (M±m)
Фекалии	153,37±20,10 нг/г
Цельная периферическая кровь	19,14±2,00 нг/мл
Плазма крови	<0,12 нг/мл

Коэффициенты вариации показали сильное разнообразие концентрации гистамина в фекалиях ($CV=57,1\%$) и в цельной периферической крови ($CV=45,6\%$) у макак резусов контрольной группы.

При этом содержание гистамина в фекалиях контрольной группы обезьян не превышало показателей, определяемых в фекалиях человека при использовании ИФА (Histamine ELISA kit, 2015).

Уровень гистамина в цельной крови макак соответствовал физиологической норме этих животных, ранее описанной Almedia A.P с соавторами (1980).

При оценке данных ИФА, установлено, что уровень гистамина в плазме крови интактных макак резусов находится ниже порога чувствительности использованного набора реагентов.

4.2. Исследование показателей уровня гистамина у обезьян при коррекции пробиотическими композициями метаболизма гистамина микробиоценозов слизистых оболочек желудочно-кишечного тракта

Исследование пробиотических композиций на основе консорциума штаммов *L. helveticus NKJC*, *L. casei KAA* и *L. helveticus JCH* на экспериментальных моделях *in vivo* показало, что их однократное пероральное введение не вызывало статистически достоверного изменения содержания гистамина в тонком и толстом кишечнике. Следовательно, соотношение активности эндогенных ферментов анаболизма и катаболизма гистамина не изменялось. Поэтому было решено оценить влияние предложенных композиций на уровень экзогенного гистамина в фекалиях, обусловленный коррекцией микробиоценозов слизистых оболочек кишечника, и уровень данного биогенного амина в крови.

Исследование проводили на здоровых макаках резусах как на модели, релевантной для изучения пробиотиков. Образцы использованных пробиотических композиций имели следующие показатели:

образец композиции № 1 – композиция на основе консорциума штаммов *L. helveticus NKJC*, *L. casei KAA* и *L. helveticus JCH* в соотношении 2 : 1 : 1 соответственно, содержащая ГМС: содержание лактобацилл – 10^9 КОЕ/мл, рН 4,8, титруемую кислотность – 107°T , содержание гистамина – 226,1 нг/мл;

образец композиции № 2 – композиция на основе консорциума штаммов *L. helveticus NKJC*, *L. casei KAA* и *L. helveticus JCH* в соотношении 2 : 1 : 1 соответственно, содержащая ЛКМС: содержание лактобацилл – 10^9 КОЕ/мл, рН 4,8, титруемую кислотность – $59,5^\circ\text{T}$, содержание гистамина – 10,1 нг/мл.

образец композиции № 3 – композиция на основе консорциума штаммов *L. helveticus NKJC*, *L. casei KAA* и *L. helveticus JCH* в соотношении 2 : 1 : 1 соответственно, содержащая ГМС и 300 мкмоль/л Cu^{2+} : содержание лактобацилл – 10^9 КОЕ/мл, рН 4,9, титруемую кислотность – 105°T , содержание гистамина – 222,8 нг/мл;

образец композиции № 4 – композиция на основе консорциума штаммов *L. helveticus NKJC*, *L. casei KAA* и *L. helveticus JCH* в соотношении 2 : 1 : 1 соответственно, содержащая ЛКМС и 300 мкмоль/л Cu^{2+} : содержание лактобацилл – 10^9 КОЕ/мл, рН 4,8, титруемую кислотность – $59,3^\circ\text{T}$, содержание гистамина – 9,3 нг/мл.

При санитарно-микробиологическом исследовании образцов продукции выявлялась только технологически значимая микрофлора (лактобациллы) и не высевались индикаторные, условно патогенные и патогенные микроорганизмы.

4.2.1. Состояние здоровья обезьян

Животные были разделены на четыре группы. Номера опытных групп животных соответствовали приведенным выше номерам образцов композиций.

По заключению ветеринарного врача за все дни клинического наблюдения 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 (таблица 19).

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

Таблица 19 – Показатель общей реактивности организма обезьян

Номер обезьяны	Возраст, лет	Вес, кг	Температура тела (°C) по дням наблюдения													
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Опытная группа № 1																
36806	6,2	8,7	38,6	39,7	39,5	39,7	39,4	39,6	39,6	39,6	39,8	39,6	39,6	39,7	39,6	39,4
36604	5,3	7,8	39,7	39,4	39,7	38,5	39,6	39,3	39,7	39,7	39,3	39,4	38,4	39,4	39,4	39,6
36253	5,4	7,2	39,4	38,8	39,8	38,7	39,7	38,1	38,5	38,9	38,6	39,7	38,7	38,2	38,5	38,7
36096	5,5	10,0	38,7	38,2	38,3	39,3	39,8	38,8	39,0	39,3	38,3	39,2	38,4	39,8	38,2	39,9
36108	5,4	10,0	38,3	38,5	38,5	38,5	38,3	38,9	39,4	39,7	38,6	38,0	38,8	38,9	38,4	39,3
35673	6,3	10,1	39,7	39,6	39,7	39,0	39,6	39,5	39,2	39,5	39,4	39,4	39,3	39,0	39,8	39,4
Опытная группа № 2																
35590	6,4	10,0	38,6	38,6	39,4	38,7	38,7	38,4	38,4	38,5	38,4	38,5	38,4	38,7	38,5	38,7
35591	6,5	10,1	39,7	38,7	38,7	39,5	38,4	39,6	39,6	39,4	38,3	39,4	39,5	38,4	39,6	39,5
36349	5,1	10,2	39,4	38,4	39,8	38,7	39,7	38,7	39,7	39,6	38,5	38,6	38,8	39,6	38,3	39,6
36589	5,4	9,9	39,8	38,8	39,3	38,9	38,9	38,6	39,2	39,7	39,8	38,5	38,3	38,0	39,5	39,4
36838	5,1	9,6	39,4	38,6	39,8	39,4	38,2	39,4	39,5	39,4	38,6	39,6	39,5	38,6	39,7	39,3
36591	5,4	9,5	38,9	38,0	38,5	39,0	39,5	38,8	39,9	38,6	38,1	38,4	38,6	39,7	38,5	39,6
Опытная группа № 3																
36524	5,5	9,4	38,5	39,6	39,8	39,1	39,3	39,1	39,3	39,5	39,6	39,8	39,3	39,5	39,1	39,6
36516	5,4	7,8	39,3	39,2	39,5	38,7	39,2	39,2	39,4	39,3	39,2	39,5	38,7	39,2	39,2	39,7
36720	5,5	7,9	39,8	38,7	39,0	38,9	38,6	38,6	38,6	38,8	38,7	39,3	38,2	38,6	38,6	38,6
36618	5,4	8,0	38,4	38,6	38,5	39,5	39,2	38,7	39,8	38,4	38,8	39,5	38,6	39,1	38,7	39,8
36646	5,4	8,1	38,2	38,9	38,9	38,7	38,4	38,2	39,3	39,6	38,9	38,9	38,7	38,4	38,2	39,6
36590	5,4	8,5	39,1	39,0	39,1	39,2	39,2	39,2	39,5	39,1	39,2	39,1	39,4	39,2	39,2	39,5
36716	5,3	7,9	38,3	38,7	39,5	39,0	38,4	39,8	39,1	39,4	38,4	39,5	39,0	38,4	39,8	39,1
Опытная группа № 4																
36839	5,1	7,7	38,6	38,4	39,6	38,4	38,7	38,5	38,0	38,6	38,5	38,6	38,4	38,3	38,4	38,3
36713	5,4	7,6	39,2	38,5	38,3	39,0	38,8	39,4	39,5	39,1	38,5	39,3	39,0	38,8	39,4	39,4
35157	8,4	10,0	39,5	38,9	39,4	38,3	39,0	38,9	39,0	38,6	38,4	38,4	38,3	39,0	38,9	39,1
36651	5,4	9,8	39,1	39,2	39,5	38,7	38,8	38,7	39,1	39,1	39,4	38,9	38,4	38,5	39,4	39,3
35654	7,4	10,5	39,7	38,4	39,3	39,3	38,4	39,4	39,4	39,1	38,5	39,7	39,3	38,8	39,6	39,4
36137	6,5	9,3	38,6	38,9	38,4	39,3	39,0	38,9	39,0	38,6	38,4	38,9	38,9	39,5	38,4	39,1
35200	8,3	9,5	39,1	39,2	38,5	39,7	38,5	38,4	39,1	39,1	39,2	38,9	38,7	38,6	38,9	39,2

Примечание – номера опытных групп животных соответствуют приведенным выше номерам образцов композиций

4.2.2. Содержание гистамина в фекалиях

С учетом большого разброса содержания гистамина в фекалиях и цельной периферической крови, установленного при обследовании макак резусов в контрольной группе, была проведена целевая выборка обезьян и сформированы четыре опытные группы. Для обеспечения оценки физиологического влияния пробиотических композиций на снижение уровня гистамина в организме в опытные группы обезьян 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 контрольной группе 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 цельной периферической крови ($P > 0,05$), но с уменьшенным по сравнению с контрольной группой разбросом содержания гистамина в фекалиях и цельной периферической крови и соответственно с меньшими значениями коэффициентов вариации этих показателей.

Средние концентрации гистамина в фекалиях макак опытных групп № 1, № 2, № 3 и № 4 до введения пробиотиков были равны $173,8 \pm 20,3$ нг/г ($CV=26,1\%$), $165,8 \pm 15,4$ нг/г ($CV=20,7\%$), $173,1 \pm 12,1$ нг/г ($CV=17,1\%$) и $170,6 \pm 14,7$ нг/г ($CV=21,1\%$) соответственно. При сравнении содержания гистамина в фекалиях обезьян из разных групп экспериментальных животных до введения пробиотических композиций и в фекалиях группы контрольных животных установлено отсутствие статистически значимых различий ($P > 0,05$) (таблица 20) (Рубальский Е.О. с соавт., 2015).

Таблица 20 – Средние показатели уровня гистамина в фекалиях обезьян

Контрольная точка	Средняя концентрация гистамина, нг/г (M±m)			
	Опытная группа № 1	Опытная группа № 2	Опытная группа № 3	Опытная группа № 4
До введения	173,8±20,3	165,8±15,4	173,1±12,1	170,6±14,7
После 7 суток	168,9±8,4*	152,1±14,7*	134,6±12,3*	134,5±14,3*
После 14 суток	153,9±10,8*	143,7±8,7*	133,7±1,7**	134,1±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% (таблица 21).

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 21 – Сила влияния фактора перорального введения 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±0,099	0,048±0,095	0,328±0,056	0,232±0,064
После 14 суток	0,082±0,092	0,158±0,084	0,505±0,041*	0,374±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 – $P > 0,05$).

4.2.3. Содержание гистамина в периферической крови

Исходное содержание гистамина в цельной периферической крови макак резусов опытных групп № 1, № 2, № 3 и № 4 не имело значимых различий ($P > 0,05$) и составляло $20,9 \pm 1,4$ нг/мл ($CV=14,9\%$), $21,0 \pm 0,9$ нг/мл ($CV=10,0\%$), $19,3 \pm 1,0$

нг/мл ($CV=13,2\%$), $18,7\pm 0,8$ нг/мл ($CV=9,9\%$) соответственно. Эта концентрация соответствовала физиологической норме содержания гистамина в крови, установленной для контрольной группы животных ($P>0,05$) (таблица 22) (Рубальский Е.О. с соавт., 2015).

Таблица 22 – Средние показатели уровня гистамина в цельной периферической крови обезьян

Контрольная точка	Средняя концентрация гистамина, нг/мл ($M\pm m$)			
	Опытная группа № 1	Опытная группа № 2	Опытная группа № 3	Опытная группа № 4
До введения	$20,9\pm 1,4$	$21,0\pm 0,9$	$19,3\pm 1,0$	$18,7\pm 0,8$
После 7 суток	$19,6\pm 0,9^*$	$19,9\pm 0,7^*$	$18,2\pm 1,4^*$	$18,3\pm 0,5^*$
После 14 суток	$21,0\pm 1,9^*$	$20,8\pm 1,0^*$	$19,8\pm 0,8^*$	$19,7\pm 1,7^*$

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

Статистически недостоверное ($P>0,05$) снижение уровня гистамина в крови было установлено во всех опытных группах макаков 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 не наблюдалась через 7 суток после прекращения дачи пробиотических композиций. Напротив, средние значения концентрации гистамина 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 ($CV=20,9\%$).

Также в опытных группах животных не установлено значимого влияния 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

но 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% (таблица 23).

Таблица 23 – Сила влияния фактора перорального введения пробиотических композиций на уровень гистамина в цельной периферической 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	0,066±0,093	0,213±0,079	0,034±0,08	0,019±0,082
После 14 суток	0,001±0,1	0,03±0,1	0,016±0,082	0,028±0,081

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

Таким образом при сравнении содержания гистамина в цельной крови обезьян из всех групп экспериментальных животных во всех контрольных точках установлено, что 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) также, как и при исследовании уровня этого биогенного амина у интактных макаков резусов.

Динамика уровней гистамина в стуле и цельной периферической крови макаков резусов опытных групп визуально отражена на рисунках 3-6 (Рубальский Е.О. с соавт., 2015).

Таким образом динамика содержания гистамина в цельной крови не была однонаправленной с динамикой этого биогенного амина в фекалиях опытных животных.

