

На правах рукописи

Цапиева Анна Николаевна

**Микробиологический и молекулярно-генетический анализ
молочнокислых бактерий как перспективных пробиотиков**

03.02.03 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Санкт-Петербург - 2020

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Институт экспериментальной медицины»

Научный руководитель:

Член-корреспондент РАН,
доктор медицинских наук,
профессор

Суворов Александр Николаевич

Официальные оппоненты:

Сидоренко Сергей Владимирович - доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней федерального медико-биологического агентства», Отдел медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии, заведующий

Нетрусов Александр Иванович - доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Биологический факультет, кафедра микробиологии, профессор

Ведущая организация:

Федеральное бюджетное учреждение науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Защита диссертации состоится «_____» _____ 2020 года в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.046.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д.10

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д.10, <http://www.gabrich.ru>

Автореферат разослан «_____» _____ 2020 года

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор медицинских наук, профессор

Ольга Юрьевна Борисова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Изменившийся в последнее время характер питания современного человека уменьшил содержание в его рационе продуктов, содержащих молочнокислые бактерии. Возникший в результате изменения структуры питания дисбаланс стал одной из причин участвовавших расстройств в области желудочно-кишечного тракта, сопровождающихся дисбиотическими состояниями. Идея использования чистых культур молочнокислых микроорганизмов в качестве средства для борьбы с преждевременной старостью впервые была высказана Нобелевским лауреатом 1908 года И.И. Мечниковым в его книге «Этюды о природе человека». «Я воздерживаюсь от всякой сырой пищи и, сверх того, ввожу в свой обиход молочнокислые микробы, мешающие загниванию в кишках» (Мечников И.И., 1905). Из болгарской простокваши им был выделен и испытан на животных бактериальный штамм *Lactobacillus bulgaricus* (Мечников И.И., 1907). Столетие спустя идея И.И. Мечникова нашла развитие, и сейчас целое направление в науке посвящено изучению пробиотиков (Суворов А.Н., 2015; Алешкин В.А., 2015).

Большое количество научных работ посвящено изучению положительных эффектов, которые способны оказывать пробиотики на организм человека (de Roos N.M., 2000; Deshpande G.C., 2011; Jeppsson B., 2011; Twetman, S., 2012; Vujic G., 2013). Но результаты часто ограничиваются эмпирическими данными об успешности применения различных штаммов пробиотиков без детального изучения свойств применяемых микроорганизмов.

Одним из источников получения новых перспективных штаммов являются различные ферментированные продукты, являющиеся частью культуры потребления пищи в странах мира. Так в южных странах ближнего зарубежья распространены кисломолочные продукты (джургот, айран, мацони, чакка) получаемые в домашних условиях путем внесения заквашенного молока в новую порцию свежего молока. Эти продукты никогда не проходили контроль качества, стандартизацию, оценку эффективности или безопасности. Анализ микробного состава таких продуктов, полученных в домашних условиях, является интересной задачей по поиску новых потенциальных пробиотических штаммов.

Комплексная оценка биологических свойств штаммов молочнокислых бактерий и их аргументированное использование в пищевой промышленности и медицинской практике является актуальной и целесообразной задачей, решение которой приведет к существенному повышению эффективности пробиотической терапии (Амерханова А.М., 2006; Суворов А.Н., 2011; Кафарская Л.И., 2016). Идея персонифицированной терапии с применением индивидуальных пробиотиков – аутопробиотиков, на основе детально охарактеризованных собственных штаммов микробиоты человека, является актуальной и интересной задачей в области создания инновационных отечественных продуктов и препаратов (Коршунов В.М., 1987; Шендеров Б.А., 1999; Суворов А.Н., 2010).

Степень разработанности темы исследования

С появлением новейших методов молекулярной генетики и иммунологии изучение как новых, так и давно используемых пробиотических штаммов движется быстрыми темпами. Это связано с осознанием роли микробиоты в поддержании здоровья человека и пониманием, что нарушение микробного баланса может способствовать развитию ряда заболеваний, включая метаболические расстройства и онкологию. Для поддержания и восстановления микробного баланса организма применяют препараты-пробиотики. Первые в России пробиотические препараты были созданы в 1970-х годах Гончаровой В.В. и Тарасовой И.Б. на основе бифидобактерий и лактобацилл соответственно. Новые знания о свойствах отдельных представителей кишечной микробиоты стимулируют разработку препаратов на основе новых пробиотических штаммов. Исследования, направленные на поиск перспективных штаммов молочнокислых микроорганизмов, распространены во всем мире (Yu J., 2012; Kaewnopparat S., 2013; Kuda T., 2013). В нашей стране разработкой новых пробиотических препаратов известны ведущие российские исследователи

(Амерханова А.М., 2006; Бондаренко В.М., 2008; Ботина С.Г., 2010; Жиленкова О.Г., 2011; Алешкин А.В., 2011; Вахитов Т.Я., 2018; Суворов А.Н., 2018).

Многолетнее успешное использование пробиотиков для лечения и профилактики различных состояний, сопровождающихся дисбиотическими расстройствами, привело к накоплению опыта в применении пробиотиков и их терапевтических эффектах. Однако часто имеющиеся данные разрознены, исследования влияния пробиотиков на организм *in vivo* проводятся отдельно от изучения свойств самих штаммов *in vitro*. Более того, часто штаммы молочнокислых бактерий, применяемые для создания пробиотиков на протяжении десятков лет, не исследованы или исследованы недостаточно (Ботина С.Г., 2010). Наиболее ярким примером в данном случае является штамм *Lactobacillus plantarum* 8P-A3. Данный штамм используется для создания пробиотических препаратов с 1973 года, была показана его эффективность в лечении дисбиотических состояний, диареи различной этиологии, бактериального вагиноза, в комплексной терапии *Helicobacter pylori* - ассоциированных состояний (Шарипова И.С., 1993; Феклисова Л.В., 2010; Циммерман Я.С., 2010). Однако геном данного штамма ранее не был охарактеризован за исключением доступной в базе данных GenBank NCBI нуклеотидной последовательности, кодирующей 16S рРНК штамма (Ботина С.Г., 2010). Появившийся за десятилетия использования пробиотиков пробел в знаниях между терапевтическими эффектами штаммов и исследованиями этих штаммов *in vitro* необходимо заполнять новыми данными о генетической организации известных пробиотических штаммов, а вновь выделенные штаммы должны подвергаться комплексному анализу. Ключевыми факторами при анализе как новых, так и уже известных пробиотических штаммов являются данные об их безопасности, генетических характеристиках, спектре антагонистической активности относительно патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, физиологических свойствах, способности продуцировать антимикробные вещества, а также об особенностях их воздействия на иммунную систему и микробиоценоз. Наиболее мягким воздействием на организм хозяина отличаются аутопробиотики – персональные пробиотики на основе собственных штаммов микробиоты человека. Впервые использовать собственные штаммы для коррекции дисбиоза после приема антибиотиков было предложено Коршуновым В.М. с соавторами в 1987 году (Коршунов В.М., 1984). Затем эта идея нашла свое развитие в работах Шендерова Б.А., он с соавторами предложил создание аутопробиотического комплекса на основе разбавленного кишечного содержимого пациентов, обогащенного лакто- и бифидобактериями (Шендеров Б.А., 1999). Однако оба способа имеют два основных недостатка – неизвестный конечный состав аутопробиотического комплекса, и, в связи с этим, невозможность контроля качества конечного продукта.

Учитывая недостаточность сведений о комплексном анализе пробиотических штаммов микроорганизмов, были сформулированы цель и задачи настоящего исследования.

Цель исследования – характеристика биологических свойств штаммов молочнокислых микроорганизмов, выделенных из различных источников, в качестве потенциальных пробиотиков.

Задачи исследования:

1. Выделить штаммы молочнокислых микроорганизмов из национальных молочнокислых продуктов и толстой кишки человека и определить их видовую принадлежность
2. Проанализировать пробиотические свойства выделенных штаммов и их безопасность в опытах *in vitro* (устойчивость к низким рН и содержанию желчи; антагонистическая активность; наличие генов, кодирующих бактериоцины; отсутствие генов, кодирующих факторы патогенности)
3. Изучить способность изолированных штаммов восстанавливать микробный баланс на фоне экспериментального дисбиоза, вызванного приемом антибиотиков, на модели *in vivo* с использованием лабораторных животных
4. Разработать подходы к использованию собственных штаммов микробиоты человека (родов *Enterococcus* и *Lactobacillus*) для создания аутопробиотиков

5. Исследовать влияние аутопробиотиков и пробиотиков на основе наиболее перспективных штаммов на самочувствие пациентов с нарушением микробиоценоза кишечника

Научная новизна

На основании анализа совокупности полученных знаний по изучению функционального потенциала пробиотических и аутопробиотических штаммов молочнокислых микроорганизмов были разработаны новые подходы для создания индивидуальных пробиотических продуктов на основе молочнокислых микроорганизмов родов *Lactobacillus* и *Enterococcus*, изолированных из кишечника человека, включающие микробиологический и генетический анализ перспективных штаммов (патент РФ на изобретение № 2460778 от 10.09.2012; патент РФ на изобретение № 2546253 от 10.04.2015; патент РФ на изобретение № 2553372 от 10.06.2015).

С помощью микробиологических и молекулярно-генетических методов проанализирован видовой состав двух национальных молочнокислых продуктов «Чакка» и «Мацони» и выделены новые штаммы лактобацилл, составляющие основу этих продуктов. Проведенные исследования адаптационных показателей исследуемых штаммов продемонстрировали их способность выживать в условиях, встречающихся в ЖКТ человека - при pH 2,5 и содержании желчи в среде 0,3%. Для всех штаммов определен спектр антимикробной активности в отношении панели из сорока штаммов патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, включая стрептококки, стафилококки, клебсиеллы, псевдомонады, и показано, что наиболее выраженными антимикробными свойствами обладают штаммы *E. faecium* L3 и *L. plantarum* 8P-A3.

Показана способность выделенных молочнокислых бактерий восстанавливать микробный баланс ЖКТ крыс после применения антибиотиков, а также отмечено, что антагонистические свойства молочнокислых бактерий в отношении представителей условно-патогенных микроорганизмов носят индивидуальный характер и не коррелируют с их способностью устранять дисбиотические нарушения, вызванные приемом антибиотиков.

Разработан новый метод определения видовой принадлежности лактобацилл на основе мультиплексной ПЦР с использованием оригинальных видоспецифических ДНК праймеров для идентификации 12 видов лактобацилл, наиболее распространенных в разных отделах ЖКТ человека, который может быть применен для быстрой генетической идентификации лактобацилл, выделенных от людей, животных, из пищевых продуктов и растений.

Впервые в ДНК штамма *L. plantarum* 8P-A3, применяемого в России для создания фармакологических препаратов-пробиотиков с 1973 года, были выявлены гены, кодирующие бактериоцины - плантарицины EF и NC8, и феромон-плантарицин А, и определена структура соответствующего оперона.

Полногеномное секвенирование штамма *L. plantarum* 8P-A3 установило хромосомную локализацию плантарицинового локуса. Штамм не несет других генов, кодирующих бактериоцины, кроме расположенных на плантарициновом локусе. Обнаружение генов, кодирующих антимикробные пептиды в штамме *L. plantarum* 8P-A3, является косвенным объяснением его выраженной антибактериальной активности.

Теоретическая и практическая значимость

Проведенный комплексный анализ исследуемых молочнокислых бактерий определяет новый методологический подход изучения пробиотического потенциала и безопасности перспективных штаммов молочнокислых микроорганизмов на основании их микробиологических (устойчивость к низкому pH и содержанию желчи; антагонистическая активность) и молекулярно-генетических (наличие генов, кодирующих бактериоцины; отсутствие генов, кодирующих факторы патогенности) свойств.

