

ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
«МОСКОВСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ЭПИДЕМИОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ им. Г.Н.ГАБРИЧЕВСКОГО»
ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ
ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

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

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание учёной
степени доктора биологических наук

НАУЧНЫЕ КОНСУЛЬТАНТЫ:

доктор медицинских наук Е.П. Селькова

доктор биологических наук А.В. Алёшкин

Москва - 2016

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	4
Актуальность проблемы	4
Степень разработанности темы исследования	5
Цель исследования:	6
Задачи исследования:	6
Научная новизна	6
Теоретическая и практическая значимость.....	8
Методология и методы исследования	9
Объекты исследования	9
Методы.....	14
Статистическая обработка	17
Личное участие автора	20
Положения, выносимые на защиту:	20
Степень достоверности и апробация результатов исследования	20
Глава 1 Обзор литературы. Система микробиоценозов различных биотопов человека.....	23
1.1. Введение	23
1.2. Микробиоценозы слизистых открытых полостей организма	24
1.3. Микробиоценоз кишечника.....	25
1.3.1. Комплексный подход оценки микробиоценоза человека, основные критерии, интегральные показатели.	30
1.4. Современные методы оценки микробиоценоза – omics технологии.....	32
1.4.1. Методы многомерной статистики –omics технологий, критерии, ограничения методов.....	36
1.5. Влияние про-, пребиотиков, антибиотиков и бактериофагов на микробиоценоз, методы оценки и критерии	41
1.6. Заключение.....	45
Результаты собственных исследований	46
Глава 2 Комплексный микробиологический и метаболитный паспорт здорового человека.	46
2.1. Нормальные значения показателей ферментативного пищеварения для здорового человека.	48
2.2. Нормальные значения показателей состава и концентраций микроорганизмов кала для здорового человека.	58
2.3. Критерий избытка фагочувствительной микрофлоры кишечника.....	69
2.4. Критерии метаболической активности микрофлоры кишечника.....	84
2.5. Метаболический и микробиологический паспорт микрофлоры ротоглотки здорового человека	105

Глава 3. Исследование эффективности применения лактулозы на модели антибиотико-ассоциированного дисбиоза у мышей	114
3.1. Построение дискриминантного пространства концентраций ЛЖК на модели антибиотико-ассоциированной диареи у мышей	114
3.2. Исследование концентрационной зависимости лактулозы на степень нарушения микробиоценоза кишечника мышей	118
3.3. Исследование зависимости экспозиции лактулозы на степень нарушения микробиоценоза кишечника мышей.	123
Глава 4. Применение интегральной оценки микробиоценозов у пациентов различных нозологий и при применении пробиотических препаратов.	127
4.1. Изменения микробиоценоза ротоглотки и кишечника у больных с острым бронхитом и острой пневмонией при антимикробной и противовирусной терапии и эффективность микрoэкологической коррекции синбиотиком Бифидум Мульти.	127
4.2. Изменения микробиоценоза кишечника у детей с последствиями перенесенных гастродуоденитов и влияние синбиотика Нормоспектрум	139
4.3. Изменение микробиоценозов кишечника и ротоглотки у детей с онкологическим анамнезом и влияние синбиотика Бифидум Мульти.	146
4.4. Особенности микробиоценоза ротоглотки при остром бронхите и острой пневмонии, позволяющие расширить возможности диагностики инфекционного процесса.	154
Глава 5. Создание пробиотических препаратов с заданными свойствами для персонализированной коррекции дисбиозов.	160
5.1 Разработка многовидовой композиции на основе консорциума штаммов лактобацилл с учетом показателей ЛЖК.....	160
4.2. Модель антибиотико-ассоциированного дисбиоза у мышей	165
5.3. Подбор оптимального соотношения штаммов консорциума лактобацилл в пробиотическом препарате для различных антибиотиков в модели антибиотико-ассоциированного дисбиоза у мышей	172
Заключение	176
Выводы	192
Практические рекомендации.....	192
Перспективы дальнейшей разработки темы.....	193
Список сокращений.	195
Список использованной литературы	197
Приложения	214