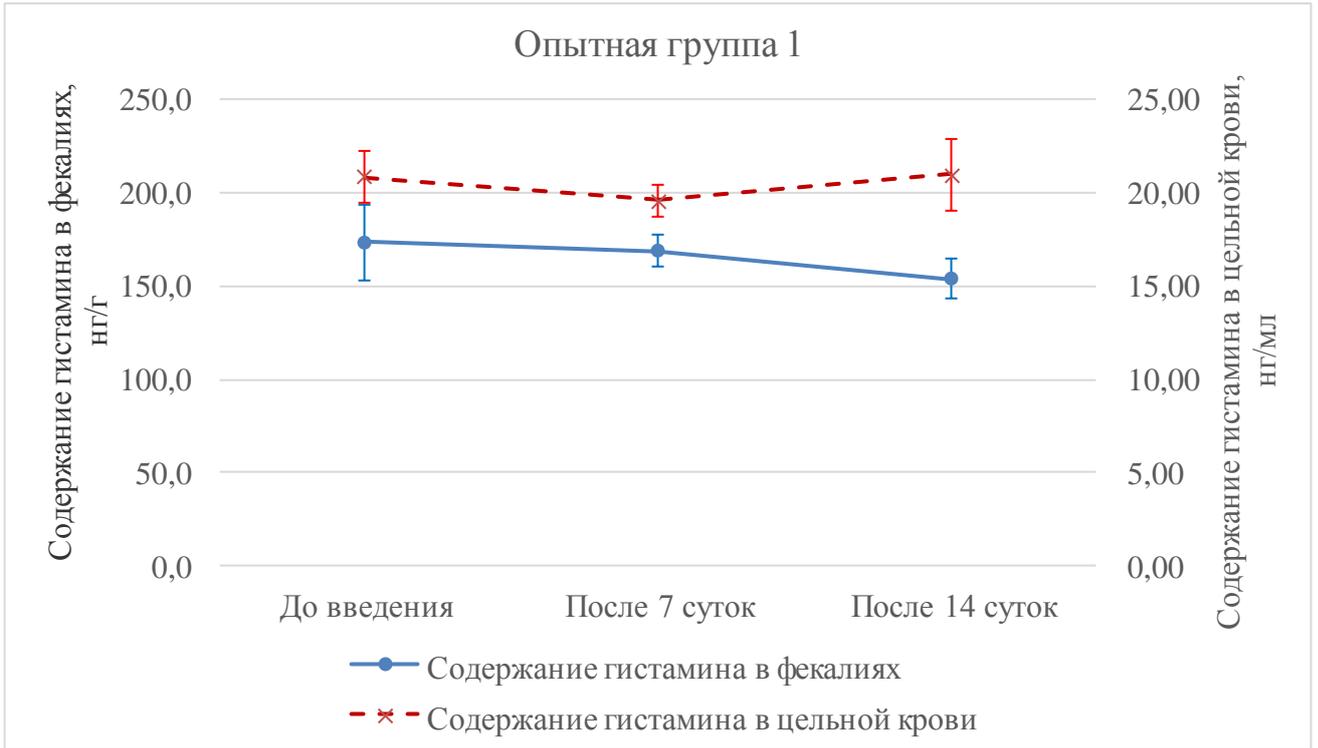


Рисунок 3 – Динамика содержания гистамина у макак опытной группы № 1

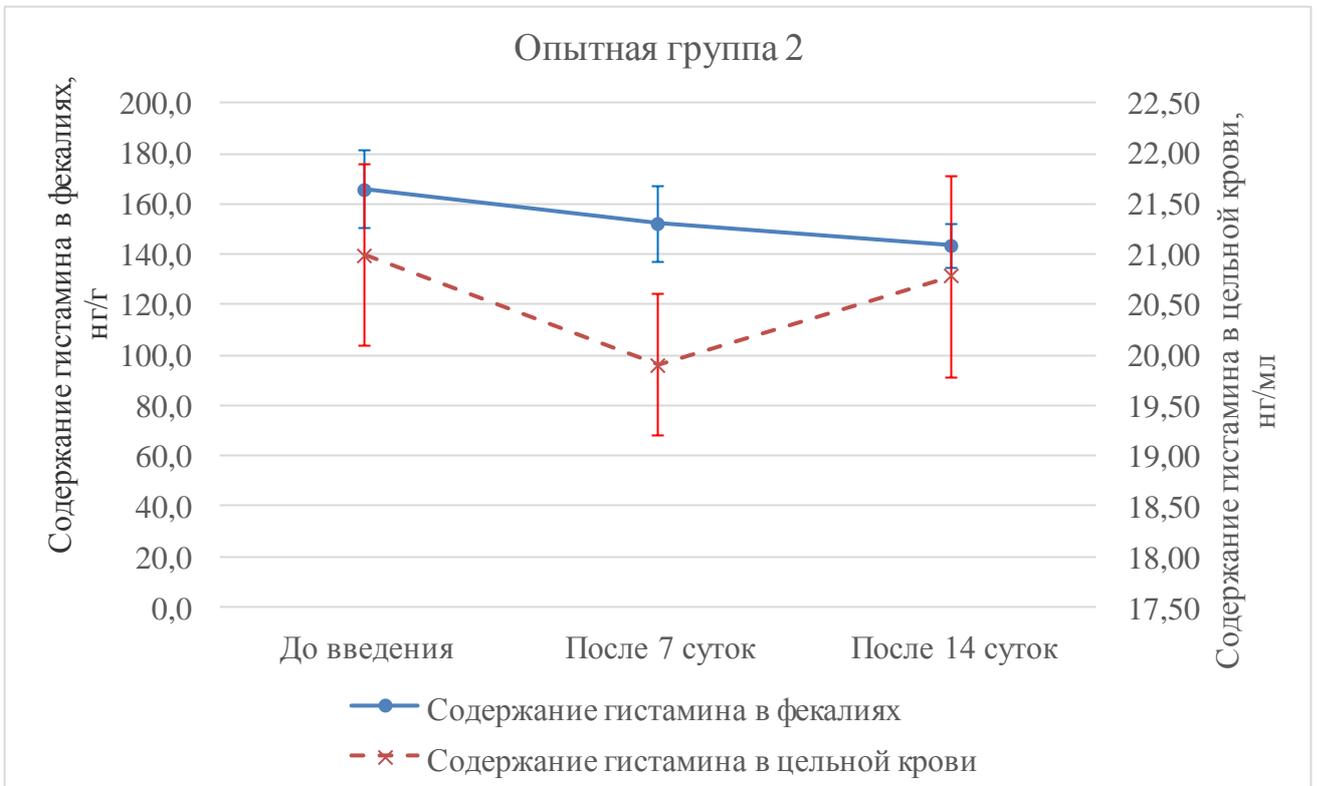


Рисунок 4 – Динамика содержания гистамина у макак опытной группы № 2

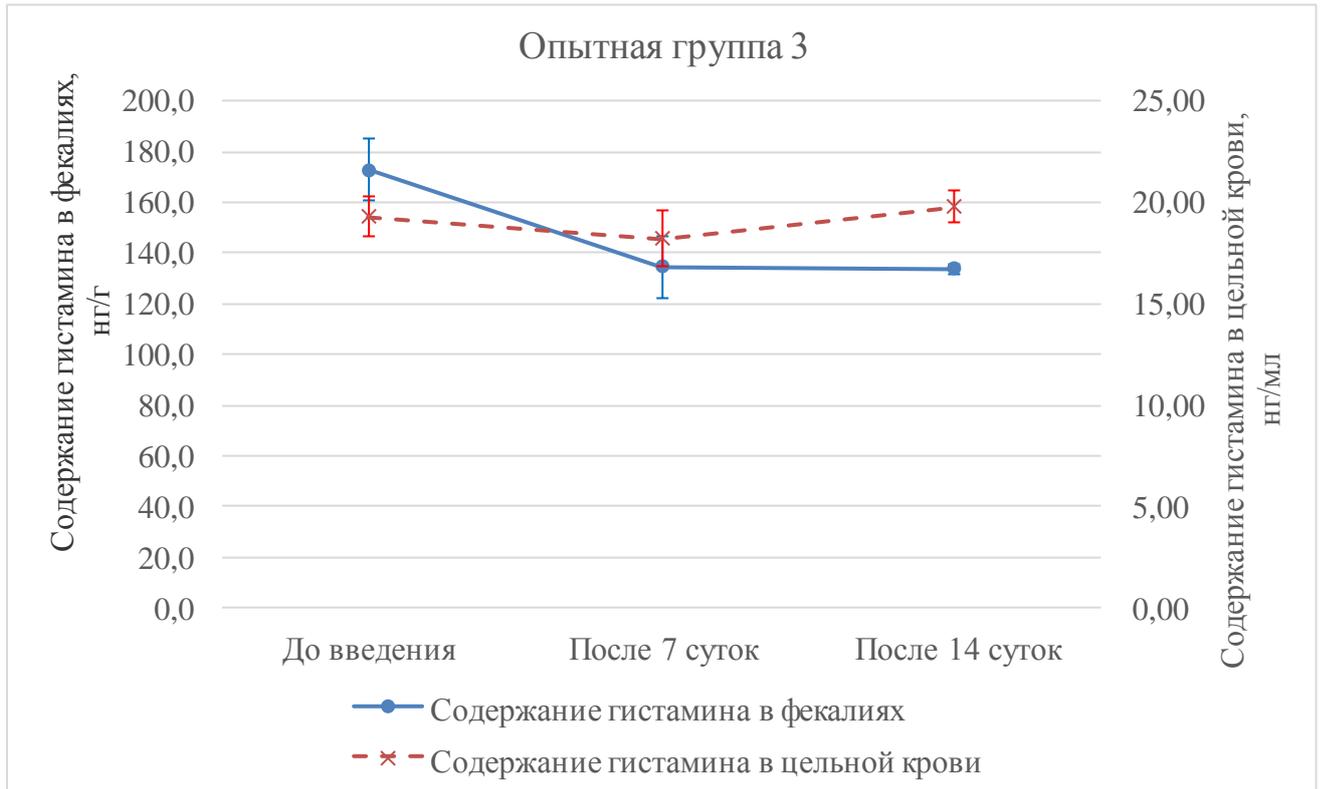


Рисунок 5 – Динамика содержания гистамина у макак опытной группы № 3

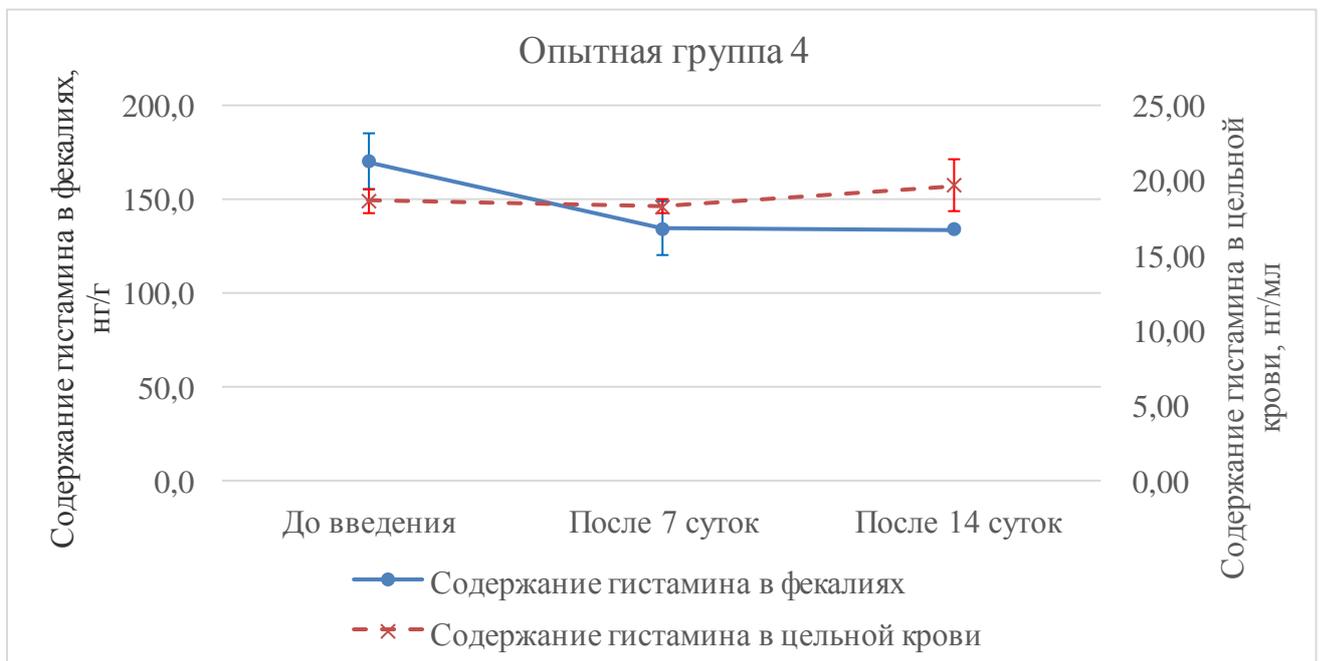


Рисунок 6 – Динамика содержания гистамина у макак опытной группы № 4

4.2.4. 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.

Исходное содержание базофилов в периферической крови макак резусов опытных групп № 1, № 2, № 3 и № 4 составляло $0,063 \pm 0,009 \times 10^9/\text{л}$, $0,045 \pm 0,004 \times 10^9/\text{л}$, $0,063 \pm 0,008 \times 10^9/\text{л}$, $0,056 \pm 0,002 \times 10^9/\text{л}$ соответственно. Динамика концентрации базофилов в крови животных представлена в таблице 24.

Таблица 24 – Динамика среднего количества базофилов в периферической крови обезьян

Контрольная точка	Среднее количество базофилов, $10^9/\text{л}$ ($M \pm m$)			
	Опытная группа № 1	Опытная группа № 2	Опытная группа № 3	Опытная группа № 4
До введения	$0,063 \pm 0,009$	$0,045 \pm 0,004$	$0,063 \pm 0,008$	$0,056 \pm 0,002$
После 7 суток	$0,072 \pm 0,013^*$	$0,058 \pm 0,013^*$	$0,057 \pm 0,012^*$	$0,050 \pm 0,003^*$
После 14 суток	$0,060 \pm 0,009^*$	$0,038 \pm 0,004^*$	$0,064 \pm 0,008^*$	$0,043 \pm 0,002^*$

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

Статистически недостоверное ($P > 0,05$) снижение количества базофилов было установлено во всех опытных группах животных: в опытных группах №1 и №2 – через 14 суток после начала эксперимента, в опытной группе № 3 – через 7 суток после начала эксперимента и в опытной 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 25).

Таблица 25 – Динамика процентного содержания базофилов в периферической крови обезьян

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 – $P < 0,001$

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 – $P < 0,05$, $\eta_x^2 = 38,5\%$, опытная группа № 4 – $P < 0,001$.

4.2.5. Анализ динамики микрофлоры продуцирующей гистамин

Посев фекалий обезьян опытных групп во всех контрольных точках позволяет проследить динамику изменений кишечной микрофлоры (таблица 26) (Рубальский Е.О. с соавт., 2015).

Таблица 26 – 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 опускались ниже показателей, характерных для клинически здоровых обезьян семейства мартышковых (Дарсания М.Ш., 2000).

До введения пробиотических композиций содержание бактерий рода *Bifidobacterium* в фекалиях обезьян опытных групп № 1, № 2, № 3 и № 4 составляло 8,6±0,4 lg КОЕ/г, 9,2±0,4 lg КОЕ/г, 9,0±0,5 lg КОЕ/г, 9,1±0,4 lg КОЕ/г соответственно. В опытных группах № 1, № 2 и № 3 отмечалось повышение количества бифидобактерий через 7 суток после ежедневного введения пробиотиков до уровня 10,0±0,1 lg КОЕ/г, 10,0±0,1 lg КОЕ/г и 9,9±0,2 lg КОЕ/г соответственно. Еще

через 7 суток (после отмены дачи пробиотиков) титр бифидобактерий у животных опытных групп № 2, № 3 и № 4 достигал $10,0 \pm 0,1$ lg КОЕ/г.

Средние значения титра бактерий рода *Lactobacillus* в опытных группах № 1 и № 2 не имели статистически значимых различий во всех контрольных точках. У обезьян опытной группы № 3 содержание лактобацилл в фекалиях исходно составляло $8,9 \pm 0,6$ lg КОЕ/г, через 7 суток после введения пробиотической композиции – $9,3 \pm 0,3$ lg КОЕ/г и через 14 суток – $9,7 \pm 0,3$ lg КОЕ/г. Средняя концентрация лактобацилл у животных опытной группы № 4 составляла до введения пробиотика – $9,3 \pm 0,5$ lg КОЕ/г, после 7 суток введения – $8,7 \pm 0,4$ lg КОЕ/г и через 14 суток – $9,7 \pm 0,3$ lg КОЕ/г.

Количество кишечной палочки (*E. coli*) в фекалиях животных до введения пробиотиков в опытных группах № 1, № 2, № 3 и № 4 составляло $5,8 \pm 0,7$ lg КОЕ/г, $5,7 \pm 0,5$ lg КОЕ/г, $5,4 \pm 0,6$ lg КОЕ/г и $5,7 \pm 0,6$ lg КОЕ/г соответственно. Через 7 суток ежедневного введения пробиотических композиций этот показатель составлял $5,4 \pm 0,7$ lg КОЕ/г, $5,3 \pm 0,5$ lg КОЕ/г, $5,1 \pm 0,4$ lg КОЕ/г и $5,6 \pm 0,5$ lg КОЕ/г соответственно, а еще через 7 суток после отмены пробиотиков $5,2 \pm 0,6$ lg КОЕ/г, $6,3 \pm 0,4$ lg КОЕ/г, $6,9 \pm 0,4$ lg КОЕ/г, $6,4 \pm 0,3$ lg КОЕ/г соответственно.

Содержание в фекалиях макак резусов бактерий рода *Staphylococcus* снижалось на фоне дачи пробиотических композиций во всех опытных группах. Снижение количества стафилококков также наблюдалось после отмены дачи пробиотических композиций. До введения композиций на основе лактобацилл у нескольких обезьян были обнаружены бактерии вида *S. aureus*: в опытной группе № 2 – 2 обезьяны с титром по $5,0$ lg КОЕ/г; в опытной группе № 3 – 1 обезьяна с титром $4,0$ lg КОЕ/г; в опытной группе № 4 – 2 обезьяны с титром $4,0$ lg КОЕ/г и $6,0$ lg КОЕ/г. После 7 суток введения композиций у этих животных произошла элиминация золотистого стафилококка, эффект которой сохранялся и через 7 суток после отмены дачи пробиотиков.

Также наблюдалось снижение количества бактерий рода *Proteus* в фекалиях опытных групп животных № 1, № 2 и № 4. До введения композиций протей был

обнаружен у нескольких обезьян: в опытной группе № 1 – 3 обезьяны с титром 3,0 lg КОЕ/г, 3,0 lg КОЕ/г, 4,0 lg КОЕ/г; в опытной группе № 2 – 1 обезьяна с титром 3,0 lg КОЕ/г; в опытной группе № 4 – 2 обезьяны с титром по 4,0 lg КОЕ/г. Через 7 суток после ежедневного введения композиций протей высевался только у 1 обезьяны из опытной группы № 1, не высевался у животных опытной группы № 2 и высевался в меньшем титре у обезьян опытной группы № 4.