Разработанная технология получения аутопробиотиков на основе собственных штаммов молочнокислых бактерий, включающая изучение генетических особенностей перспективных штаммов, позволяет в срок от 5 до 14 рабочих дней получить персональный пробиотик для коррекции дисбиоза.

Разработанный метод видовой идентификации лактобацилл на основе мультиплексной ПЦР, который является эффективным и достоверным для определения вида лактобацилл, позволяет идентифицировать штаммы в течение одного рабочего дня и может быть рекомендован для рутинного применения в лабораториях, объектом изучения которых являются лактобациллы.

На основании совокупности полученных данных изучения пробиотического потенциала, индивидуального спектра антимикробной активности, исследований на модели лабораторных животных из исследуемых штаммов молочнокислых бактерий были отобраны наиболее перспективные для практического применения (патент РФ на изобретение № 2391395 от 10.06.2010, патент РФ на изобретение № 2391393 от 10.06.2010). Двухкомпонентная закваска на основе *L.delbrueckii* TS1-06 и *L. fermentum* TS3-06 сертифицирована ООО «Авена» для использования в пищевых продуктах.

В базу данных GenBank NCBI задепонированы следующие нуклеотидные последовательности: CP046726 - полногемный сиквенс *L. plantarum* 8P-A3; HQ651181 - плантарициновый локус *L.plantarum* 8P-A3; EU346727 - участок кодирующий 16S рРНК *L.delbrueckii* TS1-06; EU346728 - участок кодирующий 16S рРНК *L. fermentum* TS3-06; GU299484 - участок кодирующий 16S рРНК *L.delbrueckii subsp. bulgaricus* LM1 - GenBank; GU299485 - участок кодирующий 16S рРНК *L.delbrueckii subsp. bulgaricus*.

Рабочая коллекция микроорганизмов отдела молекулярной микробиологии ФГБНУ «ИЭМ» пополнена 46 штаммами молочнокислых бактерий: *L. delbrueckii* TS1-06, *L. fermentum* TS3-06, *L.delbrueckii subs. bulgaricus* LM1, *L. delbrueckii subs. bulgaricus* LM2, три штамма *L. fermentum* (ПСРК-7, ПСРК-10, ПСРК-23), четыре штамма *L. delbrueckii* (ПСРК-13, ПСРК-16, ПСРК-17, ПСРК-19), пять штаммов *L. plantarum* (8P-A3, ПСРК-11, ПСРК-25 - ПСРК-27), два штамма *L.crispatus* (ПСРК-22, ПСРК-32), *L. reuteri* ПСРК-31, два штамма *L. helveticus* (ПСРК-4, ПСРК-8), двадцать пять штаммов *E. faecium* (ПСРК-50, ПСРК-51, ПСРК-53, ПСРК-57, ПСРК-58, ПСРК-60, ПСРК-61, ПСРК-65 - ПСРК-70, ПСРК-72 - ПСРК-74, ПСРК-76 - ПСРК-80, ПСРК-82 - ПСРК-85).

Разработанный метод создания аутопробиотиков применяется для проведения исследований сотрудниками Кафедры терапии и клинической фармакологии Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова на базе Городской больницы №26 г. Санкт-Петербурга (акт внедрения от 14.03.2019), а также для выполнения поисковых научных исследований в рамках Государственного задания «Молекулярно-генетические и клеточные основы патогенеза, диагностики и лечения социально значимых заболеваний инфекционной и неинфекционной природы» (шифр: 0557-2016-0001) (акт внедрения от 15.02.2019).

Методология и методы исследования

Методология настоящего исследования спланирована согласно поставленной цели. Предметом исследования является разработка метода комплексного анализа пробиотических свойств перспективных штаммов молочнокислых микроорганизмов. Анализ научной литературы, посвященной методам оценки пробиотических свойств молочнокислых бактерий, а также механизмам пробиотического действия молочнокислых бактерий, проведен на основе формально-логических методов. Для достижения поставленной цели в работе использованы методы микробиологии, биологии, молекулярной генетики и биоинформатики и методы статистической обработки результатов. Работа с лабораторными животными проводилась согласно ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур» на основании Протокола №2 Локального этического комитета при Научно-Исследовательском Институте Экспериментальной Медицины Северо-Западного отделения Российской Академии Медицинских Наук от 21 марта 2011 года.

Объекты исследования

В работе использованы свежевыделенные штаммы молочнокислых (Таблица 1, пп. 1- 12) и условно-патогенных микроорганизмов (Таблица 2, столбец 3); штаммы из российских пробиотических препаратов (Таблица 1, пп. 13-14), типовые коллекционные штаммы АТСС (Americal Type Culture Collection) (Таблица 2, столбец 2), коллекционные штаммы отдела

молекулярной микробиологии Федерального Государственного бюджетного учреждения науки «Институт экспериментальной медицины» (Таблица 2, столбец 2).

Таблица 1 – Исследуемые культуры молочнокислых микроорганизмов

Наименование микроорганизма	Источник выделения штамма
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> TS1-06	Молочнокислый продукт «Чакка», Таджикистан
<i>Lactobacillus fermentum</i> TS3-06	Молочнокислый продукт «Чакка», Таджикистан
<i>Lactobacillus delbrueckii subs. bulgaricus</i> LM1	Молочнокислый продукт «Мацони», Армения
<i>Lactobacillus delbrueckii subs. bulgaricus</i> LM2	Молочнокислый продукт «Мацони», Армения
<i>Lactobacillus fermentum</i> (3 штамма)	Толстая кишка человека
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> (4 штамма)	Толстая кишка человека
<i>Lactobacillus plantarum</i> (4 штамма)	Толстая кишка человека
<i>Lactobacillus crispatus</i> (2 штамма)	Толстая кишка человека
<i>Lactobacillus reuteri</i>	Толстая кишка человека
<i>Lactobacillus helveticus</i> (2 штамма)	Толстая кишка человека
<i>Enterococcus faecium</i> (25 штаммов)	Толстая кишка человека
<i>Enterococcus spp.</i> (15 штаммов)	Толстая кишка человека
<i>Enterococcus faecium</i> L3	«Ламинолакт», ООО Авена, Россия
<i>Lactobacillus plantarum</i> 8P-A3	«Лактобактерин сухой», ФГУП «НПО «Микроген», Россия

Таблица 2 – Индикаторные культуры

Индикаторные культуры	Типовые коллекционные штаммы ATCC	Коллекционные штаммы Отдела молекулярной микробиологии ФГБНУ «ИЭМ»
<i>Streptococcus pyogenes</i>	ATCC 700294 (SF370), ATCC BAA-1633 (NZ131)	2, 6, 14, 7281, 4/70, 118, 171, 7761, 152, 128
<i>Streptococcus agalactiae</i>	-	2/86, 1/92, 60/59, 1/82, 090R, 74-430, 75-155, 86, 4272, 6816, 1706
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	42, 60, 76, 209
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212	-
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	CS35, M15
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	1, 2
<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	74, 49
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	SH, 62

Лабораторные животные

В работе использовали самцов крыс линии Wistar массой 200-220 г, возраст 5-7 недель (n=28). Животных получали из питомника «Рапполово» Ленинградской области.

Микробиологические методы исследования

Условия культивирования и хранения

Культивирование микроорганизмов проводили на жидких и плотных питательных средах, а также на обезжиренном молоке при 37-40 °С в аэробных и анаэробных условиях.

Хранение микроорганизмов осуществляли в морозильной камере при -70°C (New Brunswick Scientific, США) в жидкой питательной среде с добавлением глицерина.

Оценку устойчивости микроорганизмов к желчи и низким pH проводили по методике, предложенной Дунн и соавторами (Dunn C. et al., 2001) с модификацией. Предварительно выращенные до стационарной фазы роста культуры осаждали центрифугированием (5000 об/мин, 10 минут, 4 °С), затем ресуспендировали в физиологическом растворе с получением конечной концентрации клеток 10⁸ КОЕ/мл. Затем повторно осаждали клетки центрифугированием (5000 об/мин, 10 минут, 4 °С) и ресуспендировали в питательной среде, содержащей от 0 до 5% желчи или в питательной среде с pH 1,2; 2,5 и 3,5. Кислотность среды доводили до необходимой 0,1М HCl. Пробы отбирали с момента внесения культуры в среду, затем через 5, 30, 60 минут. Для определения числа клеток в среде использовали метод посева на плотные питательные среды (метод Коха).

Метод двухслойного агара с модификацией (Ермоленко Е.И., 2008) использовали для определения антагонистической активности исследуемых молочнокислых микроорганизмов. В качестве индикаторных культур использовали 39 штаммов патогенных и условно-патогенных микроорганизмов из коллекции Отдела молекулярной микробиологии ФГБНУ «ИЭМ» (Таблица 2). Количественно степень антагонистической активности выражали Минимальной Ингибирующей Концентрацией Антагониста (МИКА). МИКА – это количество антагониста в нижнем слое агара, необходимого для подавления роста индикаторной культуры.

Молекулярно-генетические методы исследования

Выделение хромосомной ДНК проводили фенол-хлороформным методом или с использованием коммерческого набора ДНК-сорб-В (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия).

Метод полимеразной цепной реакции использовали для определения вида бактерий, для оценки наличия в геноме исследуемых штаммов генов, кодирующих бактериоцины и гены патогенности с использованием известных (Таблица 3) и разработанных специфических ДНК-праймеров.

Таблица 3 - Праймеры, используемые для детекции генов патогенности энтерококков

Название целевого гена	Нуклеотидная последовательность праймеров		Размер ожид. фрагмента	Ссылка на источник
	прямой	обратный		
<i>E. faecium</i> -спец	ttgaggcagaccagattgacg	tatgacagcgactccgattcc	658	(Cheng S., 1997)
<i>sprE</i>	gcgtcaatcggaagaatcat	cggggaaaaagctacatcaa	233	(Kolodjieva V., 2006)
<i>fsrB</i>	tttattggtatgcccacaa	tcatcagaccttgatgacg	316	(Kolodjieva V., 2006)
<i>asaI</i>	ccagccaactatggcggaatc	cctgtcgcaagatcgactgta	529	(Creti R., 2004)
<i>efaA</i>	cgttagctgcttgcgggaatc	ccatactacgtttatcgacac	735	(Creti R., 2004)
<i>gelE</i>	accccgatcattggttt	acgcattgctttccatc	419	(Creti R., 2004)
<i>esp</i>	ttgctaattgctagtcacgacc	gcgtcaaacactgcattgccga	932	(Creti R., 2004)
<i>vanA</i>	ttcatgtccacgaaccagag	cgttgaacgaacgattgaaaa	436	(Ильин В.К., 2013)

Детекцию результатов ПЦР производили с помощью электрофореза в 1% агарозном геле с 0,5 мкг/мкл бромистого этидия в 1x TAE буфере. Визуализацию результатов проводили с помощью системы гель-документирования VersaDoc MP4000 (Bio-Rad, США).

Метод 16sРНК типирования, включающий постановку ПЦР с разработанными праймерами, специфичными к участку ДНК, кодирующему 16s РНК бактерий; секвенирование полученного фрагмента и анализ нуклеотидных последовательностей применяли для идентификации исследуемых микроорганизмов.

Метод мультиплексной ПЦР применяли для идентификации лактобацилл с использованием набора разработанных праймеров, специфичных к ДНК различных видов лактобацилл.

Секвенирование методом Сэнгера проводили для исследуемых фрагментов ДНК на автоматическом секвенаторе Beckman CEQ 2000 (Beckman Coulter, США), с использованием набора реактивов GenomeLab DTCS - Quick Start Kit (Beckman Coulter, США).

