

На правах рукописи

Затевалов Александр Михайлович

Интегральная оценка состояния микробиоценозов биотопов желудочно-кишечного тракта и методы коррекции их нарушений

03.01.06 — Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

03.02.03 — Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой
степени доктора биологических наук

Москва - 2016

Работа выполнена в 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

Научные консультанты:

доктор медицинских наук Селькова Евгения Петровна

доктор биологических наук Алёшкин Андрей Владимирович

Официальные оппоненты:

Дерябин Дмитрий Геннадьевич,

доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделом лабораторной диагностики инфекций передающихся половым путем, и дерматозов Федерального государственного бюджетного учреждения "Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии" Минздрава России

Кобринский Борис Аркадьевич,

доктор медицинских наук, профессор, академик РАЕН, заведующий лабораторией систем поддержки принятия клинических решений Института современных информационных технологий в медицине Федерального исследовательского центра «Информатика и управление» РАН

Червинец Вячеслав Михайлович

доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой микробиологии и вирусологии с курсом иммунологии Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Тверской государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» Российской академии медицинских наук

Защита состоится « _____ » _____ 2016 года в 10 часов на заседании диссертационного совета Д.208.046.01 в 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 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 и на сайте www.gabrich.ru.

Автореферат разослан “ _____ ” _____ 2016 года.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук

Борисова Ольга Юрьевна

Общая характеристика работы

Актуальность проблемы

Микробиота человека представляет собой совокупность множества видов, а по количеству клеток она в 100 раз превышает число соматических и зародышевых клеток человека (Hood L., Heath J.R. и соавт., 2004). Микробиота играет важную роль в поддержании здоровья человека, а так же может служить высокоинформативным маркером и прогностическим критерием заболеваний (Галимзянов Х.М., 2013). По оценкам ученых количество видов микроорганизмов в микробиоценозах человека составляет 3500 видов, что было определено по итогам глобального проекта MetaHIT по расшифровке метагенома человека (Junjie Qin, Ruiqiang Li, Jeroen Raes et al., 2009). Наибольшее количество микроорганизмов находится в кишечнике. Микробиоценоз кишечника — это сложная замкнутая система, с большим количеством трофических, метаболических и генетических связей. Поэтому для его описания недостаточно бактериологического исследования кала, в котором высевается не более 1% микроорганизмов микрофлоры кишечника (Коршунов В.М., Ефимов Б.А., Кафарская Л.И., 2002). Большинство из них являются некультивируемыми, что объясняет вероятностный характер появления микроорганизмов в кале. В последние годы, для описания состояния микробиоценозов используются методы математического моделирования (Пожидаева А.С., 2015). Системные подходы к описанию сложных биологических объектов, таких как микробиоценозы, объединены в отдельное научное направление -omics технологии (Weston A.D., Hood L., 2004). Сочетание данных о составе микроорганизмов кала, метаболической активности микробиоценоза и типе ферментного нарушения с современными методами математического моделирования и многомерной статистики расширяет возможности изучения закрытых биологических систем, диагностики заболеваний, их прогнозирования и персонализацию средств микрoэкологической коррекции и профилактики. Исходя из тенденций современной мировой медицины существует необходимость диагностики заболеваний на качественно новом уровне. С увеличением возможностей диагностических аппаратно-программных комплексов увеличивается количество данных об объекте исследования, поэтому требуется интегральная система оценки микробиоценозов, включающая широкое применение математического моделирования и комплексный подход оценки факторов влияния на микробиоценозы (Распоряжение Правительства РФ от 28.12.2012 N 2580-р «Об утверждении Стратегии развития медицинской науки в Российской Федерации на период до 2025 года»).

Степень разработанности темы исследования

Развитие молекулярных методов привело к разработке новых подходов в исследовании микрофлоры – метагеномным исследованиям. Впервые термин метагеномика применил J. Handelsman, и M.R. Rondon в 1998 г., а в 2008 году стартовал глобальный проект MetaHIT, позволивший представить в 2011 г. первые результаты расшифровки метагенома человека. В последние годы интерес исследователей сконцентрировался на постгеномных исследованиях. J.K.Nicholson в 1999 г. впервые ввел термин - метаболом, которым он обозначил изучение совокупности всех низкомолекулярных метаболитов клетки, ткани, органа или всего организма. В 2006 г. J.K.Nicholson вводит термин метабономика, который определяется как количественное измерение динамического многопараметрического метаболического ответа живых систем на патофизиологические воздействия и генные модификации.

Учитывая вышеизложенное, актуальным является разработка, системы изучения и интегральной оценки микробиоценозов биотопов (на примере кишечника и ротоглотки) с учетом современных возможностей математического моделирования и многомерной статистики для расширения возможностей диагностики и прогноза развития заболеваний, связанных с их функциональным состоянием.

Цель исследования: Разработать систему интегральной оценки микробиоценозов на примере различных биотопов (желудочно-кишечного и респираторного трактов) основанную на применении биотехнологических методов исследования микрофлоры.

Задачи исследования:

1. Изучить и оценить возможности применения методов математического моделирования при оценке микробиоценозов организма (на примере кишечника и ротоглотки). Определить диагностические и прогностические критерии оценки микробиоценозов и их референсные значения. Создать алгоритм определения функционального нарушения пищеварения по копрологическому синдрому.
2. С целью оценки ферментативного пищеварения и состояния микробиоценоза кишечника разработать систему интегральной оценки состояния микробиоценоза биотопов желудочно-кишечного тракта по результатам комплексного анализа микрофлоры кишечника.
3. Изучить изменения метаболома кишечника под воздействием антибиотико-, гормоно- и противоопухолевой терапии на модели антибиотико-ассоциированного дисбиоза мышей.
4. Оценить возможности применения математических моделей состояния микробиоценоза ротоглотки и его метаболома для создания прогностических критериев оценки и расширения возможностей дифференциальной клинико-лабораторной диагностики у пациентов с острым бронхитом или острой пневмонией.
5. Разработать метод оценки эффективности применения пробиотических препаратов для нормализации микробиоценоза при заболеваниях различного генеза.
6. Создать методику оптимизации состава пробиотических препаратов по их метаболитическим профилям на основе консорциума штаммов лактобацилл с заданными свойствами и разработать алгоритм их индивидуального подбора для микробиологической коррекции микробиоценоза желудочно-кишечного тракта на модели антибиотико-ассоциированного дисбиоза у мышей.

Научная новизна

Созданы алгоритмы для оценки нарушений ферментативной активности и переваривающей способности желудка по копрологическому исследованию.

Впервые для определения степени микробиологических нарушений микробиоценозов желудочно-кишечного тракта использованы средства математического моделирования, получены искусственные нейронные сети и классификационные правила линейного дискриминантного анализа концентраций летучих жирных кислот кала или слюны, позволяющие повысить точность оценки микробиоценозов ротоглотки и кишечника.

Определены критерии нарушений функционального состояния микробиоценоза желудочно-кишечного тракта по концентрациям летучих жирных кислот в кале и дисбиотического изменения состава микробиоценоза кишечника, связанные с избыточным содержанием микрофлоры, чувствительной к бактериофагам. Обоснованы их референсные значения.

Разработана интегральная система оценки состояния микробиоценозов желудочно-кишечного тракта, определяющая вектор и глубину изменений состава и функциональных нарушений микрофлоры под действием различных факторов (инфекционные агенты, антибактериальные, противовирусные и др. препараты, неблагоприятные факторы внешней среды и др).

Составлена математическая модель, позволяющая оценить функциональные изменения микробиоценоза (на лабораторной модели антибиотико-ассоциированного дисбиоза у мышей) при воздействии антимикробных, противоопухолевых и гормональных препаратов и при протективном действии лактулозы с целью персонафицированного подбора средств микробиологической коррекции.

Впервые предложен персонафицированный подход к конструированию препаратов на основе пробиотиков, содержащий два вида лактобацилл, который способствует повышению эффективности лечения и профилактики основного заболевания.

Разработана схема комплексного биохимического анализа микрофлоры кишечника, включающая определение концентраций летучих жирных кислот методом газожидкостной хроматографии, оценку нарушений ферментативной активности, переваривающей способности желудка и микробиологический анализ кала. Показана эффективность применения результатов комплексного анализа микрофлоры кишечника для оценки дисбиотических изменений у пациентов с заболеваниями различного генеза.

Теоретическая и практическая значимость

Создана новая концепция оценки состояния микробиоценозов, которая включает интегральную систему критериев, полученных методами математического моделирования. Концепция позволяет оценивать микробиоценозы как закрытую биологическую систему, состоящую из культивируемых и некультивируемых микроорганизмов и их метаболитов. Внедрение интегральной системы критериев позволяет более точно оценить состояние микробиоценоза и его метаболома, а также участие метаболитов, образующихся в результате жизнедеятельности микроорганизмов и перераспределяющихся между различными полостями организма.

Разработаны федеральные клинические рекомендации «Определение дисбиотических изменений желудочно-кишечного тракта по маркерам содержимого кишечника» министерства здравоохранения Российской Федерации» (Утверждены Протокол №6 24.11.2015 г. МЗ РФ).

На основе биотехнологических методов обоснована необходимость интегральной оценки микробиоценозов различных систем организма, которая включает определение типа и глубины изменений микробиоты под воздействием антибактериального и противовирусного лечения инфекционных заболеваний и прочих патологических состояний, а так же эффективность микробиологической коррекции состояния микробиоценозов кишечника и ротоглотки.

Разработанные математические модели состояния микробиоценоза и его метаболома расширяют возможности оценки состояния биотопов ротоглотки у пациентов с острым заболеванием респираторного тракта и дифференциальной клинико-лабораторной диагностики при остром бронхите и острой пневмонии.

Полученные в исследовании референсные значения критериев, определяющие концентрации летучих жирных кислот и количество фагочувствительной микрофлоры в

кале, дают возможность оценить состояние микробиоценоза кишечника и проводить его коррекцию бактериофагами.

Результаты исследований о влиянии антимикробных, противоопухолевых и гормональных средств на концентрации летучих жирных кислот в содержимом кишечника показали необходимость проведения микрoэкологической коррекции биоценозов путем индивидуального подбора пробиотических препаратов, созданных на основе консорциумов двух видов лактобацилл (патент на изобретение №2431492 Российская Федерация RU «Композиция для коррекции дисбактериоза кишечника» от 20.10.2011).

Методология и методы исследования

Методология настоящего исследования спланирована в соответствии с поставленной целью. Объектами исследования стали микроорганизмы, выделенные из кала, с задней стенки глотки обследуемых, и из содержимого кишечника лабораторных мышей. Предметом исследования явились результаты исследований концентраций летучих жирных кислот (ЛЖК) в кале и в слюне обследуемых, в содержимом кишечника лабораторных мышей, структурные элементы кала, определяемые микроскопией и биохимическими реакциями. Научная литература, посвященная проблеме исследования микробиоценозов и коррекции их нарушений, была проанализирована формально-логическими методами исследования. Планирование и проведение исследований, направленных на решение поставленных задач, осуществлялось на основе общенаучных и специфических методов.

Микробиологические методы:

Точный объемный метод посева на жидкие и полужидкие питательные агаризованные среды с предварительным приготовлением десятикратных серийных разведений использовали для бактериологического анализа мазков с задней стенки ротоглотки (ЗСГ) и анализа фекалий. Идентификация родовой, видовой и типовой принадлежности микроорганизмов осуществляли на основании изучения морфологических, тинкториальных, культуральных, ферментативных и антигенных свойств согласно приказу МЗ СССР №535 от 22.04.1985, «Определителю бактерий Берджи» (1997). Мясо-пептонный агар с добавлением 5% эритроциров барана («Микроген», Махачкала) использовали для выделения всего спектра аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов и определения их количества. На среде Агар Ман, Рогоза, Шарп (МРС) («Микроген», Махачкала) в течение 3-5 суток при +37°C в анаэробных условиях выращивали *Lactobacillus spp.* Видовую принадлежность *Lactobacillus* проводили согласно руководству на тест-системах API CHL 50 для биохимической идентификации *Lactobacillus* (BioMerieux, Франция). *Bifidobacterium spp.* определяли по числу колоний, выросших на плотной питательной среде Балурокка («Микроген», Махачкала) в течение 5-7 суток при +37°C в анаэробных условиях. На среде Эндо («Микроген», Махачкала) проводили Выделение энтеробактерий. Родовую идентификацию микроорганизмов *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Hafnia* осуществляли с учетом биохимических реакций ферментации лактозы, глюкозы, сорбита, рамнозы, маллоната, гидролиза, мочевины, образования сероводорода, характера роста на среде Симмонса, образования индола, подвижности, лизиндекарбоксилазной активности, реакции с метиловым красным, определения фенилаланиндезаминазы.