Бактерии рода *Clostridium* были выявлены у нескольких животных из всех опытных групп до начала введения пробиотических композиций на основе лактобацилл: в опытной группе № 1 – 4 обезьяны с титром 5,0 lg КОЕ/г, 5,0 lg КОЕ/г, 5,0 lg КОЕ/г и 4,0 lg КОЕ/г; в опытной группе № 2 – 4 обезьяны с титром 7,0 lg КОЕ/г, 6,0 lg КОЕ/г, 5,0 lg КОЕ/г и 5,0 lg КОЕ/г; в опытной группе № 3 – 2 обезьяны с титром 4,0 lg КОЕ/г и 7,0 КОЕ/г; в опытной группе № 4 – 1 обезьяна с титром 8,0 КОЕ/г. После 7 суток введения пробиотических композиций клостридии были обнаружены только у 1 обезьяны из опытной группы № 2. Через 7 суток после отмены композиций эти бактерии не были высеяны ни у одного животного.

Таким образом 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 опытных групп № 1 и № 2. Однако для обеспечения достоверного снижения уровня этого биогенного амина, которое наблюдалось у макак опытных групп № 3 и № 4 необходимо поддержание стабильных свойств консорциума по снижению уровня этого биогенного амина. Штаммы введенных композиций влияют на гистаминообразующую способность микроорганизмов микробиоценоза кишечника обезьян. Ранее было показано, что получение обезьянами пробиотика на основе лактобацилл сопровождается появлением и стимуляцией новых пробиотических штаммов в их кишечнике (Онищенко Г.Г. с соавт., 2002).

**Глава 5. ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ
ИММУНОГЛОБУЛИНОВОГО ЗВЕНА ГУМОРАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА
У ИНТАКТНЫХ МАКАСА МУЛАТТА И ПРИ КОРРЕКЦИИ
ПРОБИОТИЧЕСКИМИ КОМПОЗИЦИЯМИ МЕТАБОЛИЗМА
ГИСТАМИНА МИКРОБИОЦЕНОЗОВ СЛИЗИСТЫХ ОБОЛОЧЕК
ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА**

5.1. Исследование уровней иммуноглобулинов у интактных животных

Концентрация сывороточных IgG, IgA и IgM обследованных интактных макак резусов (контрольная группа) по данным РИД составляла $26,69 \pm 1,34$ г/л (CV=21,9%), $3,46 \pm 0,18$ г/л (CV=22,8%) и $1,39 \pm 0,13$ г/л (CV=40,5%) соответственно. Концентрация иммуноглобулинов в сыворотке крови у животных контрольной группы по данным ИФА сильно варьировала и составляла: IgG – $13,92 \pm 2,2$ г/л (CV=68,9%), IgG1 – $9,19 \pm 1,45$ г/л (CV=68,9%), IgA – $2,6 \pm 0,5$ г/л (CV=84,7%), IgM – $1,37 \pm 0,3$ г/л (CV=96,0%) и IgE – $1,9 \pm 0,5$ мг/л (CV=115,9%). Следовательно, для повышения информативности оценки физиологического влияния факторов на концентрацию иммуноглобулинов в крови у обезьян данного вида целесообразно отбирать животных таким образом, чтобы в формируемых группах был минимально возможный разброс концентраций определяемых иммуноглобулинов.

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).

5.2. Исследование уровней иммуноглобулинов при коррекции пробиотическими композициями метаболизма гистамина микробиоценозов слизистых оболочек желудочно-кишечного тракта

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).

5.2.1. Уровни сывороточных иммуноглобулинов по данным РИД

Средние концентрации IgG в сыворотке крови макак резусов из опытных групп во всех контрольных точках не имели статистически значимых различий с уровнем этого иммуноглобулина у контрольной группы животных ($P > 0,05$) (таблица 27).

Таблица 27 – Средние показатели уровня IgG в сыворотке крови обезьян по данным РИД

Контрольная точка	Средняя концентрация IgG, г/л ($M \pm m$)			
	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*	30,46±3,56*

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

Концентрация IgG в сыворотке крови при использовании метода РИД до введения пробиотических композиций у животных опытных групп № 1, № 2, № 3 и № 4 имели значения 25,02±2,23 г/л, 26,49±2,9 г/л, 28,66±2,4 г/л и 24,67±2,14 г/л соответственно. После введения пробиотических композиций в течение 7 суток уровень IgG в крови составлял 26,27±2,04 г/л, 27,75±3,07 г/л, 30,85±3,84 г/л и 23,26±1,82 г/л соответственно. Через 14 суток после начала эксперимента количество IgG было на уровне 26,44±2,32 г/л, 25,21±2,78 г/л, 30,46±3,56 г/л и 30,46±3,56

г/л соответственно. Таким образом по данным РИД не было обнаружено статистически достоверных изменений уровня антител этого класса в сыворотке крови макак резусов, получавших пробиотические композиции.

Показатели силы влияния (η_x^2) пробиотических композиций на уровень IgG в сыворотке крови макак резусов как через 7, так и через 14 суток эксперимента по данным РИД были низкими и составляли: в опытной группе № 1 – 2,0% и 2,3% соответственно, в опытной группе № 2 – 1,1% и 1,2% соответственно, в опытной группе № 3 – 2,2% и 1,7% соответственно, в опытной группе № 4 – 2,4% и 3,9% ($P>0,05$).

Концентрация сывороточного IgA по данным РИД у макак из опытных групп во всех контрольных точках не имели статистически значимых различий с уровнем иммуноглобулина этого класса у контрольной группы животных ($P>0,05$) (таблица 28).

Таблица 28 – Средние показатели уровня IgA в сыворотке крови обезьян по данным РИД

Контрольная точка	Средняя концентрация IgA, г/л ($M\pm m$)			
	Опытная группа № 1	Опытная группа № 2	Опытная группа № 3	Опытная группа № 4
До введения	3,08±0,24	3,84±0,42	3,29±0,36	3,68±0,28
После 7 суток	3,36±0,27*	4,41±0,54*	3,95±0,27*	4,01±0,31*
После 14 суток	3,33±0,31*	4,2±0,4*	3,79±0,29*	3,77±0,35*

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

Уровни сывороточного IgA до введения пробиотических композиций у животных опытных групп № 1, № 2, № 3 и № 4 имели значения 3,08±0,24 г/л, 3,84±0,42 г/л, 3,29±0,36 г/л и 3,68±0,28 г/л соответственно. После введения пробиотических композиций в течение 7 суток концентрация IgA в крови составляла 3,36±0,27 г/л, 4,41±0,54 г/л, 3,95±0,27 г/л и 4,01±0,31 г/л соответственно. Через 14 суток после начала эксперимента количество иммуноглобулина этого класса было на уровне 3,33±0,31 г/л, 4,2±0,4 г/л, 3,79±0,29 г/л и 3,77±0,35 г/л соответственно. Таким образом статистически достоверных изменений количества сывороточного

IgA не наблюдалось как на фоне введения пробиотических композиций, так и после их отмены ($P>0,05$).

По данным, полученным методом РИД, установлены следующие показатели силы влияния (η_x^2) пробиотических композиций на уровень IgA в сыворотке крови макак резусов через 7 и через 14 суток эксперимента: в опытной группе № 1 – 6,3% и 4,7% соответственно, в опытной группе № 2 – 7,6% и 4,2% соответственно, в опытной группе № 3 – 17,8% и 10,5% соответственно, в опытной группе № 4 – 5,9% и 0,4% ($P>0,05$).

Количественный анализ IgM с использованием метода РИД показал в крови обезьян из опытных групп во всех контрольных точках отсутствие статистически значимых различий с уровнем иммуноглобулина этого класса контрольной группы интактных животных ($P>0,05$) (таблица 29).

Таблица 29 – Средние показатели уровня IgM в сыворотке крови обезьян по данным РИД

Контрольная точка	Средняя концентрация IgM, г/л ($M\pm m$)			
	Опытная группа № 1	Опытная группа № 2	Опытная группа № 3	Опытная группа № 4
До введения	1,67±0,24	1,33±0,3	1,1±0,1	1,52±0,2
После 7 суток	1,65±0,18*	1,38±0,3*	1,0±0,09*	1,4±0,2*
После 14 суток	1,64±0,21*	1,35±0,32*	0,97±0,11*	1,43±0,21*

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

Концентрация IgM в крови до дачи пробиотиков у обезьян опытных групп № 1, № 2, № 3 и № 4 составляла 1,67±0,24 г/л, 1,33±0,3 г/л, 1,1±0,1 г/л и 1,52±0,2 г/л соответственно. Через 7 суток ежедневного введения пробиотических композиций концентрация IgM в крови животных составляла 1,65±0,18 г/л, 1,38±0,3 г/л, 1,0±0,09 г/л и 1,4±0,2 г/л соответственно. Через 7 суток после отмены пробиотиков количество IgM было на уровне 1,64±0,21 г/л, 1,35±0,32 г/л, 0,97±0,11 г/л и 1,43±0,21 г/л соответственно. Таким образом статистически достоверных изменений количества IgM в сыворотке крови макак не наблюдалось во всех контрольных точках эксперимента ($P>0,05$).

Установленные по данным, полученным при помощи метода РИД, показатели силы влияния (η_x^2) пробиотических композиций на уровень IgM в сыворотке крови макак резусов как через 7, так и через 14 суток эксперимента были низкими и составляли: в опытной группе № 1 – 0,04% и 0,08% соответственно, в опытной группе № 2 – 0,2% и 0,03% соответственно, в опытной группе № 3 – 5,6% и 7,4% соответственно, в опытной группе № 4 – 1,8% и 0,9% ($P > 0,05$).

5.2.2. Уровни сывороточных иммуноглобулинов по данным ИФА

Средние концентрации IgG в сыворотке крови макак резусов из опытных групп во всех контрольных точках не имели статистически значимых различий с уровнем этого иммуноглобулина у контрольной группы животных ($P > 0,05$) (таблица 30).

Таблица 30 – Средние показатели уровня IgG в сыворотке крови обезьян по данным ИФА

Контрольная точка	Средняя концентрация IgG, г/л (M±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 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 – $P < 0,05$

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 $15,34 \pm 1,48$ г/л и $15,81 \pm 1,12$ 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.

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 под влиянием изучаемого фактора (таблица 31).

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).

Таблица 31 – Сила влияния фактора перорального введения пробиотических композиций на уровень IgG в сыворотке крови обезьян по данным ИФА

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	$0,315 \pm 0,068$	$0,0002 \pm 0,1$	$0,221 \pm 0,065$	$0,009 \pm 0,083$
После 14 суток	$0,393 \pm 0,061^*$	$0,013 \pm 0,099$	$0,449 \pm 0,046^*$	$0,008 \pm 0,083$

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

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 32 и 33).

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 32 – Средние показатели уровня IgG1 в сыворотке крови обезьян по данным ИФА

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 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 – $P < 0,05$

Таблица 33 – Сила влияния фактора перорального введения пробиотических композиций на уровень IgG1 в сыворотке крови обезьян по данным ИФА

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 32).

Концентрация сывороточного IgA у макак из опытных групп во всех контрольных точках не имели статистически значимых различий с уровнем иммуноглобулина этого класса у контрольной группы животных ($P>0,05$) (таблица 34).

Таблица 34 – Средние показатели уровня IgA в сыворотке крови обезьян по данным ИФА

Контрольная точка	Средняя концентрация IgA, г/л ($M\pm m$)			
	Опытная группа № 1	Опытная группа № 2	Опытная группа № 3	Опытная группа № 4
До введения	2,75±0,18	2,86±0,35	2,91±0,15	2,48±0,21
После 7 суток	2,5±0,2*	2,94±0,06*	2,88±0,2*	2,81±0,17*
После 14 суток	2,74±0,21*	2,79±0,34*	2,8±0,27*	2,72±0,18*

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

Уровни сывороточного IgA до введения пробиотических композиций у животных опытных групп № 1, № 2, № 3 и № 4 имели значения 2,75±0,18 г/л, 2,86±0,35 г/л, 2,91±0,15 г/л и 2,48±0,21 г/л соответственно. После введения пробиотических композиций в течение 7 суток концентрация IgA в крови составляла 2,5±0,2 г/л, 2,94±0,06 г/л, 2,88±0,2 г/л и 2,81±0,17 г/л соответственно. Через 14 суток после начала эксперимента количество иммуноглобулина этого класса было на уровне 2,74±0,21 г/л, 2,79±0,34 г/л, 2,8±0,27 г/л и 2,72±0,18 г/л соответственно. Таким образом статистически достоверных изменений количества сывороточного IgA не наблюдалось как на фоне введения пробиотических композиций, так и после их отмены ($P>0,05$).

Кроме того, установлены очень низкие показатели силы влияния пробиотических композиций на уровень IgA в сыворотке крови макак резусов как через 7, так и через 14 суток эксперимента: в опытной группе № 1 – 9,5% и 0,04% соответственно, в опытной группе № 2 – 0,6% и 0,3% соответственно, в опытной группе № 3 – 0,2% и 1,1% соответственно, в опытной группе № 4 – 12,4% и 6,7% ($P>0,05$).

Количественный анализ IgM в крови обезьян из опытных групп во всех контрольных точках показал отсутствие статистически значимых различий с уровнем иммуноглобулина этого класса контрольной группы интактных животных ($P>0,05$) (таблица 35).

Таблица 35 – Средние показатели уровня IgM в сыворотке крови обезьян по данным ИФА

Контрольная точка	Средняя концентрация IgM, г/л (M±m)			
	Опытная группа № 1	Опытная группа № 2	Опытная группа № 3	Опытная группа № 4
До введения	1,51±0,31	1,63±0,31	1,33±0,16	1,45±0,16
После 7 суток	1,6±0,24*	1,4±0,2*	1,22±0,14*	1,46±0,13*
После 14 суток	1,44±0,21*	1,47±0,32*	1,24±0,2*	1,34±0,22*

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

Концентрация IgM в крови до дачи пробиотиков у обезьян опытных групп № 1, № 2, № 3 и № 4 составляла 1,51±0,31 г/л, 1,63±0,31 г/л, 1,33±0,16 г/л и 1,45±0,16 г/л соответственно. Через 7 суток ежедневного введения пробиотических композиций концентрация IgM в крови животных составляла 1,6±0,2 г/л, 1,4±0,2 г/л, 1,22±0,14 г/л и 1,46±0,13 г/л соответственно. Через 7 суток после отмены пробиотиков количество IgM было на уровне 1,44±0,21 г/л, 1,47±0,32 г/л, 1,24±0,2 г/л и 1,34±0,22 г/л соответственно. Таким образом статистически достоверных изменений количества IgM в сыворотке крови макак не наблюдалось во всех контрольных точках эксперимента ($P>0,05$).

Показатели силы влияния пробиотических композиций на уровень IgM в сыворотке крови макак резусов как через 7, так и через 14 суток эксперимента

были низкими и составляли: в опытной группе № 1 – 0,6% и 0,4% соответственно, в опытной группе № 2 – 4,3% и 1,6% соответственно, в опытной группе № 3 – 2,8% и 1,2% соответственно, в опытной группе № 4 – 0,02% и 1,4% соответственно ($P>0,05$).

Средние показатели IgE в сыворотке крови макак резусов из опытных групп во всех контрольных точках эксперимента не имели статистически значимых различий с уровнем иммуноглобулина этого класса контрольной группы интактных животных ($P>0,05$) (таблица 36).

Таблица 36 – Средние показатели уровня IgE в сыворотке крови обезьян по данным ИФА

Контрольная точка	Средняя концентрация IgE, мг/л ($M\pm m$)			
	Опытная группа № 1	Опытная группа № 2	Опытная группа № 3	Опытная группа № 4
До введения	1,72±0,78	1,58±0,73	1,85±0,65	1,89±0,88
После 7 суток	1,81±0,86	1,71±0,67	1,83±0,61	1,97±0,87
После 14 суток	1,64±0,76	1,69±0,8	1,78±0,6	1,94±0,85

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

Содержание IgE в сыворотке крови до введения пробиотиков обезьянам опытных групп № 1, № 2, № 3 и № 4 было на уровне 1,72±0,78 мг/л, 1,58±0,73 мг/л, 1,85±0,65 мг/л и 1,89±0,88 мг/л соответственно. Через 7 суток ежедневной дачи пробиотических композиций концентрация IgE в крови животных составляла 1,81±0,86 мг/л, 1,71±0,67 мг/л, 1,83±0,61 мг/л и 1,97±0,87 мг/л соответственно. По прошествии 14 суток эксперимента (через 7 суток после отмены пробиотиков) концентрация IgE была на уровне 1,64±0,76 мг/л, 1,69±0,8 мг/л, 1,78±0,6 мг/л и 1,94±0,85 мг/л соответственно. Таким образом статистически достоверных изменений количества IgE в сыворотке крови макак резусов опытных групп не наблюдалось во всех контрольных точках ($P>0,05$).