Полногеномное секвенирование бактериальной ДНК проводили методом высокопроизводительного секвенирования с использованием комбинации платформ PacBio RS и Illumina HiSeq 4000 на базе научного центра BIOZERON Co., Ltd (Шанхай, Китай).

Методы работы с лабораторными животными

Модель индуцированного дисбиоза кишечника, разработанная д.б.н. Ермоленко Е.И. (Tarasova et al., 2010), была использована для изучения влияния молочнокислых микроорганизмов на макроорганизм и его микрофлору при развитии дисбиотических состояний. Экспериментальным животным (4 группы по 7 животных) после индукции дисбиоза вводили: 1) закваску на основе *L. plantarum* 8P-A3; 2) закваску на основе двух штаммов *L. delbrueckii* TS1-06 и *L. fermentum* TS3-06; 3) закваску на основе *E. faecium* L3; 4) контрольной группе вводили стерильное молоко.

Исследования влияния аутопробиотиков и пробиотиков на самочувствие пациентов с нарушением микробиоценоза кишечника

Исследования влияния аутопробиотиков проводились сотрудниками Кафедры терапии и клинической фармакологии Северо-Западного государственного медицинского университета им.

И.И. Мечникова на базе Городской больницы №26 г. Санкт-Петербурга. В исследование вошли 84 пациента с синдромом раздраженного кишечника (СРК). Методом рандомизации все пациенты были разбиты на 4 группы. В течение 10 дней пациенты получали один из вариантов пробиотической терапии: 1) аутопробиотик на основе собственных штаммов *Lactobacillus spp.* (16 чел.); 2) симбиотическую закваску на основе *L. delbrueckii* TS1-06 и *L. fermentum* TS3-06 (18 чел.); 3) аутопробиотик на основе собственных штаммов *E. faecium* (25 чел.); 4) пробиотическую закваску на основе *E. faecium* L3 (25 чел.). Для оценки эффективности и выявления наиболее успешного метода проводилась сравнительная оценка влияния терапии пробиотическими продуктами на клинические показатели пациентов до и после курса пробиотической терапии.

Методы биоинформатики и статистики

Конструирование специфических ДНК-праймеров проводили с использованием программ Primer-3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>), Primer-BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Праймеры были созданы на основе последовательностей ДНК, имеющихся в базах данных GenBank NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) и NIH Human Microbiome Project (<http://www.hmpdacc.org/>). Полученные в результате секвенирования нуклеотидные последовательности анализировали с помощью программ Chromas, BioEdit и BLAST. Анализ результатов высокопроизводительного секвенирования с последующей сборкой бактериального генома был выполнен с использованием программ FALCON v. 0.3.0 и Celera Assembler v. 8.3. Анализ полногеномного сиквенса выполнен с помощью программ NCBI BLAST и программы автоматической аннотации генома RAST (<https://rast.nmpdr.org/>). Результаты электрофореза визуализировали и обрабатывали с помощью программы Quantity One (Bio-Rad, США).

Статистический анализ результатов работы был проведен с использованием программы PASW Statistics 18.0 с использованием дисперсионного анализа, критерия Крускала-Уоллиса, критерия Фридмана, критерия Уилкоксона.

Личное участие автора

Личное участие автора диссертации, заключалось в составлении плана исследования, проведении аналитического обзора литературы, выполнении микробиологических и молекулярно-генетических исследований, анализе полученных данных, статистической обработке и обобщении полученных результатов. Разработка метода идентификации лактобацилл с помощью мультиплексных ПЦР проводилась самостоятельно автором диссертации. Разработка метода получения аутопробиотиков и работа с лабораторными животными выполнялась совместно с д.м.н. Ермоленко Е.И. Исследование влияния аутопробиотиков, полученных с использованием метода, разработанного автором, на самочувствие пациентов с СРК, проводились сотрудниками Кафедры терапии и клинической фармакологии Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И.Мечникова к.м.н. Соловьевой О.И и к.м.н. Сундуковой З.Р. под руководством д.м.н., проф. Симаненкова В.И. на базе Городской больницы №26 г. Санкт-Петербурга.

Положения, выносимые на защиту

1. Разработанный подход по созданию аутопробиотиков с использованием штаммов *Enterococcus faecium* и *Lactobacillus spp.* позволяет получить персональный пробиотик, восстанавливающий микробиоценоз пациента, на основе собственных штаммов микробиоты.
2. Разработан новый метод идентификации лактобацилл на основе мультиплексной ПЦР, который позволяет в течение одного рабочего дня установить видовую принадлежность лактобацилл, выделенных из различных источников.
3. Штаммы *L. delbrueckii* TS1-06 и *L. fermentum* TS3-06; *L. plantarum* 8P-A3; *E. faecium* L3 в виде молочнокислых заквасок способны восстанавливать микробный баланс ЖКТ лабораторных крыс на модели индуцированного дисбиоза кишечника, вызванного антибиотиками.

Степень достоверности и апробация результатов

О достоверности полученных результатов свидетельствует достаточный объем выборки исследованных штаммов молочнокислых микроорганизмов, большой объем проведенных

исследований. Изучено более 60 штаммов молочнокислых микроорганизмов, выделенных из толстой кишки человека и других источников. Работа выполнена с применением современных методов микробиологии и молекулярной генетики с использованием сертифицированного и поверенного оборудования в рамках темы плановой научно-исследовательской работы Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» «Изучение молекулярных механизмов инфекционных заболеваний стрептококковой природы; подходы к профилактике и терапии» (номер государственной регистрации 0120.0 803270).

Основные результаты исследований были представлены на всероссийских и международных конференциях и симпозиумах: на XXXII Международном Конгрессе SOMED, Санкт-Петербург, Россия, 2009; Международной Научной Конференции «Пробиотики и Пребиотики», Кошице, Словакия, 2010, 2011, 2012, 2014, 2017 гг.; Международной Научной Конференции «Микробная Экология Желудочно-Кишечного Тракта», Кошице, Словакия, 2010; конференции молодых ученых «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия», Санкт-Петербург, 2011; 14-ом Международном Славяно-Балтийском научном Форуме, Санкт-Петербург, 2012; Международной конференции «Бактериофаги и пробиотики: альтернатива антибиотикам», Тбилиси, Грузия, 2012; конференции молодых ученых «Фундаментальная наука и клиническая медицина», Санкт-Петербург, 2017; Всероссийской мультikonференции с международным участием «Биотехнология - медицине будущего», Санкт-Петербург, 2019.

Публикации

По теме диссертации опубликованы 33 печатные работы, в том числе 6 публикаций в рецензируемых изданиях, 2 публикации в других изданиях, 5 патентов РФ на изобретения, 20 публикаций в материалах конференций.

Объем и структура диссертационной работы

Материалы диссертационной работы изложены на 108 страницах машинописного текста и иллюстрированы 21 таблицей, 20 рисунками. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, 5 глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений и списка литературы, включающего 207 источников, из которых 40 – отечественных, 167 – зарубежных авторов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРОБИОТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ВЫДЕЛЕННЫХ ШТАММОВ МОЛОЧНОКИСЛЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Выделение молочнокислых микроорганизмов из национальных продуктов и пробиотических препаратов

Шесть штаммов молочнокислых микроорганизмов с помощью методов классической микробиологии были изолированы из молочнокислых продуктов и пробиотиков, использующихся на территории России и стран ближнего зарубежья. Целью отбора являлись грамположительные факультативно-анаэробные бактерии, способные размножаться на соответствующих селективных питательных средах (МРС /Энтерококкагар) и способные заквашивать молоко.

Из армянского и таджикского молочнокислых продуктов «Мацони» и «Чакка» были выделены по две чистые культуры лактобацилл (Таблица 1). Из препарата «Лактобактерин сухой» (НПО Микроген, Россия) был выделен штамм *L. plantarum* 8P-A3. Из препарата «Ламинолакт» (ООО Авена, Россия) был выделен штамм *E. faecium* L3. Штаммы из коммерческих препаратов использовали в работе в качестве контрольных.

Исследование адаптационных свойств исследуемых микроорганизмов

При попадании в желудочно-кишечный тракт человека пробиотические микроорганизмы сталкиваются с двумя основными биологическими барьерами: условия высокой кислотности в желудке (рН 1,5-3,0) и условия высокого содержания желчи в тонком кишечнике. Потому оценка

адаптационных свойств была проведена для шести штаммов, изолированных из молочнокислых продуктов и пробиотиков. Результаты представлены в таблицах 4 и 5.

Таблица 4 – Выживаемость исследуемых культур при различных значениях pH, lgКОЕ/мл

Культура	pH	Время инкубации, мин			
		0	5	30	60
<i>L. delbrueckii</i> TS1-06	1,2	8,0 ± 0,1	0	0	0
	2,5	8,0 ± 0,1	7,9 ± 0,2	5,3 ± 0,2	3,7 ± 0,1
<i>L. fermentum</i> TS3-06	1,2	8,8 ± 0,1	0	0	0
	2,5	8,9 ± 0,2	8,8 ± 0,1	8,8 ± 0,2	8,7 ± 0,2
<i>L. delbrueckii</i> subs. <i>bulgaricus</i> LM1	1,2	8,0 ± 0,1	0	0	0
	2,5	8,0 ± 0,1	7,8 ± 0,1	4,8 ± 0,3	3,4 ± 0,3
<i>L. delbrueckii</i> subs. <i>bulgaricus</i> LM2	1,2	8,0 ± 0,1	0	0	0
	2,5	8,0 ± 0,1	7,7 ± 0,2	4,6 ± 0,1	3,6 ± 0,3
<i>E. faecium</i> L3	1,2	8,0 ± 0,2	7,9 ± 0,1	6,0 ± 0,1	0
	2,5	8,0 ± 0,1	8,0 ± 0,1	8,0 ± 0,2	7,7 ± 0,2

Таблица 5 – Выживаемость исследуемых культур в среде с различным содержанием желчи

Конц. желчи в среде, %	Концентрация клеток микроорганизмов, lgКОЕ/мл				
	<i>L. delbrueckii</i> TS1-06	<i>L. fermentum</i> TS3-06	<i>L. delbrueckii</i> subs. <i>bulgaricus</i> LM1	<i>L. delbrueckii</i> subs. <i>bulgaricus</i> LM2	<i>E. faecium</i> L3
5	0	0	0	0	5,3±0,1
2,50	0	0	0	0	5,5±0,1
1,25	0	5,1±0,1	0	0	5,7±0,1
0,60	4,2±0,1	5,2±0,1	4,3±0,1	4,0±0,1	5,7±0,1
0,30	4,5±0,1	5,2±0,1	4,3±0,1	4,4±0,1	5,8±0,1
0,15	4,7±0,1	5,2±0,1	5,1±0,1	4,8±0,1	5,8±0,1
0	7,6±0,1	7,8±0,1	8,2±0,1	8,1±0,1	8,0±0,1

Произведенный анализ способности микроорганизмов выживать в условиях, встречающихся в ЖКТ человека и животных, выявил, что наиболее стрессоустойчивым штаммом является контрольный штамм *E. faecium* L3. Из штаммов, изолированных из молочнокислых заквасок, штамм *L. fermentum* TS3-06 проявил себя как наиболее устойчивый. Все изолированные штаммы оказались способны выживать при pH 2,5 и содержании желчи в среде до 0,6 %.

Определение антагонистической активности микроорганизмов по отношению к грамположительным и грамотрицательным патогенным бактериям

В результате исследования антибактериальной активности исследуемых молочнокислых микроорганизмов были определены МИКА в отношении 39 индикаторных штаммов (Таблица 6).