Объекты и объем проведенных исследований

Объем исследований, учреждение	Вид исследований	Группы
Исследование микробиоценозов ЖКТ человека		
<p><i>Дизайн 1.</i> Результаты анализов кала 3175 человек от 4 до 90 лет, из них 2508 (79,0%) женщины и 667 (21,0%) мужчины (Консультационно-диагностический центр (КДЦ) ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора).</p> <p>Результаты анализов кала 60 пациентов из них 28 (46,6%) женщины и 32 (53,4%) мужчины (Отделения реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) НИИ нейрохирургии им. Академика Н.Н. Бурденко РАМН).</p>	<p>Копрологический анализ кала с определением копрологического синдрома, определение концентраций летучих жирных кислот в кале, бактериологический посев кала с определением чувствительности к бактериофагам.</p>	<p>Результаты анализов пациентов, с патологическими состояниями различной степени компенсации разделены на группы норма - (N), 1 степень - (I), 2 степень - (II) микробиологических нарушений, согласно ОСТ (Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника, 2003).</p> <p>3 степень микробиологических нарушений - (III) составили пациенты ОРИТ, оглушенные или без сознания более 96 часов и получающие энтеральное зондовое питание. Отбор пациентов проводили д.м.н. Ершова О.Н. и врач отделения реанимации и интенсивной терапии, к.м.н. Крылов К.Ю.</p>
<p><i>Дизайн 2.</i> Результаты анализов слюны и микрофлоры задней стенки глотки у 424 человек в возрасте от 4 до 90 лет Из них 318 (75%) женщины и 106 (25%) мужчин (КДЦ ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора).</p>	<p>Комплексные анализы микрофлоры ротоглотки, включающие определение концентраций летучих жирных кислот в слюне, бактериологический посев мазка с задней стенки глотки с определением чувствительности к бактериофагам.</p>	<p>Результаты анализов пациентов с патологическими состояниями различной степени компенсации были разделены на 3 группы по степени микробиологических нарушений: 1 степень (I), 2 степень (II), 3 степень (III) и группа норма (N) в соответствии с методическими рекомендациями (Зверев В.В. с соавт., 2011).</p>
<p><i>Дизайн 3.</i> Результаты анализов пациентов – детей 47 человек из них 14 (29,8%) женского и 33 (70,2%) мужского пола (Отделении детских инфекций детской городской клинической больницы имени святого Владимира).</p>	<p>Биохимическое исследование слюны на содержание ЛЖК, бактериологический анализ мазка с задней стенки ротоглотки. Бактериологический анализ кала, определение концентрации ЛЖК в кале.</p>	<p>Отбор пациентов с диагнозами острый бронхит (ОБ) и острая пневмония (ОП), а так же по анамнезу эпизодически болеющие дети (ЭБД) и часто болеющие дети (ЧБД) и группу сравнения (ГС) проводил врач, д.м.н. Мескина Е.Р. В исследовании оценивали влияние синбиотика «Бифидум-Мульти» (группы ОБ + БМ, ОП + БМ, ЭБД + БМ, ЧБД + БМ), который содержит в своем составе штаммы <i>B. bifidum</i>, <i>B. breve</i>, <i>B. infantis</i>, <i>B. longum</i> и <i>B. adolescentis</i> а так же пребиотические компоненты: пектин, олигофруктоза и инулин (ООО "НПФ АМФИТА", Россия). Применение синбиотиков регламентировано Отраслевым стандартом «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника» и Учебным пособием (Феклисова, 2011).</p>
<p><i>Дизайн 4.</i> Результаты анализов пациентов - детей 46 человек из них 21 (45,8%) женского и 25 (54,2%) мужского пола, проходивших типовую программу медицинской реабилитации (МКООУ санаторной школе-интернате № 5 г. Нижний Новгород).</p>	<p>Бактериологический и копрологический анализы кала.</p>	<p>Отбор пациентов в группу гастродуодениты (ГД) согласно анамнезу и группу сравнения (ГС) проводил врач, к.м.н. Шапкина О.А. В исследовании оценивали влияние синбиотика «Нормоспектрум» (группа ГД+ГС), в состав которого входят штаммы <i>B. bifidum</i>, <i>B. longum</i> и <i>B. adolescentis</i>, входящие в нормальную микрофлору взрослого человека, два штамма ацидофильных лактобацилл, а также виды <i>L. plantarum</i> и <i>L. casei</i>, пребиотические компоненты – инулин и олигофруктоза, витаминно-минеральный премикс (ООО "НПФ АМФИТА", Россия).</p>

Объем исследований, учреждение	Вид исследований	Группы
<i>Дизайн 5.</i> Результаты анализов пациентов – детей, проходившие типовую программу медицинской реабилитации (санаторий «Русское поле» Чеховский район, Московской области).	Бактериологический и копрологический анализы кала, определение концентраций летучих жирных кислот в кале и слюне.	Отбор пациентов в группы с онкологическим анамнезом (ОА) и группу сравнения (ГС) проводил врач, д.м.н. Цейтлин Г.Я. и к.м.н. Коновалова М.В. В исследовании оценивали влияние синбиотика «Бифидум Мульти» (группа ОА+БМ).
Исследование функционального состояния микробиоценоза на модели антибиотико-ассоциированного дисбиоза у мышей		
<i>Дизайн 6.</i> Для моделирования антибиотик-ассоциированного дисбиоза использовали белых лабораторных мышей (питомник филиал «Столбовая» ФГБУН «Научного центра биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства»), беспородные, самцы, вес 12-14г — 192 особи.	Определение концентраций ЛЖК в содержимом кишечника мышей.	Старшим научным сотрудником, к.б.н. Мелиховой А.М. из мышей были сформированы группы в зависимости от применяемого антимикробного, противоопухового или гормонального препарата: Амоксициллин (ООО Барнаульский завод медпрепаратов, Россия) доза - 10 мг - (АМЦ); Кларитромицин (ЗАО «Вертекс», Россия) - 10 мг - (КЛТ); Азитромицин (ООО Озон, Россия) - 2 мг - (АЗТ); Левофлоксацин (ООО «АВВА Рус, Россия) - 0,5 мг - (ЛВЦ); Цефиксим ("Pharma International Co", Иордания) - 2 мг - (ЦФС); Фосфомидин (ОАО КРАС-ФАРМА, Россия) - 4 мг - (ФМЦ); Метотрексат (ООО Северная Звезда, Россия) - 0,1 мг - (МТР); Преднизолон (Мосхимфарм-препараты, Россия) - 0,2 мг - (ПНЗ). Дозы препаратов рекомендованы производителями, с пересчетом на массу тела. Численность групп - 11 особей мышей в каждой группе. Для исследования влияния протективного действия пребиотических препаратов использовался сироп «Лактулоза» группа (Л) (в состав препарата входят лактулоза 66,7%, лимонная кислота 0,05% и очищенная вода) (ООО АВВА Рус, Россия);
Исследование метаболической активности двухвидовых композиций штаммов лактобацилл		
<i>Дизайн 7.</i> Выбор двухвидовых композиций на основе промышленно применимых видов лактобацилл, предназначенных для персонализированной коррекции дисбактериозов, осуществляли на основе исследования влияния на уровень ЛЖК в пригодной для промышленного культивирования питательной среде композиций штаммов лактобацилл.	Определяли концентрации летучих жирных кислот газожидкостной хроматографией.	Попарно в соотношениях 1:3; 1:2; 1:1; 2:1; 3:1 были культивированы штаммы: <i>Lactobacillus acidophilus</i> НК-1; К3Ш24; 100АШ; а так же <i>Lactobacillus plantarium</i> и <i>Lactobacillus casei</i> . Композиции культивировали в гидролизатно-молочной среде (ГМС) 48 часов.

Для выделения *Staphylococcus* использовали желточно-солевой агар Чистовича («Микроген», Махачкала), для дифференциации *Staphylococcus* и *Micrococcus* использовали тест на анаэробное сбраживание глюкозы и ферментирование глицерина в присутствии эритромицина. *Streptococcus* выделяли на среде Columbia agar (BioMerieux, Франция) с добавлением дефибрированной бараньей крови (5%), налидиксовой кислоты (15 мг/л) и колистина (10 мг/л) (Бондаренко В.М., Лихоед В.Г. «Методические рекомендации «Микробиологическая диагностика дисбактериоза кишечника», ГУ НИИЭМ им. Н.Ф.Гамалеи РАМН, М., 2007). Для исследования фаговой резистентности использовали бактериофаги производства («Микроген», Махачкала): стафилококковый бактериофаг, поливалентный бактериофаг, колипротейный бактериофаг, интенси-бактериофаг, клебсиеллезный бактериофаг, стрептококковый бактериофаг, секстафаг.

Физико-химические методы.

Копрологические показатели определяли микроскопированием суспензии кала, биохимическими реакциями и определением органолептических характеристик (Морозова В.Т. с соавт., 2005). Все исследуемые показатели были формализованы и использованы для определения копрологических синдромов по алгоритмам, разработанным в настоящей диссертационной работе.

Концентрации ЛЖК в биосубстратах исследовали газожидкостной хроматографией (ГЖХ) на газо-жидкостном хроматографе с капиллярной колонкой с неподвижной фазой FFPA и пламенно-ионизационным детектором, методом прямого ввода подкисленного супернатанта исследуемого субстрата в испаритель (Иконников Н.С. и соавт., 1999 г.; Кондракова О.А. с соавт., 2001).

Математико-статистические методы.

Математическое моделирование искусственные нейронные сети (ИНС) использовали для изучения степени микробиологических нарушений микробиоценозов желудочно-кишечного тракта (Patterson D., 1996). Подбор архитектуры искусственной нейронной сети проходил с помощью пакета ST Neural Networks программы Statistica 8.0. Данные бактериологического анализа для обработки искусственной нейронной сетью предварительно подготавливали: значения (десятичные логарифмы концентрации микроорганизмов в кале или мазке задней стенки глотки) округляли до целого числа и обозначали в программе как категориальные.

Построение линейной дискриминантной функции концентраций ЛЖК проводили с помощью пакета Discriminant Analysis программы Statistica 8.0. (Боровиков В.П., 1997). Оценку корреляционно ковариационной независимости переменных, отношение меры внутригрупповой изменчивости к мере общей изменчивости (лямбда Уилкса), классификацию результатов анализов исследуемых групп проводили с помощью решающих правил линейных дискриминантных функций (ЛДФ).

В работе использованы методы вариационной статистики с вычислением средней арифметической и ее стандартной ошибки ($M \pm SE$) с использованием параметрических (t-критерий Фишера-Стьюдента) и непараметрических (U-критерий Вилкоксона) методов. Значимыми считали различия при $p < 0,05$. Для оценки соответствия полученных результатов теоретической гипотезе использовали χ^2 -критерий. Корреляции оценивали с помощью критерия Пирсона. Расчеты проводи-

лись с использованием компьютерных программ «Microsoft Office Excel 2010» и «Statistica 8.0».

Метод экспертной оценки.

Метод экспертной оценки использовался для определения степени микробиологических нарушений микробиоценоза кишечника и ротоглотки. Экспертная оценка проводилась врачом-бактериологом на соответствие результатов бактериологического анализа кала или мазка с задней стенки глотки и определенной степени микробиологических нарушений описанной в ОСТе (Приказе МЗ РФ № 231 от 9 июня 2003 г.) и учебном пособии (Зверев В.В., 2011).

Личное участие автора

Автор участвовал в организации всех этапов исследования; выборе объекта, разработке методологии проведения данного научного исследования, включающего на первоначальных этапах биохимическое, микроскопическое и бактериологическое исследование с последующей разработкой системы интегральной оценки микробиоценозов, на основе математического моделирования и статистической обработки результатов, обосновании выводов и практических рекомендаций.

Копрологические анализы и микробиологические исследования выполнялись совместно с сотрудниками ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора д.б.н. Воропаевой Е.А., Гусаровой М.П., Затеваловой Е.А.

Хроматографические исследования выполнялись совместно с сотрудниками ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора к.х.н. Иконниковым Н.С., Кошкиной Н.К., Гудовой Н.В.

Культивирование микроорганизмов и определение концентраций летучих жирных кислот было проведено совместно с научными сотрудниками ООО «Комплаенс» Рубальским Е.О. и Зязиным С.Н.

Положения, выносимые на защиту:

1. Важным условием для проведения многофакторного анализа инфекционного процесса и прогноза развития заболеваний является интегральная система оценки микробиоценозов биотопов желудочно-кишечного тракта. В оценке микробиологического состояния биотопов и определения степени микробиологических нарушений большое значение имеет исследование микробных сообществ микробиоценозов желудочно-кишечного тракта с помощью методов математического моделирования.
2. Диагностические и прогностические критерии и их референсные значения, полученные на основе методов биотехнологического моделирования нормальных и патологических метаболических и метагеномных процессов биотопов желудочно-кишечного тракта, позволяют оценить эффективность про-, (пре-) биотикотерапии и персонифицировать программу лечебных мероприятий.
3. Персонифицированный подбор пробиотических биопрепаратов на основе консорциума лактобацилл для микробиологической коррекции должен проводиться с учетом синергетического эффекта метаболической активности, входящих в его состав штаммов, и специфичности воздействия антимикробных и других средств, влияющих на метаболизм микробиоценозов.

Степень достоверности и апробация результатов исследования:

О достоверности результатов работы свидетельствует достаточный объем исследований с применением современных высокочувствительных и специфичных методик, средств математического моделирования, адекватных методов статистической обработки полученных данных.

Диссертация апробирована на заседании Ученого Совета ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека протокол № 4 от 27 мая 2015 года

Основные положения диссертации доложены на: IX Общероссийском конгрессе детских инфекционистов (Москва, 2010); IV Ежегодном Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням (Москва, 2010); XIX конгрессе детских гастроэнтерологов России и стран СНГ (Москва, 2012); IV Ежегодном Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням, (Москва, 2012); 14-м Международном Славяно-Балтийском научном форуме (Санкт Петербург, 2012); Международной научной конференции «Достижения и перспективы развития биотехнологии» (Саранск, 2012); Международной научно-практической конференции «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности» (Ульяновск, 2013); V Ежегодном Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням (Москва, 2013); Всероссийской научно-практической конференции «Инновационные технологии в противоэпидемической защите населения» (Нижний Новгород, 2014); II научно-практической конференции «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности» (Санкт-Петербург, 2014); XIX форуме «Национальные дни лабораторной медицины России – 2015» (Москва, 2015); 12-ой Международной научной гастроэнтерологической сессии НОГР «Санкт-Петербург – Гастросессия – 2015» (Санкт-Петербург, 2015).

По материалам диссертации опубликовано 55 научных работы, в том числе 21 статья в рецензируемых изданиях, в сборниках научных трудов и материалах конференций - 27, монографий в соавторстве – 5, патента — 2.

Объем и структура диссертации

Материалы диссертации изложены на 215 страницах машинописного текста, иллюстрированы 80 таблицами, 61 рисунком. Диссертационная работа включает обзор литературы, материалы и методы исследования, четыре главы собственных исследований, заключение, выводы, практические рекомендации, список литературы, содержащий 109 отечественных и 91 зарубежных источника.