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Агрессивное воздействие на человека неблагоприятных условий жизни - стрессы, экология, недоброкачественные продукты питания и вода, а также наличие преморбидного фона (хронические заболевания, наследственность и т.д.) - у значительной части населения приводит к различным изменениям в микробном сообществе организма. Эти изменения носят как явный, так и скрытый характер, не проявляясь в виде симптомов заболеваний, и часто служат дополнительным фактором риска при развитии основного заболевания. В то же время в научных кругах сформировалось понятие о желудочно-кишечном тракте человека как о сложной экосистеме, исследование которой требует тщательного подхода. По результатам научных исследований кал человека включает ДНК всех микроорганизмов, обитающих в кишечном тракте во время обследования [19]. Вместе с тем, традиционные микробиологические методы исследований, применяемые в настоящее время, не могут дать исчерпывающую качественную и количественную характеристику микробиоценоза человека. Кроме того, эти методы не дают возможность производить анализ индивидуальности популяционных взаимодействий микроорганизменных «сигнальных систем» и прочие характеристики микроорганизмов, из которых формируются современные взгляды на микрoэкологию человека. Современные микробиологические методы не позволяют культивировать более чем 50% представителей индигенной микрофлоры человека. Кроме того, классические культуральные и биохимические подходы, используемые для характеристики биоценозов, являются трудоемкими и затратными, что ограничивает их применение в практическом здравоохранении. Эти методы основаны на получении чистой культуры микроорганизмов, выделенных из содержимого просвета кишечника, и изучении их биохимических характеристик. Это ограничивает возможность получения суждения о биоценозе, как о конструкции макроорганизм - микробиота [37].

В современных технологиях и инструментальных методах диагностики учитываются информационные пробелы, связанные с недостаточным обследованием такого значимого органа, как микробиоценоз различных биотопов человека. [1].

В рамках новых технологических решений есть необходимость пересмотра диагностических и прогностических подходов к микробиоценозам человека. Массовое распространение физико-химических методов (хроматографии, секвенирования, массспектрометрии) существенно расширило возможности получения ранее недоступной информации о микроорганизмах и их свойствах. Появление и распространение интернета, возможности обмена информацией в режиме реального времени и создание электронных

библиотек с возможностью их динамического наполнения, возможности работы с колоссальными объемами данных произвели настоящую революцию в научных исследованиях по диагностике и прогнозированию заболеваний. Благодаря накопленным данным в настоящее время меняются подходы к диагностике и оценке состояния микробиоценоза.

В исследованиях ряда авторов R. Goodacre (2007 г.) показано, что микробиота кишечника представляет собой совокупность множества видов различных микроорганизмов, обладающая огромным метаболическим потенциалом [112; 136; 145; 197]. По количеству клеток она в 100 раз превышает число соматических и зародышевых клеток человека. В ДНК человека идентифицировано 23 000 генов, а в микробиоме — 10 000 000 генов. В микробном сообществе человека эволюционно сложились межклеточные коммуникации, которые представляют собой организацию трофических и энергетических взаимозависимостей внутри кишечного микробиоценоза. В современных условиях человек рассматривается в виде суперорганизма, который обладает комплексом своих генов и генов микроорганизмов, которые находятся в полостях его организма [136]. Таким образом, микробиоту кишечника можно рассматривать как орган отдельный человека. Это представление не противоречит определению органа, как компонента организма, представляющей собою эволюционно сформировавшийся микробно-тканевой комплекс, соединенный общей функцией, структурной системой и развитием.

Степень разработанности темы исследования

Исходя из тенденций современной мировой медицины системный подход к описанию функционирования разных систем организма, как единого целого, позволяет перейти на качественно новый уровень знаний - персонифицированной медицины, которая основывается на принципах превентивной (упреждающей) медицины.

В ряде работ (Велькова В.В. 2008, J. Quackenbush 2010 и др.) показаны подходы персонифицированной медицины и указаны новые направления многомерной биологии и медицины (high dimensional biology), -omics (-омик) технологии [18; 147]. Современные -omics технологии основаны на создании новых подходов и определении критериев диагностики, учитывающих взаимодействие всех систем, обеспечивающих жизнедеятельность биологического объекта. В современных условиях для исследования микробиоценоза биологического индивидуума наиболее важными являются: геномика, протеомика и метаболомика [18; 147].