Таблица 6 – Средние показатели минимальной ингибирующей концентрации исследуемых молочнокислых микроорганизмов, по отношению к индикаторным культурам

Микроорганизм	МИКА, lg КОЕ/мл					
	TS1-06	TS3-06	LM1	LM2	8P-A3	L3
<i>S. aureus</i>	3,8±0,3	-	3,4±0,3	3,8±0,3	3,4±0,2	3,2±0,2
<i>E. coli</i>	3,8±1,3	5,7±1,6	3,1±0,9	3,4±1,1	2,0±0,4	1,6±0,4
<i>P. aeruginosa</i>	4,8±0,2*	5,5±1,5*	4,7±1,1	3,6±0,6*	3,0±0,4	2,9±0,5
<i>K. oxytoca</i>	4,6±0,2	8,0±0,5	3,4±1,0	3,5±0,5	2,3±0,2	2,2±0,2
<i>K. pneumoniae</i>	4,3±1,1	7,7±0,4	3,0±0,2	2,8±0,2	2,3±0,2	2,3±0,2
<i>E. faecalis</i>	5,4±0,2	-	4,2±0,3	4,0±0,3	3,8±0,5	3,3±0,1
<i>S. pyogenes</i>	3,5±0,5	5,6±2,0 (2,5±0,2)**	3,6±0,4	3,9±0,8	2,0±0,3	1,9±0,2
<i>S. agalactiae</i>	4,0±0,3	-	4,8±0,2	3,6±0,8	2,9±0,2	3,0±0,8
СРЕДНЕЕ	4,3±0,5	6,5±1,1	3,8±0,6	3,6±0,3	2,7±0,6	2,6±0,6

Примечание: * Подавляет рост только некоторых штаммов патогенов внутри одного вида.

** Штамм *L. fermentum* TS3-06 обладает избирательной антагонистической активностью, способен подавлять рост трех из 12 штаммов стрептококков с МИКА 2,5±0,2 lg КОЕ/мл и не способен подавлять рост других штаммов *S. pyogenes* и *S. agalactiae*.

Наиболее выраженную антагонистическую активность (по среднему показателю МИКА) проявили контрольные культуры *E. faecium* L3 и *L. plantarum* 8P-A3. Средним уровнем антагонистической активности в отношении исследованных штаммов патогенных и условно-патогенных микроорганизмов обладали штаммы *L. delbrueckii* TS1-06, *L. delbrueckii subs. bulgaricus* LM1 и *L. delbrueckii subs. bulgaricus* LM2. Наименьший уровень антагонистической активности из исследованных молочнокислых микроорганизмов проявил себя штамм *L. fermentum* TS3-06.

Штаммы *S. agalactiae* оказались наиболее устойчивыми к действию молочнокислых микроорганизмов среди 40 исследуемых штаммов индикаторных культур. По среднему показателю МИКА наиболее чувствительными штаммы *S. agalactiae* оказались к действию *E. faecium* L3. Наиболее чувствительным штаммом к действию антагонистов явился штамм *E. coli* M15, а наиболее устойчивыми – штаммы *P. aeruginosa*. Было показано, что молочнокислые микроорганизмы проявляли неодинаковую способность ингибировать рост отдельных штаммов патогенов. Так, показатель МИКА *E. faecium* L3 для наиболее чувствительного штамма *E. coli* CS35 был равен $1,3 \pm 0,1$ lg КОЕ/мл, а для штамма *S. agalactiae* 1/82, продемонстрировавшего максимальную резистентность, эта величина была существенно больше и составляла $3,9 \pm 0,3$ lg КОЕ/мл. Наиболее показательным в данном случае является штамм *L. fermentum* TS3-06, который в большинстве случаев не был способен подавить рост индикаторных штаммов патогенов. Так, штамм не подавлял рост ни одного из исследуемых штаммов стрептококка группы В. Однако, для подавления роста штамма *S. pyogenes* 152 потребовалось всего $2,5 \pm 0,2$ lg КОЕ/мл, что соизмеримо с показателем МИКА для контрольных штаммов. На рисунке 1 приведен пример роста индикаторных штаммов *S. pyogenes* без антагониста (А) и с содержанием $3,3$ lg КОЕ/мл *L. delbrueckii* TS1-06 (Б) в нижнем слое агара.

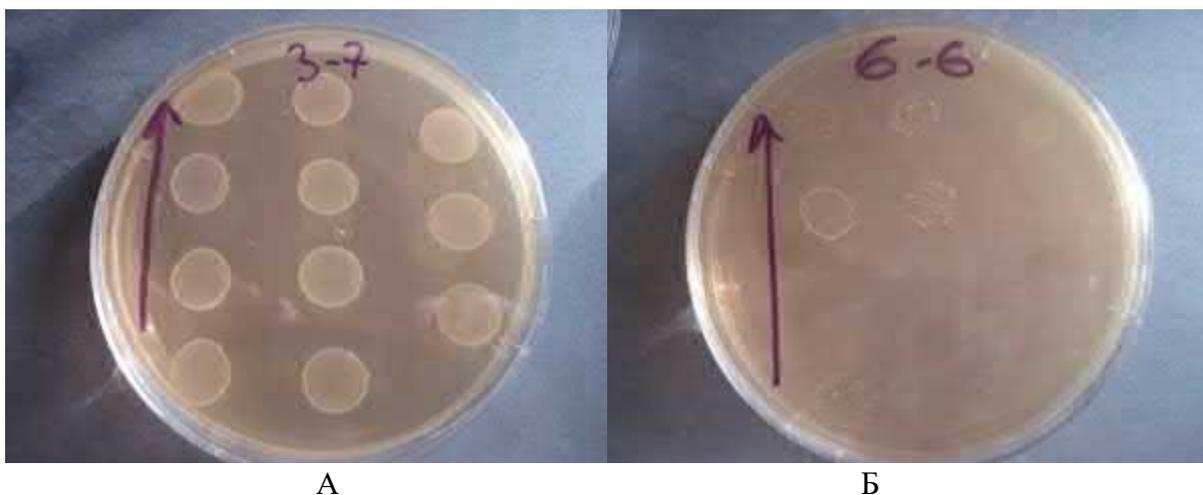


Рисунок 1 – Рост индикаторных штаммов *S. pyogenes* на чашках с двухслойным агаром
Примечание: (А) Контроль: нет антагониста в нижнем слое агара. (Б) Опыт: $3,3$ lg КОЕ/мл *L. delbrueckii* TS1-06 в нижнем слое агара

Очевидно, что на контрольной чашке Петри (А) с двухслойным агаром без *L. delbrueckii* TS1-06 в нижнем слое выросли все 11 штаммов *S. pyogenes*. На опытной чашке (Б), содержащей в нижнем слое $3,3$ lg КОЕ/мл *L. delbrueckii* TS1-06 выросли только 6 из 11 штаммов *S. pyogenes*. Необходимо отметить характер роста штаммов *S. pyogenes* на поверхности агара – полноценный на контрольной чашке и слабый на опытной.

По результатам данного исследования можно заключить, что антагонистическая активность каждого из исследуемых штаммов микроорганизмов является индивидуальной и носит избирательный характер. Перспективным является использование отдельных пробиотических штаммов для специфичного подавления чувствительных к ним инфекционных агентов без риска возникновения побочных эффектов в виде дисбиотических нарушений.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИССЛЕДУЕМЫХ ШТАММОВ МОЛОЧНОКИСЛЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Создание ДНК праймеров для ПЦР

Для изучения геномов исследуемых штаммов молочнокислых бактерий были сконструированы специфические праймеры на гены кодирующие бактериоцины (Таблица 7).

Для изучения строения плантарицинового локуса *L. plantarum* 8P-A3 были сконструированы праймеры (Таблица 8) на основании известных нуклеотидных последовательностей других бактериоцин-продуцирующих штаммов *L. plantarum* (Navarro L., 2008; Diep D.B., 2009; Sáenz Y., 2009).

Для создания метода идентификации лактобацилл с использованием мультиплексной ПЦР были сконструированы видоспецифичные праймеры на основе нуклеотидных последовательностей, кодирующих ферменты, характерные для определенных видов лактобацилл (Таблица 9).

Все праймеры были сконструированы *de novo* на основании нуклеотидных последовательностей, имеющихся в базах данных GenBank NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) и Human Microbiome Project (<http://www.hmpdacc.org/>). Для создания и анализа праймеров использовали компьютерные программы Primer3Plus (<https://primer3plus.com>) и Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

Таблица 7 - Праймеры на гены, кодирующие бактериоцины

Название кодируемого геном белка	Нуклеотидная последовательность праймеров		Размер ожид. фрагмента
	прямой	обратный	
Лактоцин S	ctgagcttacacgcttctgc	tttgaagcaacctgcaacat	153
Лактоцин F	tagcagtcggtgttggtgga	cttgccaaaaccacctgttg	182
Лактоцин В	tgctgctgagcctttgataa	ttggtggaggaaatcctaaag	170
Лактоцин 705	tccaagacgtcccttttgt	gcatatggtcatgcacaagc	242
Сакацин Р	aacagcaattacaggtggaaa	ttatttattccagccagcgttt	151
Плантарицин А	ggtggcgacaggagatttac	agaaacgcgttccgatttta	353
Сакацин А	aattaccggcggtgctagat	cattccagctaaaccactagcc	136
Плантарицин S	gtcgtccaagtacctcgtt	atatccgatgtcgccatag	495
Плантарицин EF	gccagtgataggtgctaac	gggggagatcaacaattatgaa	458

Таблица 8 - Праймеры для исследования строения плантарицинового локуса *L. plantarum* 8P-A3

Название гена, гомологичного праймеру	Нуклеотидная последовательность праймера	Название гена, гомологичного праймеру	Нуклеотидная последовательность праймера
<i>narA1</i>	cggtcaggtgactgcaacac	<i>plnG</i>	ttacaaggggtcagctatcgtt
<i>plnCB</i>	ggcaagagtagctgtctcaa	<i>plnG</i>	tcagtaattgcatccagtcac
<i>pln8C</i>	atactgtggcaaatgcctaaa	<i>plnH</i>	tacacgatcaaggcaacca
<i>plnORF3J51</i>	atctacgtcagcgcaaaaac	<i>plnU</i>	tcaatcgagcaaccatacca
<i>plnORF4J51</i>	cggtttaggctttctgctg	<i>plnU</i>	gtagcggatggctattgga
<i>plnR</i>	agtgaattcaaaatactagcgcatag	<i>plnW</i>	gtgtcatcgctaccggattt
<i>plnR</i>	gattagtgatgggctgct	<i>plnW</i>	tgattacggccaattgggtt
<i>plnL</i>	tagatgccgctccgtaaagt	<i>plnY</i>	aacgatccgacactccaag
<i>plnQ</i>	cacagctaacaccctagcc	Область за <i>plnJ</i>	agtgaattcaaaatactagcgcatag
<i>plnA</i>	ccccatctgcaagaatacg	<i>plnJ</i>	gcttcgccatcataaaatcc
<i>plnC</i>	ggtggcgacaggagatttac	<i>plnM</i>	cgcaaccatcaaaaatacca
<i>plnC</i>	agaaacgcgttccgatttta	<i>plnN</i>	gtgaaatgcaaacgggactt
Область перед <i>plnI</i>	gctcttagcggatcccaaaactcaga	<i>plnO</i>	atcttcggaccctctgatt
<i>plnI</i>	gccagtgataggtgctaac	<i>plnP</i>	tgattggcagaagaagtg
Область за <i>plnF</i>	gggggagatcaacaattatgaa	Область за <i>plnE</i>	aacgaattcaaggggattattatgcta