Основное содержание работы.

Разработка диагностических и прогностических критериев, их референсных значений

Для оценки состояния микробиоценозов ротоглотки и кишечника по результатам, бактериологического анализа кала, ротоглотки, концентраций ЛЖК слюны, кала и копрологического анализа в научной работе были применены методы математического моделирования. Изучение результатов бактериологического анализа кала статистическими методами сравнения встречаемости, количества микроорганизмов и их ассоциатов показало отсутствие достоверных различий между сформированными группами (Таблица 1 *дизайн 1*) N – I; N – II, N – III, I – II, I – III, II – III.

Для поиска различий микробиоценозов различных групп патологического состояния разной степени компенсации по результатам бактериологических анализов кала была построена искусственная нейронная сеть MPL93-14-4 (Рисунок 1).

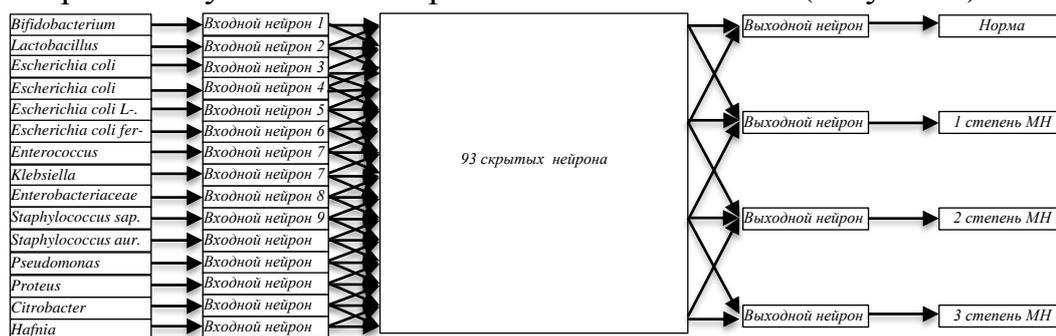


Рисунок 1 - Схема искусственной нейронной сети MLP 93-39-4 определения степени микробиологических нарушений по результатам бактериологического анализа кала.

Результаты корректной классификации исследуемых групп, характеризующие качество их разделения, представлены в виде матрицы (Таблица 2).

Таблица 2

Классификация объектов по группам искусственной нейронной сетью MPL93-14-4

Результаты выходного нейрона	Доля объектов с заданной классификацией, определённой ИНС MPL 93-14-4, %			
	1 степень (I)	2 степень (II)	3 степень (III)	Норма (N)
1.MLP 93-14-4-1	98,47	0,38	0,00	1,15
1.MLP 93-14-4-2	5,08	94,92	0,00	0,00
1.MLP 93-14-4-3	0,00	0,00	100,00	0,00
1.MLP 93-14-4-5	2,59	0,00	0,00	97,41
Корректность классификации, %	90,35	99,02	100	99,63

Из таблицы 2 видно, что выявлена наименьшая вероятность ложной классификации между пациентами из группы «норма» и пациентами со 2-й степенью микробиологических нарушений, что коррелирует с количественным соотношением микроорганизмов в исследуемых группах.

Исследование результатов бактериологического анализа микрофлоры ротоглотки методами сравнения встречаемости количества микроорганизмов и их ассоциатов показало отсутствие достоверных различий между сформированными группами (Таблица 1, дизайн 2) N – I; N – II, N – III, I – II, I – III, II – III. Для поиска различий микробиоценозов исследуемых групп по бактериологическому анализу ротоглотки была построена ИНС MPL 58-30-4, характеристика корректной классификации ИНС MPL 58-30-4 представлена в таблице 3.

Из таблицы 3 видно, что между группами N и III вероятность ложной классификации выше для групп N – I и N – II, а так же I – III, что свидетельствует о несоответствии количественного выражения степени микробиологических нарушений и глубины изменений в соотношениях микроорганизмов.

Сравнение средних величин концентраций ЛЖК в кале у пациентов исследуемых групп N – I, N – II, I – II показало отсутствие достоверных различий. Достоверные изменения концентраций ЛЖК в кале были получены при сравнении между пациентами, входящими в группы N – III, I – III, II – III (Таблица 1, дизайн 1). Гра-

ницы значений концентраций ЛЖК в кале для III группы рассматривали как референсные значения концентраций ЛЖК в кале (Таблица 4).

Таблица 3

Классификации объектов по группам искусственной нейронной сетью MPL58-30-4

Результаты выходного нейрона	Доля объектов с заданной классификацией, определённой ИНС MPL 58-30-4, %			
	1 степень (I)	2 степень (II)	3 степень (III)	Норма (N)
1.MLP 58-30-4-1	98,5	0,00	0,00	0,00
1.MLP 58-30-4-2	1,50	100	0,00	0,00
1.MLP 58-30-4-3	0,00	0,00	98,4	0,7
1.MLP 58-30-4-5	0,00	0,00	1,60	99,3
Корректность классификации, %	99,3	100	98,4	99,3

Таблица 4

Референсные значения концентраций летучих жирных кислот в кале

Параметр, ед. изм.	Границы	Среднее
Суммарный уровень ЛЖК, ммоль/г.	не менее 59,74	80,75
Концентрация масляной кислоты, ммоль/г	не менее 4,97	10,16
Доля уксусной кислоты, %	не более 74,78	67,63
Доля пропионовой кислоты, %	не менее 16,49	18,99
Доля масляной кислоты, %	не менее 9,96	13,38
Структурный индекс, ед.	не менее 0,5	0,67
Индекс изокилот, ед.	не более 0,66	0,53

Результаты концентраций ЛЖК в слюне исследовали методами элементарного статистического сравнения. Установлено, что достоверные различия между группами N – I; N – II, N – III, I – II, I – III, II – III отсутствуют. Для исследования микробиоценоза ротоглотки методом математического моделирования – дискриминантным анализом концентраций ЛЖК в слюне оценили значения корреляционных связей ($r < 0,66$) в исследуемых группах и значения уровня значимости F-критерия для величины лямбды Уилкса, не превышающее 0,05. (Бююль А., Цёфель П., 2005). Результат распределения анализов пациентов в пространстве дискриминантных функций представлен на рисунке 2.

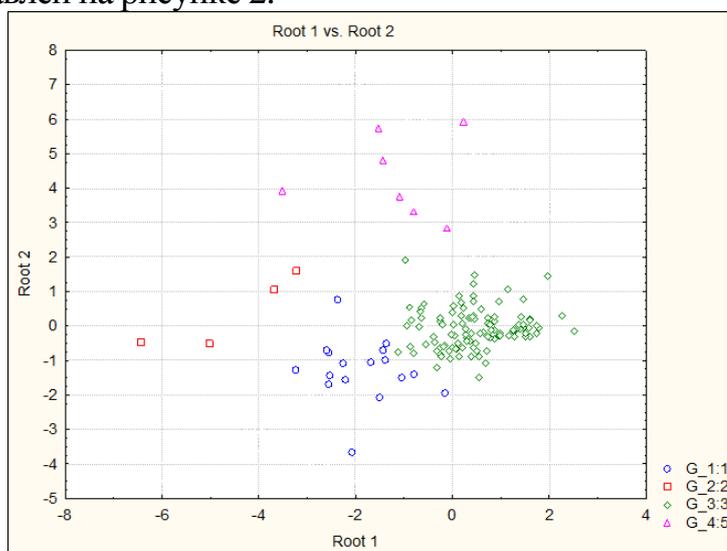
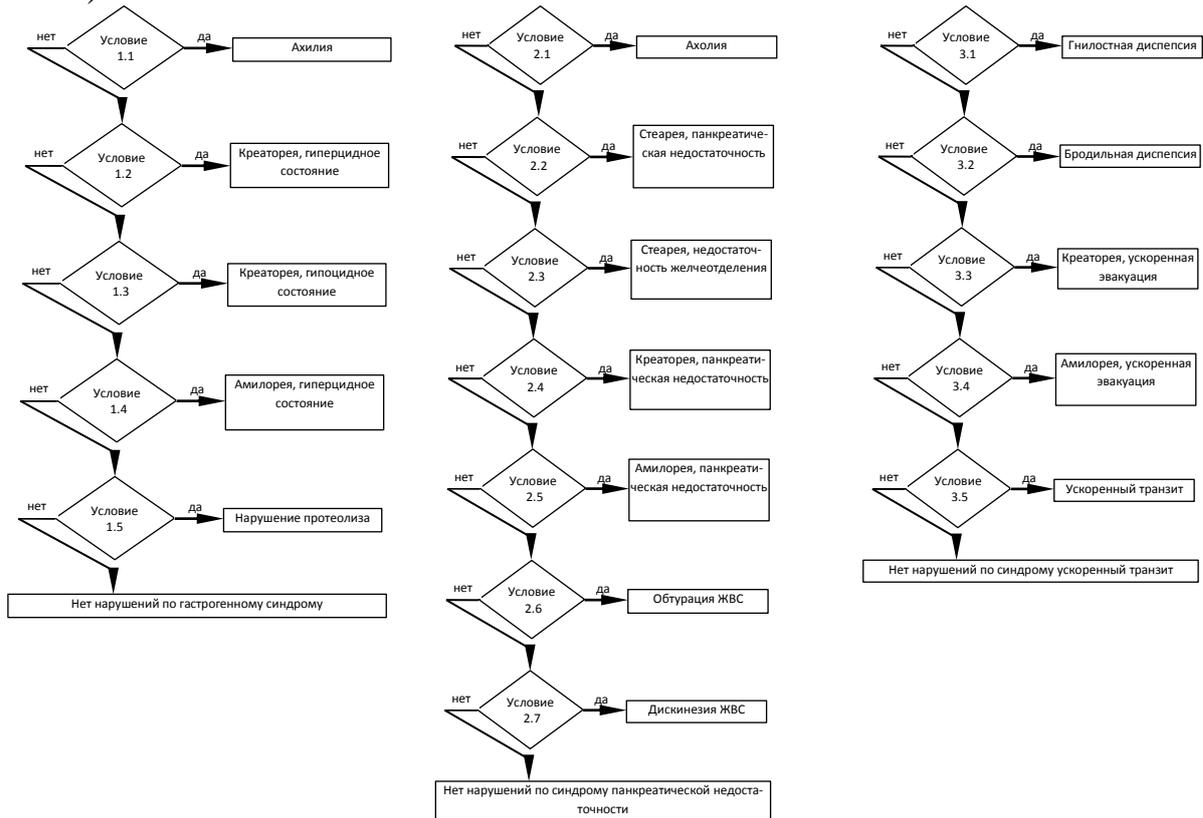


Рисунок 2 - Распределение пациентов по группам (G_1:1 – I, G_2:2 – II, G_3:3 – III, G_4:5 – N), в проекции двух дискриминантных функций (Root 1, Root 2)

На рисунке 2 показано, что между центроидами групп N и III расстояние меньше, чем между центроидами групп: N – I, N – II. Это свидетельствует о несоответствии количественного выражения степени микробиологических нарушений и глубины изменений в соотношениях микроорганизмов микробиоценоза задней стенки глотки.

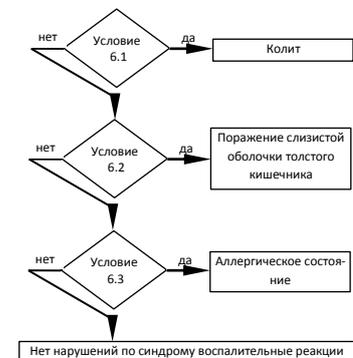
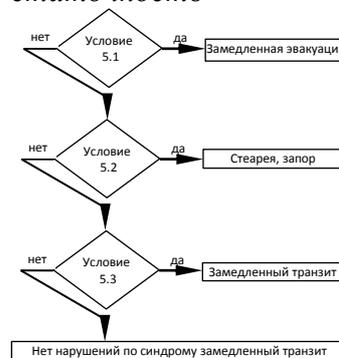
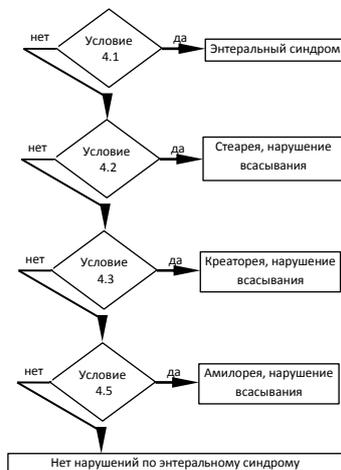
Для определения копрологических синдромов данные полуколичественного макро- и микроскопического анализа кала были формализованы. На основе формализованных данных, сведений литературы (Морозова В.Т., 2005) и собственных работ были построены алгоритмы поиска копрологических синдромов. Алгоритмы определения копрологических синдромов представлены в виде схем (Рисунок 3).



а) гастрогенный синдром

б) панкреатическая недостаточность

в) ускоренный транзит



г) нарушения всасывания

д) замедленный транзит

е) воспалительные реакции

Рисунок 3 - Алгоритмы определения копрологических синдромов.

Частоту встречаемости фагочувствительной микрофлоры в микробиоценозах кишечника сравнивали у пациентов с нарушением ферментативного пищеварения по типу амилорея, стеаторея, креаторея. Выявлено 2-х кратное увеличение частоты встречаемости микробиоценозов, с микроорганизмами чувствительными к родственным бактериофагам, у пациентов с нарушением ферментативного пищеварения. При анализе зависимости между концентрациями масляной кислоты и суммарной концентрацией ЛЖК, и долей микрофлоры, чувствительной к бактериофагам, установлено наличие экстремума на значении 10% фагочувствительной условно-патогенной микрофлоры к общему количеству условно-патогенной микрофлоры. На основании этих исследований выбран 10% порог, определяющий наличие фагочувствительной микрофлоры в микробиоценозе кишечника.