Прицип -омикс технологий по мнению Шестакова и др. сводится к оценке больших массивов данных о генах, белках или метаболитах биологического объекта средствами биофизики. Наиболее эффективными среди современных биофизических методов генома,

протеома и метаболома являются использование методов многомерной статистики (дисперсные, регрессионные) и программами распознавания образов [105].

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 метаболическим профилям на основе консорциума штаммов лактобацилл с заданными свойствами и разработать алгоритм их индивидуального подбора для микрoэкологической 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 персонифицированного подбора средств микрoэкологической коррекции.

Впервые предложен персонифицированный 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 микрoэкологической 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 людей, и из содержимого кишечника лабораторных мышей. Предметом исследования явились результаты исследований концентраций летучих жирных кислот (ЛЖК) в кале и в слюне людей, 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

Объекты исследования

Методология настоящего исследования спланирована в соответствии с поставленной целью. Предметом исследования стали микроорганизмы, выделенные из кала, с задней стенки глотки людей, и из содержимого кишечника лабораторных мышей. Предметом исследования стали результаты исследований концентраций летучих жирных кислот (ЛЖК) в кале и в слюне людей и в содержимом кишечника лабораторных мышей, структурные элементы кала, определяемые микроскопией и биохимическими реакциями.

Биологические субстраты пациентов с различной степенью функциональных и микробиологических нарушений.

В соответствии с целью и задачами работы, было проведено комплексное копрологическое, биохимическое, микробиологическое исследование нативного материала (фекалий, слюны и мазков из зева и носа) людей разных возрастных категорий в возрасте от 4 до 90 лет.

Обследованный контингент представлен в таблице 1.

Таблица 1 – Обследованный контингент

Обследованный контингент	Количество человек	Раздел работы
Взрослые люди от 4 до 90 лет, из них 2508 (79,0%) женщины и 667 (21,0%) мужчины с дисбактериозами кишечника, обратившиеся в КДЦ при МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского	3175	Глава 2. Комплексный микробиологический и метаболический паспорт здорового человека
Дети 47 человек из них 14 (29,8%) женского и 33 (70,2%) мужского пола с ОРЗ, проходившие лечение в детском инфекционном отделении МОНИКИ	47	Раздел 4.1. Изменения микробиоценоза ротоглотки и кишечника у больных с острым бронхитом и острой пневмонией при антимикробной и противовирусной терапии и эффективность микробиологической коррекции синбиотиком Бифидум Мульти Раздел 4.4. Особенности микробиоценоза ротоглотки при остром бронхите и острой пневмонии, позволяющие расширить возможности диагностики инфекционного процесса.
Дети 46 человек из них 21 (45,8%) женского и 25 (54,2%) мужского пола с хроническим гастродуоденитом, проходившие типовую программу медицинской реабилитации в санаторной школе-интернате № 5 г. Нижний Новгород	46	Раздел 4.2. Изменения микробиоценоза кишечника у детей с последствиями перенесенных гастродуоденитов и влияние синбиотика Нормоспектрум
Дети 127 человек из них 43 (33,6%) женского и 84 (66,4%) мужского пола с гемобластозом и солидными опухолями, проходившие типовую программу медицинской реабилитации в санатории «Русское поле» Чеховский район, Московской области	127	Раздел 4.3. Изменение микробиоценозов кишечника и ротоглотки у детей с онкологическим анамнезом и влияние синбиотика Бифидум Мульти
Пациенты ОРИТ - 60 пациентов из них 28 (46,6%) женщины и 32 (53,4%) мужчины, находящиеся на ИВЛ более 96 часов и получающие энтеральное зондовое питание с диарейным и без диарейного синдрома в ОРИТ НИИ нейрохирургии им. Академика Н.Н. Бурденко РАМН	60	Раздел 2.4. Критерии метаболической активности микрофлоры кишечника

Экспериментальные животные

В разных разделах работы были использованы лабораторные животные одного вида, которые представлены в таблице 2.

Таблица 2 -Объекты исследования. Экспериментальные животные, использованные в разных разделах работы

Лабораторные животные	Кол-во особей	Раздел работы
Мыши белые лабораторные, беспородные, самцы, вес 12-14г	192	Глава 3. Исследование эффективности применения лактулозы на модели антибиотико-ассоциированного дисбиоза у мышей Раздел 5.2. Модель антибиотико-ассоциированного дисбиоза у мышей

Антибиотические препараты и бактериофаги, и прочие пробиотические и пребиотические препараты, используемые в работе

В разных разделах работы были использованы разные химиопрепараты.