Были выявлены низкие показатели силы влияния пробиотических композиций на уровень IgE в сыворотке крови макак резусов как через 7, так и через 14 суток эксперимента, составлявшие: в опытной группе № 1 – 0,07% и 0,06% соот-

ответственно, в опытной группе № 2 – 0,2% и 0,1% соответственно, в опытной группе № 3 – 0,008% и 0,07% соответственно, в опытной группе № 4 – 0,04% и 0,01% соответственно ($P > 0,05$).

5.3. 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 7-9).

Аминокислотная дистанция между группой Fc фрагментов IgG1 макак резусов и группой человека составила 0,093 замены (рисунок 7). При этом аминокислотные дистанции внутри этих групп не превышают 0,0078 (у макак резусов) и 0,0088 (у человека).

Генетическая дистанция между группами аминокислотных последовательностей Fc фрагментов IgA человека и макак резусов составляет 0,0888 замены (рисунок 8). Однако аминокислотные дистанции внутри этих групп достигают 0,0322 (у человека) и 0,0452 (у макак резусов).

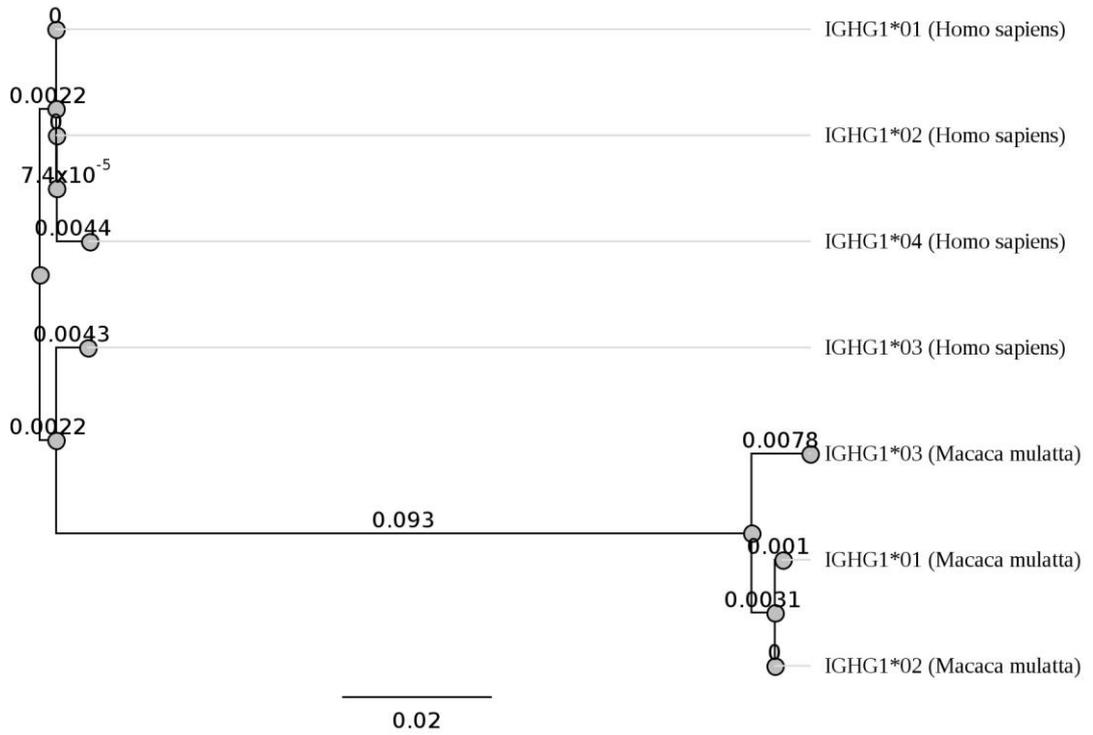


Рисунок 7 – Филогенетическое дерево Fc фрагментов IgG1

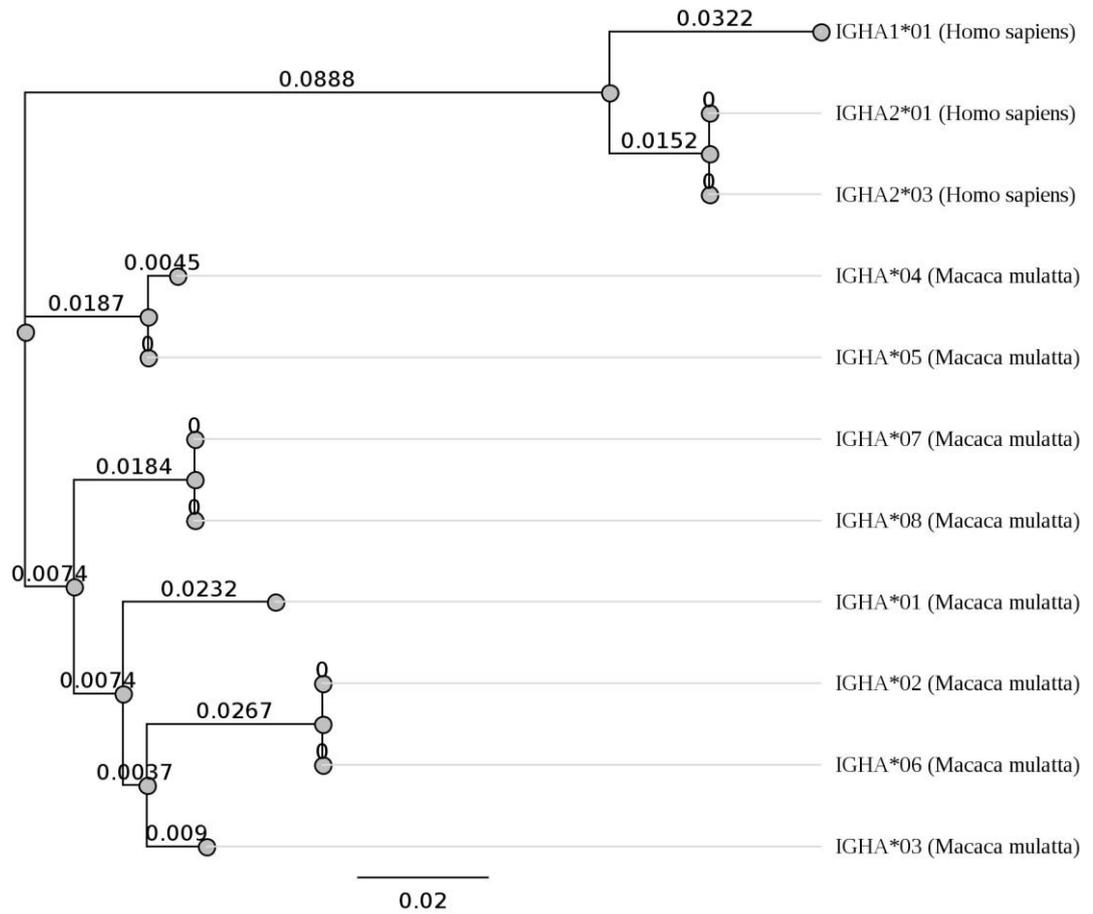


Рисунок 8 – Филогенетическое дерево Fc фрагментов IgA

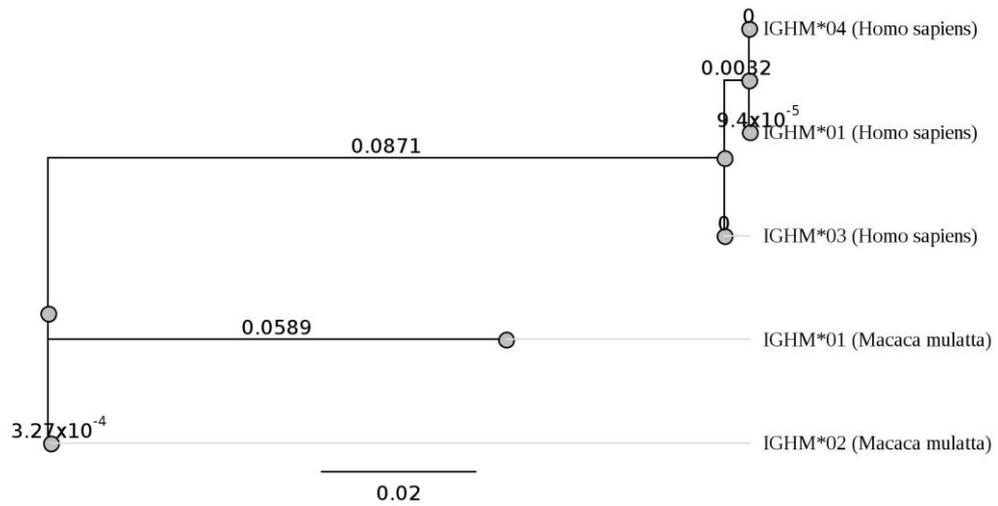


Рисунок 9 – Филогенетическое дерево Fc фрагментов IgM

Генетическая дистанция первичной структуры Fc фрагментов IgM между последовательностями человека и обезьян составляет 0,0871 аминокислотных замены (рисунок 9). Однако аминокислотные дистанции между Fc фрагментами обезьян достигают 0,0589, в то время как у человека не превышают 0,0032.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разнообразие симптомов и синдромов, опосредованных повышенным уровнем гистамина в организме, подтверждают актуальность разработки средств, снижающих пул этого биогенного амина в организме. Наиболее подходящей моделью *in vivo* исследования разрабатываемых средств являются обезьяны. Кроме того обезьяны являются наиболее адекватной моделью для изучения состояний, связанных с изменением многих компонентов иммунной системы, в том числе гуморального звена иммунитета.

В учреждениях, содержащих обезьян и предоставляющих условия по выполнению работ на этих экспериментальных животных, возможно создание условий для стандартизации планируемых исследований. Одним из таких условий является коррекция микробиоценозов открытых полостей организма.

Поэтому нами была поставленная задача по разработке пробиотических композиций, способных решать вышеуказанные проблемы. В основе композиций было предложено использовать консорциум штаммов лактобацилл для обеспечения антагонистической активности в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, в том числе продуцирующих гистамин. Соотношение штаммов в консорциуме было подобрано таким образом, чтобы обеспечивать снижение гистамина в среде культивирования. Дополнительно свойства консорциума были стабилизированы и усилены добавлением в среду культивирования катионов меди (II) в физиологически приемлемой концентрации. Cu^{2+} при этом выполняют функцию ингибитора синтеза гистамина и являются фактором ферментативного разрушения гистамина.

Безопасность и перспективность использования разработанных пробиотических композиций была подтверждена *in vivo* на модельных животных мышах инбредной линии BALB/c. По данным Zimmermann A.S. с соавторами (2011) концентрация гистамина тонком кишечнике мышей этой линии увеличивается с возрастом и составляет в возрасте 5-9 недель – $1,3 \pm 0,3$ пмоль/мг, 10-14 недель –

2,5±1,0 пмоль/мг, 15-19 недель – 4,7±2,2 пмоль/мг, 20-24 недели – 7,0±2,1 пмоль/мг, что в пересчете на единицы массы составляет 144,5±33,3 нг/г, 277,9±111,2 нг/г, 522,4±244,5 нг/г, 778,1±233,4 нг/г соответственно.

Концентрация гистамина в тонком и толстом кишечнике мышей контрольной группы в настоящей работе составляла 221,4±16,2 нг/г и 167,4±10,4 нг/г соответственно. Все исследуемые композиции, не вызывали в течение часа повышения содержания гистамина в тонком и толстом кишечнике используемых экспериментальных животных (уровень значимости различий с контрольной группой $P > 0,05$). Проведенное нами исследование также показало, что при использовании всех исследованных композиций (введенных однократно) у мышей структура тонкого и толстого кишечника не претерпевала морфологических изменений. Таким образом введенные однократно *per os* мышам образцы композиций не вызывали токсического действия на организм животных и повышения пула гистамина в кишечнике.

В ходе проведенных исследований нами были установлены физиологические показатели концентрации гистамина в крови и в фекалиях у здоровых интактных макак резусов, содержащихся в Научно-исследовательском институте медицинской приматологии. Полученные данные содержания гистамина в крови соответствуют ранее описанным концентрациям этого биогенного амина в крови макак резусов в норме (Almeida A.P. et al, 1980; Lorenz W. et al., 1974). Следует отметить, что концентрация гистамина в крови интактных здоровых макак резусов не превышает верхнюю границу нормы, характерную для человека (Горячкина Л.А. с соавт., 2009). Это подтверждает обоснованность использования модели макак резусов для исследования динамики гистамина в норме и перспективность интерпретации полученных данных в отношении организма человека.

Нам не удалось найти в доступной литературе ранее описанных концентраций гистамина в нормальном стуле макак резусов. Известно, что у человека концентрация гистамина в кале может сильно варьировать от рациона питания и микрофлоры, колонизирующей желудочно-кишечный тракт. Так повышение концен-

трации гистамина в стуле может наблюдаться не только при поступлении с пищей исходно высокого количества этого биогенного амина, но и при сочетанном поступлении пищи, богатой аминокислотой гистидином (прежде всего животного происхождения), и наличием в кишечнике микроорганизмов, обладающих гистидин-декарбоксилазной активностью (Вайсфельд И.Л., Кассиль Г.Н., 1981; Ворopaева Е.А., 2002; Joneja J.M., 2004). Относительно низкий и стабильный уровень гистамина в фекалиях интактных макак резусов можно объяснить постоянством состава корма и пониженным содержанием в нем животного белка по сравнению с нормальным питанием человека.

Перорально введенные макакам резусам разработанные пробиотические композиции обеспечивали корригирование микробиоценоза кишечника, направленное в том числе на элиминацию патогенных и условно-патогенных бактерий, способных продуцировать гистамин. Однако достоверное снижение концентрации гистамина в фекалиях обеспечивали только композиции на основе ГМС, ЛКМС с добавлением Cu^{2+} . Кроме того, данное снижение уровня гистамина носило отсроченный характер и проявлялось через неделю после 7 суток ежедневного введения композиций. Поэтому можно предположить, что достоверная коррекция уровня гистамина в содержимом кишечника возможна при сочетанной элиминации или снижении титра микроорганизмов, потенциально продуцирующих этот биогенный амин, и колонизацией слизистых оболочек микроорганизмами, которые стабильно снижают его концентрацию *in vitro*.

Ни одна из разработанных композиций не обеспечивала снижение гистамина в периферической крови обезьян. Однако композиции на основе ЛКМС и ЛКМС с добавлением Cu^{2+} обеспечивали процентное снижение базофилов в периферической крови, которое также было отсроченным. Основываясь на данном эффекте, а также принимая во внимание особенности состава и низкую концентрацию гистамина в ЛКМС можно сделать заключение о наличии тенденции снижения пула связанного гистамина в периферической крови макак при введении композиций на основе этой питательной среды.

Макаки резусы имеют высокую степень гомологии аминокислотных последовательностей иммуноглобулинов по сравнению с человеком. Например подклассы IgG макак резусов отличаются от аналогичных подклассов человека лишь на несколько аминокислот и процент идентичности СН доменов составляет: IgG1 – 89,9%, IgG2 – 88,0%, IgG3 – 92,9%, IgG4 – 91,4%. Однако большинство аминокислот являются функционально консервативными (Scinicariello F. et al., 2004), а значит даже небольшие замены могут повлиять на их антигенные свойства. Тем не менее некоторые авторы в исследованиях Ig обезьян используют диагностикумы, разработанные для исследования антител человека. Для получения наиболее объективных результатов мы проводили исследование иммуноглобулинов макак резусов как с использованием наборов, разработанных для оценки Ig обезьян Старого Света, так и с использованием диагностикума для определения концентрации Ig человека. Это исследование также позволило определить возможные преимущества и ограничения обоих подходов.