Таким образом, исследование микробных сообществ микробиоценозов с помощью методов математического моделирования позволяет уточнить параметры и критерии оценки микробиоценозов организма, а так же минимизировать ошибку, связанную с субъективностью экспертной оценки.

Система интегральной оценки состояния микробиоценоза биотопов желудочно-кишечного тракта

Изучение микробиоценозов организма с целью расширения возможностей диагностики и прогноза заболеваний требует новых подходов. Необходима систематизация критериев оценки микробиоценозов, унификация параметров и их формализация для того, чтобы оценить величину и вектор изменений системы микробно-тканевого комплекса. Комплексный подход к оценке микробиоценозов, предложенный в исследовании, позволяет интерпретировать реакцию закрытых систем на воздействия различных внешних факторов.

Нами представлена система интегральной оценки микробиоценозов биотопов с использованием биотехнологического моделирования нормальных и патологических метаболических и метагеномных процессов биотопов ЖКТ (на примере кишечника и ротоглотки). Разработанная нами система интегральной оценки состояния микробиоценоза биотопов желудочно-кишечного тракта представлена на рисунке 4.

Как видно, из представленной схемы (Рисунок 4) на микробиоценозы биотопов человека оказывают воздействие различные факторы, такие как инфекционные заболевания, применение химиотерапии и химиопрепаратов (антибактериальные, противовирусные и др. препараты), воздействие неблагоприятных факторов внешней среды и др. Нами подтверждены выводы исследователей (Кольченко И.И., 2002, Бельмер С.В., 2005, Шабашова Н.В., 2011, Алешкин В.А. с соавт. 2014) о том, что под влиянием эндогенных и экзогенных факторов наблюдаются нарушения ферментативного пищеварения и избыточный рост просветной микрофлоры.

Кроме того, показано, что выявленные нарушения ферментативного пищеварения приводят к увеличению в 2 раза встречаемости микроорганизмов, чувствительных к бактериофагам. В связи с увеличением количества микроорганизмов просветной микрофлоры, последняя получает субстратное преимущество перед индигенной, что приводит к подавлению ее роста.



Рисунок 4 - Система интегральной оценки состояния микробиоценозов биотопов ЖКТ.

Подавление роста индигенной микрофлоры приводит к снижению концентраций метаболитов, в основном, масляной кислоты, что было показано на примере достоверных отличий концентраций ЛЖК в кале в группе III (3-я степень микробиологических нарушений). Снижение концентрации масляной кислоты приводит к изменению большинства физиологических функций в организме человека, основными из которых, являются поддержание гомеостаза, в т.ч. водно-электролитного баланса, энергообеспечение колоноцитов, участие в регуляции моторики и иммуннокоррекции. Эти изменения способствуют снижению колонизационной резистентности. Нормальная собственная микрофлора кишечника человека является важнейшим регулятором иммунологического процесса и индуцирует формирование иммунитета в целом всего организма. Дисбиотические изменения в кишечнике могут приводить к дефектам развития иммунитета, в частности, нарушениям переключения синтеза антител класса IgE на IgA (sIgA), стимуляции дифференцировки T_H преимущественно в T_H2-клетки. Все изложенное, приводит к развитию патологических процессов.

Изменения метаболомов кишечника под воздействием химиопрепаратов на модели антибиотико-ассоциированного дисбиоза мышей

С целью изучения изменений метаболома ЖКТ под воздействием химиопрепаратов проведено математическое моделирование состояния метаболома кишечника на модели антибиотико-ассоциированного дисбиоза у мышей (Таблица 1, *дизайн б*). Для исследования содержимого кишечника в модели антибиотико-ассоциированного дисбиоза у мышей применили дискриминантный анализ.

Нахождение центроидов в трехмерной проекции дискриминантных функций позволило графически представить величину и направленность метаболических изменений (Рисунок 5).

Установлено, что самое большое расстояние наблюдается от центроида группы N до центроида группы АМЦ, а минимальное – от центроида группы N до центроидов групп ПНЗ и МТР (Таблица 1, дизайн б). Между группами МТР и ПНЗ и группами N и ПНЗ не установлено достоверных отличий. Так же нет достоверных отличий между группами КЛТ, ЛВЦ и ЦФС. Таким образом, с помощью математического моделирования показаны достоверные отличия метаболитных изменений микробиоценоза при воздействии антибиотико-, гормоно- и противоопухолевой терапии на модели антибиотико-ассоциированного дисбиоза мышей.

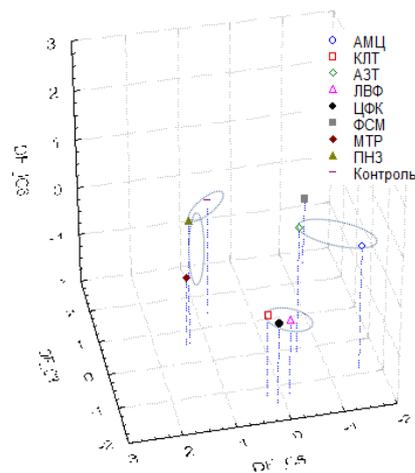


Рисунок 5 - Распределение центроидов групп и достоверность отличий между группами

На основании полученных результатов (Рисунок 5) можно сделать вывод, что наибольшее влияние на антиметаболическую активность микробиоценоза кишечника мышей из всего перечня изучаемых препаратов оказывает амоксициллин (АМЦ). Для оценки эффективности протективных свойств лактулозы в исследовании ее дозу варьировали от 0 до 20 мг на особь. Полученные результаты эффективности протективного действия (отношение квадратов расстояний Махаланобиса) представлены на графике (Рисунок 6).

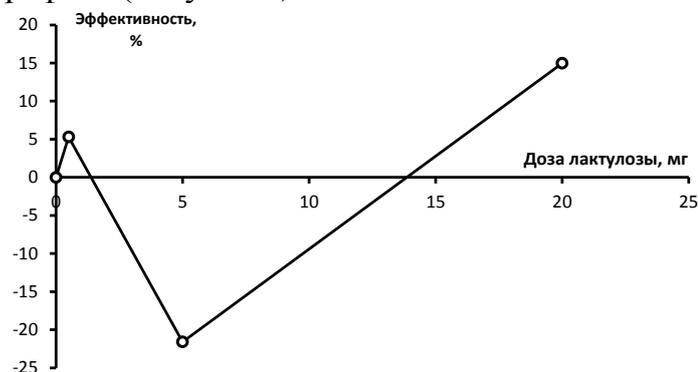


Рисунок 6 - Эффективность действия лактулозы рассчитанная на основании квадратов расстояний Махаланобиса у разных экспериментальных групп.

Установлено, что увеличение дозы лактулозы, принимаемой совместно с антибиотиками, не имеет линейной зависимости. Для дозы 0,5 мг эффективность составила 5%, для 5 мг – эффект отрицательный (составляет -20%), а при дозе 20 мг –

положительный (15%). Максимальный положительный эффект достигается при максимальной дозе лактулозы - 20 мг, причем и он не превышает 15%.

При определении эффективности лактулозы при различных концентрациях азитромицина и экспозиции (3 и 6 дней) на модели антибиотико-ассоциированного дисбиоза мышей показано, что протективное действие лактулозы на микробиоценоз мышей увеличивается на 80% с увеличением количества лактулозы до 20 мг и экспозиции до 6 дней.

Таким образом, дискриминантным анализом концентраций ЛЖК в содержимом кишечника проведена количественная оценка воздействия различных средств (антимикробных средств, пробиотиков, пребиотиков и прочих) на микробиоценоз кишечника мышей.

Оценка состояния микробиоценоза ротоглотки пациентов с острыми респираторными заболеваниями с помощью методов математического моделирования

1. Искусственная нейронная сеть состояния микробиоценозов ротоглотки по концентрациям микроорганизмов. Для оценки состояния микробиоценоза ротоглотки пациентов с острым бронхитом и острой пневмонией применили искусственную нейронную сеть (ИНС). Искусственная нейронная сеть позволяет классифицировать состояния микробиоценозов по концентрациям микроорганизмов, выделенных на задней стенке глотки. Для создания ИНС были отобраны результаты бактериологического посева мазков с задней стенки глотки отобранные по 2 группам ОБ — 17 человек и ОП — 27 (Таблица 1, дизайн 3). На основании полученных результатов была разработана ИНС MLP 37-16-2. Полученная ИНС показала 100% корректное разделение групп острый бронхит и острая пневмония, что подтверждает отличие состава микрофлоры задней стенки глотки при остром бронхите и острой пневмонии.

2. Математическая модель состояния метаболома микробиоценоза ротоглотки дискриминантным анализом концентраций ЛЖК в слюне. Для математической модели метаболической активности микробиоценоза ротоглотки при заболеваниях острый бронхит и острая пневмония использовали дискриминантный анализ. По результатам дискриминантного анализа определения концентраций ЛЖК в слюне в группах ОБ – 17 человек и ОП – 27 человек (Таблица 1, дизайн 3) были рассчитаны классификационные функции дискриминантного анализа, которые позволяют достоверно ($p < 0,05$) дифференцировать состояния микробиоценоза ротоглотки у пациентов с диагнозом острый бронхит и острая пневмония. При проверке правильности классификации решающими правилами линейного дискриминантного анализа групп пациентов с ОБ и ОП были некорректно классифицированы один результат в группе ОБ и один результат в группе ОП. Среднее значение точности корректной классификации составила 95,45% (Таблица 5).

Получены линейные классификационные уравнения:

$$F1 = -6,13238 + 0,50752 \times C2 - 1,15227 \times C5 - 3,88032 \times IC6$$

$$F2 = -0,80473 + 0,113286 \times C2 + 1,909195 \times C5 + 0,119217 \times IC6$$

где: С2 – концентрация уксусной кислоты в слюне, ммоль/г; С5 – концентрация валериановой кислоты в слюне, ммоль/г; С6 – концентрация изокапроновой кислоты в слюне, ммоль/г.

Таблица 5.

Оценка чувствительности решающих правил (Результаты классификации дискриминантным анализом групп пациентов с ОБ и ОП).

Группы, заданные для классификации	Доля корректной классификации, %	Результаты классификации по группам, чел.	
		Острый бронхит (ОБ)	Острая пневмония (ОП)
Острый бронхит (ОБ)	94,12	16	1
Острая пневмония (ОП)	96,30	1	26
Итого:	95,45	17	27

Таким образом, нами получен результат, свидетельствующий о различиях между группами ОБ и ОП. При рассмотрении F-критерия и уровня значимости получили оценку различий между группами. F-критерий между ОБ и ОП группами равен 5,20759 ($p < 0,00001$). Полученные классификационные функции позволяют эффективно расширить возможности дифференциальной диагностики пациентов со схожими симптомами.

Интегральная оценка изменения микробиоценозов желудочно-кишечного тракта при заболеваниях различного генеза.

Интегральная оценка изменений микробиоценозов ЖКТ, вызванных проведением антимикробной терапии при остром бронхите и острой пневмонии.

Изучали особенности микробиоценозов ротоглотки и кишечника у пациентов с острым бронхитом (группа ОБ) и острой пневмонией (группа ОП) (Таблица 1, дизайн 3). С целью изучения влияния антимикробной и противовирусной терапии, а также пробиотикотерапии (синбиотик «Бифидум Мульти») провели сравнительный анализ средних значений микробиологических нарушений, частоту встречаемости микробиоценозов с присутствием фагочувствительной микрофлоры не более 10% со значениями концентраций летучих жирных кислот, находящихся в рамках референсных значений (Таблица 4). Результаты представлены на гистограммах (Рисунок 7).

В результате проведенного исследования (Рисунок 7) установили достоверное увеличение среднего значения степени микробиологических нарушений микробиоценоза ротоглотки после антимикробной терапии в группе ОБ и с применением синбиотика «Бифидум Мульти» (Рисунки 7а, 7в), а так же снижение частоты встречаемости микробиоценозов с фагочувствительными микроорганизмами, что не отмечается в группе ОП (Рисунки 7а, 7в). Не было достоверных изменений степени микробиологических нарушений микробиоценоза кишечника в группах ОБ и ОП. Наблюдали достоверное увеличение встречаемости фагочувствительной микрофлоры в микробиоценозе группы ОБ, а так же снижение встречаемости микробиоценозов со значениями концентраций ЛЖК в кале в рамках референсных значений (Рисунки 7г, 7д).

Влияние синбиотика «Бифидум-Мульти» на микробиоценозы при лечении острого бронхита можно характеризовать, как положительное, так как в подгруппе ОБ+БМ с включением «Бифидум Мульти» в схему лечения, снижается средняя

степень микробиологических нарушений ротоглотки и кишечника. Этого не происходит при отсутствии в схеме лечения «Бифидум Мульти» (Рисунки 7а, б, в).