Для моделирования антибиотико-ассоциированной диареи у мышей использовались следующие химиопрепараты в дозах, рассчитанных по инструкции к препарату (таблица 3).

Таблица 3 - Антимикробные химиопрепараты

Обозначение	Препарат	Дневная доза
(АМЦ)	Амоксициллин - антибиотик группы полусинтетических пенициллинов широкого спектра действия, ООО Барнаульский завод медпрепаратов, Россия	10 мг.
(КЛТ)	Кларитромицин - антибиотик группы макролидов, ЗАО «Вертекс», Россия	10 мг.
(АЗТ)	Азитромицин - антибиотик группы макролидов, является представителем азалидов, ООО Озон, Россия	2 мг.
(ЛВЦ)	Левифлоксацин - антибактериальный препарат широкого спектра действия из группы фторхинолонов, ООО «АВВА Рус», Россия	0,5 мг.
(ЦФС)	Цефиксим - полусинтетический цефалоспориновый антибиотик III поколения широкого спектра действия, "Pharma International Co", Иордания	2 мг.
(ФМЦ)	Фосфомицин - антибиотик широкого спектра действия, ОАО КРАСФАРМА, Россия	4 мг.
(МТР)	Метотрексат - противоопухолевое средство из группы антиметаболитов - антагонистов фолиевой кислоты, ООО Северная Звезда, Россия	0,1 мг.
(ПНЗ)	Преднизолон - синтетический глюкокортикостероид (ГКС), дегидрированный аналог гидрокортизона, Мосхимфармпрепараты, Россия	0,2 мг.

Для исследования антибиотикочувствительности использовались бумажные диски с 12-тью антибиотиками (линкомицин, левомицетин, доксициклин, гентамицин, налидиксовая кислота, цефазолин, офлоксацин, ципрофлоксацин, азитромицин, апицилин, ванкомицин, метронидазол). HiMedia Laboratories Pvt. Limited (Индия)

Для исследования фаговой резистентности использовались бактериофаги производства «Микроген»: стафилококковый бактериофаг, пиополивалентный бактериофаг, колипротейный бактериофаг, интенстинальный бактериофаг, клебсиелёзный бактериофаг, стрептококковый бактериофаг, секстафаг.

Для исследования влияния про-, пребиотических препаратов использовались:

- «Лактулуоза» (сироп) в состав препарата входят лактулоза 66,7%, лимонная кислота 0,05% и очищенная вода. (ООО АВВА Рус, Россия);
- «Нормоспектр» в состав препарата входят штаммы *B. bifidum*, *B. longum* и *B. adolescentis*, характерные для нормальной микрофлоры взрослого человека, два штамма ацидофильных лактобацилл, а также виды *L. plantarum* и *L. casei*, пребиотические компоненты — инулин и олигофруктоза, витаминно-минеральный премикс. (ЗАО "АМФИТА", Россия);
- «Бифидум-Мульти», который содержит в своем составе виды *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. longum* и *B. adolescentis* а так же пребиотические компоненты: пектин, олигофруктоза и инулин. (ЗАО "АМФИТА", Россия).

Питательные среды, использованные в работе

Питательные среды для исследования дисбиоза кишечника:

1. Среда для выделения и культивирования бифидобактерий (ФБУН Ростов НИИМП Роспотребнадзора):

Состав среды в граммах на 1дм³ гидролизата молозивного творога: глюкозы-10; натрия хлорид-5; аскорбиновой кислоты-1; пептона-2; L-цистина-0,1.

Среда предлагается в готовом виде, перед употреблением флаконы со средой вскрывают в стерильных условиях и разливают в стерильные пробирки по 9,0 мл.

2. Модифицированная среда для выделения лактобактерий (ФБУН РостовНИИМП Роспотребнадзора) (Патент на изобретение № 2202609, г.Москва, 20 апреля 2003г.) Состав питательной среды в граммах на 1 дм³ (гидролизата молозивного творога 0,5 дм³ Н₂О дистил. до 1 дм³): MnSO₄-0,05г; L-цистин- 0,2г; MgSO₄-0,2г; K₂HPO₄ . Н₂О-2,0г; CaCO₃ -15 г; дрожжевой аутолизат – 50 мл; пептон-10г; агароза-20г. Перед употреблением среда разогревается на водяной бане (+100° С) и разливается в стерильных условиях в стерильные чашки Петри.