Средняя концентрация IgG по данным РИД (диагностикум содержал антитела против Н- и L-цепей IgG) как у интактных животных контрольной группы, так в опытных группах превышала показатель этого иммуноглобулина по данным ИФА (набор содержал антитела против Fc фрагментов IgG). Аналогичное заключение можно сделать, проанализировав работы ряда авторов, использовавших различные диагностикумы (Monte-Wicher V. et al., 1970; Challacombe S.J., Russell M.W., 1979; Miller C.J. et al., 1992; Lü F.X. et al., 1999; Lü X.S., Miller C.J., 1996). Этот феномен можно объяснить тем, что диагностикум для постановки РИД имеет в своем составе антитела против Н- и L-цепей IgG, а значит способные также связываться с κ или λ цепями, которые являются общими для всех классов иммуноглобулинов организма. Следовательно, у такого типа диагностикумов может быть небольшая перекрестная реакция с другими антителами.

С использованием наборов ИФА для определения концентрации иммуноглобулинов обезьян Старого Света было установлено достоверное повышение

IgG и IgG1 в крови макак через неделю после 7 суток перорального введения пробиотических композиций на основе ГМС и ГМС с добавлением Cu^{2+} .

Ранее на модели мышей показано наличие иммуномодулирующих и гипоаллергенных свойств гидролизата молочного белка (Pan D.D. et al., 2013). Возможно выявленное нами физиологическое повышение IgG у макак резусов объясняется наличием в питательной среде ГМС гидролизатов белков молока. Однако Pan D.D. с соавторами не наблюдали достоверного повышения IgG на фоне дачи гидролизата белка молока. Поэтому вероятно разработанный и используемый нами консорциум лактобацилл усиливает и закрепляет свойство пробиотической композиции физиологично повышать IgG в сыворотке крови.

Нами не было выявлено достоверного повышения IgG при использовании метода РИД, а также не было выявлено достоверных изменений концентрации других иммуноглобулинов при использовании методов ИФА и РИД.

Известно, что гены, кодирующие СН домены классов и подклассов иммуноглобулинов человека и макак резусов, имеют достаточно большое количество различных аллелей. В настоящее время в Международной информационной системе иммуногенетики IMGT (<http://www.imgt.org>) следующее количество полных или частичных последовательностей аллелей генов, кодирующих СН домены антител:IGHG1 человека – 5, IGHA1 человека – 2, IGHA2 человека – 3, IGHM человека – 4, IGHG1 макак резусов – 3, IGHA макак резусов – 20, IGHM макак резусов – 2. Такое разнообразие генетического материала с одной стороны обеспечивает внутривидовую вариабельность, а с другой может затруднить количественное определение антител.

Для подтверждения объективности данных, полученных с использованием методов РИД и ИФА, было проведено филогенетическое исследование полных аминокислотных последовательностей Fc фрагментов IgG1, IgA и IgM человека и макак резусов, имеющихся в открытом доступе. Проведенный анализ позволил 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 видоспецифических антигенов, 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 *Musca 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 *Musca mulatta* по данным радиальной иммунодиффузии с использованием диагностикума для *Нomo 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
ДНК –	дезоксирибонуклеиновая кислота
ИФА –	иммуноферментный анализ
КОЕ –	колониеобразующая единица
ЛКМС –	лимоннокислотная молочная сыворотка
МРС –	среда Мозера-Рогоза-Шарпа
РИД –	радиальная иммунодиффузия
сут. –	сутки
C _H –	константный домен тяжелой цепи иммуноглобулина
C _L –	константный домен легкой цепи иммуноглобулина
Cu ²⁺ –	катионы меди двухвалентной (II)
CuSO ₄ · 5H ₂ O –	меди сульфат пентаводный
CV –	коэффициент вариации
E. –	<i>Escherichia</i>
Fab –	fragment antigen binding – антигенсвязывающий фрагмент
Fc –	fragment cristallizable – кристаллизующийся фрагмент
H –	тяжелая цепь иммуноглобулина
Ig –	иммуноглобулин
IgA –	иммуноглобулин класса A
IgA1 –	иммуноглобулин подкласса A1
IgA2 –	иммуноглобулин подкласса A2
IgD –	иммуноглобулин класса D
IgE –	иммуноглобулин класса E
IgG –	иммуноглобулин класса G
IgG1 –	иммуноглобулин подкласса G1
IgG2 –	иммуноглобулин подкласса G2
IgG3 –	иммуноглобулин подкласса G3

IgG4 –	иммуноглобулин подкласса G4
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 M
L –	легкая цепь иммуноглобулина
L. –	<i>Lactobacillus</i>
M –	среднее арифметическое
m –	ошибка репрезентативности
n –	число образцов
P –	уровень значимости
S. –	<i>Staphylococcus</i>
V _H –	вариабельный домен тяжелой цепи иммуноглобулина
V _L –	вариабельный домен легкой цепи иммуноглобулина
η_x^2 –	показатель силы влияния фактора
σ –	среднее квадратическое отклонение

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алешкин, А.В. Поликомпонентные пробиотические препараты – конструирование, производство и стратегия их продвижения на российском фармацевтическом рынке: дисс. ... д-ра биол. наук. – М., 2011. – 297 с.
2. Алешукина, А.В. Отношения микроб-хозяин в биотопах толстой кишки при дисбактериозах: дисс. ... д-ра мед. наук. – М., 2012. – 237 с.
3. Амерханова, А.М. Научно-производственная разработка новых препаратов-синбиотиков и клинико-лабораторная оценка их эффективности: автореф. дисс. ... д-ра биол. наук. – М., 2009. – 49 с.
4. Ардатская, М.Д. Пре- и пробиотики в коррекции микрoэкологических нарушений кишечника / М.Д. Ардатская // Фарматека. – 2011. – № 12 (225). – С. 62-68.
5. Беляева, Е.А. Микробиота кишечника коренного жителя Центрального федерального округа Российской Федерации как основа для создания региональных пробиотических препаратов: дисс. ... канд. биол. наук. – Тверь, 2014. – 118 с.
6. Ботина, С.Г. Классификация отечественных пробиотических культур рода *Lactobacillus* / С.Г. Ботина, К.М. Климина, Н.В. Коробан, В.В. Зинченко, В.Н. Даниленко // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2010. – № 5. – С. 3-7.
7. Вайсфельд, И.Л. Гистамин в биохимии и физиологии / И.Л. Вайсфельд, Г.Н. Кассиль. – М.: Наука, 1981. – 278 с.
8. Воробьев, А.А. Иммунология и аллергология (цветной атлас): учебное пособие для студентов медицинских вузов / А.А. Воробьев, А.С. Быков, А.В. Караулов, С.А. Быков, М.Я. Корн / под ред. А.А. Воробьева, А.С. Быкова, А.В. Караулова – М.: Практическая медицина, 2006. – 288 с.
9. Воропаева, Е.А. Микробная экология и гистаминообразующая активность микроорганизмов задней стенки глотки детей, больных бронхиальной астмой: дисс. ... канд. биол. наук. – М., 2002. – 139 с.

10. Глушанова, Н.А. Биологические свойства лактобацилл / Н.А. Глушанова // Бюллетень сибирской медицины. – 2003. - № 4. – С. 50-58.
11. Гончарова, Г.И. Инструкция по приготовлению кисломолочного бифидум-бактерина на молочных кухнях / Г.И. Гончарова, Л.П. Семенова, А.М. Лян-ная, Э.П. Козлова. – М. : Министерство здравоохранения РСФСР, 1987. – 11 с.
12. Горкин, В.З. Система аминоксидаз: современные достижения в исследова-ниях природы, функций и их нарушений: обзор / В.З. Горкин, Л.Н. Овчини-кова // Вопросы медицинской химии. – 1993. – № 4. – С. 2-10.
13. Горячкина, Л.А. Клиническая аллергология и иммунология: руководство для практикующих врачей / Л.А. Горячкина и др. / под ред. Л.А. Горячкиной, К.П. Кашкина. – М.: Миклош, 2009. – 432 с.
14. ГОСТ 10444.11-89 Продукты пищевые. Методы определения молочнокислых микроорганизмов. – М., 1989. – 13 с.
15. ГОСТ 10444.12-88 Продукты пищевые. Метод определения дрожжей и плес-невых грибов. – М., 1988. – 6 с.
16. ГОСТ 30347-97 Молоко и молочные продукты. Методы определения *Staphylococcus aureus*. – М., 1997. – 8 с.
17. ГОСТ 30648.4-99 Продукты молочные для детского питания. Титриметриче-ские методы определения кислотности. – М.: ИПК Издательство стандартов, 1999. – 9 с.
18. ГОСТ 30648.5-99 Продукты молочные для детского питания. Метод опреде-ления активной кислотности. – М.: ИПК Издательство стандартов, 1999. – 7 с.
19. ГОСТ Р 52814-2007 Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода *Salmonella*. – М., 2008. – 23 с.
20. ГОСТ Р 52816-2007 Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий). – М., 2008. – 19 с.

21. Грачева, Н.М. Микробная экология и состояние слизистой оболочки желудочно–кишечного тракта у больных аллергическими заболеваниями / Н.М. Грачева, Н.А. Колганова, И.Т. Щербаков // Журнал микробиологии. – 2004. – № 1. – С. 79-81.
22. Гущин, И.С. Устранение неизбежности аллергического ответа / И.С. Гущин // Пульмонология. – 2010. – № 4. – С. 23-33.
23. Дарсания, М.Ш. Микрофлора кишечника обезьян и доклиническое изучение лечебных биопрепаратов: дисс. ... канд. биол. наук. – М., 2000. – С. 46-52.
24. Даудова, А.Д. Использование пробиотиков при аллергических болезнях / А.Д. Даудова, И.Н. Григорьева // Естественные науки. – 2014. – № 1(46). – С. 54-59.
25. Джикидзе, Э.К. Использование обезьян как модели для оценки эффективности микробных биопрепаратов при заболеваниях, связанных с дисбактериозом / Э.К. Джикидзе, С.А. Шагинян, В.В. Поспелова и др. // Вестник АМН СССР. – 1986. – №3. – С.74-77.
26. Егорова, Т.П. Роль паразитарных инвазий в возникновении острых кишечных заболеваний у обезьян / Т.П. Егорова, Т.И. Кебу // Фундаментальные и прикладные проблемы медицины и биологии в опытах на обезьянах. Материалы международной научной конференции, 19-22 сентября 2007 года. – Сочи-Адлер, 2007. – С. 125-132.
27. Ермоленко Е.И. Молочнокислые бактерии: индивидуальные особенности действия на патогенные микроорганизмы, макроорганизм и его микробиоту: дисс. ... д-ра мед. наук. – СПб, 2009. – 275 с.
28. Забирова, Т.М. Биологические свойства лактобацилл биотопов человека в норме и при дисбиозах: дисс. ... канд. мед. наук. – Оренбург, 2001. – 148 с.
29. Зарудий, Ф.С. Гистамин и противогистаминные средства. – Уфа: Башкортостан, 1995. – 224 с.
30. Зильбернагель, С. Наглядная физиология / С. Зильбернагель, А. Деспопулос; пер. с англ. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2013. – 408 с.

31. Караулов, А.В. Клиническая иммунология / А.В. Караулов, А.М. Земсков, В.М. Земсков / под ред. А.В. Караулова. – М.: Медицинское информационное агентство, 1999. – 604 с.
32. Кебу, Т.И. Сравнительное изучение кишечного биоценоза у обезьян в норме и при патологии / Т.И. Кебу, Э.К. Джикидзе, З.К. Стасилевич // Сб. тез. докл. Рос. конф. «Организм и окружающая среда: жизнеобеспечение и защита человека в экстремальных условиях» (26-29 сентября 2000, Москва). – М., 2000. – С. 233-235.
33. Ключева, Л.А. Микрoэкологические нарушения и их коррекция при хроническом рецидивирующем афтозном стоматите (на примере г. Сургута): автореф. дисс. ... канд. мед. наук. – Сургут, 2008. – 124 с.
34. Козлов, Л.В. Исследование функциональной активности компонентов и факторов системы комплемента человека / Л.В. Козлов // Вопросы медицинской химии. – 2002. – Т. 48. – № 6. – С. 634.
35. Кудрявцева, А.В. Атопический дерматит у детей и подростков / А.В. Кудрявцева // Медицинский совет. – 2010. – № 5.– С. 78-86.
36. Кузнецов, А.П. Физиология иммунной системы: монография / А.П. Кузнецов, А.В. Грязных, Н.В. Сажина – Курган: Изд-во Курганского гос. ун-та, 2015. – 150 с.
37. Кулакова, Ю.В. Разработка поликомпонентного метаболитного пробиотика для наружного применения на основе лактобацилл: автореф. дисс. ... канд. биол. наук. – М., 2013. – 24 с.
38. Куяров, А.В. Микробная экология детей Севера (клиника нарушений, диагностика, коррекция): монография / А.В. Куяров, Г.Н. Куярова, Л.А. Ключева. – Ханты-Мансийск: Полиграфист, 2008. – 100 с.
39. Куяров, А.В. Пробиотическая микробиология на службе здоровья жителей Севера: монография / А.В. Куяров, А.А. Куяров, Г.Н. Куярова, З.Н. Низамутдинова, С.Н. Нохрина, Л.А. Сайгушева, Д.А. Сухарев. – Сургут: ИЦ СурГУ, 2013. – 223 с.

40. Лакин, Г.Ф. Биометрия: Учебное пособие для биологических специальностей вузов – 4-е издание, переработанное и дополненное / Г.Ф. Лакин. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
41. Лапин, Б.А. Проблемы инфекционной патологии обезьян / Б.А. Лапин, Э.К. Джикидзе, Р.И. Крылова, З.К. Стасилевич, Л.А. Яковлева. – М.: Издательство РАМН, 2004. – 140 с.
42. Лапин, Б.А. Руководство по медицинской приматологии / Б.А. Лапин, Э.К. Джикидзе, Э.П. Фридман. – М.: Медицина, 1987. – 192 с.
43. Латышева, Т.В. Принципы заместительной терапии внутривенными иммуноглобулинами / Т.В. Латышева // Цитокины и воспаление – 2005. – Т. 4, № 3. – С. 58-62.
44. Лахтин, М.В. Защита потенциальных антител человека от протеолиза секретами клинических штаммов кандид в присутствии лектинов пробиотических бактерий человека / М.В. Лахтин, Л.В. Козлов, В.М. Лахтин, В.А. Алешкин, С.С. Афанасьев, А.В. Караулов, Ю.В. Несвижский, А.Л. Байракова, Е.А. Воропаева, М.С. Афанасьев, А.М. Бичучер, Р.Л. Панурина, Е.О. Рубальский // Астраханский медицинский журнал. – 2012. – Т. 7, № 1. – С. 63-68.
45. Лебедев, К.А. Иммунология образраспознающих рецепторов: Интегральная иммунология / К.А. Лебедев, И.Д. Понякина. – М.: Книжный дом «Либроком», 2013. – 256 с.
46. Ленцнер, А.А. Видовой состав лактофлоры кишечника здоровых макаков резусов / А.А. Ленцнер, Х.П. Ленцнер, М.Э. Микельсаар, М.Э. Тюри, А.А. Трошин, Э.Р. Тарк, В.М. Князев, В.И. Корольков, Н.Н. Лизько, Л.Н. Петрова // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1989. – № 6. – С. 11-15.
47. Ленцнер, А.А. Лактофлора кишечника макаков резусов и ее изменения в ходе полетов на биоспутниках «Космос» / А.А. Ленцнер, Х.П. Ленцнер, В.М. Князев // Биоспутники «Космос». Тез. докл. международного симпозиума. МЗ

- СССР, Межведомственный научно-технический совет по космическим исследованиям. – М., 1991. – С.70-71.
48. Лукашов В.В. Молекулярная эволюция и филогенетический анализ / В.В. Лукашов. – М.: Бином. Лаборатория знаний, 2009. – 257 с. – ISBN 978-5-9963-0114-0.
 49. Ляшенко, А.В. Пространственная структура медных полиядерных оксидов – лакказ *Corgiolus zonatus* и *Cerrena maxima*: автореф. дисс. ... канд. хим. наук. – М.: 2006. – 22 с.
 50. Макаров, П.О. Методики нейродинамических исследований и практикум по физиологии анализаторов человека / Макаров П.О. – М.: Государственное издательство «Высшая школа», 1959. – 269 с.
 51. Марко, М. Иммуномодулирующие пробиотические молочно-кислые бактерии: пат. № 2535974 Рос. Федерация / М. Марко, Й. Снел, М. Клеребезем, П.Ф. Зуурендонк, Х.Ф.Й. Савелкаул – № 2009128209/10; заявл. 21.12.07; опубл. 20.12.14, Бюл. № 35.
 52. Матвеева, Н.И. Клинико-бактериологические и иммунологические характеристики аллергического ринита на Севере и влияние на них экологических факторов жилища: дисс. ... канд. мед. наук. – Сургут, 2005. - 124 с.
 53. Матуа, А.З. Сравнительно-возрастные аспекты иммунного статуса низших обезьян (макак резусов и павианов гамадрилов) // Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук. – Санкт-Петербург, 2010. – 148 с.
 54. Матуа, А.З. Показатели специфического и неспецифического иммунитета у макак-резусов в сравнительно-возрастном аспекте / А.З. Матуа, З.В. Шевцова // Кубанский научный медицинский вестник. – 2007. – С. 98-101.
 55. Менье, А. Штамм *Lactobacillus delbrueckii*, снижающий содержание холестерина в крови: пат. 2539785 Рос. Федерация / А. Менье, Ф. Лаланн, К. Николль, А. Хлебников, К. Гайе. – № 2011124924/10; заявл. 19.11.09; опубл. 27.01.2015, Бюл. № 3.