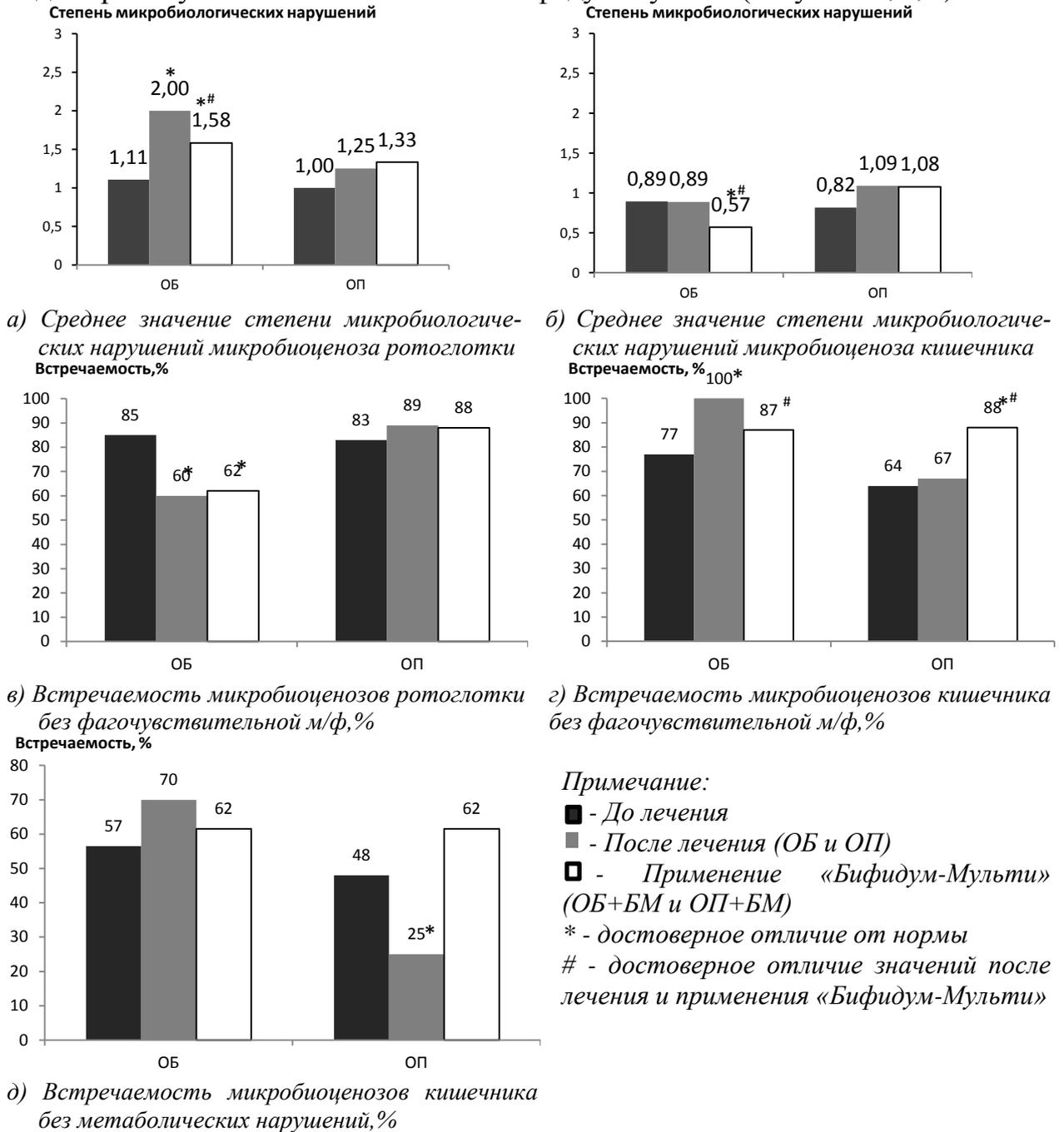
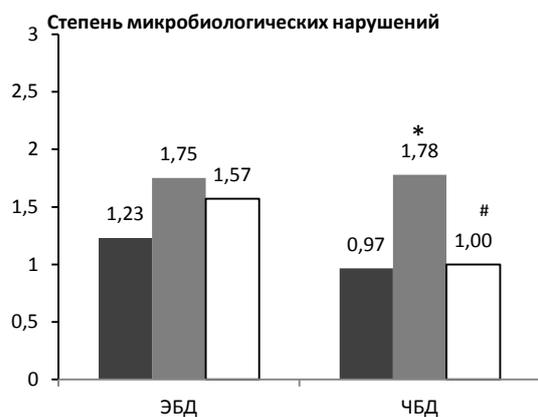
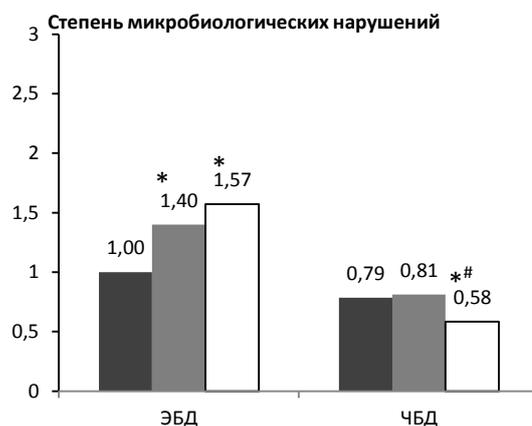


Рисунок 7 - Изменения состояния микробиоценозов кишечника и ротоглотки у пациентов групп «ОБ» и «ОП».

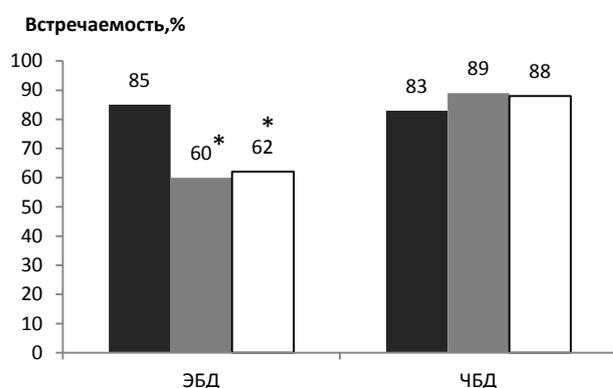
Изучали особенности микробиоценозов ротоглотки и кишечника у пациентов с острым бронхитом и острой пневмонией в группах эпизодически болеющие дети (ЭБД) и часто болеющие дети (ЧБД) (Таблица 1, дизайн 3). Оценивали влияние антимикробной и противовирусной и протективного действие синбиотика «Бифидум Мульти» на микробиоценоз кишечника и ротоглотки. Сравнивали средние значения микробиологических нарушений и частоту встречаемости микробиоценозов с присутствием фагочувствительной микрофлоры не более 10% со значениями концентраций летучих жирных кислот, находящихся в рамках референсных значений (Таблица 4). Результаты представлены на гистограммах (Рисунок 8).



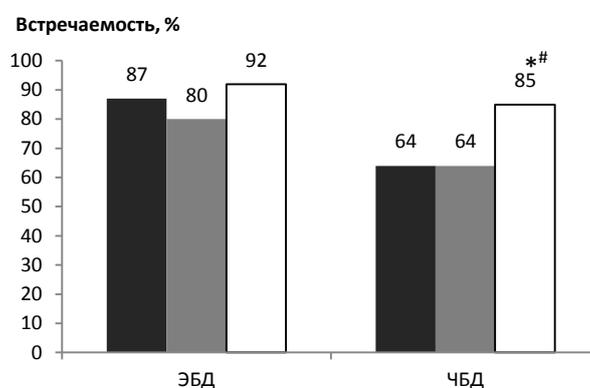
а) Среднее значение степени микробиологических нарушений микробиоценоза ротоглотки



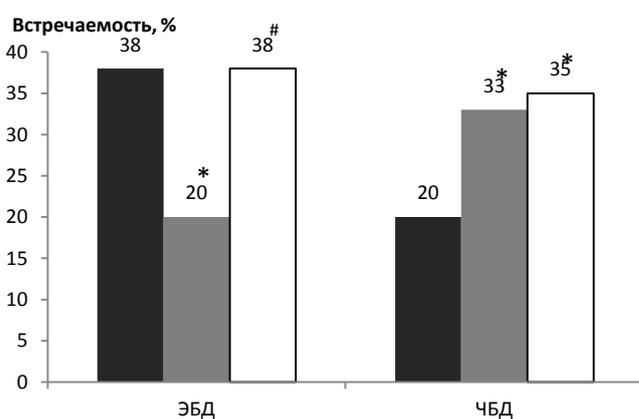
б) Среднее значение степени микробиологических нарушений микробиоценоза кишечника



в) Встречаемость микробиоценозов ротоглотки без фагочувствительной м/ф, %



г) Встречаемость микробиоценозов кишечника без фагочувствительной м/ф, %



д) Встречаемость микробиоценозов кишечника без метаболических нарушений, %

Примечание:

- - До лечения
- - После лечения (ЭБД и ЧБД)
- - Применение Бифидум Мульти (ЭБД+БМ и ЧБД+БМ)

* - достоверное отличие от нормы

- достоверное отличие значений после

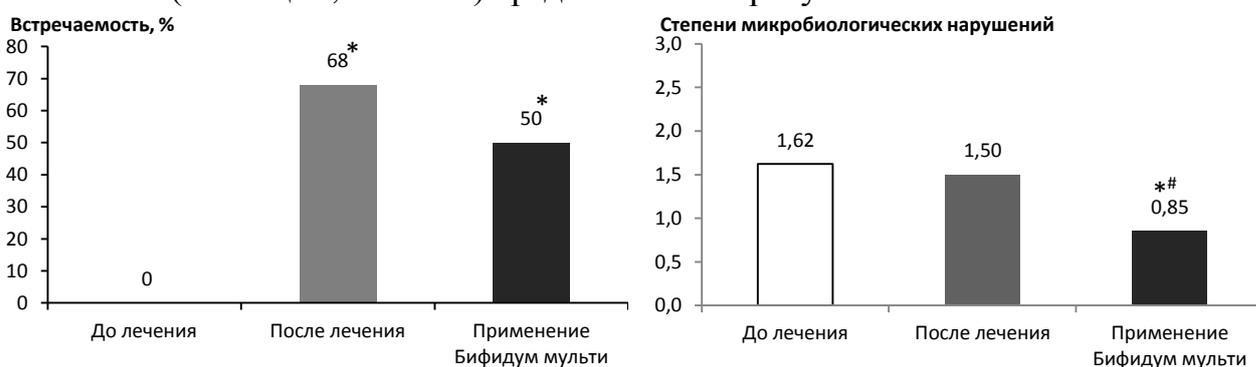
лечения и применения Бифидум Мульти

Рисунок 8 - Изменения состояния микробиоценозов ротоглотки и кишечника в группах «ЭБД» и «ЧБД».

На гистограммах (Рисунки 8а, 8б, 8д) представлены данные, которые показывают влияние проводимой антибактериальной терапии на средние значения степеней микробиологических нарушений ротоглотки и кишечника, а так же на частоту встречаемости значений концентраций ЛЖК в кале в рамках референсных значе-

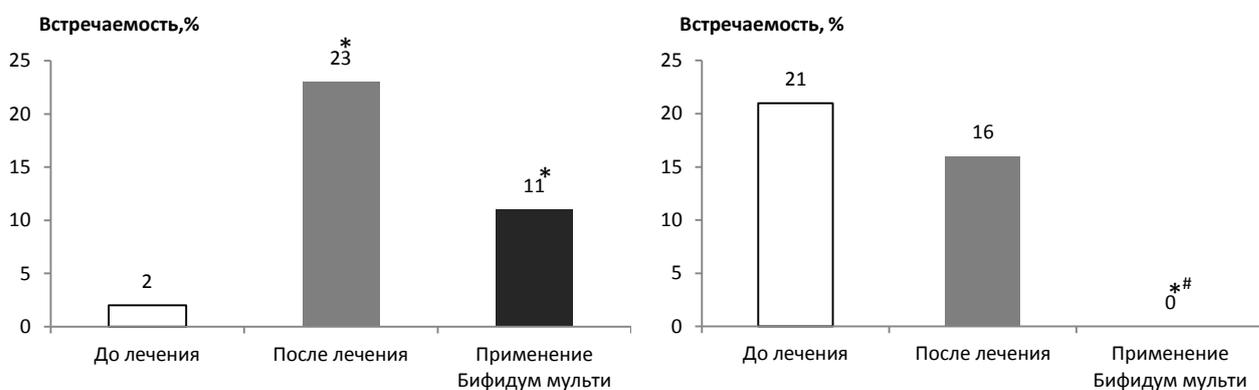
ний. Увеличивается средняя степень микробиологических нарушений микробиоценоза ротоглотки для группы ЧБД и средняя степень микробиологических нарушений микробиоценоза кишечника в группе ЭБД. В группе ЭБД снижается частота встречаемости микробиоценозов ротоглотки без фагочувствительной микрофлоры и микробиоценозов кишечника без метаболических нарушений. Для группы ЧБД увеличивается частота встречаемости микробиоценозов кишечника без метаболических нарушений. Назначение в схему лечения «Бифидум Мульти» способствует снижению средней степени микробиологических нарушений для микробиоценозов кишечника и ротоглотки в подгруппе ЧБД (Рисунки 8а, 8б). В подгруппе ЭБД включение в схему «Бифидум Мульти» не приводит к снижению частоты встречаемости микробиоценозов кишечника без метаболических нарушений (Рисунок 8д).

Результаты исследования микробиоценозов у пациентов с онкологическим анамнезом (Таблица 1, дизайн 5) представлены на рисунке 9.