Таблица 9 - Праймеры, используемые для генетической идентификации исследуемых культур

Название праймера	Нуклеотидная последовательность праймеров		Р-р ожд. фрагм
	прямой	обратный	
16S рРНК	tggtcaggatgaacgctgg	ttacccaccacaagctaa	276
<i>L.plantarum</i> -спец	aagggatgctcaagtcattgtt	tccaaaactgctttgagtagg	499
<i>L.plantarum</i> -спец 2	gtattgattggcttgcatcatga	agttaaatctctcaaaacta	1536
<i>L.delbrueckii</i> - спец	gggtgatttggtagcctag	gccgcctttcaaaactgaatc	137
<i>L.crispatus</i> - спец	agcgagcggaaactaacagattta	agctgatcatgcgatctgctt	133
<i>L.delbrueckii</i> group-спец	cgagaagagagagaaactcaact	tcgctcgccgctacttgga	279
<i>L.casei</i> group- спец	gcaccgagattcaacatgg	ggttcttgatctatgcggtattag	116
<i>L.rhamnosus</i> - спец	tgcttgcatcttgatttaattttg	ggttcttgatctatgcggtattag	121
<i>L.salivarius</i> - спец	cgaactttctacaccgaatgc	tgaacggcggtgtgtacaag	1400
<i>L.reuteri</i> - спец	gctgggtgtagtaactgg	taagcttcgatgcacctgtgg	295
<i>L.fermentum</i> - спец	gtttgccaagaccacagtgata	gtagtcatggcgaggatcttt	396
<i>L.ruminis</i> - спец	tcgtcatcgtaataatccgta	tgaagcagcaaatcgtgatac	502
<i>L.helveticus</i> - спец	ttaaactggcattcaacca	caagcattccaccgattttt	345
<i>L.acidophilus</i> - спец	atgcatttgacattggtttga	cagcacttggaaatcgaacaag	603
<i>L.gasseri</i> - спец	atttgaaggcgatccaagaaat	tgaacgcatttcaagacgagta	700
<i>L.casei</i> - спец	ttaacgcgtgtaaggtgattc	tatgaattagccgatggacagg	800

Генетическая идентификация молочнокислых микроорганизмов

Для генетической идентификации штаммов лактобацилл, изолированных из молочнокислых продуктов «Чакка» и «Мацони» использовали метод 16S рРНК типирования. В результате анализа полученных последовательностей ДНК с помощью BLAST было установлено, что «Чакка» содержала *L. delbrueckii*, *L. fermentum*, а «Мацони» - 2 штамма *L. delbrueckii subs. bulgaricus*. Все нуклеотидные последовательности были депонированы в GenBank NCBI. Штаммы были внесены в рабочую коллекцию молочнокислых микроорганизмов Отдела молекулярной микробиологии ФГБНУ «ИЭМ» под названиями *L. delbrueckii* TS1-06, *L. fermentum* TS3-06, *L. delbrueckii subs. bulgaricus* LM1 и *L. delbrueckii subs. bulgaricus* LM2.

С помощью постановки ПЦР с праймерами, специфичными к ДНК энтерококков вида *E. faecium* (Таблица 3) и лактобацилл вида *L. plantarum* (Таблица 9), была подтверждена видовая принадлежность микроорганизмов *E. faecium* L3 и *L. plantarum* 8P-A3, изолированных из пробиотических препаратов «Лактобактерин сухой» и «Ламинолакт» соответственно.

С использованием классической ПЦР с праймерами, гомологичными участку ДНК, кодирующему специфическую ДНК геликазу *E. faecium*, среди изолированных индигенных штаммов энтерококков от пациентов были отобраны 25 штаммов, относящихся к виду *E. faecium*.

Разработка метода идентификации лактобацилл на основе мультиплексной ПЦР

На основании метода мультиплексной ПЦР нами был разработан быстрый, точный и экономичный способ определения вида лактобацилл, изолированных из различных источников.

Для этого нами были сконструированы специфические ДНК-праймеры, каждая пара которых была гомологична специфическому участку ДНК одного из 12 видов лактобацилл (Таблица 9). Для разработки метода были отобраны виды лактобацилл, наиболее часто встречающиеся в ЖКТ человека (Felis G.E., 2007). Генетическую идентификацию всех изолированных индигенных лактобацилл проводили с помощью разработанного соискателем метода на основе мультиплексной ПЦР. Для этого на матрице ДНК, выделенной из чистой культуры штамма индигенной лактобациллы, проводили три мультиплексные ПЦР: М-ПЦР №1, №2, №3 (Таблица 10).

Таблица 10 – Наборы праймеров для постановки мультиплексных ПЦР

М-ПЦР №1 (Тамп=53 ⁰ С)		М-ПЦР №2 (Тамп=52 ⁰ С)		М-ПЦР №3 (Тамп=52 ⁰ С)	
Праймеры	Ожид.р-р амп-на	Праймеры	Ожид.р-р амп-на	Праймеры	Ожид.р-р амп-на
<i>L.casei_group</i>	116	<i>L.rhamnosus</i>	121	<i>L.delbrueckii</i>	137
<i>L.delbrueckii_group</i>	279	<i>L.crispatus</i>	133	<i>L.fermentum</i>	396
<i>L.reuteri_group</i>	295	<i>L.helveticus</i>	345	<i>L.acidophilus</i>	600
<i>L.plantarum</i>	499	<i>L.ruminis</i>	502	<i>L.casei</i>	800

М-ПЦР №1 включает праймеры, специфичные к разным филогенетическим группам лактобацилл, гомологичные одновременно к нескольким видам лактобацилл, относящихся к одной филогенетической группе. Так, праймеры *L. casei_group* специфичны к ДНК *L. casei*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*; *L. delbrueckii_group* специфичны к *L. delbrueckii*, *L. acidophilus*, *L. helveticus*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*; *L. reuteri_group* специфичны к *L. reuteri* и *L. fermentum*. Два других набора М-ПЦР №2 и М-ПЦР №3 включают праймеры специфичные строго к перечисленным в таблице видам. Результат применения разработанного метода определения вида лактобацилл представлен на рисунке 2.

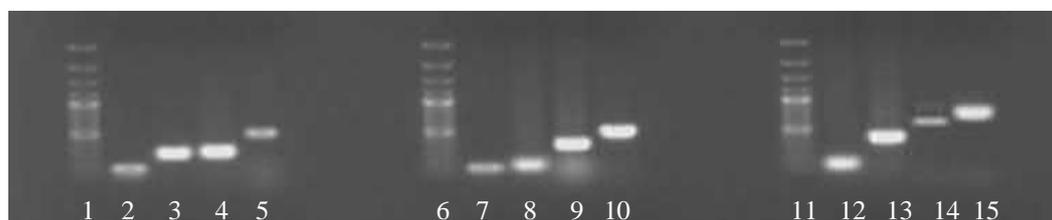


Рисунок 2 - Электрофореграмма результатов М-ПЦР №1, №2, №3 на матрице ДНК исследуемых бактерий

Примечание: 1 - маркер мол.веса GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific), 2 - *L.paracasei* Lactosan, 3 - *L.delbrueckii* TS1-06, 4 - *L.reuteri* 7-3, 5 - *L.plantarum* 8P-A3, 6 - маркер мол.веса GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific), 7 - *L. rhamnosus* K32, 8 - *L. crispatus* M1, 9 - *L. helveticus* Д75, 10 - *L. ruminis* 4-4, 11 - маркер мол.веса GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific), 12 - *L.delbrueckii* TS1-06, 13 - *L. fermentum* TS3-06, 14 - *L. acidophilus* Биобактон, 15 - *L.casei* ATCC 393

В результате генетической идентификации лактобацилл с помощью М-ПЦР было отобрано 16 штаммов индигенных лактобацилл от 16 пациентов с синдромом раздраженного кишечника. Далее штаммы были использованы для получения аутопробиотической молочнокислой закваски.

Таким образом, для дальнейшей работы были отобраны 47 штаммов молочнокислых микроорганизмов. 41 индигенный штамм от пациентов с СРК: *E. faecium* (25 шт.), *L. helveticus* (2 шт.), *L. fermentum* (3 шт.), *L. delbrueckii* (4 шт.), *L. plantarum* (4 шт.), *L. reuteri*, *L. crispatus* (2 шт.). 4 штамма из национальных молочнокислых продуктов: *L. delbrueckii subs. bulgaricus* LM1 и *L. delbrueckii subs. bulgaricus* LM2, *L. delbrueckii* TS1-06 и *L. fermentum* TS3-06. 2 штамма из коммерческих препаратов: *E. faecium* L3 и *L. plantarum* 8P-A3.

Исследование геномов исследуемых лактобацилл на наличие генов, кодирующих бактериоцины

Способность синтезировать бактериоцины является важной характеристикой штаммов – кандидатов в пробиотики. Пять исследуемых лактобацилл, выделенных из молочнокислых продуктов и препаратов, были проанализированы на наличие в их геномах генов, кодирующих белки-бактериоцины: лактоцины S, F, B, 705, сакацины P и A, плантарицины A, S и EF. В результате проведенного исследования в геноме *L. plantarum* 8P-A3 были обнаружены гены, кодирующие феромон-плантарицин A и двухпептидный бактериоцин EF.

Анализ геномов четырех других лактобацилл на наличие генов, кодирующих белки-бактериоцины, не выявил генов, кодирующих перечисленные бактериоцины в геномах *L. delbrueckii* TS1-06, *L. fermentum* TS3-06, *L. delbrueckii subs. bulgaricus* LM1 и *L. delbrueckii subs. bulgaricus* LM2.

Необходимо отметить, что проведенный анализ включал поиск только нескольких бактериоцинов, для которых известны их нуклеотидные последовательности. Способность исследуемых штаммов избирательно подавлять рост патогенных микроорганизмов (что было показано в исследовании антагонистической активности) может говорить о наличии не выявленных генов новых антимикробных пептидов – бактериоцинов в геноме исследуемых лактобацилл.

Генетический анализ плантарицинового локуса *L. plantarum* 8P-A3

В зарубежной литературе было подробно описано несколько штаммов лактобацилл, имеющих плантарициновый локус (плн-локус) с различной генетической организацией (Navarro L., 2008; Rojo-Bezares B., 2008; Diep DB, 2009; Sáenz Y., 2009). Плантарициновые локусы различных штаммов *L. plantarum* характеризуются наличием двух частей – консервативной и вариабельной (около 11500 п.н. и 5000-9000 п.н. соответственно). Различные типы плн-локусов кодируют три плантарицина: EF, JK, NC8 и ряд других регуляторных белков.

Для анализа организации плн-локуса в штамме *L. plantarum* 8P-A3 были составлены праймеры, соответствующие известным нуклеотидным последовательностям плн-локусов различной организации. Анализ локуса *L. plantarum* 8P-A3 с помощью ПЦР подтвердил наличие в консервативной части локуса трех оперонов: оперона *plnEFI*, кодирующего плантарицин EF и белок устойчивости к нему; регуляторного оперона *plnABCD*, кодирующего два регулятора ответа (активатор и супрессор), гистидин киназу и белок активатор (феромон); транспортного оперона *plnGHSTUV*, кодирующего ABC-транспортёр, вспомогательный транспортный белок, а также ряд протеаз СААХ II семейства, функция которых на настоящий момент не определена. Было показано, что консервативная часть плн-локуса *L. plantarum* 8P-A3 имеет гомологию 99% с соответствующими последовательностями штаммов *L. plantarum* C11 и *L. plantarum* J51.