56. Методические рекомендации по изучению общетоксического действия фармакологических средств. Утверждены Управлением государственного контроля лекарственных средств и медицинской техники Минздрава России 29.12.1997. – URL: <http://www.medline.ru/public/fund/pharmcom/3.phtml> (дата обращения: 15.10.2015).
57. МУК 2.3.2.721-98 Пищевые продукты и пищевые добавки. Определение безопасности и эффективности биологически активных добавок к пище. – М., 1998. – 50 с.
58. Онищенко, Г.Г. Иммунобиологические препараты и перспективы их применения в инфектологии / Г.Г. Онищенко, В.А. Алешкин, С.С. Афанасьев и др. / под ред. Г.Г. Онищенко, В.А. Алешкина, С.С. Афанасьева, В.В. Поспеловой – М.: ГОУ ВУНМЦ МЗ РФ, 2002. – 608 с.
59. ОСТ 91500.11.0004-2003 // Отраслевой стандарт. Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника. – 2003. – URL: www.rspor.ru/db_standarts/PVB_disbacterioz.doc (дата обращения: 10.12.2015).
60. Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных. Утверждены приказом МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 // «ВИТА» центр защиты прав животных – Эксперименты на животных. – URL: <http://www.vita.org.ru/exper/order-peotrovsky.htm> (дата обращения: 15.10.2015).
61. Р 4.1.1672-03 Методы контроля. Химические факторы. Руководство по методам контроля качества и безопасности биологически активных добавок к пище. – 2003. – URL: <http://rudocor.net/medicine/bz-bw/med-amjuc/pg-20.htm> (дата обращения 15.10.2015).
62. Ревякина, В.А. Пищевая аллергия у детей. Актуальная проблема современности / В.А. Ревякина, А.Г. Сурков, К.Н. Шарапова // Вопросы практической педиатрии. – 2009. – Т. 4, № 1. – С. 55-65.
63. Романенко, Э.Е. Микрофлора слизистой носа при аллергическом круглогодичном и инфекционном рините / Э.Е. Романенко, А.П. Батуро, М.А. Мокро-

- носова // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2003. – № 3. – С. 66-71.
64. Рубальский, Е.О. Влияние пробиотических композиций на физиологические показатели пула гистамина *Mascaca 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.
65. Савченко, Т.Н. Микроэкология новорожденных: автореф. дисс. ... докт. мед. наук. – Волгоград, 2011. – 37 с.
66. Соловьева, И.В. Биологические свойства лактобацилл. перспективы использования в лабораториях Роспотребнадзора экспресс-методов амплификации нуклеиновых кислот при контроле качества пищевых продуктов, БАД к пище, лекарственных форм, содержащих лактобациллы (аналитический обзор) / И.В. Соловьева, А.Г. Точилина, И.В. Белова, Н.А. Новикова, Т.П. Иванова // Журнал МедиАль. – 2014. – № 2(12). – С. 29-44.
67. СП 1045-73 Санитарные правила по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев) // Россельхознадзор – Нормативные документы. – URL: <http://www.fsvps.ru/fsvps/laws/182.html> (дата обращения: 15.10.2015).
68. Ткаченко, Е.И. Питание, микробиоценоз и интеллект человека / Е.И. Ткаченко, Ю.П. Успенский. – СПб.: СпецЛит, 2006. – 590 с.
69. Точилина, А.Г. Биохимическая и молекулярно-генетическая идентификация бактерий рода *Lactobacillus*: автореф. дисс. ... канд. биол. наук. – Нижний Новгород, 2009. – 25 с.
70. Тюрин, Ю.А. Роль факторов патогенности золотистых стафилококков в развитии атопического дерматита / Ю.А. Тюрин, Д.А. Долбин // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2008. – № 4. – С. 105-110.

71. Ускова, М.А. Изучение свойств пробиотических молочнокислых бактерий как биологически активных компонентов пищи: дисс. ... канд. биол. наук. – М., 2010. – 178 с.
72. Хаитов, Р.М. Аллергические болезни в России на рубеже веков. Оценка ситуации в 21 веке / Р.М. Хаитов, Н.И. Ильина // Вестник Санкт–Петербургской государственной медицинской академии им. И.И. Мечникова. – 2005. – № 1. – С. 170-176.
73. Харева, А.Г. Содержание гистамина в кисломолочной продукции / А.Г. Харева, Д.С. Тышкевич, А.А. Куяров, А.Р. Овчиникова, Т.Н. Новицкая // Сборник научных трудов биологического факультета. Выпуск 5. Сургутский государственный университет ХМАО-Югры. – Сургут: ИЦ СурГУ, 2008. – С. 161-162.
74. Шендеров, Б.А. Штамм бактерий *Lactobacillus helveticus* ГКНМ 147, обладающий способностью снижать уровень холестерина в крови и используемый для получения препаратов и продуктов питания для профилактики и лечения гиперхолестеринемий: пат. № 2072692 Рос. Федерация / Б.А. Шендеров, И.В. Волосникова, Н.Г. Рахимова, Е.М. Горская. – № 94013100/13; заявл. 13.04.94; опубл. 27.01.97.
75. Шендеров, Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание. Том. I: Микрофлора человека и животных и ее функции / Б.А. Шендеров. – М.: ГРАНТЬ, 1998. – С. 21-27.
76. Шендеров, Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание. Том. III: Пробиотики и функциональное питание / Б.А. Шендеров. – М.: ГРАНТЬ, 2001. – С. 75-93.
77. Шишов, В.А. Нейромедиаторные амины, их предшественники и продукты окисления в культуре *Escherichia coli* K-12 / В.А. Шишов, Т.А. Кировская, В.С. Кудрин, А.В. Олескин // Прикладная биохимия и микробиология. – 2009. – Т. 45, № 5 – С. 550-554.

78. Черешнев, В.А. Физиология иммунной системы и экология / В.А. Черешнев, Н.Н. Кеворков, Б.А. Бахметьев, С.В. Ширшев, Ю.И. Шилов, К.В. Шмагель, В.А. Демаков, М.В. Черешнева, И.А. Тузанкина, А.В. Осипенко, М.Б. Раев, Л.Б. Королевская, Е.А. Старкова, О.Н. Баданина, И.В. Ширшева // Иммунология – 2001. – № 3. – С. 12-16.
79. Ющук, Н.Д. Острые кишечные инфекции: диагностика и лечение. / Н.Д. Ющук, Л.Е. Бродов. – М. Медицина, 2001. – С. 248.
80. Abo-Amer, A.E. Molecular characterization of antimicrobial compound produced by *Lactobacillus acidophilus* AA11 / A.E. Abo-Amer // *Acta microbiologica et immunologica Hungarica*. – 2007. – V. 54, № 2. – P. 107-119.
81. Almeida, A.P. Distribution of histamine and histaminase (diamine oxidase) in blood of various species / A.P. Almeida, W. Flye, D. Deveraux, Z. Horakova, M.A. Beaven // *Comp. Biochem. Physiol.* – 1980. – V. 67C, № 2. – P. 187-190.
82. Bailey, M.T. Intestinal microbial patterns of the common marmoset and rhesus macaque / M.T. Bailey, C.L. Coe // *Comp. Biochem. Physiol A Mol. Integr. Physiol.* – 2002. – V. 133, № 2. P. 379-388.
83. Bals, R. Rhesus monkey (*Macaca mulatta*) mucosal antimicrobial peptides are close homologues of human molecules / R. Bals, C. Lang, D.J. Weiner, C. Vogelmeier, U. Welsch, J.M. Wilson // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* – 2001. – V. 8, № 2. – P. 370-375.
84. Bauer, K. Cross-reactions between human and animal plasma proteins. I. The immunological evolution groups (IEG) I and II / K. Bauer // *Humangenetik*. – 1970. – V. 8, № 4. – P. 325-329.
85. Bauer, K. Cross-reactions between human and animal plasma proteins. IV. Non-*eutheria mammalia* / K. Bauer // *Humangenetik*. – 1971. – V. 13, № 1. – P. 49-57.
86. Bäckhed, F. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage / F. Bäckhed, H. Ding, T. Wang, L.V. Hooper, G.Y. Koh, A. Nagy, C.F. Semenkovich, J.I. Gordon // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2004. – V. 101, № 44. – P. 15718-15723.

87. Benno, Y. Comparison of fecal microflora between wild Japanese monkeys in a snowy area and laboratory-reared Japanese monkeys / Y. Benno, K. Itoh, Y. Miyao, T. Mitsuoka // *Nihon. Juigaku. Zasshi.* – 1987. – V. 49, № 6. – P. 1059-1064.
88. Benno, Y. Effect of the two-year milk-feeding on the gastrointestinal microflora of the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) / Y. Benno, S. Honjo, T. Mitsuoka // *Microbiol. Immunol.* – 1987. – V. 31, № 9. – P. 943-947.
89. Bertl, K. Smoking influences salivary histamine levels in periodontal disease / K. Bertl, H. Haririan, M. Laky, M. Matejka, O. Andrukhov, X. Rausch-Fan // *Oral Dis.* – 2012. – V. 18, № 4. – P. 410-416. – doi: 10.1111/j.1601-0825.2011.01891.x.
90. Born, G.V.R. The effect of copper on the enzymic oxidation of histamine and aliphatic diamines / G.V.R. Born // *Br. J. Pharmacol. Chemother.* – 1953. – V. 8, № 1. – P. 42-45.
91. Bosch, M. *Lactobacillus plantarum* CECT7315 and CECT7316 stimulate immunoglobulin production after influenza vaccination in elderly / M. Bosch, M. Méndez, M. Pérez, A. Farran, M.C. Fuentes, J. Cuñé // *Nutr. Hosp.* – 2012. – V. 27, № 2. – P. 504-509. – doi: 10.1590/S0212-16112012000200023.
92. Bubnov, R.V. Probiotics and immunity: provisional role for personalized diets and disease prevention / R.V. Bubnov, M.Y. Spivak, L.M. Lazarenko, A. Bomba, N.V. Boyko // *EPMA J.* – 2015. - V. 6, № 1. – 14. – doi: 10.1186/s13167-015-0036-0.
93. Burton, D.R. Human antibody effector function / D.R. Burton, J.M. Woof // *Adv. Immunol.* – 1992. – V. 51. – P. 1-84.
94. Callejón, S. Identification of a novel enzymatic activity from lactic acid bacteria able to degrade biogenic amines in wine / S. Callejón, R. Sendra, S. Ferrer, I. Pardo // *Appl Microbiol Biotechnol.* 2014. – V. 98, № 1. – P. 185-198. – doi: 10.1007/s00253-013-4829-6.
95. Calvas, P. Characterization of the three immunoglobulin G subclasses of macaques / P. Calvas, P. Apoil, F. Fortenfant, F. Roubinet, J. Andris, D. Capra, A. Blancher // *Scand. J. Immunol.* – 1999. – V. 49, № 6. – P. 595-610.

96. Carrier, C.A. Resident bacteria in a mixed population of rhesus macaque (*Macaca mulatta*) monkeys: a prevalence study / C.A. Carrier, T.B. Elliott, G.D. Ledney // *J. Med. Primatol.* – 2009. – V. 38, № 6. – P. 397-403.
97. Challacombe, S.J. Estimation of the intravascular half-lives of normal rhesus monkey IgG, IgA and IgM / S.J. Challacombe, M.W. Russell // *Immunology.* – 1979. – V. 36, № 2. – P. 331-338.
98. Das, S. Evolutionary dynamics of the immunoglobulin heavy chain variable region genes in vertebrates / S. Das, M. Nozawa, J. Klein, M. Nei // *Immunogenetics.* – 2008. – V. 60, № 1. P. 47-55. – doi: 10.1007/s00251-007-0270-2.
99. de Moreno de LeBlanc, A. Effect of the administration of a fermented milk containing *Lactobacillus casei* DN-114001 on intestinal microbiota and gut associated immune cells of nursing mice and after weaning until immune maturity / A. de Moreno de LeBlanc, C.A. Dogi, C.M. Galdeano, E. Carmuega, R. Weill, G. Perdigón // *BMC Immunol.* – 2008. – V. 9:27. – doi: 10.1186/1471-2172-9-27.
100. Dvorak, A.M. Ultrastructural criteria for identification of mast cells and basophils in humans, guinea pigs, and mice / A.M. Dvorak, H.F. Dvorak, S.J. Galli // *Am. Rev. Respir. Dis.* – 1983 – V. 128 (2 Pt 2). – P. S49-S52.
101. Enomoto, M. Oral administration of *Lactobacillus plantarum* NRIC0380 suppresses IgE production and induces CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) cells in vivo / M. Enomoto, S. Noguchi, M. Hattori, H. Sugiyama, Y. Suzuki, A. Hanaoka, S. Okada, T. Yoshida // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* – 2009. – V. 73, № 2. – P. 457-460.
102. Esteves, M.B. Antigenic similarities among mammalian immunoglobulins / M.B. Esteves, R.A. Binaghi // *Immunology.* – 1972. – V. 23, № 2. – P. 137-145.
103. Fallon, P.G. Juvenile rhesus monkeys have lower type 2 cytokine responses than adults after primary infection with *Schistosoma mansoni* / P.G. Fallon, J. Gibbons, R.A. Vervenne, E.J. Richardson, A.J. Fulford, S. Kiarie, R.F. Sturrock, P.S. Coulson, A.M. Deelder, J.A. Langermans, A.W. Thomas, D.W. Dunne // *J. Infect. Dis.* – 2003. – V. 187, № 6 – P. 939-945.
104. Fernández-No, I.C. Differential characterization of biogenic amine-producing bac-

- teria involved in food poisoning using MALDI-TOF mass fingerprinting / I.C. Fernández-No, K. Böhme, J.M. Gallardo, J. Barros-Velázquez, B. Cañas, P. Calomata // *Electrophoresis*. – 2010. – V. 31, № 6. – P. 1116-1127.
105. Foxx-Orenstein, A.E. Manipulation of the gut microbiota as a novel treatment strategy for gastrointestinal disorders / A.E. Foxx-Orenstein, W.D. Chey // *Am. J. Gastroenterol. Suppl.* – 2012. – V. 1, № 1. – P. 41–46. – doi: 10.1038/ajgsup.2012.8
106. García-Ruiz, A. Potential of wine-associated lactic acid bacteria to degrade biogenic amines / A. García-Ruiz, E.M. González-Rompinelli, B. Bartolomé, M.V. Moreno-Arribas // *Int. J. Food Microbiol.* – 2011. – V. 148, № 2. – P. 115-120. – doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.05.009.
107. Goldsby, R.A. Immunology, 5th Edition / R.A. Goldsby, T.K. Kindt, B.A. Osborne, J. Kuby – W.H. Freeman and Company, New York, 2003. – 603 p. – ISBN 0-7167-4947-5.
108. Górska, S. Distinct immunomodulation of bone marrow-derived dendritic cell responses to *Lactobacillus plantarum* WCFS1 by two different polysaccharides isolated from *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 0900 / S. Górska, M. Schwarzer, W. Jachymek, D. Srutkova, E. Brzozowska, H. Kozakova, A. Gamian // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2014. – V. 80, № 20. – P. 6506-6516. – doi: 10.1128/AEM.02104-14.
109. Gospos, A. Development of an allergy test model: activation of human mast cells with potentially allergenic substances / A. Gospos, U. Dreikhausen, D.C. Dartsch, M. Szamel, S. Hockertz // *Toxicology*. – 2001. – V. 166, № 1-2. – P. 91-96.
110. Gutowska-Owsiak, D. Histamine exerts multiple effects on expression of genes associated with epidermal barrier function / D. Gutowska-Owsiak, M. Salimi, T.A. Selvakumar, X. Wang, S. Taylor, G.S. Ogg // *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* – 2014. – V. 24, № 4. – P. 231-239.