3. Питательная среда Эндо (НПО “Питательные среды” г. Махачкала) приготавливается в соответствии с прилагаемой инструкцией.

4. Маннитно-солевой агар для выявления стафилококков.

В расплавленный и остуженный до 60° С солевой агар (НПО “Питательные среды” г. Махачкала) pH=7,2, содержащий 10% хлорида натрия прибавляют 10-20% желточной взвеси. Для получения желточной взвеси желток асептически извлекают из яйца, взбалтывают с 200 мл изотонического раствора хлорита натрия. Смешивают тщательно агар с желточной взвесью и разливают в чашки Петри.

5. Кровяной агар для выявления энтерококков и гемолизирующих форм бактерий (М.О.Биргер, 1982).

К расплавленному и охлажденному до 45-50° С питательному агару для выращивания бактерий (НПО “Питательные среды” г. Махачкала) прибавляют 5-10% эритроцитарной массы барана. Агар с кровью тщательно перемешивают, избегая образования пены, и разливают в стерильные чашки Петри.

6. Питательная агар для выращивания бактерий (НПО “Питательные среды” г. Махачкала), скошенный в пробирках, используют для выделения протеев по способу Шукевича, а также для получения / хранения чистой культуры изолятов бактерий.

7. Питательная среда для выделения грибов рода *Candida*. (ФБУН РостовНИИМП Роспотребнадзора) (Патент № 2299237 г.Москва 30 мая 2007г.)

К гидролизату молозивного творога, разведенного 1:1 дистиллированной водой, добавляют 1% пептона; 2% микробиологического агара и 4% глюкозы. Стерилизуют при 100°С - 0,5 атм в течение 20 мин. Перед употреблением в расплавленную среду добавляют фурациллин 1:10000 и разливают в стерильные чашки Петри.

8. Питательная среда. Среда Вильсон-Блер (железо-сульфитный агар) (М.О. Биргер 1982).

К 100 мл питательного агара для выращивания бактерий (НПО “Питательные среды” г. Махачкала), с 1% глюкозы pH=7,4 при температуре 60° С прибавляют 10 мл 20% раствора сульфита натрия (Na_2SO_3) и 1 мл 8% раствора хлорида железа (FeCl_2), приготовленного на стерильной дистиллированной воде. Раствор Na_2SO_3 стерилизуют 1 ч текучим паром. Среду не стерилизуют. Разливают в стерильные пробирки по 10 мл. перед употреблением регенерируют на кипящей водяной бане.

Питательная среда для подбора селективной дозы антибиотиков и проведения глубинного культивирования *E.coli* М-17 .

В качестве питательной среды для подбора селективной дозы антибиотиков использовали питательный бульон (НПО «Питательные среды» Махачкала), приготовленный

по прилагаемой рецептуре. Для проведения глубинного культивирования в питательный бульон прибавляли 1% лактозы (Реахим), стерилизовали дробно текущим паром.

Определение антибиотикорезистентности проводили дискодиффузионным методом на среде Мюллера-Хинтона.

Методы

Метод определения концентрации летучих жирных кислот в биологических субстратах газожидкостной хроматографией

Определение концентраций летучих жирных кислот (ЛЖК) в содержимом кишечника проводится методом газо-жидкостной хроматографии, основанным на разделении веществ в потоке газа-носителя на гетерогенизированных поверхностях адсорбционных колонок благодаря различным скоростям адсорбционно-десорбционных процессов. Для определения содержания летучих жирных кислот в содержимом кишечника применяют разделение подкисленного супернатанта пробы на хроматографе [87]. В работе использовался газожидкостный хроматограф Кристалл 5000.2 оборудованный пламенно-ионизационным детектором на капиллярной, металлизированной колонке FFPA, диаметром 0,25 мм, длиной 32 метра. Параметры хроматографирования: термостат - изотерма 155°C, температура испарителя и детектора 250°C, скорость газа носителя 60 см/сек, давление в колонке 136 кПа. Для расчета концентрации используется метод внутреннего стандарта, который состоит в добавлении к определенной массе исследуемого материала вещества с известной массой. Расчет концентраций по площадям пиков осуществляют с помощью компьютерной программы фирмы СКБ Хроматэк. Определение концентраций ЛЖК в фекалиях осуществляют в три этапа: пробоподготовка, хроматографирование, обработка результатов.