Набор Flash High-Fidelity PCR Master mix (Finnzymes, Финляндия) позволил получить фрагмент ДНК размером около 20 тыс. п.н. в результате ПЦР с праймерами *napA1* – *plnU*. Этот результат свидетельствовал о том, что в штамме *L. plantarum* 8P-A3 имеется вариабельная часть плн-локуса, по размерам соизмеримая с таковыми уже исследованных штаммов. Анализ вариабельной части с помощью ПЦР выявил, что локус несет оперон *plnNC8βac*, кодирующий двухпептидный бактериоцин NC8 и белок устойчивости к нему; участок, кодирующий три открытые рамки считывания *orf3*, *orf4* и *orf5*, которые были ранее описаны в штамме *L. plantarum* J51 (Navarro L., 2008). Также было показано, что локус кодирует неполный оперон *plnJKLR* (отсутствуют гены двухпептидного бактериоцина *plnJ* и *plnK*).

Таким образом, нами впервые было показано наличие и организация генетического локуса, кодирующего гены трех антимикробных пептидов, в штамме *L. plantarum* 8P-A3, используемого в России с 1973 года. С наличием данного локуса можно связать столь высокие антагонистические свойства штамма, однако роль этих пептидов в общей антимикробной активности штамма не изучена и требует дальнейших исследований.

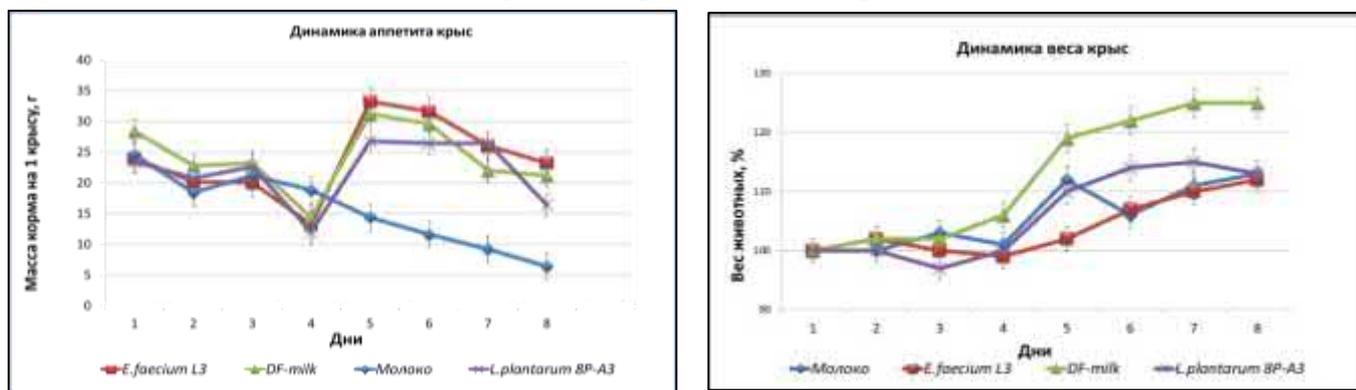
Полногеномное секвенирование *L. plantarum* 8P-A3

С помощью полногеномного секвенирования штамма *L. plantarum* 8P-A3 было установлено, что геном штамма имеет одну хромосому (3323296 п.н.) и одну плазмиду (9480 п.н.). Всего геном кодирует 3174 гена, из них 3005 генов кодируют белки, 78 генов отвечают за синтез тРНК и 16 генов - рРНК. Идентификационные номера нуклеотидных последовательностей в банке данных GenBank NCBI CP046726; CP046727.

Полногеномное секвенирование *L. plantarum* 8P-A3 подтвердило, что плантарициновый локус, просеквенированный нами ранее, располагается на хромосоме. Штамм не несет других генов, кодирующих бактериоцины, кроме расположенных на плантарициновом локусе плантарицинов А, EF и NC8. В геноме штамма обнаружен ген устойчивости к микроцину C7; 13 копий гена, кодирующего алкогольдегидрогеназу; 6 копий гена, кодирующего лактатдегидрогеназу. Сравнение полногеномного сиквенса штамма *L. plantarum* 8P-A3 и ранее просеквенированного плантарицинового локуса *L. plantarum* 8P-A3 показало 99,9% сходство между последовательностями.

АНАЛИЗ СПОСОБНОСТИ ИССЛЕДУЕМЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ ВОССТАНАВЛИВАТЬ МИКРОБНЫЙ БАЛАНС ПОСЛЕ ИНДУЦИРОВАННОГО ДИСБИОЗА

После индукции дисбиоза антибиотиками крысам вводили молочнокислые закваски на основе исследуемых штаммов молочнокислых микроорганизмов. Три группы животных получали молоко, заквашенное штаммами молочнокислых бактерий: *L. plantarum* 8P-A3; *L. delbrueckii* TS1-06 и *L. fermentum* TS3-06 (DF-milk); *E. faecium* L3. Контрольной группе животных после воздействия антибиотиками вводили молоко. Результаты представлены на рисунках 3 и 4.



А

Б

Рисунок 3 – Изменение аппетита и веса крыс в течение эксперимента

Примечание: (А) динамика аппетита крыс, (Б) динамика веса крыс

На рисунке 3 видно, что во время приема антибиотиков аппетит животных снижался, а вес не менялся или снижался (группа *L. plantarum* 8P-A3). Начиная с пятого дня (второй день введения молочнокислой закваски) у всех групп крыс, за исключением контрольной, получавшей молоко, наблюдалось достоверное повышение аппетита и веса. Таким образом, можно заключить, что самочувствие животных улучшалось.

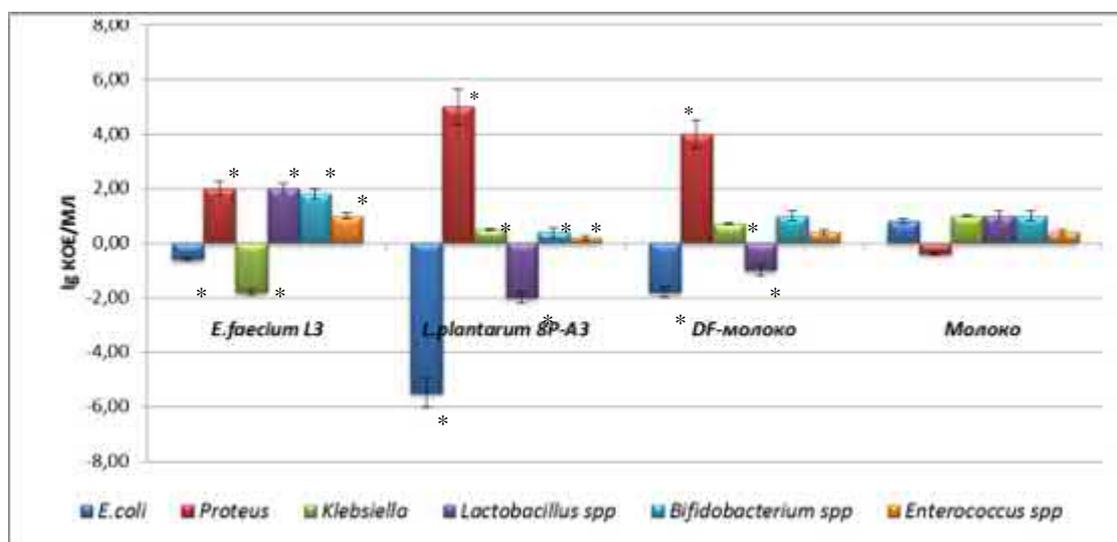


Рисунок 4 – Изменение количественного состава микрофлоры толстой кишки исследуемых групп животных после введения молочнокислых заквасок

Примечание: *при сравнении с контролем $p < 0,05$

После трехдневной антибиотикотерапии в фекалиях крыс достоверно снизилось количество лактобацилл, бифидобактерий и энтерококков, и выросло количество протей, кишечной палочки и клебсиелл. Штамм *L. plantarum* 8P-A3 был способен подавлять рост кишечной палочки, снизив ее содержание в фекалиях крыс на 5 порядков. Но кроме этого штамм угнетал рост лактобацилл

вероятно за счет способности продуцировать антимикробные вещества, к которым у других представителей микробиоты крыс имеется устойчивость. Подобный результат наблюдается и в другой группе крыс, получавших в качестве пробиотической терапии молочнокислую закваску на основе штаммов *L. delbrueckii* TS1-06 и *L. fermentum* TS3-06. Такой результат может объясняться тем, что эти штаммы микроорганизмов не способны подавлять рост протей, но способны подавлять рост близкородственных видов – лактобацилл. Таким образом, на фоне приема пробиотика - сильного антагониста, происходит подавление роста отдельных видов микроорганизмов и увеличение роста других микроорганизмов, не чувствительных к действию штамма-пробиотика. По результатам проведенных исследований можно сделать вывод о том, что наличие высоких антагонистических свойств не коррелирует с его способностью восстанавливать микробный баланс организма хозяина.

Наилучший результат по способности восстанавливать физиологические параметры самочувствия крыс после приема антибиотиков, показали закваски, на основе штаммов *L. delbrueckii* TS1-06 и *L. fermentum* TS3-06 (DF-молоко) и на основе штамма *E. faecium* L3. В то время как аппетит у всех групп животных, кроме контрольной, достоверно увеличился после введения в рацион молочнокислых заквасок, наиболее быстрое увеличение веса наблюдалось у крыс группы, получавшей закваску, на основе штаммов *L. delbrueckii* TS1-06 и *L. fermentum* TS3-06.

РАЗРАБОТКА МЕТОДА И ПОЛУЧЕНИЕ АУТОПРОБИОТИКА НА ОСНОВЕ СОБСТВЕННЫХ ШТАММОВ МИКРОБИОТЫ ЧЕЛОВЕКА

Метод получения готового аутопробиотика включает три основные стадии: выделение чистой индигенной культуры; генетический анализ изолированных индигенных штаммов молочнокислых микроорганизмов; получение молочнокислой закваски.

Для выделения аутопробиотических лактобацилл и энтерококков осуществляли забор материала из кишечника пациента. Тампон с материалом помещали в транспортную среду и доставляли в бактериологическую лабораторию не позднее 2 часов после забора материала. Суспензию высевали на плотную селективную питательную среду. Отбор отдельных колоний целевых микроорганизмов (*Lactobacillus spp./ Enterococcus spp.*) осуществляли на основании морфологических свойств колоний и клеток изолированных микроорганизмов после 24-48 часов инкубации. К перспективным штаммам относили грамположительные клетки, растущие на соответствующих селективных средах, способные заквашивать молоко.

Генетический анализ изолированных индигенных штаммов молочнокислых микроорганизмов включал определение вида выделенных штаммов с помощью постановки ПЦР с видоспецифичными праймерами (Таблицы 3 и 9), а также ПЦР анализ на наличие в их геноме генов, кодирующих потенциальные факторы патогенности (Таблица 3).

С помощью постановки ПЦР с праймерами, гомологичными участку ДНК, кодирующему специфическую ДНК геликазу *E. faecium* (Таблица 3) среди выделенных индигенных штаммов энтерококков отобрали штаммы, относящиеся к виду *E. faecium*.

Для определения вида изолированных индигенных лактобацилл использовали разработанный соискателем метод идентификации лактобацилл на основе мультиплексной ПЦР (Таблицы 9 и 10). Для дальнейшего использования были отобраны только те штаммы микроорганизмов, которые были идентифицированы до вида. Таким образом, на данном этапе было получено 16 штаммов индигенных *Lactobacillus spp.* и 40 штаммов индигенных *E. faecium*. Чистые культуры штаммов подвергали криоконсервации.