111. Hajighasemi, F. Production and characterization of mouse monoclonal antibodies recognizing multiple subclasses of human IgG / F. Hajighasemi, F. Shokri // *Avicenna. J. Med. Biotech.* – 2010. – V. 2, № 1. – P. 37-45.
112. Hemarajata, P. Effects of probiotics on gut microbiota: mechanisms of intestinal immunomodulation and neuromodulation / P. Hemarajata, J. Versalovic // *Therap. Adv. Gastroenterol.* – 2013. – V. 6, № 1. – P. 39-51. – doi: 10.1177/1756283X12459294.
113. Hemarajata, P. Lactobacillus reuteri-specific immunoregulatory gene rsiR modulates histamine production and immunomodulation by Lactobacillus reuteri / P. Hemarajata, C. Gao, K.J. Pflughoft, C.M. Thomas, D.M. Saulnier, J.K. Spinler, J. Versalovic // *J. Bacteriol.* – 2013. – V. 195, № 24. – P. 5567-5576. – doi: 10.1128/JB.00261-13.
114. Hirasawa, N. Regulation of histamine production in macrophages / N. Hirasawa, K. Ohuchi // *Nippon Yakurigaku Zasshi.* – 2001. – V. 118, № 1. – P. 23-28.
115. Histamine ELISA kit // Site Immundiagnostik AG. – 2015. – URL: http://www.immundiagnostik.com/fileadmin/pdf/Histamin%20Stuhl_K8213.pdf (дата обращения: 10.12.2015)
116. Holvoet, S. Characterization of candidate anti-allergic probiotic strains in a model of th2-skewed human peripheral blood mononuclear cells / S. Holvoet, A.W. Zuercher, F. Julien-Javaux, M. Perrot, A. Mercenier // *Int. Arch. Allergy Immunol.* – 2013. – V. 161, № 2. – P. 142-154. – doi: 10.1159/000343703.
117. Howard, W.A. Immunoglobulin light-chain genes in the rhesus macaque I: kappa light-chain germline sequences for subgroups IGKV1, IGKV and IGKV3 / W.A. Howard, J.M. Bible, E. Finlay-Dijsselbloem, S. Openshaw, D.K. Dunn-Walters // *Immunogenetics.* – 2005. – V. 57, № 3. – P. 210-218.
118. Howard, W.A. Immunoglobulin light-chain genes in the rhesus macaque II: lambda light-chain germline sequences for subgroups IGLV1, IGLV2, IGLV3, IGLV4 and IGLV5 / W.A. Howard, J.M. Bible, E. Finlay-Dijsselbloem, S. Openshaw, D.K. Dunn-Walters // *Immunogenetics.* – 2005. – V. 57, № 9. – P. 655-664.

119. Hung, C.R. Role of acid back-diffusion, glutathione, oxyradical, and histamine in antral hemorrhagic ulcer in rats: the protective effect of lysozyme chloride and antioxidants / Hung C.R., Wang P.S. // *J. Lab. Clin. Med.* – 2002. - № 140 (3). – P. 142-151.
120. Isolauri, E. Probiotics: effects on immunity / E. Isolauri, Y. Sütas, P. Kankaanpää, H. Arvilommi, S. Salminen // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2001. – V. 73(2 Suppl). – P. 444S-450S.
121. Isolauri, E. Probiotics: use in allergic disorders: a Nutrition, Allergy, Mucosal Immunology, and Intestinal Microbiota (NAMI) Research Group Report / E. Isolauri, S. Salminen // *J. Clin. Gastroenterol.* – 2008. – V. 42, Suppl. 2. – P. S91-S96. – doi: 10.1097/MCG.0b013e3181639a98.
122. Jin, L. Species diversity and relative abundance of lactic acid bacteria in the milk of rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) / L. Jin, K. Hinde, L. Tao // *J. Med. Primatol.* – 2011. – V. 40, № 1. – P. 52-58. – doi: 10.1111/j.1600-0684.2010.00450.x (Электронный журнал).
123. Joneja, J.M. Histamine intolerance, diamine oxidase activity, and probiotics / J.M. Joneja // *Vickerstaff Health Services.* – 2004. – URL: <http://www.allergynutrition.com/wp-content/uploads/2014/05/Histamine-DAO-and-Probiotics-Revised.pdf> (дата обращения: 10.12.2015).
124. Jutel, M. Histamine regulates T-cell and antibody responses by differential expression of H₁ and H₂ receptors / M. Jutel, T. Watanabe, S. Klunker, M. Akdis, O.A. Thomet, J. Malolepszy, T. Zak-Nejmark, R. Koga, T. Kobayashi, K. Blaser, C.A. Akdis // *Nature.* – 2001. – V. 413, № 6854. – P. 420-425.
125. Klaenhammer, T.R. Growth Characteristics, Bile Sensitivity, and Freeze Damage in Colonial Variants of *Lactobacillus acidophilus* / T.R. Klaenhammer, E.G. Kleeman // *Applied and environmental microbiology.* – 1981. – V. 41, № 6. – P. 1461-1467.
126. Kim, S.H. Source and identification of histamine-producing bacteria from fresh and temperature-abused albacore / S.H. Kim, K.G. Field, M.T. Morrissey // *J. Food*

- Prot. – 2001. – V. 64, № 7. – P. 1035-1044.
127. Komprda, T. Tyrosine- and histidine-decarboxylase positive lactic acid bacteria and enterococci in dry fermented sausages / T. Komprda, P. Sládková, E. Petirová, V. Dohnal, R. Burdychová // *Meat Sci.* – 2010. – V. 86, № 3. – P. 870-877.
128. Kotani, Y. Oral intake of *Lactobacillus pentosus* strain b240 accelerates salivary immunoglobulin A secretion in the elderly: A randomized, placebo-controlled, double-blind trial / Y. Kotani, S. Shinkai, H. Okamatsu, M. Toba, K. Ogawa, H. Yoshida, T. Fukaya, Y. Fujiwara, P.H. Chaves, K. Kakumoto, N. Kohda // *Immun. Ageing.* – 2010. – V. 7:11. – doi: 10.1186/1742-4933-7-11.
129. Landete, J.M. Updated molecular knowledge about histamine biosynthesis by bacteria / J.M. Landete, B. De las Rivas, A. Marcobal, R. Muñoz // *Critical reviews in food science and nutrition.* – 2008. – Vol. 48, № 8. – P. 697-714.
130. Leblanc, J. Induction of a humoral immune response following an *Escherichia coli* O157:H7 infection with an immunomodulatory peptidic fraction derived from *Lactobacillus helveticus*-fermented milk / J. Leblanc, I. Fliss, C. Matar // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* – 2004. – V. 11, № 6. – P. 1171-1181.
131. Lefranc, M.-P. *The Immunoglobulin FactsBook* / M.-P. Lefranc, G. Lefranc – Houston: Academic. Gulf Professional Publishing, 2001. – 458 p. – ISBN: 012441351X.
132. Leslie, G.A. Structure and function of serum and membrane immunoglobulin D (IgD) / G.A. Leslie, L.N. Martin // *Contemporary Topics in Molecular Immunology.* – 1978. – V. 7. – P. 1-49.
133. Liu, Y.W. Oral administration of heat-inactivated *Lactobacillus plantarum* K37 modulated airway hyperresponsiveness in ovalbumin-sensitized BALB/c mice / Y.W. Liu, T.W. Liao, Y.H. Chen, Y.C. Chiang, Y.C. Tsai // *PLoS One.* – 2014. – V. 9, № 6. – e100105. – doi: 10.1371/journal.pone.0100105.
134. Lorenz, W. Elevated plasma histamine concentrations in surgery: causes and clinical significance / W. Lorenz, W. Seidel, A. Doenicke, R. Tauber, H.-J. Reimann,

- R. Uhlig, G. Mann, P. Dormann, A. Schmal, G. Häfner, H. Hamelmann // *Klinische Wochenschrift* – 1974. – V. 52, № 9. – P. 419-425.
135. Lucas, P.M. Histamine-producing pathway encoded on an unstable plasmid in *Lactobacillus hilgardii* 0006 / P.M. Lucas, W.A. Wolken, O. Claisse, J.S. Lolkema, A. Lonvaud-Funel // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2005. – V. 71, № 3. – P. 1417-1424.
136. Lü, F.X. Immunoglobulin concentrations and antigen-specific antibody levels in cervicovaginal lavages of rhesus macaques are influenced by the stage of the menstrual cycle / F.X. Lü, Z. Ma, T. Rourke, S. Srinivasan, M. McChesney, C.J. Miller // *Infect. Immun.* – 1999. – V. 67, № 12. – P. 6321-6328.
137. Lü, X.S. Concentration of IgG in the sera of normal rhesus macaques as determined by a species-specific radial immunodiffusion assay / X.S. Lü, C.J. Miller // *J. Immunol. Methods.* – 1996. – V. 197. – P. 193–196.
138. Maassen C.B. Growth phase of orally administered *Lactobacillus* strains differentially affects IgG1/IgG2a ratio for soluble antigens: implications for vaccine development / C.B. Maassen, W.J. Boersma, C. van Holten-Neelen, E. Claassen, J.D. Laman // *Vaccine.* – 2003. – V.21. – P. 2751-2757.
139. Maintz, L. Histamine and histamine intolerance / L. Maintz, N. Novak // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2007. – V. 85, № 5 – P. 1185-1196.
140. Matsui, K. Inhibitory effects of *Schefflera leucantha* extract on production of allergic mediators by Langerhans cells and mast cells / K. Matsui, M. Wirotsangthong, W. Thanakijcharoenpath, C. Mungmee, A. Nishikawa // *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* – 2010. – V. 20, № 6. – P. 463-468.
141. Martin, L.N. Chromatographic fractionation of rhesus monkey (*Macaca mulatta*) IgG subclasses using DEAE cellulose and protein A-sepharose / L.N. Martin // *Journal of immunological methods.* – 1982. – V. 50, № 3. – P. 319-329.
142. McKenna, P. The macaque gut microbiome in health, lentiviral infection, and chronic enterocolitis / P. McKenna, C. Hoffmann, N. Minkah, P.P. Aye, A. Lackner, Z. Liu, C.A. Lozupone, M. Hamady, R. Knight, F.D. Bushman // *PLoS Pathog.* – 2008. - Feb V. 4, № 2. – e20. – doi: 10.1371/journal.ppat.0040020.

143. Miller, C.J. Genital secretory immune response to chronic simian immunodeficiency virus (SIV) infection: a comparison between intravenously and genitally inoculated rhesus macaques / C.J. Miller, D.W. Kang, M. Marthas, Z. Moldoveanu, H. Kiyono, P. Marx, J.H. Eldridge, J. Mestecky, J.R. McGhee // *Clin. Exp. Immunol.* – 1992. – V. 88, № 3. – P. 520-526.
144. Monte-Wicher, V. Comparative studies of monkey and human immunoglobulins / V. Monte-Wicher, K. Wicher, C.E. Arbesman // *Immunochemistry.* – 1970. - V. 7, № 10. – P. 839-849.
145. Moro-García, M.A. Oral supplementation with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 8481 enhances systemic immunity in elderly subjects / M.A. Moro-García, R. Alonso-Arias, M. Baltadjieva, C. Fernández Benítez, M.A. Fernández Barrial, E. Díaz Ruisánchez, R. Alonso Santos, M. Alvarez Sánchez, J. Saavedra Miján, C. López-Larrea // *Age (Dordr.).* – 2013. – V. 35, № 4. – P. 1311-1326. – doi: 10.1007/s11357-012-9434-6.
146. Muraki, T. Prokaryotic homologs of the eukaryotic 3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase and 2-amino-3-carboxymuconate-6-semialdehyde decarboxylase in the 2-nitrobenzoate degradation pathway of *Pseudomonas fluorescens* strain KU-7 / T. Muraki, M. Taki, Y. Hasegawa, H. Iwaki, P.C. Lau // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2003. – V. 69, № 3. – P. 1564-1572.
147. Nakao, S. Comparative study of the membrane-permeabilizing activities of mastoparans and related histamine-releasing agents in bacteria, erythrocytes, and mast cells / S. Nakao, K. Komagoe, T. Inoue, T. Katsu // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2011. – V. 1808, № 1. – P. 490-497. – doi: 10.1016/j.bbamem.2010.10.007.
148. Neoh, S.H. Immunoglobulin classes in mammalian species identified by cross-reactivity with antisera to human immunoglobulins / S.H. Neoh, D.M. Jahoda, D.S. Rowe, A. Voller // *Immunochemistry.* – 1973. – V.10, № 12. – P. 805-813.
149. Nguyen, D.C. Immunoglobulin gamma subclasses and corresponding Fc receptors in rhesus macaques: genetic characterization and engineering of recombinant mol-

- ecules // Dissertation for the Degree of Doctor of Philosophy. – Georgia State University, 2012. – 250 p. – URL: http://scholarworks.gsu.edu/biology_diss/111
150. Nomura, H. Histamine stimulates alveolar macrophages to release neutrophil and monocyte chemotactic activity / H. Nomura, E. Sato, S. Koyama, M. Haniuda, K. Kubo, S. Nagai, T. Izumi // *J. Lab. Clin. Med.* – 2001. – V. 138, № 4. – P. 226-235.
151. O'Hara, A.M. The gut flora as a forgotten organ / A.M. O'Hara, F. Shanahan // *EMBO Rep.* – 2006. – V. 7, № 7. – P. 688-693.
152. O'Sullivan, A. Early diet impacts infant rhesus gut microbiome, immunity, and metabolism / A. O'Sullivan, X. He, E.M. McNiven, N.W. Haggarty, B. Lönnerdal, C.M. Slupsky // *J. Proteome Res.* – 2013. – V. 12, № 6. – P. 2833-2845. – doi: 10.1021/pr4001702.
153. Ouwehand, A.C. Antiallergic effects of probiotics / A.C. Ouwehand // *J. Nutr.* – 2007. – V. 137, № 3, Suppl. 2. – P. 794S-797S.
154. Ovadia, S. Successful cyclosporine treatment for atopic dermatitis in a rhesus macaque (*Macaca mulatta*) / S. Ovadia, S.R. Wilson, C.J. Zeiss // *Comp. Med.* – 2005. – V. 55, № 2. – P. 192-196.
155. Pan, D.D. Immunomodulatory and hypoallergenic properties of milk protein hydrolysates in ICR mice / D.D. Pan, Z. Wu, J. Liu, X.Y. Cao, X.Q. Zeng // *J. Dairy. Sci.* – 2013. – V. 96, № 8. – P. 4958-4964. – doi: 10.3168/jds.2013-6758.
156. Patterson, R. Reagin-mediated asthma in rhesus monkeys and relation to bronchial cell histamine release and airway reactivity to carbocholine / R. Patterson, K.E. Harris, I.M. Suszko, M. Roberts // *The Journal of Clinical Investigation* – 1976. – V. 57. – P. 586-593.
157. Perdígón G. Interaction of lactic acid bacteria with the gut immune system / G. Perdígón, C. Maldonado Galdeano, J.C. Valdez, M. Medici // *Eur. J. Clin. Nutr.* – 2002. – V. 56, Suppl. 4. – P. S21-S26.
158. Pithva, S. Probiotic attributes of autochthonous *Lactobacillus rhamnosus* strains of human origin / S. Pithva, S. Shekh, J. Dave, B.R. Vyas // *Appl. Biochem. Biotech-*