Пробоподготовка.

Для определения ЛЖК использовали супернатант пробы содержимого кишечника животных или кала человека. Получение его проходит по следующей схеме:

1. В одноразовой пластиковой пробирке взвешивали 2-3 грамма содержимого кишечника на аналитических весах с точностью до 3-го знака.
2. К пробе приливали 1 мл 0,02N соляной кислоты и 1 мл стандартного вещества (диметилмасляная кислота). Гомогенизировали смесь путем растирания стеклянной палочкой или энергичного встряхивания в закрытой пробирке.
3. Пробирку с гомогенной смесью центрифугировали 10 минут при 6000 об./мин.
4. Полученный супернатант был прозрачным и имел кислую реакцию (pH 2-3).

Хроматографирование.

Для хроматографирования использовали газо-жидкостной хроматограф Кристалл 5000.2 с капиллярной колонкой FFPA d - 0,25 мм, L - 32 м и детектором пламенно-ионизационного типа. Газ - носитель азот.

Порядок работы на хроматографе.

1. Хроматограф выводили на режим:

- температура термостата, °C	155
- температура детектора, °C	250
- температура испарителя, °C	250
- скорость газа носителя, см/сек	60
- давление газа носителя кПа	136
- деление потока газа носителя	1:35

2. Пробу - супернатант отбирали из пластиковой пробирки хроматографическим шприцом 1 мкл и вводили в испаритель хроматографа. Пики концентраций летучих жирных кислот определяли по времени удержания. Времена удержания определяли на основании разделения стандартного образца - смеси монокарбоновых кислот гомологического ряда от уксусной до капроновой кислоты.

Времена удержания:

Уксусная кислота, мин	1,36
Пропионовая кислота, мин	1,59
Изомасляная кислота, мин	1,69
Масляная кислота, мин	1,94
Изовалериановая кислота, мин	2,16
Стандартное вещество (диметилмасляная кислота), мин	2,39
Валериановая кислота, мин	2,6
Изокапроновая кислота, мин	3,16
Капроновая кислота, мин	3,6

Обработка хроматограмм.

Расчет пиков проводился с помощью компьютерной программы СКБ Хроматэк путем анализа последовательности пиков, их границ и высот. Площади пиков определяются как площади треугольников с основанием равным ширине пика и высотой равной высоте пика. Исходя из площади пика стандарта (диметилмасляной кислоты) с известной концентрацией и отношениям площадей анализируемых пиков, рассчитывали концентрацию каждого компонента смеси ЛЖК. В формуле расчета использовали также коэффициенты горения, которые являются коэффициентами перевода молярной концентрации в весовую. Концентрации отдельных компонентов рассчитывали по формуле:

$$C_i = \frac{K_i \cdot S_i \cdot C_{ст.}}{S_{ст.}}$$

где

$C_i, C_{ст.}$ — концентрации стандарта и компонента,

$S_i, S_{ст.}$ — площади пиков,

K_i — переводной коэффициент.

Исходя из весовых концентраций, рассчитывали общий уровень кислот, уровни и доли в общем пуле (спектры) уксусной (C2), пропионовой (C3), масляной (C4), изо-масляной (iC4), валериановой (C5), изо-валериановой (iC5), капроновой (C6), изо-капроновой (iC6) кислот, а также значение структурного индекса (СИ), индекса изокилот (ИИ). Значение СИ используется как показатель инфраструктуры микробиоценоза, соотношения анаэробных и факультативно-анаэробных популяций, поскольку источниками уксусной кислоты можно считать почти всю индигенную кишечную микрофлору, а более восстановленных метаболитов (все кислоты за исключением уксусной) — только более строгих анаэробов. Значение ИИ используется как показатель преобладающего типа микроорганизмов сахаролиты - протеолиты. Увеличение значение ИИ - это увеличение суммарной концентрации изокилот, продуктов микробного переваривания аминокислот (белков), то есть увеличение доли протеолитической микрофлоры в микробном сообществе.