После генетической идентификации все индигенные штаммы *E. faecium* с помощью ПЦР (Таблица 3) анализировали на наличие в их геноме генов, кодирующих потенциальные факторы патогенности: устойчивость к ванкомицину (ген *van*), адгезины (гены *asal*, *esp*), желатиназу (ген *gelE*), белок феромон (ген *fsrB*), сериновую протеазу (ген *sprE*). Для дальнейших исследований были отобраны штаммы *E. faecium*, не содержащие ни одного из перечисленных факторов патогенности.

По определению ВОЗ лактобациллы являются безопасными для организма человека (Hanlon P.R., 2017). Поэтому, в случае получения аутопробиотика на основе лактобацилл, после генетической идентификации до вида штаммы лактобацилл сразу использовались для приготовления готового продукта.

После проведения вышеописанных исследований по выделению, идентификации и оценке безопасности индигенных штаммов молочнокислых микроорганизмов для получения аутопробиотиков были отобраны 16 штаммов *Lactobacillus sp.*, относящихся к видам *L. helveticus*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. delbrueckii*, *L. crispatus*, *L. reuteri* и 25 штаммов *E. faecium* от 41 пациента с СРК (Таблица 1). Путем внесения 2% посевного материала, полученного из отдельной колонии чистой культуры, в 1 литр стерильного молока были получены аутопробиотические молочнокислые закваски. Готовый продукт хранили до использования при 4 °С не более 4 дней. Аутопробиотические молочнокислые закваски использовали в дальнейших исследованиях. Разработанный метод получения аутопробиотиков на основе молочнокислых микроорганизмов родов *Lactobacillus* и *Enterococcus*, а также примеры использования разработанного метода подробно описаны (патент РФ на изобретение № 2460778 от 10.09.2012; патент РФ на изобретение № 2546253 от 10.04.2015; патент РФ на изобретение № 2553372 от 10.06.2015).

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ПРОБИОТИКОВ И АУТОПРОБИОТИКОВ НА САМОЧУВСТВИЕ ПАЦИЕНТОВ С СИНДРОМОМ РАЗДРАЖЕННОГО КИШЕЧНИКА

Исследования влияния аутопробиотиков, полученных с использованием вышеописанного метода, проводились сотрудниками Кафедры терапии и клинической фармакологии Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова на базе Городской больницы №26 г. Санкт-Петербурга.

В исследованиях, одобренных этическим комитетом Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова, принимали участие 84 пациента с СРК. Все пациенты были разбиты на 4 группы. Две группы пациентов принимали аутопробиотические молочнокислые закваски (*Lactobacillus spp./E.faecium*) и две группы принимали молочнокислые закваски на основе пробиотических штаммов микроорганизмов (*L. delbrueckii* TS1-06 и *L. fermentum* TS3-06 или *E. faecium* L3). Пациенты перорально получали молочнокислую закваску по 50 мл 2 раза в сутки в течение 10 дней.

Клиническую оценку влияния пробиотической терапии на состояние пациентов с СРК проводили на основании динамики выраженности таких характерных для СРК симптомов, как выраженность боли в животе, дискомфорт в эпигастральной области, метеоризм, характеристика стула по Бристольской шкале (БШ). Так же оценивали сохранность аппетита и общее самочувствие по оценке пациентом.

Результаты клинической оценки самочувствия пациентов до и после пробиотической терапии представлены в таблицах 11 и 12.

Таблица 11 – Динамика клинических показателей у пациентов двух групп, принимавших молочнокислую закваску на основе штаммов *E. faecium*

Клинические показатели	<i>E. faecium</i> L3		Аутопробиотик на основе штаммов <i>E. faecium</i>	
	до лечения	после лечения*	до лечения	после лечения*
Боль в животе	1,62±0,16	0,87±0,15	1,75±0,17	0,41±0,15
Чувство тяжести	1,29±0,24	0,79±1,17	1,87±1,13	0,37±1,14
Метеоризм	2,33±0,11	1,33±0,17	2,45±0,12	0,62±0,16
Аппетит	1,04±0,04	1,37±0,10	1,00±0,00	1,70±0,09
Стул БШ	2,87±0,40	3,20±0,26	3,16±0,41	3,83±0,14
Самочувствие	1,83±0,14	0,16±0,18	1,95±0,16	0,66±0,14

Примечание: * до и после лечения в обеих группах $p < 0,01$

** между группами $p > 0,2$

Таблица 12 – Динамика клинических показателей у пациентов двух групп, принимавших молочнокислую закваску на основе штаммов *Lactobacillus spp.*

Клинические показатели	<i>L.delbrueckii</i> TS1-06, <i>L.fermentum</i> TS3-06		Аутопробиотик на основе <i>Lactobacillus spp.</i>	
	до лечения	после лечения*	до лечения	после лечения*
Боль в животе	2,09±0,30	0,91±0,70	1,89±0,93	1,00±0,87
Частота стула	2,41±1,02	1,57±0,99	2,61±1,32	1,33±0,83
Метеоризм	2,64±0,50	2,00±0,45	2,54±0,73	0,89±0,60
Аппетит	1,04±0,04	1,37±0,10	1,00±0,00	1,70±0,09
Стул БШ	5,40±1,09	4,00±1,00	5,67±1,41	3,11±0,78
Самочувствие	1,82±0,40	2,36±0,67	1,89±0,33	2,62±0,44

Примечание: * до и после лечения в обеих группах $p < 0,01$

** между группами $p > 0,2$

Во всех группах обследуемых пациентов, получавших молочнокислые закваски на основе собственных и пробиотических штаммов молочнокислых микроорганизмов, достоверно уменьшилась выраженность болевого синдрома, выраженность метеоризма, отмечено достоверное изменение формы стула. Наблюдалось достоверное улучшение общего самочувствия пациентов. Побочных эффектов обнаружено не было.

ВЫВОДЫ

1. На основании исследования адаптационных, физиологических и генетических свойств среди штаммов молочнокислых микроорганизмов, выделенных из национальных молочнокислых продуктов и кишечника человека в период 2007-2012 гг., отобраны в качестве наиболее перспективных для получения пробиотиков и аутопробиотиков 47 штаммов бактерий, относящихся к видам *E. faecium*, *L. delbrueckii*, *L. reuteri*, *L. delbrueckii subs. bulgaricus*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. crispatus*, *L. helveticus*.
2. Впервые в геноме штамма *L. plantarum* 8P-A3, используемого в России с 1973 года, выявлен плантарициновый локус размером 17588 п.н. и определена его структура. Анализ полногеномного сиквенса *L. plantarum* 8P-A3 показал, что кроме плантарицинов A, EF и NC8, расположенных на плантарициновом локусе, геном не несет других генов, кодирующих бактериоцины.
3. Разработан метод генетической идентификации лактобацилл на основании мультиплексной ПЦР с использованием видоспецифических праймеров, который является эффективным инструментом для быстрого определения видовой принадлежности лактобацилл, выделенных из различных источников.
4. Продемонстрирована способность симбиотической молочнокислой закваски на основе *L. delbrueckii* TS1-06 и *L. fermentum* TS3-06 восстанавливать микробный баланс на фоне дисбиоза, вызванного приемом антибиотиков, на модели лабораторных животных. Установлена способность этих штаммов выживать в условиях, приближенных к встречающимся в ЖКТ человека – при pH 2,5 и содержании желчи в среде 0,3%.
5. Разработан метод получения аутопробиотических молочнокислых заквасок на основе безопасных штаммов собственной кишечной микробиоты (родов *Enterococcus* и *Lactobacillus*). Алгоритм получения аутопробиотика включает генетическую идентификацию выделенных аутоштаммов до вида, а также анализ на отсутствие генов, кодирующих потенциальные факторы патогенности.
6. Курсовой прием молочнокислых заквасок на основе *L. delbrueckii* TS1-06 и *L. fermentum* TS3-06, *E. faecium* L3, а также на основе аутопробиотических штаммов *E. faecium* и *Lactobacillus spp.* пациентами с синдромом раздраженного кишечника показал клиническую эффективность приема аутопробиотиков и пробиотиков при данном заболевании.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Определение видовой принадлежности штаммов молочнокислых микроорганизмов, а также их генетических характеристик должны являться необходимым требованием при использовании штаммов при производстве пробиотических продуктов и препаратов.

Предложенный подход для анализа пробиотических свойств молочнокислых микроорганизмов *in vitro* может быть использован для отбора наиболее перспективных штаммов, выделенных из различных источников.

Консервация отдельных штаммов микробиоты может быть предложена широкому кругу лиц с целью создания биобанка для приготовления аутопробиотиков для коррекции дисбиотических нарушений.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Дальнейшие исследования будут направлены на детальное изучение генетических характеристик молочнокислых микроорганизмов с целью определения роли отдельных генов в физиологической активности молочнокислых бактерий.

Предполагается продолжение исследований в области создания поликомпонентных аутопробиотиков на основании генетически охарактеризованных штаммов собственной микробиоты.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Бочкарева, А.Н. Молекулярно-генетический и микробиологический анализ молочнокислой закваски «Чага» / **А.Н. Бочкарева**, А.Н. Суворов // Материалы 10-го юбилейного международного славяно-балтийского научного форума «Санкт-Петербург - Гастро-2008», Санкт-Петербург, 14-16 мая 2008 г. - Научно-практический журнал Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. - 2008. - № 2-3. - С. М14-М15.
2. **Симаненков, В.И. Постинфекционный синдром раздраженного кишечника: есть ли место в терапии пробиотикам?** / **В.И. Симаненков**, А.Н. Суворов, С.М. Захаренко, **А.Н. Бочкарева**, З.Р. Сундукова // **Инфекционные болезни.** - 2009. - Т. 7, №3. - С. 3-9.
3. Бочкарева, А.Н. Анализ состава микрофлоры традиционного таджикского молочнокислого продукта «Чака» / А.Н. Бочкарева, С. Саторов, А.Н. Суворов // **Здравоохранение Таджикистана.** - 2009. - №3. - С. 65-70.
4. Гончар, Н.В. Элиминация *K. pneumoniae* при использовании лактосодержащих пробиотиков с различной устойчивостью к антибиотикам / Н.В. Гончар, Л.В. Березина, Н.Б. Вербицкая, О.В. Добролеж, **А.Н. Бочкарева** // Материалы 6-й Объединенной научной сессии и 2-го Международного конгресса по пробиотикам «Санкт-Петербург-Пробиотики-2009», Санкт-Петербург, 28-29 октября 2009 г. - Научно-практический журнал Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. - 2009. - № 4. - С. М10.
5. Суворов, А.Н. Рекомбинантные вакцины и пробиотики как возможные средства защиты от стрептококковых заболеваний / А.Н. Суворов, Г.Ф. Леонтьева, Е.И. Ермоленко, К.Б. Грабовская, Л.Ф. Мерингова, И.В. Королева, Н.В. Дуплик, Т.В. Гупалова, А.С. Коржуева, Ф.В. Елисеев, **А.Н. Бочкарева**, А.А. Тотолян // **Медицинский академический журнал.** - 2010. - Т. 10, №2. - С. 32-39.
6. **Цапиева, А.Н. Исследование антагонистических свойств лактобацилл, выделенных из молочнокислых продуктов и пробиотиков** / **А.Н. Цапиева**, А.Н. Суворов // **Профилактическая и клиническая медицина.** - 2010. - №3-4. - С. 156-161.
7. Сундукова, З.Р. Опыт клинического изучения аутопробиотиков / З.Р. Сундукова, В.Н. Донец, **А.Н. Бочкарева** // Юбилейная конференция молодых ученых «Актуальные вопросы клинической и экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, 22 апреля 2010 г. - С. 133.
8. **Цапиева, А.Н. Пробиотики на основе индигенных лактобацилл человека** / **А.Н. Цапиева**, Е.И. Ермоленко, О.И. Соловьева, В.И. Симаненков, А.Н. Суворов // **Всероссийская научная конференция молодых ученых «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия»,**