- nol. – 2014. – V. 173, № 1. – P. 259-277. – doi: 10.1007/s12010-014-0839-9.
159. Quigley, E.M. Microflora modulation of motility / E.M. Quigley // *J. Neurogastroenterol. Motil.* – 2011. – V. 17, № 2. – P. 140-147. – doi: 10.5056/jnm.2011.17.2.140.
160. Radaev, S. Recognition of immunoglobulins by Fc γ receptors / S. Radaev, P. Sun // *Mol. Immunol.* – 2002. – V. 38, № 14. – P. 1073-1083.
161. Ramsland, P.A. Crystal structures of human antibodies: a detailed and unfinished tapestry of immunoglobulin gene products / P.A. Ramsland, W. Farrugia // *J. Mol. Recognit.* – 2002. – V. 15, № 5. – P. 248-259.
162. Rask, C. Differential effect on cell-mediated immunity in human volunteers after intake of different lactobacilli / C. Rask, I. Adlerberth, A. Berggren, I.L. Ahrén, A.E. Wold // *Clin. Exp. Immunol.* – 2013. – V. 172, № 2. – P. 321-332. – doi: 10.1111/cei.12055.
163. Roberts, S.A. Crystal structure and electron transfer kinetics of CueO, a multicopper oxidase required for copper homeostasis in *Escherichia coli* / S.A. Roberts, A. Weichsel, G. Grass, K. Thakali, J.T. Hazzard, G. Tollin, C. Rensing, W.R. Montfort // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2002. – V. 99, № 5. – P. 2766-2771.
164. Rogers, K.A. Immunoglobulins and immunoglobulin Fc receptors in nonhuman primates commonly used in biomedical research // Dissertation for the Degree of Doctor of Philosophy. – Georgia State University, 2006. – 254 p. – URL: http://scholarworks.gsu.edu/biology_diss/6
165. Rogers, K.A. Nonhuman primate IgA: genetic heterogeneity and interactions with CD89 / K.A. Rogers, L. Jayashankar, F. Scinicariello, R. Attanasio // *J. Immunol.* – 2008. – V. 180, № 7. – P. 4816-4824.
166. Rogers, K.A. Molecular characterization of immunoglobulin D in mammals: immunoglobulin heavy constant delta genes in dogs, chimpanzees and four old world monkey species / K.A. Rogers, J.P. Richardson, F. Scinicariello, R. Attanasio // *Immunology.* – 2006. – V. 118, № 1. – P. 88-100.
167. Ryffel, B. Histamine scavenging attenuates endotoxin-induced acute lung injury /

- B. Ryffel, I. Couillin, I. Maillet, B. Schnyder, G.C. Paesen, P. Nuttall, W. Weston-Davies // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2005. – V. 1056. – P. 197-205.
168. Saitou, N. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees / N. Saitou, M. Nei // *Molecular Biology and Evolution.* – 1987. – V. 4, № 4. – P. 406-425.
169. Sakurai, T. Basic and applied features of multicopper oxidases, CueO, bilirubin oxidase, and laccase / T. Sakurai, K. Kataoka // *Chem. Rec.* – 2007. – V. 7, № 4. P. 220-229.
170. Saysell, C.G. Probing the catalytic mechanism of *Escherichia coli* amine oxidase using mutational variants and a reversible inhibitor as a substrate analogue / C.G. Saysell, W.S. Tambyrajah, J.M. Murray, C.M. Wilmot, S.E. Phillips, M.J. McPherson, P.F. Knowles // *Biochem. J.* – 2002. – V. 365, Pt. 3. – P. 809-816.
171. Schelegle, E.S. Allergic asthma induced in rhesus monkeys by house dust mite (*Dermatophagoides farinae*) / E.S. Schelegle, L.J. Gershwin, L.A. Miller, M.V. Fanucchi, L.S. Van Winkle, J.P. Gerriets, W.F. Walby, A.M. Omlor, A.R. Buckpitt, B.K. Tarkington, V.J. Wong, J.P. Joad, K.B. Pinkerton, R. Wu, M.J. Evans, D.M. Hyde, C.G. Plopper // *Am. J. Pathol.* – 2001. – V. 158, № 1. – P. 333-341.
172. Schabussova, I. Distinctive anti-allergy properties of two probiotic bacterial strains in a mouse model of allergic poly-sensitization / I. Schabussova, K. Hufnagl, C. Wild, S. Nutten, A.W. Zuercher, A. Mercenier, U. Wiedermann // *Vaccine.* – 2011. – V. 29, № 10. – P. 1981-1990. – doi: 10.1016/j.vaccine.2010.12.101.
173. Scinicariello, F. Intraspecies heterogeneity of immunoglobulin alpha-chain constant region genes in rhesus macaques / F. Scinicariello, R. Attanasio // *Immunology.* – 2001. – V. 103, № 4. – P. 441-448.
174. Scinicariello, F. Rhesus macaque antibody molecules: sequences and heterogeneity of alpha and gamma constant regions / F. Scinicariello, C.N. Engleman, L. Jayashankar, H.M. McClure, R. Attanasio // *Immunology.* – 2004. – V. 111, № 1. – P. 66-74.

175. Shanahan, F. Therapeutic implications of manipulating and mining the microbiota / F. Shanahan // *J. Physiol.* – 2009. – V. 587(Pt. 17). – P. 4175-4179. – doi: 10.1113/jphysiol.2009.174649.
176. Shearer, M.H. Comparison and characterization of immunoglobulin G subclasses among primate species / M.H. Shearer, R.D. Dark, J. Chodosh, R.C. Kennedy // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* – 1999. – V. 6, № 6. – P. 953-958.
177. Shen, C. Development of serum antibodies during early infancy in rhesus macaques: implications for humoral immune responses to vaccination at birth / C. Shen, H. Xu, D. Liu, R.S. Veazey, X. Wang // *Vaccine.* – 2014. – V. 32, № 41. P. 5337-5342. – doi: 10.1016/j.vaccine.2014.07.036.
178. Shepard, E.M. Towards the development of selective amine oxidase inhibitors. Mechanism-based inhibition of six copper containing amine oxidases / E.M. Shepard, J. Smith, B.O. Elmore, J.A. Kuchar, L.M. Sayre, D.M. Dooley // *Eur. J. Biochem.* – 2002. – V. 269, № 15. – P. 3645-3658.
179. Sherman, M.A. The role of mast cells in bacterial enteritis / M.A. Sherman // *Am. J. Pathol.* – 2007. – V. 171, № 2. – P. 399-401.
180. Spinler, J.K. From prediction to function using evolutionary genomics: human-specific ecotypes of *Lactobacillus reuteri* have diverse probiotic functions / J.K. Spinler, A. Sontakke, E.B. Hollister, S.F. Venable, P.L. Oh, M.A. Balderas, D.M. Saulnier, T.A. Mistretta, S. Devaraj, J. Walter, J. Versalovic, S.K. Highlander // *Genome Biol. Evol.* – 2014. – V. 6, № 7. – P. 1772-1789. – doi: 10.1093/gbe/evu137.
181. Steer, T. Perspectives on the role of the human gut microbiota and its modulation by pro- and prebiotics / T. Steer, H. Carpenter, K. Tuohy, G.R. Gibson // *Nutr. Res. Rev.* – 2000. – V. 13, № 2. – P. 229-254. – doi: 10.1079/095442200108729089.
182. Stropfová, V. Isolation and characterization of faecal bifidobacteria and lactobacilli isolated from dogs and primates / V. Stropfová, A. Lauková // *Anaerobe.* – 2014. – V. 29. – P. 108-112. doi: 10.1016/j.anaerobe.2013.10.007.

183. Sumiyama, K. Adaptive evolution of the IgA hinge region in primates / K. Sumiyama, N. Saitou, S. Ueda // *Mol. Biol. Evol.* – 2002. – V. 19, № 7. – P. 1093-1099.
184. Taverniti, V. S-layer protein mediates the stimulatory effect of *Lactobacillus helveticus* MIMLh5 on innate immunity / V. Taverniti, M. Stuknyte, M. Minuzzo, S. Arioli, I. De Noni, C. Scabiosi, Z.M. Cordova, I. Junttila, S. Hämäläinen, H. Turpeinen, D. Mora, M. Karp, M. Pesu, S. Guglielmetti // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2013. – V. 79, № 4. – P. 1221-1231. – doi: 10.1128/AEM.03056-12.
185. Taweechotipatr, M. *Lactobacillus saerimneri* and *Lactobacillus ruminis*: novel human-derived probiotic strains with immunomodulatory activities / M. Taweechotipatr, C. Iyer, J.K. Spinler, J. Versalovic, S. Tumwasorn // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2009. – V. 293, № 1. – P. 65-72. – doi: 10.1111/j.1574-6968.2009.01506.x.
186. Thullier, P. A comparison of human and macaque (*Macaca mulatta*) immunoglobulin germline V regions and its implications for antibody engineering / P. Thullier, S. Chahboun, T. Pelat // *MAbs.* – 2010. – V. 2, № 5. – P. 528-538.
187. Trout, H.H. Stimulation of gastric acid secretion in the rhesus monkey / H.H. Trout, M. Zinner, J.W. Harmon // *Dig. Dis. Sci.* – 1985. – V. 30, № 1. – P. 82-87.
188. Underberg, E. Process for the production of aminooxidase-containing material or aminooxidase from microorganisms, such products and their use in the degradation of histamin in food and drinks: patent № EP0170880 (B1) / E. Underberg, A. Lembke. – Filing 03.07.85; publ. 06.02.91, Bull. № 91/06.
189. Vaerman, J.P. Communications: Identification of IgA in several mammalian species / J.P. Vaerman, J.F. Heremans, G. Van Kerckhoven // *J. Immunol.* – 1969. – V. 103, № 6. – P. 1421-1423.
190. Vargas García, C.E. Piliation of *Lactobacillus rhamnosus* GG promotes adhesion, phagocytosis, and cytokine modulation in macrophages / C.E. Vargas García, M. Petrova, I.J. Claes, I. De Boeck, T.L. Verhoeven, E. Dilissen, I. von Ossowski, A. Palva, D.M. Bullens, J. Vanderleyden, S. Lebeer // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2015. – V. 81, № 6. – P. 2050-2062. – doi: 10.1128/AEM.03949-14.

191. Villena, J. Immunobiotic *Lactobacillus rhamnosus* strains differentially modulate antiviral immune response in porcine intestinal epithelial and antigen presenting cells / J. Villena, E. Chiba, M.G. Vizoso-Pinto, Y. Tomosada, T. Takahashi, T. Ishizuka, H. Aso, S. Salva, S. Alvarez, H. Kitazawa // *BMC Microbiol.* – 2014. – V. 14:126. – doi: 10.1186/1471-2180-14-126.
192. Vujkovic-Cvijin, I. Gut-Resident *Lactobacillus* Abundance Associates with IDO1 Inhibition and Th17 Dynamics in SIV-Infected Macaques / I. Vujkovic-Cvijin, L.A. Swainson, S.N. Chu, A.M. Ortiz, C.A. Santee, A. Petriello, R.M. Dunham, D.W. Fadrosh, D.L. Lin, A.A. Faruqi, Y. Huang, C. Apetrei, I. Pandrea, F.M. Hecht, C.D. Pilcher, N.R. Klatt, J.M. Brenchley, S.V. Lynch, J.M. McCune // *Cell. Rep.* – 2015. – V. 13, № 8. – P. 1589-1597. – doi: 10.1016/j.celrep.2015.10.026.
193. Wang, M.D. Effects of histamine and cimetidine on chloride secretion in isolated monkey gastric mucosa / M.D. Wang // *Zhongguo Yao Li Xue Bao.* – 1985. – V. 6, № 3. – P. 175-177.
194. Wang, R.F. PCR detection and quantitation of predominant anaerobic bacteria in human and animal fecal samples / R.F. Wang, W.W. Cao, C.E. Cerniglia // *Applied and environmental microbiology.* – 1996. – V. 62, № 4. – P. 1242-1247.
195. Warncke, M. Different adaptations of IgG effector function in human and nonhuman primates and implications for therapeutic antibody treatment / M. Warncke, T. Calzascia, M. Coulot, N. Balke, R. Touil, F. Kolbinger, C. Heusser // *J. Immunol.* – 2012. – V. 188, № 9. – P. 4405-4411. – doi: 10.4049/jimmunol.1200090.
196. Watson, C.T. Complete haplotype sequence of the human immunoglobulin heavy-chain variable, diversity, and joining genes and characterization of allelic and copy-number variation / C.T. Watson, K.M. Steinberg, J. Huddleston, R.L. Warren, M. Malig, J. Schein, A.J. Willsey, J.B. Joy, J.K. Scott, T.A. Graves, R.K. Wilson, R.A. Holt, E.E. Eichler, F. Breden // *Am. J. Hum. Genet.* – 2013. – V. 92, № 4. – P. 530-546. – doi: 10.1016/j.ajhg.2013.03.004.
197. Wessler, S. *Helicobacter pylori* activates the histidine decarboxylase promoter through a mitogen-activated protein kinase pathway independent of pathogenicity

- island-encoded virulence factors / S. Wessler, M. Höcker, W. Fischer, T.C. Wang, S. Rosewicz, R. Haas, B. Wiedenmann, T.F. Meyer, M. Naumann // *J. Biol. Chem.* – 2000. – V. 275, № 5. – 3629-3636.
198. Wu, P.C. The IgE gene in primates exhibits extraordinary evolutionary diversity / P.C. Wu, J.B. Chen., S. Kawamura, C. Roos, S. Merker, C.C. Shih, B.D. Hsu, C. Lim, T.W. Chang // *Immunogenetics.* – 2012. – V. 64, № 4. – P. 279-287. – doi: 10.1007/s00251-011-0586-9.
199. Yamamoto, N. Antiallergic agent, utilization thereof for reducing allergy and method of reducing allergy: patent № EP1555028B1 / N. Yamamoto, Y. Ishida, I. Bando. – filing 26.06.03; publ. 30.09.09, Bull. № 2009/40.
200. Yan, G. Genome sequencing and comparison of two nonhuman primate animal models, the cynomolgus and Chinese rhesus macaques / G. Yan, G. Zhang, X. Fang, Y. Zhang, C. Li, F. Ling, D.N. Cooper, Q. Li, Y. Li, A.J. van Gool, H. Du, J. Chen, R. Chen, P. Zhang, Z. Huang, J.R. Thompson, Y. Meng, Y. Bai, J. Wang, M. Zhuo, T. Wang, Y. Huang, L. Wei, J. Li, Z. Wang, H. Hu, P. Yang, L. Le, P.D. Stenson, B. Li, X. Liu, E.V. Ball, N. An, Q. Huang, Y. Zhang, W. Fan, X. Zhang, Y. Li, W. Wang, M.G. Katze, B. Su, R. Nielsen, H. Yang, J. Wang, X. Wang, J. Wang // *Nat. Biotechnol.* – 2011. – V. 29, № 11. – P. 1019-1023. – doi: 10.1038/nbt.1992.
201. Yoshida, T. An increased number of CD4+CD25+ cells induced by an oral administration of *Lactobacillus plantarum* NRIC0380 are involved in antiallergic activity / T. Yoshida, W. Fujiwara, M. Enomoto, S. Nakayama, H. Matsuda, H. Sugiyama, M. Shimojoh, S. Okada, M. Hattori // *Int. Arch. Allergy. Immunol.* – 2013. – V. 62, № 4. – P. 283-289. – doi: 10.1159/000354924.
202. Zachariae, R. Skin reactions to histamine of healthy subjects after hypnotically induced emotions of sadness, anger, and happiness / R. Zachariae, M.M. Jørgensen, H. Egekvist, P. Bjerring // *Allergy.* – 2001. – V. 56, № 8. – P. 734-740.
203. Zahorsky-Reeves, J.L. Similarities in the immunoglobulin response and VH gene usage in rhesus monkeys and humans exposed to porcine hepatocytes / J.L. Za-

- horsky-Reeves, C.R. Gregory, D.V. Cramer, I.Y. Patanwala, A.E. Kyles, D.C. Borie, M.K. Kearns-Jonker // *BMC Immunol.* – 2006. – V. 7:3. – doi: 10.1186/1471-2172-7-3.
204. Zaman, M.Z. Novel starter cultures to inhibit biogenic amines accumulation during fish sauce fermentation / M.Z. Zaman, F. Abu Bakar, S. Jinap, J. Bakar // *Int. J. Food Microbiol.* – 2011. – V. 145, № 1. – P. 84-91.
205. Zhao, Z.Z. A fluorometric microassay for histamine release from human gingival mast cells / Z.Z. Zhao, P.B. Sugerman, L.J. Walsh, N.W. Savage // *J. Periodontal. Res.* – 2001. – V. 36 (4). – P. 233-236.
206. Zimmermann, A.S. Systematic analysis of histamine and N-methylhistamine concentrations in organs from two common laboratory mouse strains: C57Bl/6 and Balb/c / A.S. Zimmermann, H. Burhenne, V. Kaever, R. Seifert, D. Neumann // *Inflamm. Res.* – 2011. – V. 60, № 12. – P. 1153-1159. doi: 10.1007/s00011-011-0379-5.

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 *Mascara 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 противoinфекционного 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. Пospelова, 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. Зверев, В.В. Микроэкология 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.
2. 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. Есян, 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.

3. 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.

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.