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 бактериологического 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) [91, 92]. 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. 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 дефибринированной бараньей крови (5%), налидиксовой кислоты (15 мг/л) и колистина (10 мг/л) [12]. Для исследования фаговой резистентности использовали бактериофаги производства («Микроген», Махачкала): стафилококковый бактериофаг, пиополивалентный бактериофаг, колипротейный бактериофаг, интенсти-бактериофаг, клебсиеллзный бактериофаг, стрептококковый бактериофаг, секстафаг.

Копрология

При макроскопическом исследовании определяется форма, консистенция, цвет, запах, остатки непереваренной пищи, слизь, кровь, гной.

Микроскопическим исследованием определяются остатки непереваренной пищи, мышечные волокна, соединительная ткань, растительная клетчатка переваримая и непереваримая, крахмал, иодофильная флора, оксалаты, трипельфосфаты, Шарко-Лейдена, жир нейтральный, жирные кислоты, соли жирных кислот, лейкоциты, плоский эпителий, яйца глистов, простейшие, дрожжевые грибы. Метод заключается в микроскопировании трех препаратов каловой эмульсии, а именно каловую эмульсию без примесей, смешанную с препаратом Люголя и препарат смешанный с метиленовой синевой.

Химическим исследованием определяется рН кала, наличие стеркобилина, билирубина, скрытой крови, воспалительного белка, концентраций монокарбоновых летучих жирных кислот в гомологическом ряду от уксусной до капроновой кислоты, включая их изоформы. Определение этих параметров проводится с помощью диагностических тест-полосок.

Статистическая обработка

Математическое моделирование изменения состава микробиоценозов кишечника и ротоглотки проводилось с помощью построения искусственных нейронных сетей (ИНС). Нейронные сети возникли из исследований в области искусственного интеллекта, а именно, из попыток воспроизвести способность биологических нервных систем обучаться и исправлять ошибки, моделируя низкоуровневую структуру мозга [175]. Нейронная сеть используется тогда,

когда неизвестен точный вид связей между входами и выходами, - если бы он был известен, то связь можно было бы моделировать непосредственно. Другая существенная особенность нейронных сетей состоит в том, что зависимость между входом и выходом находится в процессе обучения сети. Для обработки результатов бактериологических анализов использовали обучение многослойного персептрона с минимизацией ошибки по алгоритму радиальных базисных функций. Подбор архитектуры сетей проходил с помощью пакета ST Neural Networks программы Statistica 8.0 из пяти наиболее производительных ИНС, по критерию наименьшей ошибки классификации для обучающей и тестовой выборки. Данные бактериологического анализа для обработки ИНС предварительно подготавливались. Значения (десятичные логарифмы концентрации микроорганизмов в кале или мазке ЗСГ) округлялись до целого числа и обозначались в программе как категориальные.

Дискриминантный анализ используется для принятия решения о том, какие переменные различают (дискриминируют) две или более возникающие совокупности (группы). Иными словами необходимо определить, отличаются ли совокупности по среднему какой-либо переменной (или линейной комбинации переменных), и затем использовать эту переменную, чтобы предсказать для новых членов их принадлежность к той или иной группе оптимальным способом. Под оптимальным способом понимается либо минимум математического ожидания потерь, либо минимум вероятности ложной классификации. Медицина является типичной областью применения дискриминантного анализа. Суть анализа сводится к построению решающего правила, позволяющего по результатам измерения параметров объекта (концентраций метаболитов микрофлоры) определить группу, к которой он принадлежит. Такое решающее правило выражается в классификационных функциях и расстояниях до центроидов (расстояние Махаланобиса) в дискриминантном пространстве. Дискриминантное пространство образуется при проведении дискриминантного анализа над случаями с заданной принадлежностью к группам.

В математической статистике расстояние Махаланобиса — мера расстояния между векторами случайных величин, обобщающая понятие евклидова расстояния. Предложено индийским статистиком Махаланобисом (англ. Prasanta Chandra Mahalanobis) в 1936 году [2].

Если рассмотреть задачу определения вероятности того, что некоторая точка в N-мерном евклидовом пространстве принадлежит множеству, которое задано набором точек, определённо принадлежащих данному множеству, то существует центр масс множества — центроид. Интуитивно понятно, что чем ближе заданная точка к центроиду, тем больше вероятность того, что она принадлежит множеству.