а) Встречаемость пациентов с микробиоценозами кишечника без нарушений ферментативного пищеварения, %

б) Средние значения степени микробиологических нарушений микробиоценозов кишечника



в) Встречаемость микробиоценозов ротоглотки без метаболических нарушений, %

г) Встречаемость микробиоценозов кишечника без метаболических нарушений, %

Примечание: □ - До лечения ■ - После лечения ■ - Применение «Бифидум-Мульти»

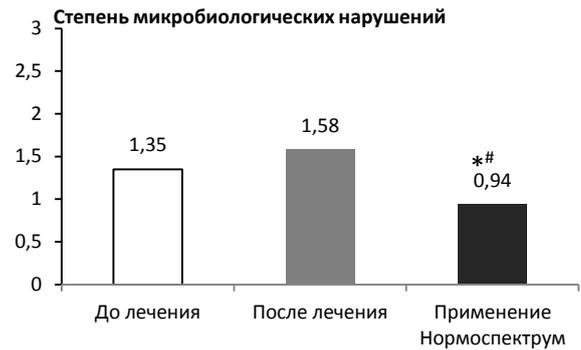
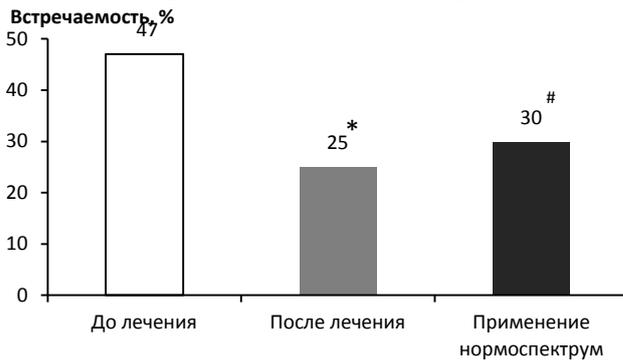
* - достоверное отличие от нормы # - достоверное отличие значений после лечения (ОА) и применения «Бифидум-Мульти» (ОА+БМ)

Рисунок 9 - Изменения состояния микробиоценозов ротоглотки и кишечника пациентов группы «онкологический анамнез»

В результате оценки нарушения микробиоценозов у пациентов с онкологическим анамнезом (Таблица 1, дизайн 5) (Рисунок 9) наблюдали увеличение частоты встречаемости нормального копросиндрома (Рисунок 9а), микробиоценозов с нор-

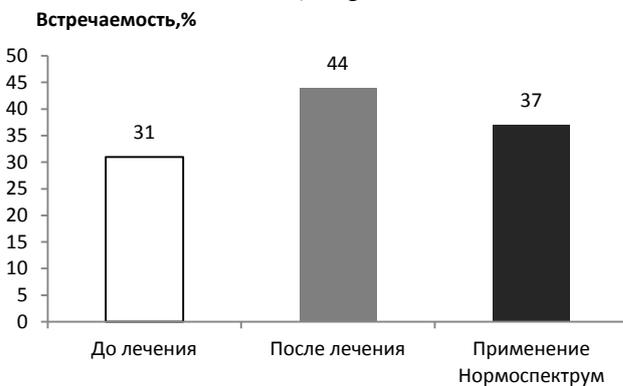
мальными значениями концентраций ЛЖК в слюне (Рисунок 9в). В подгруппе ОА + БМ, в схему профилактических мероприятий которых включали «Бифидум Мульти», наблюдали снижение средней степени микробиологических нарушений микробиоценоза кишечника (Рисунок 9б) и снижение частоты встречаемости микробиоценозов с концентрацией ЛЖК в кале (Рисунок 9г) в рамках референсных значений. Таким образом, обнаружено положительное влияние синбиотика на микробиоценоз кишечника.

Результаты оценки влияния профилактических мероприятий на состояние микробиоценоза кишечника пациентов, проходивших типовую программу медицинской реабилитации после лечения хронического гастродуоденита (Таблица 1, дизайн 4) представлены на рисунке 10.



а) Встречаемость пациентов с микробиоценозами кишечника без нарушений ферментативного пищеварения, %

б) Средняя степень микробиологических нарушений микробиоценозов кишечника



Примечание:

□ - До лечения

■ - После лечения (ГД)

■ - Применение Нормоспектрум (ГД+НС)

* - достоверное отличие от нормы

- достоверное отличие значений после лечения и применения Нормоспектрум

в) Встречаемость микробиоценозов кишечника без метаболических нарушений, %

Рисунок 10 - Изменения состояния микробиоценозов кишечника у пациентов группы «Гастродуодениты».

На графиках отмечается положительный эффект от включения в схему медицинской реабилитации синбиотика «Нормоспектрум», так как в этой группе пациентов (ГД+НС) отмечается достоверное снижение средней степени микробиологических нарушений микрофлоры кишечника (Рисунок 10б). Так же в группе ГД+НС не отмечается снижение частоты встречаемости микробиоценозов с нормальным копрологическим синдромом (рисунок 10а), которое наблюдается для группы ГД (Рисунок 10а).

Разработка методики оптимизации состава пробиотических препаратов по их метаболическим профилям на модели антибиотико-ассоциированного дисбиоза у мышей

С целью решения задачи индивидуального подбора консорциума штаммов лактобацилл для микробиологической коррекции микробиоценоза желудочно-кишечного тракта на модели антибиотико-ассоциированного дисбиоза у мышей разработан и апробирован метод «Оптимизации состава пробиотических препаратов по его метаболическому профилю» в зависимости от применяемого антимикробного препарата. Культивирование моновидовых и двухвидовых композиций проводили по методике, описанной в таблице 1, дизайн 7. В двухвидовых композициях учитывали концентрации тех летучих жирных кислот, значения которых достоверно превышали значения ЛЖК моновидовых композиций. Например, для композиции *L. casei* - *L. plantarum* равной 3:1 увеличивается концентрация пропионовой кислоты в питательной среде, а для композиции с соотношением количества *L. acidophilus* NK-1 - *L. plantarum* равной 1:3 увеличиваются концентрации уксусной, масляной, извалериановой, валериановой и изокапроновой кислот. Всего было отобрано 14 композиций, в которых достоверно увеличивались концентрации ЛЖК.

Таким образом, есть возможность проектирования пробиотических препаратов на основе двухвидовых консорциумов с возможностью компенсации набора конкретных ЛЖК, снижение концентраций которых в организме может быть вызвано дисбиотическими нарушениями ятрогенного генеза.

С целью персонализации микробиологической коррекции сопоставили наборы летучих жирных кислот, концентрации которых увеличивались в двухвидовых композициях и снижались в кишечнике на фоне приёма антимикробных, противовоспалительных и гормональных препаратов. Исследование концентраций ЛЖК в содержимом кишечника проводили на модели антибиотико-ассоциированного дисбиоза у мышей. Дефицит концентраций ЛЖК в содержимом кишечника мышей оценивали относительно контрольной группы (дизайн 6).

Оптимальный считается консорциум с наибольшим числом совпадений дефицитных концентраций ЛЖК в модели антибиотико-ассоциированного дисбиоза и избыточных ЛЖК в консорциумах штаммов лактобацилл. Результаты изучения эффективности применения индивидуально составленных консорциумов штаммов лактобацилл на фоне приема антибиотиков представлены в таблице 6.

Таблица 6.

Эффективность применения индивидуальных консорциумов штаммов лактобацилл при применении антибиотиков по соответствию концентраций ЛЖК

Состав консорциума	амоксициллин	цефиксим	левофлоксацин	кларитромицин	фосфомидин	азитромицин	метотрексат	преднизолон
<i>L. acidophilus</i> NK-1 <i>L. plantarum</i> 1:3	4	4	3	3	2	1	1	0
<i>L. acidophilus</i> K3Ш24 <i>L. casei</i> 2:1	4	3	2	2	2	1	1	0
<i>L. acidophilus</i> NK-1 <i>L. plantarum</i> 1:2	3	3	3	3	2	2	1	1
<i>L. acidophilus</i> 100au <i>L. plantarum</i> 1:2	2	3	3	3	2	2	0	1
<i>L. acidophilus</i> 100au <i>L. plantarum</i> 3:1	2	3	3	3	2	2	0	1

Эффективность применения индивидуальных консорциумов штаммов лактобацилл при применении антибиотиков по соответствию концентраций ЛЖК

Состав консорциума	амоксциллин	цефксим	левофлоксацин	кларитромицин	фосфомидин	азитромицин	метотрексат	преднизолон
<i>L. casei</i> <i>L. plantarum</i> 1:2	2	3	3	3	2	2	0	1
<i>L. acidophilus</i> K3Ш24 <i>L. casei</i> 1:1	3	2	1	1	1	0	1	0
<i>L. acidophilus</i> K3Ш25 <i>L. plantarum</i> 3:1	2	3	3	3	2	2	0	1
<i>L. acidophilus</i> K3Ш26 <i>L. plantarum</i> 1:1	2	2	1	2	1	1	0	0
<i>L. acidophilus</i> K3Ш27 <i>L. plantarum</i> 1:2	1	2	2	2	1	1	0	0
<i>L. acidophilus</i> K3Ш28 <i>L. plantarum</i> 2:1	2	2	1	2	1	1	0	0
<i>L. acidophilus</i> NK-1 <i>L. plantarum</i> 1:1	2	1	1	0	1	0	1	0
<i>L. acidophilus</i> NK-2 <i>L. plantarum</i> 2:1	2	1	1	0	1	0	1	0
<i>L. casei</i> <i>L. plantarum</i> 3:1	1	1	1	1	1	1	0	1
Эффективность, %	67	67	60	60	67	100	50	100

Примечание: Максимальные значения выделены **полужирным курсивом**

Из таблицы 6 видно, что максимальная эффективность компенсации дефицита ЛЖК при действии азитромицина наблюдается у 5-ти различных композиций. Число композиций максимально эффективно компенсирующих действие преднизолона 6. Компенсация дефицита ЛЖК при применении цефксима и амоксициллина возможна только на 67%.

Заключение.

Предложена система интегральной оценки микробиоценозов биотопов кишечника и ротоглотки с помощью объединения различных критериев характеризующих микробиоценоз, как закрытую биологическую систему. Получены референсные значения для концентрации летучих жирных кислот, разработаны и представлены алгоритмы определения нарушения ферментного пищеварения, впервые отмечены зависимость нарушений ферментативного пищеварения и появления фагочувствительной микрофлоры в кишечнике.

Результаты данной работы позволяют оценивать нарушения состояния микробиоценозов при воздействии на них химиопрепаратов, а так же положительные тенденции при проведении микробиологической коррекции. При оценке метаболизма микробиоценоза на модели антибиотико-ассоциированного дисбиоза у мышей с помощью дискриминантного анализа определены глубина и вектор изменения системы, рассчитаны эффективность дозы и экспозиции для протективного действия лактулозы. Предложен метод оптимизации состава пробиотических препаратов по их метаболическим профилям на основе сравнения профицита концентраций ЛЖК в консорциумах лактобацилл и дефицита их концентраций в содержимом кишечника при применении антимикробных средств.

Выводы

1. Впервые разработаны алгоритмы, позволяющие выявить ахолию, ахилию, гнилостную и бродильную диспепсию, энтеральный синдром, замедленный тран-

зит, колит и другие типы нарушений ферментативной активности и переваривающей способностей желудка и кишечника по копрологическому исследованию.

2. Впервые разработаны математические модели для классификации микробиоценозов кишечника и ротоглотки по степеням микробиологических нарушений. Определены и обоснованы: референсные значения концентраций летучих жирных кислот в кале; критерии избытка фагочувствительной микрофлоры в микробиоценозах, и определено их референсное значение — 10%.
3. На базе биотехнологических методов сформирована и предложена система интегральной оценки, включающая тип и глубину изменений микробиоценоза под действием различных факторов (инфекции, антибактериальные, противовирусные и др. препараты, неблагоприятные факторы внешней среды и др).
4. С помощью методов математического моделирования на лабораторной модели антибиотико-ассоциированного дисбиоза у мышей показаны достоверные отличия метаболитных изменений микробиоценоза кишечника при антибиотико-, гормоно- и противоопухолевой терапии. Рассчитаны дозы (20 мг/мышь) и длительность приема лактулозы (6 суток), обеспечивающие сохранность нормоценоза желудочно-кишечного тракта.
5. Разработаны и предложены математические модели состояния микробиоценоза ротоглотки и его метаболома на базе искусственных нейронных сетей и линейных дискриминантных функций при остром бронхите и острой пневмонии. Получены классификационные правила линейного дискриминантного анализа концентраций летучих жирных кислот в слюне, которые позволяют корректно дифференцировать микробиоценозы с точностью при остром бронхите — 94,12%, при острой пневмонии — 96,3%, среднее значение точности — 95,45%. Дифференцирование микробиоценозов при остром бронхите и острой пневмонии на базе искусственной нейронной сети MLP 37-16-3 проводится с точностью 100%.
6. С помощью интегральной системы проведена оценка микробиоценозов желудочно-кишечного тракта у пациентов с бронхолегочной патологией, с онкопатологией и с заболеваниями желудочно-кишечного тракта. Определена эффективность микробиологической коррекции синбиотиками «Бифидум Мульти» и «Нормоспектрум». Показано, что у пациентов с бронхолегочной патологией снижается средняя степень микробиологических нарушений ротоглотки (с 2,00 до 1,58) и кишечника (с 0,89 до 0,57). Получен на фоне применения «Бифидум Мульти» наиболее выраженный протективный эффект по изменениям степени микробиологических нарушений микробиоценоза ротоглотки у часто болеющих (с 1,78 до 1,00) в сравнении с эпизодически болеющими детьми (с 1,75 до 1,57). У пациентов с онкопатологией на фоне применения «Бифидум Мульти» уменьшается число случаев нарушения ферментативного пищеварения (с 68 до 50%), а так же средняя степень микробиологических нарушений (с 1,50 до 0,89). Установлено, что у пациентов с заболеваниями желудочно-кишечного тракта на фоне применения «Нормоспектрум» происходит снижение числа случаев нарушения ферментативного пищеварения (с 30 до 25%).

7. Предложено проводить персонафицированную микроэкологическую коррекцию микробиоценозов пациентам, получающими терапию антимикробными, противоопухолевыми и гормональными средствами и имеющим дефицит летучих жирных кислот в кишечнике. Определены некоторые варианты содержания/состава различных штаммов лактобацилл на примере следующих видов *Lactobacillus acidophilus* НК-1, КЗШ24, 100АШ, а так же *Lactobacillus plantarium* и *Lactobacillus casei* в соотношениях 1:3, 1:2;1:1; 2:1; 3:1 в пробиотических препаратах в зависимости от применяемых химиопрепаратов (амоксициллин, цефаликсим, левофлоксацин, кларитромицин, фосфомицин, азитромицин, метотрексат, преднизолон).

Практические рекомендации.