- Санкт-Петербург, 21–22 декабря 2010 г. - Медицинский академический журнал. - 2010. – Т. 10, №5. - С. 194.
9. **Цапиева, А.Н.** Создание инновационных пробиотических продуктов на основе штаммов лактобацилл, обладающих избирательной антагонистической активностью против патогенных микроорганизмов / **А.Н. Цапиева**, Е.И. Ермоленко, О.И. Соловьева, А.Н. Суворов // Материалы Всероссийской молодежной научной конференции-школы «Нейробиология интегративных функций мозга», 21-25 ноября 2011 г. - Медицинский академический журнал. - 2011. - Т. 11, Спецвыпуск. - С. 58.
 10. Соловьева, О.И. Аутопробиотический *Enterococcus faecium* в лечении синдрома раздраженной кишки / О.И. Соловьева, В.И. Симаненков, А.Н. Суворов, З.Р. Сундукова, **А.Н. Цапиева** // Материалы восемнадцатой гастроэнтерологической недели, Москва, 8-10 октября 2012 г. - Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. Приложение №40. - 2012. - Т. 22. - №5. - С. 166.
 11. Карасева, А.Б. Характеристика штаммов *Enterococcus faecium*, выделенных от пациентов с синдромом раздраженного кишечника / А.Б. Карасева, И.С. Кассиров, **А.Н. Цапиева** // Фундаментальная Наука и Клиническая Медицина, Санкт-Петербург, 22 апреля 2017 г. - 2017. - Т. 20. - С. 247-248.
 12. **Цапиева, А.Н.** Разработка метода идентификации индигенных лактобацилл кишечника при создании аутопробиотиков / **А.Н. Цапиева**, Е.А. Боровкова, А.Б. Карасева, Е.В. Алиева, А.Н. Суворов // **Вопросы детской диетологии.** - 2019. - Т. 17, №3. - С. 52-59.
 13. Суворов, А.Н. Микробиом (микробиота) при синдроме раздраженного кишечника: пути коррекции / А.Н. Суворов, О.И. Соловьева, М.П. Котылева, **А.Н. Цапиева**, А.Б. Карасева, Ю.Д. Кондратенко, А.Л. Лapidус, Е.И. Ермоленко // Материалы всероссийской мультikonференции с международным участием «Биотехнология - медицине будущего», Новосибирск, 29 июня-2 июля 2019 г. - 2019. - С. 111.
 14. **Боровкова, Е.А.** Оценка безопасности индигенных лактобацилл кишечника, перспективных в качестве аутопробиотиков / Е.А. Боровкова, Е.В. Алиева, Д.А. Ковалёв, Н.А. Шапаков, А.Б. Карасёва, А.Н. Цапиева, А.Н. Суворов, D. Guo, J. Yang, S. Zhao // **Современная наука: актуальные проблемы теории и практики. Серия: Естественные и Технические Науки.** - 2020. - №07. - С. 14-19.
 15. Suvorov, A. Enterococci as probiotics / A. Suvorov, E. Ermolenko, A. Chernish, **A. Bochkareva**, V. Donetch, V. Simanenkov // Annual meeting of the Japan Association of Lactic Acid Bacteria, Tokyo, Japan. - 2009. - p.35.
 16. **Bochkareva, A.N.** Antagonistic activity of lactic acid lactobacilli against group A and B streptococci and some other pathogenic microorganisms / **A.N. Bochkareva**, A.N. Suvorov // XXXII International Congress of the SOMED, Санкт-Петербург, 29-30 октября 2009 г. - Научно-практический журнал Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. - 2009. - №4. - С. А3.
 17. **Tarasova, E.** The influence of probiotic enterococci on the microbiota and cytokines expression in rats with dysbiosis induced by antibiotics / E. Tarasova, E. Yermolenko, V. Donets, Z. Sundukova, A. Bochkareva, Y. Borshev, M. Suvorova, Y. Plyasov, V. Simanenkov, A. Suvorov // **Beneficial Microbes.** - 2010. - V. 1, №3. - P. 265-270.
 18. **Bochkareva, A.N.** Antagonistic activity of Lactic Acid Bacteria against group A and B streptococci / **A.N. Bochkareva**, A.N. Suvorov // International scientific conference on Probiotics and Prebiotics, Kosice, Slovakia, 15-17 June 2010. -2010. - P. 100.
 19. Suvorov, A.N. Effects of Probiotic *E. faecium* on the immune system of rats on the model of experimental intestinal dysbiosis / A.N. Suvorov, E. Tarasova, E. Yermolenko, M. Suvorova, **A. Bochkareva** // International scientific conference on Probiotics and Prebiotics, Kosice, Slovakia, 15-17 June 2010. – 2010. - P. 66.

20. **Tsapieva, A.** Structure of plantaricin locus of *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 / **A. Tsapieva, A. Suvorov** // International Scientific Conference on Gastro-Intestinal Microbial Ecology, Kosice, Slovakia, 9-10 November 2010. - 2010. - P. 52-53.
21. Suvorov, A. Potential of enterococci used as probiotics or auto-probiotics for the treatment of intestinal disorders / A. Suvorov, E. Yermolenko, **A. Tsapieva**, Z. Sundukova, V. Simanenkov // International Scientific Conference on Gastro-Intestinal Microbial Ecology, Kosice, Slovakia, 9-10 November 2010. - 2010. - P. 36-37.
22. **Tsapieva, A. Structure of plantaricin locus of *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 / A. Tsapieva, N. Duplik, A. Suvorov // Beneficial Microbes. - 2011. - Vol. 2, №4. - P. 255-261.**
23. **Tsapieva, A.N.** Probiotic potential of lactobacilli isolated from national fermented milk products / **A.N. Tsapieva**, E.I. Yermolenko, A.V. Yeliseev, O.I. Solovieva, Z.R. Sundukova, V.I. Simanenkov, A.N. Suvorov // International scientific conference on Probiotics and Prebiotics, Kosice, Slovakia, 14-16 June 2011. - 2011.- P. 65.
24. Suvorov, A. Enterococci as probiotics or autoprobiotics / A. Suvorov, V. Simanenkov, L. Gromova, V. Kolodjjeva, **A. Tsapieva**, A. Chernish, O. Solovieva E. Ermolenko // Prebiotics and probiotics potential for human health, Sofia, Bulgaria, 18 April 2011. - 2011. - P. 104-106.
25. Suvorov, A. Enterococci as probiotics or means of vaccine delivery. Can medicine give them a chance? A. Suvorov, T. Gupalova, **A. Tsapieva**, E. Ermolenko, K. Grabovskaya, M. Gladilina, G. Leontieva // 22nd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), March 31 - April 02, 2012, London, United Kingdom. - 2012. - P. 153.
26. **Tsapieva, A.N.** The best antimicrobial peptides of probiotic bacteria / **A.N. Tsapieva**, A.N. Suvorov // International Scientific Conference «Bacteriophages and probiotics - alternative to antibiotics», Tbilisi, Georgia, 1-4 July 2012. - 2012. - P. 129.
27. Solovyova, O. Autoprobiotic with *Enterococcus faecium* in the treatment of Irritable Bowel Syndrome / O. Solovyova, V. Simanenkov, A. Suvorov, Z. Sundukova, **A. Tsapieva** // International scientific conference on Probiotics and Prebiotics, Kosice, Slovakia, 11-13 June 2013. - 2013.- P. 40-41.
28. Karaseva, A. Antimicrobial activity and enterocin-encoding genes in *Enterococcus faecium* strains / A. Karaseva, **A. Tsapieva**, I. Kassirov, E. Ermolenko, T. Haertle, A. Suvorov // Proceedings of the International Scientific conference on Probiotics and prebiotics, Budapest, Hungary, 20-22 June 2017. - 2017. - C. 98.

Изобретения

1. Патент 2391393 Российская Федерация, МПК С12N 1/20, А23С 9/12, А61К 35/74. Штамм *Lactobacillus delbrueckii* TS1-06, используемый для изготовления бактериальных препаратов и производства жидкой молочнокислой закваски в качестве продукта питания лечебно-профилактического назначения / Г.Г. Алехина, А.Н. Суворов, **А.Н. Бочкарева**; заявитель и патентообладатель Г.Г. Алехина, А.Н. Суворов. - № 2008145316/13; заявл. 19.11.2008; опубл. 10.06.2010, Бюл. № 16. - 6 с.
2. Патент 2391395 Российская Федерация, МПК С12N 1/20, А23С 9/12, А61К 35/74. Штамм *Lactobacillus fermentum* TS3-06, используемый для изготовления бактериальных препаратов и производства жидкой молочнокислой закваски в качестве продукта питания лечебно-профилактического назначения / Г.Г. Алехина, А.Н. Суворов, **А.Н. Бочкарева**; заявитель и патентообладатель Г.Г. Алехина, А.Н. Суворов. - № 2008145321/13; заявл. 19.11.2008; опубл. 10.06.2010, Бюл. № 16. - 6 с.
3. Патент 2460778 Российская Федерация, МПК С12N 1/20, А61К 35/74, А23С 9/127. Способ получения аутопробиотика на основе *Enterococcus faecium*, представителя индигенной микрофлоры кишечника хозяина / А.Н. Суворов, В.И. Симаненков, З.Р. Сундукова, Е.И. Ермоленко, **А.Н. Цапиева**, В.Н. Донец, О.И. Соловьева; заявитель и патентообладатель А.Н. Суворов, В.И. Симаненков. - № 2010154822/10; заявл. 30.12.2010; опубл. 10.09.2012, Бюл. № 16. - 9 с.

4. Патент 2546253 Российская Федерация, МПК C12N 1/20, C12Q 1/68, A61K 35/74, A23C 9/123. Способ получения персонифицированного аутопробиотического продукта и способ лечения синдрома раздраженной кишки с использованием этого продукта / В.И. Симаненков, А.Н. Суворов, О.И. Соловьева, Е.И. Ермоленко, **А.Н. Цапиева**, З.Р. Сундукова; заявитель и патентообладатель В.И. Симаненков, А.Н. Суворов. - № 2013120765/10; заявл. 25.04.2013; опубл. 10.04.2015, Бюл. № 10. - 21 с.
5. Патент 2553372 Российская Федерация, МПК A61K 35/74, A61P 1/14. Способ профилактики постинфекционного синдрома раздраженной кишки / В.И. Симаненков, А.Н. Суворов, О.И. Соловьева, **А.Н. Цапиева**, И.А. Шумихина; заявитель и патентообладатель Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова" Министерства здравоохранения Российской Федерации. - № 2014102545/15; заявл. 27.01.2014; опубл. 10.06.2015, Бюл. № 16. - 7 с.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БШ - Бристольская шкала формы стула
ВОЗ – всемирная организация здравоохранения
ЖКТ – желудочно-кишечный тракт
КОЕ/мл – количество колониеобразующих единиц на 1 миллилитр питательной среды
МИКА – минимальная ингибирующая концентрация антагониста
М-ПЦР – мультиплексная полимеразная цепная реакция
МРС – питательная среда для лактобацилл (англ. deMan, Rogosa, Sharp)
ПЦР – полимеразная цепная реакция
рРНК – рибосомальная РНК
тРНК – транспортная РНК
СРК – синдром раздраженного кишечника
ТАЕ – трис-ацетатный буфер для электрофореза
DF-молоко – закваска, на основе штаммов *L. delbrueckii* TS1-06 и *L. fermentum* TS3-06
lgКОЕ/мл – логарифм количества колониеобразующих единиц на 1 миллилитр среды