1. Для повышения эффективности диагностики и оптимизации схем лечения дисбиозов желудочно-кишечного тракта рекомендуется использовать комплексный анализ микрофлоры кишечника, включающий определение концентраций летучих жирных кислот, бактериологический анализ кала и копрограмму, и комплексный анализ микрофлоры ротоглотки, включающий определение концентраций летучих жирных кислот, бактериологический анализ мазка с задней стенки глотки.
2. При оценке результатов комплексного анализа микрофлоры кишечника рекомендуется учитывать следующие референсные значения оценки концентраций летучих жирных кислот в кале: суммарный уровень летучих жирных кислот — не менее 59,74 ммоль/г; концентрации масляной кислоты — не менее 4,97 ммоль/г; структурного индекса — не менее 0,5; индексом изокилот — не более 0,66; соотношением ЛЖК уксусной кислоты не более 74,78%; пропионовой не менее 16,49%; масляная не менее 9,96.
3. Предлагается при оценке дисбиозов желудочно-кишечного тракта использовать критерий избытка чувствительной микрофлоры к бактериофагам, составляющей 10% от суммарного количества микроорганизмов в кале, наличие которого свидетельствует о дисбиотических изменениях с возможностью их коррекции бактериофагами.
4. При создании средств пробиотической терапии для повышения протективного эффекта рекомендуется учитывать синергетический эффект метаболической активности двух видов лактобацилл и подбирать их оптимальное соотношение в зависимости от применяемых химиопрепаратов.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Дальнейшее внедрение методов математического моделирования состояния микробиоценозов ротоглотки позволяет эффективно расширять возможности дифференциальной диагностики социально-значимых и многих других заболеваний, связанных с микробиоценозом респираторного тракта, таких как туберкулез, дифтерия, грипп и т.д. Учитывая, репрезентативность, оперативность получения результатов анализов и низкие трудозатраты, в перспективе математическое моделирование состояния метаболома микробиоценоза ротоглотки могут являться доступными методами экспресс-диагностики и позволят проводить скрининг больших групп населения, подверженных риску инфицирования.

Применение метода «Оптимизации состава пробиотических препаратов по их метаболическим профилям» позволит дополнить имеющиеся схемы лечения антимикробными, противовирусными и другими препаратами средствами микроэкологической коррекции, разработанными с учетом индивидуальных особенностей химиопрепарата.

Список работ опубликованных по теме диссертации.

1. Кондракова, О.А. Новые подходы к диагностике и лечению дисбактериозов / О.А. Кондракова, В.Н. Бабин, А.В. Дубинин, **А.М. Затевалов**, Е.А. Грубова, Е.А. Воропаева // Материалы научно-практической конференции «Современные аспекты борьбы с инфекционной заболеваемостью», посвященной 140-летию Г.Н. Габричевского. – М., 2000. - С. 148.
2. Кондракова, О.А. Экспресс-метод биохимической оценки микроэкологических и функциональных нарушений кишечника методом газо-жидкостной хроматографии / О.А. Кондракова, В.Н. Бабин, А.В. Дубинин, **А.М. Затевалов**, Н.С. Иконников, Е.А. Грубова, М.П. Гусарова, Е.А. Воропаева, Н.К. Кошкина // Методические рекомендации ГУ МНИИЭМ им. Габричевского, ООО НИФ «Ультрасан». - М., 2000. – 17 с.
3. Кондракова, О.А. Определение метаболической активности микрофлоры кишечника в комплексной оценке микроэкологических и функциональных нарушений толстого кишечника / О.А. Кондракова, В.Н. Бабин, Е.А. Грубова, А.В. Дубинин, **А.М. Затевалов**, В.А. Мельников // Пособие для врачей ГУ МНИИЭМ им. Габричевского, ООО НИФ «Ультрасан». - М., 2001. – 60 с.
4. Хетагуров, В.В. Использование гелеобразного заменителя слюны при ортопедическом лечении больных с ксеростомией / В.В. Хетагуров И.Ю., Лебеденко, З.С. Есенова, В.А. Воропаева, О.А. Кондракова, **А.М. Затевалов** // Панорама ортопедической стоматологии. - 2001. - № 4. - С. 25 - 29
5. **Ибрагимов, Т.И. Обоснование выбора материала несъемных зубных протезов для больных сахарным диабетом / Т.И. Ибрагимов, А.Ю. Нурмагомедов, О.А. Кондракова, А.М. Затевалов, А.И. Лебеденко, С.Д. Арутюнов // Институт стоматологии. - 2001. - № 4 (В). - С. 26 - 30.**
6. Кондракова, О.А. Использование экспресс-метода определения метаболической активности микрофлоры кишечника для оценки эффективности препаратов - пребиотиков / О.А. Кондракова, **А.М. Затевалов**, В.Н. Бабин // Материалы конгресса «Человек и лекарство». - М., 2002. - С. 188.
7. Хачатурова, Э.А. Роль летучих жирных кислот в оценке метаболизма у больных неспецифическим язвенным колитом и болезнью Крона в раннем послеоперационном периоде / Э.А. Хачатурова, Т.Д. Ерошкина, О.А. Кондракова, К.В. Вересов, **А.М. Затевалов** // Материалы Шестого международного конгресса: Парентеральное и энтеральное питание. - М., 2002. - С. 97.
8. Кондракова, О.А. Особенности микроэкологических нарушений толстого кишечника при функциональных запорах / О.А. Кондракова, **А.М. Затевалов**, Е.А. Грубова, М.П. Гусарова, В.Н. Бабин, И.И. Кольченко // Материалы международной научно - практической конференции «Пробиотические микроорганизмы - современное состояние вопроса и перспективы использования», посвященная памяти Г.И. Гончаровой. - М., 2002. - С. 88.
9. Дубинин, А.В. Новый пребиотик «Комплексный препарат Дубинина» / А.В. Дубинин, В.Н. Бабин, М.Д. Ардатская, О.Н. Минушкин, **А.М. Затевалов**, О.А. Кондракова // Материалы международной научно-практической конференции «Пробиотические микроорганизмы - современное состояние вопроса и перспективы использования», посвященная памяти Г.И. Гончаровой. - М., 2002. - С. 91.

10. Кондракова, О.А. Новые подходы к диагностике дисбактериоза кишечника / О. А. Кондракова, А. М. Затевалов // Клиническая лабораторная диагностика. - 2002. - № 9. - С. 29.
11. Кондракова, О.А. Коррекция нарушений метаболизма в раннем послеоперационном периоде при тяжелых формах неспецифического язвенного колита и болезни Крона / О.А. Кондракова, Т.А. Новикова, Т.Д. Ерошкина, Э.А. Хачатурова, А.М. Затевалов, О.В. Блинова, И.И. Мусин, К.В. Вересов, А.Н. Балабашин // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. - 2003. - № 4. - С. 63 - 68.
12. Мазанкова, Л.Н. Клинико-лабораторная эффективность пробиотика метаболического типа хилак-форте при острых кишечных инфекциях у детей / Л.Н. Мазанкова, Н.О. Ильина, О.А. Кондракова, А.М. Затевалов, Г.Ю. Яковлева // Педиатрия. Consilium Medicum. - 2004. - Т. 6, № 2. - С. 82 - 86.
13. Кондракова, О.А. Дисбактериоз кишечника / О.А. Кондракова, Л.Н. Мазанкова, Н.О. Ильина, А.М. Затевалов // Пособие для врачей. — М., 2005. — 245 с.
14. Мазанкова, Л.Н. Оценка состояния кишечной микрофлоры при острых кишечных инфекциях у детей младшего возраста / Л.Н. Мазанкова, Н.О. Ильина, О.А. Кондракова, А.М. Затевалов // Детские инфекции. - 2005. - Т. 4, № 3. - С. 11 - 15.
15. Мазанкова, Л.Н. Влияние бациллярных пробиотиков на метаболическую активность микрофлоры кишечника при ОКИ у детей / Л.Н. Мазанкова, Н.О. Ильина, Л.В. Бегиашвили, О.А. Кондракова, А.М. Затевалов // Детские инфекции. - 2005. - Т. 4, № 4. - С. 64 - 68.
16. Ильина, Н.О. Метаболические критерии дисбактериоза кишечника при острых кишечных инфекциях у детей / Н.О. Ильина, Л.Н. Мазанкова, О.А. Кондракова, А.М. Затевалов // Педиатрия. Consilium medicum. - 2006. - № 1. - С. 89 - 94.
17. Ильина, Н.О. Метаболические критерии дисбактериоза кишечника при острых кишечных инфекциях у детей / Н.О. Ильина, Л.Н. Мазанкова, О.А. Кондракова, А.М. Затевалов // Гастроэнтерология. Приложение к журналу Consilium Medicum. - 2006. - № 1. - С. 32 - 38.
18. Мазанкова, Л.Н. Метаболическая активность кишечной микрофлоры при острых кишечных инфекциях у детей / Л.Н. Мазанкова, О.А. Кондракова, А.М. Затевалов, Н.О. Ильина // Российский вестник перинатологии и педиатрии. - 2006. - № 2. - С. 49 - 54.
19. Кондракова, О.А. Особенности структурного и метаболического дисбаланса (СМД) кишечника детей первых лет жизни при некоторых патофизиологических состояниях и заболеваниях кишечника / О.А. Кондракова, А.М. Затевалов, Е.А. Затевалова, М.П. Гусарова // Материалы конференции «Гастро - 06». - СПб, 2006. - С. 44.
20. Кондракова, О.А. Микробиологические показатели толстой кишки у детей при ОКИ различной этиологии / О.А. Кондракова, А.М. Затевалов, Л.Н. Мазанкова // Материалы VI Съезда научного общества гастроэнтерологов России. - М., 2006. - С. 37.
21. Бокова, Т.А. Особенности метаболического статуса у детей с избыточной массой тела / Т.А. Бокова, Г.В. Риманчук, О.А. Кондракова, А.М. Затевалов // Материалы XII Российской Гастроэнтерологической недели. Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. - 2006. - Т. 16, № 5. - С. 38 - 39.
22. Кондракова, О.А. Микробиологические показатели толстой кишки у детей при ОКИ различной этиологии / О.А. Кондракова, А.М. Затевалов, Л.Н. Мазанкова // Материалы VI Съезда научного общества гастроэнтерологов России. - М., 2006. - С. 54.
23. Ильенко, Л.И. Новые возможности коррекции микрофлоры кишечника у недоношенных / Л.И. Ильенко, И.Н. Холодова, Н.Б. Таищева, О.А. Кондракова, А.М. Затевалов // Материалы 5 Российского Конгресса «Современные технологии в педиатрии и детской хирургии». - М., 2006. - С. 48.

24. Грачева, Н.М. Восстановление метаболического статуса кишечной микрофлоры у больных хроническими заболеваниями желудочно-кишечного тракта / Н.М. Грачева, Н.А. Мальшев, Н.И. Леонтьева, О.А. Кондракова, О.С. Партии, А.И. Соловьева, А.М. Затевалов, Н.К. Кошкина // *Инфекционные болезни*. - 2006. - Т. 4, № 2. - С. 37 - 41.
25. Мазанкова, Л.Н. Диетическая коррекция метаболических нарушений микрофлоры кишечника при вирусных диареях у детей раннего возраста / Л.Н. Мазанкова, Л.В. Бегиашвили, О.А. Кондракова, А.М. Затевалов, Н.О. Ильина // *Детские инфекции*. - 2008. - № 1. - С. 26 - 32.
26. Мазанкова, Л.Н. Нарушения микробиоценоза кишечника у детей раннего возраста с вторичной лактазной недостаточностью / Л.Н. Мазанкова, О.А. Кондракова, В.Н. Бабин, А.В. Дубинин, А.М. Затевалов, Л.В. Бегиашвили // *Российский вестник перинатологии и педиатрии*. - 2008. - № 2. - С. 74 - 81.
27. Ильина, Н.О. Метаболические критерии дисбактериоза кишечника при острых кишечных инфекциях у детей / Н.О. Ильина, Л.Н. Мазанкова, О.А. Кондракова, А.М. Затевалов // *Consilium medicum. Приложение Гастроэнтерология*. – 2010. - № 1. – С. 32 – 38.
28. Кончугова, Т.В. Влияние высоко- и низкоинтенсивной магнитотерапии на метаболическую активность микрофлоры толстой кишки у пациентов с синдромом раздраженного кишечника / Т.В. Кончугова, Е.П. Селькова, А.М. Затевалов, Е.В. Гусакова, Н.Б. Луферова // *Физиотерапия Бальнеология Реабилитация*. - 2010. - № 6. - С. 24 - 27.
29. Алешкин, А.В. Коррекция нарушений микробиоценоза желудочно-кишечного тракта у детей с острым лимфобластным лейкозом в период диспансерного наблюдения / А.В. Алешкин, Г.Я. Цейтлин, А.М. Затевалов, М.В. Коновалова, А.М. Амерханова, С.С. Афанасьев, Е.П. Селькова // *Астраханский медицинский журнал*. - 2010. - Т. 5, № 4. - С. 79 - 83.
30. Алешкин, А.В. Коррекция нарушений микробиоценоза ЖКТ у детей с онкологическими заболеваниями в период диспансерного наблюдения / А.В. Алешкин, А.М. Затевалов, Е.А. Воропаева, А.А. Романова, Е.С. Зубкова, О.Г. Воропаева, Е.П. Селькова, С.С. Афанасьев, А.М. Амерханова // *Материалы IX Общероссийского конгресса детских инфекционистов*. - М., 2010. - С. 12.
31. Алешкин, А.В. Коррекция нарушений микробиоценоза желудочно-кишечного тракта с острым лимфобластным лейкозом в период диспансерного наблюдения / А.В. Алешкин, Г.Я. Цейтлин, А.М. Затевалов, М.В. Коновалова, А.М. Амерханова, С.С. Афанасьев, Е.П. Селькова // *Практическая медицина*. – 2011. - № 1 (48). - С. 191 - 194.
32. Алешкин, А.В. Коррекция нарушений микробиоценоза желудочно-кишечного тракта с острым лимфобластным лейкозом в период диспансерного наблюдения / А.В. Алешкин, Г.Я. Цейтлин, А.М. Затевалов, М.В. Коновалова, А.М. Амерханова, С.С. Афанасьев, Е.П. Селькова // *Медицинский альманах*. – 2011. - № 2 (15). - С. 126 - 128.
33. Алешкин, А.В. Новые препараты синбиотики и их применение в профилактической медицине / А.В. Алешкин, А.М. Амерханова, Г.Я. Цейтлин, А.М. Затевалов, М.В. Коновалова, С.С. Афанасьев, Е.П. Селькова, Е.С. Зубкова, А.А. Куроленко, О.Г. Жиленкова, А.Ю. Ващура // *Инфекционные болезни*. – 2011. - Т. 9, приложение № 1. - С. 15.
34. Затевалов, А.М. Биотехнологический подход к оценке микробиоты кишечника // А.М. Затевалов, А.В. Алешкин, Е.П. Селькова, М.П. Гусарова, Е.А. Затевалова // *Сборник тезисов Международной научной конференции «Достижения и перспективы развития биотехнологии»*. - Саранск, 2012. - С. 137.
35. Амерханова, А.М. Современный синбиотик в программе медицинской реабилитации детей школьного возраста с хроническими хеликобактерассоциированными заболеваниями органов пищеварения / А.М. Амерханова, О.А. Шапкина, А.В. Алешкин, А.М. Затевалов //

- Материалы IV Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням. - 2012. - С. 19 - 20.
36. Селькова, Е.П. Новые подходы к исследованию метаболизма микрофлоры кишечника по анализу концентраций летучих жирных кислот / Е.П. Селькова, А.В. Алешкин, **А.М. Затевалов**, Б.А. Рудой // Материалы IV Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням - М., 2012. - С. 338 – 339.
 37. Селькова, Е.П. Новые подходы к исследованию метаболизма микрофлоры кишечника по анализу концентраций летучих жирных кислот / Е.П. Селькова, А.В. Алешкин, **А.М. Затевалов**, Б.А. Рудой // Инфекционные болезни. – 2012. - Т.10, приложение № 1 - С. 338.
 38. Шапкина, О.А. Оценка эффективности медицинской реабилитации детей школьного возраста с хроническими заболеваниями органов пищеварения, сопровождающихся синдромом запоров, с использованием нового пробиотического препарата / О.А. Шапкина, А.М. Амерханова, А.В. Алешкин, **А.М. Затевалов** // Материалы XIX конгресса детских гастроэнтерологов. – М., 2012. - С. 230 - 231.
 39. **Амерханова, А. М. Новый синбиотик в программе медицинской реабилитации детей школьного возраста с хроническими заболеваниями органов пищеварения / А.М. Амерханова, О.А. Шапкина, А.В. Алешкин, Т.В. Приходченко, А.М. Затевалов // Детские инфекции. - 2012. -Т. 11, № 1. - С. 50 - 54.**
 40. Амерханова, А.М. Современный синбиотик в программе медицинской реабилитации детей школьного возраста с хроническими хеликобактероассоциированными заболеваниями органов пищеварения / А.М. Амерханова, О.А. Шапкина, А.В. Алешкин, **А.М. Затевалов** // Инфекционные болезни. – 2012. - Т. 10, приложение № 1. - С. 19 - 20.
 41. **Караулов, А.В. Показатели колонизационной резистентности слизистых ротоглотки как объективные критерии мукозального иммунитета при бронхитах у детей / А.В. Караулов, В.А. Алешкин, Е.А. Воропаева, В.А. Метельская, В.В. Слободенюк, М.С. Афанасьев, А.М. Затевалов, А.П. Топтыгина, С.С. Афанасьев, Ю.В. Несвижский, Ю.Н. Урбан, Е.О. Рубальский, Н.С. Матвеевская // Иммунология. - 2012. - № 5. - С. 255 - 259.**
 42. Феклисова, Л.В. Алгоритм применения иммунобиологических препаратов в лечении острых кишечных инфекций у детей/ Л.В. Феклисова, Е.Р. Мескина, А.Ю. Ушакова, Н.М. Бочкарева, Е.В. Русанова, Л.В. Пожалостина, **А.М. Затевалов** // Пособие для врачей. – М., 2013 – С. 28.
 43. **Затевалов, А.М.** Влияние бактериофагов на микрофлору толстой кишки / **А.М. Затевалов**, И.А. Киселева, Ю.А. Копанев, А.В. Алешкин, С.С. Афанасьев, Е.П. Селькова // Материалы международной научно-практической конференции «Бактериофаги: Теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», Ульяновск: УГСХА им. П.А. Столыпина. - 2013. - Т. II. - С. 9 - 14.
 44. **Затевалов, А.М.** Характеристика кишечных дисфункций у пациентов ОРИТ / **А.М. Затевалов**, О.Н. Ершова, К.Е. Крылов, Е.П. Селькова, Т.А. Гренкова, И.А. Александрова // Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием "Эпидемиология в XXI веке: новые горизонты профилактики". - Кемерово, КемГМА, 2013. - С. 39.
 45. Феклисова, Л.В. Результаты изучения состояния микрофлоры кишечника у ЧБД в межморбидный период / Л.В. Феклисова, Е.А. Медведева, **А.М. Затевалов**, Л.В. Пожалостина // Сборник материалов X Российской конференции «Педиатрия и детская хирургия в Приволжском федеральном округе», 26 - 28 ноября 2013. - Казань, 2013. - С. 77 - 78.
 46. **Затевалов, А.М.** Исследование динамики фагочувствительности условно-патогенной микрофлоры ротоглотки и кишечника у часто и эпизодически болеющих детей / **А.М. Затевалов**, С.С. Афанасьев, Е.П. Селькова, А.В. Алешкин, Е.А. Воропаева, И.А. Киселева,

- Л.В. Феклисова, Е.Р. Мескина, Е.А. Медведева // Инфекция и иммунитет. Вторая НПК с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 21 - 24 сентября 2014 г. - Санкт-Петербург, 2014. - Специальный выпуск. – С. 81.
47. **Затевалов, А.М.** Исследование влияния химиопрепаратов и антибиотиков на микробиоценоз кишечника мышей средствами метабономики / **А.М. Затевалов**, А.Ю. Миронов, Е.П. Селькова, С.С. Афанасьев, Н.С. Иконников // Сборник научно-практических работ Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 85-летию Заслуженного деятеля науки РФ, профессора, д.м.н. Е.П. Москаленко Воздушно-капельные инфекции: микробиология, биотехнология, иммунология, эпидемиология. - Ростов-на-Дону, 2014. - С. 27 - 33.
48. **Затевалов, А.М.** Определение предикторов инфекционных заболеваний у пациентов с неблагоприятным преморбидным фоном / **А.М. Затевалов**, Селькова Е.П., Афанасьев С.С., А.В. Алешкин Е.А. Воропаева // Материалы Всероссийской научно-практической конференции «Инновационные технологии в противоэпидемической защите населения». – Н.Новгород, 2014. – С. 18 – 19.
49. Селькова, Е.П. ОРВИ и грипп у детей. Диагностика, профилактика, лечение / Е.П. Селькова, В.А. Алёшкин, М.Р. Богомильский, С.П. Кокорева, Е.Ю. Радциг, Т.А. Гренкова, А.С. Лапицкая, **А.М. Затевалов**, Н.В. Гудова, А.В. Доценко // Пособие для врачей. ООО "Бионика Медиа". - М., 2014. - 72 с.
50. Алёшкин, В.А. Микробиоценозы и здоровье человека / В.А. Алёшкин, С.С. Афанасьев, А.В. Караулов, Е.А. Воропаева, М.С. Афанасьев, А.В. Алёшкин, 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. Гречишников, 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.В. Бондаренко / Под редакцией В.А.Алёшкина, С.С.Афанасьева, А.В.Караулова. – Москва: Издательство «Династия», 2015. – 548 с.
51. **Затевалов, А.М.** Новые подходы к оценке микробиоценозов у пациентов ОРИТ с целью специфической микробиологической коррекции, направленной на профилактику ИСМП / **А.М. Затевалов**, Е.П. Селькова, О.Н. Ершова, И.А. Александрова, К.Ю. Крылов // Материалы Ежегодной Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Контроль и профилактика инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи» (ИСМП-2015). – М., 2015. - С. 44.
52. **Затевалов, А.М.** Медицинская кибернетика в оценке степени микробиологических нарушений микрофлоры ротоглотки и кишечника / **А.М. Затевалов**, Е.П. Селькова, А.Ю. Миронов, А.В. Алёшкин, С.С. Афанасьев // Тезисы для участия в XIX Форуме "Национальные дни лабораторной медицины России - 2015". 23-25 сентября 2015 г. - М., 2015. - С. 14.
53. **Мескина, Е.Р.** Респираторные инфекции у часто болеющих детей: новый взгляд на проблему / Е.Р. Мескина, Е.А. Медведева, Е.В. Русанова, **А.М. Затевалов** // Лечение и профилактика. – 2015. – № 4 (16). – С. 47 - 54.
54. **Феклисова, Л.В.** Перспективная клиничко-микробиологическая оценка реабилитации часто болеющих детей в условиях детского санатория / **Л.В. Феклисова**, Е.А.

Медведева, Л.И. Елезова, Е.В. Русанова, А.М. Затевалов // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. - 2015. - № 6. - С. 20 - 26.

55. Затевалов, А.М. Оценка степени микробиологических нарушений микрофлоры ротоглотки и кишечника с помощью методов математического моделирования / А.М. Затевалов, Е.П. Селькова, С.С. Афанасьев, А.В. Алёшкин, А.Ю. Миронов, М.П. Гусарова, Н.В. Гудова // Клиническая лабораторная диагностика. - 2016. – Т. 61(2). - С. 117-121.

Изобретения

56. Патент 2327995 РФ МПК⁷, G01N 33/569, C12Q 1/68 Способ диагностики хронического уrogenитального хламидиоза / Байракова А.Л., Алёшкин В.А., Воропаева Е.А., Афанасьев С.С., Кафарская Л.И., Кострова О.М., Несвижский Ю.В., Рубальский О.В., Гречишников О.Г., Метельская В.А., Шкопоров А.Н., Ефимов Б.А., Куракова А.А., Егорова Е.А., Поздняков К.В., Афанасьев М.С., Затевалов А.М., Хохлова Е.В. Заявитель и патентообладатель: ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора № 2007123483/12 заявл. 25.06.2007, опубл. 27.06.2008 Бюл. № 18, 4 с.
57. Патент 2431492 РФ МПК⁷, A61K 35/74, A61P 1/00 Композиция для коррекции дисбактериоза кишечника / Галимзянов Х.М., Затевалов А.М., Зязин С.Н., Алёшкин В.А., Афанасьев С.С., Кантемирова Б.И., Рубальский Е.О. Заявитель и патентообладатель: Общество с ограниченной ответственностью "Комплаенс" (ООО "Комплаенс") (RU), Алёшкин В. А., Афанасьев С.С., Затевалов А.М., Галимзянов Х.М., Кантемирова Б.И., Рубальский Е.О., Зязин С.Н. № 2010102844/15 от 29.01.2010, опубл. 20.10.2011 Бюл. № 29, 4 с.

Список сокращений.

АМЦ – группа мышей, на которой исследуют влияние амоксициллина

АЗТ - группа мышей, на которой исследуют влияние азитромицина

БАД — биологически активные добавки

БМ – синбиотик Бифидум - Мульти

ГЖХ – газожидкостная хроматография

ГД – группа обследуемых «Гастроудениты»

ГМС — гидролизатно-молочная среда

ГС – группа сравнения

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

ЗСГ – задняя стенка глотки

ИИ – индекс изокислот (отношение сумм концентраций изокислот к сумме линейных форм)

ИНС — искусственная нейронная сеть

КДЦ – консультационно-диагностический центр

КЛТ - группа мышей, на которой исследуют влияние кларитромицина

ЛВЦ - группа мышей, на которой исследуют влияние левофлоксацина

ЛЖК – летучие жирные кислоты

ЛКФ — линейные классификационные функции

МРС — Агар Ман, Рогоза, Шарп

МТР - группа мышей, на которой исследуют влияние метотрексата

НС – синбиотик «Нормаспектрум»

ОА – группа обследуемых с онкологическим анамнезом

ОБ – острый бронхит

ОП – острая пневмония

ОРЗ — острые респираторные заболевания

ОРИТ – отделение реанимации и интенсивной терапии

ОУ – (общий уровень) суммарная концентрация ЛЖК ммоль/г

- ПНЗ - группа мышей, на которой исследуют влияние преднизолона
- СИ – структурный индекс (отношение суммы пропионовой, масляной, валериановой, капроновой и изокислот к уксусной)
- ФМЦ - группа мышей, на которой исследуют влияние фосфомицина
- ЦФС - группа мышей, на которой исследуют влияние цефиксима
- ЧБД – часто болеющие дети
- ЭБД – эпизодически болеющие дети
- С2 — концентрация уксусной кислоты, ммоль/г
- С3 — концентрация пропионовой кислоты, ммоль/г
- iС4 — концентрация изомасляной кислоты, ммоль/г
- С4 — концентрация масляной кислоты, ммоль/г
- iС5 — концентрация изовалериановой кислоты, ммоль/г
- С5 — концентрация валериановой кислоты, ммоль/г
- iС6 — концентрация изокапроновой кислоты, ммоль/г
- С6 — концентрация капроновой кислоты, ммоль/г
- С2% - доля уксусной кислоты в сумме уксусной, пропионовой и масляной кислот, %
- С2% - доля пропионовой кислоты в сумме уксусной, пропионовой и масляной кислот, %
- С2% - доля масляной кислоты в сумме уксусной, пропионовой и масляной кислот, %
- N – группа нормы,
- IgA – иммуноглобулины класса А
- IgE – иммуноглобулины класса Е
- sIgA – секреторный иммуноглобулин класса А
- I – 1 степень микробиологических нарушений
- II – 1 степень микробиологических нарушений
- III – 1 степень микробиологических нарушений