Чтобы использовать расстояние Махаланобиса в задаче определения принадлежности заданной точки одному из N классов, нужно найти матрицы ковариации всех классов. Как

правило, это делается на основе известных выборок из каждого класса. Затем необходимо подсчитать расстояние Махаланобиса от заданной точки до каждого класса и выбрать класс, для которого это расстояние минимально. Однако также стоит учитывать, на какого размера области рассредоточены точки множества, чтобы понять, насколько значимо расстояние между заданной точкой и центром масс. Самый простой подход заключается в вычислении среднеквадратичного отклонения точек множества от центра масс. Если расстояние между заданной точкой и центром масс меньше среднеквадратичного отклонения, то можно заключить, что вероятность принадлежности точки множеству высока. Чем дальше точка, тем больше вероятность того, что она не принадлежит множеству.

При интерпретации дискриминантной функции для нескольких совокупностей и нескольких переменных, необходимо сначала проверить значимость различных функций и в дальнейшем использовать только значимые функции. Затем, для каждой значащей функции нужно рассмотреть для каждой переменной стандартизованные коэффициенты бета. Чем больше стандартизованный коэффициент бета, тем большим является относительный собственный вклад переменной в дискриминацию, выполняемую соответствующей дискриминантной функцией. В порядке получения отдельных "осмысленных" значений дискриминирующих функций можно также исследовать матрицу факторной структуры с корреляциями между переменными и дискриминирующей функцией. Таким образом, необходимо оценить средние для значимых дискриминирующих функций для того, чтобы определить, какие функции и между какими совокупностями проводят дискриминацию.

Проводился описательный анализ количественных и порядковых данных с расчетом значений среднего арифметического (M), стандартного отклонения (SD), 95% доверительного интервала ($ДИ$) для среднего, медианы (Med) и интерквартильного размаха (IQR) для всех экспериментальных групп. Распределение качественных переменных представлялось в виде значений выборочной доли (W), ее стандартной ошибки (SE) и 95% $ДИ$ для доли.

Сравнение достоверности различий количественных и порядковых признаков между группами проводилось по следующему алгоритму. После проверки допущений для применения параметрического многофакторного дисперсионного анализа с повторными измерениями (GLM), проводился расчет статистической значимости модели по критериям След Пилая и Лямбда Вилкса, а в дальнейшем, в зависимости от характера выборочных распределений и равенства дисперсий - двухфакторный одномерный параметрический ($ANOVA$ - t -критерии для связанных и несвязанных выборок) или непараметрический (критерии Манна-Уитни и Вилкоксона соответственно) дисперсионный анализ. Для всех статистических тестов устанавливался пороговый уровень альфа-ошибки $p < 0,05$.

Тестирование статистических гипотез о случайном распределении номинативных

переменных между обследуемыми группами проводилось с использованием критерия Хи-квадрат и при достигнутом уровне значимости $p < 0,05$ проводился попарный анализ межгрупповых различий генеральных (популяционных) долей каждой категории соответствующей переменной с помощью z-критерия для качественных данных (после проверки допущений) с поправкой альфа-ошибки на множественные сравнения. Статистический анализ полученных данных проводился с использованием программных пакетов Statistica 8.0. и MS OfficeExcel 2010

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 элементарной 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 микрoэкологического 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 метабеномных 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 микрoэкологической 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), Ежегодной Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Контроль и профилактика инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи» (ИСМП-2015) (Москва, 2015), VIII Ежегодном Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням с международным участием (Москва, 2016).

Глава 1 Обзор литературы. Система микробиоценозов различных биотопов человека.

1.1. Введение

Человек сложная экологическая система, в которой макроорганизм сосуществует с микроорганизмами, заселяющими различные биотопы. Микроорганизмы и макроорганизм живут в симбиозе. В результате совместной эволюций макроорганизма и его микробиоценозов сформировались ассоциации нормальной микрофлоры, выполняющих ряд, необходимых макроорганизму, функций [43]. В зависимости от выполняемых функций сформировались особые типы микробиоценозов для каждого из биотопов. Биотопы слизистых открытых полостей организма выполняют барьерную функцию, так как постоянно сталкиваются с чужеродными микроорганизмами, вирусами, испытывают прочие неблагоприятные воздействия [19]. Микробиоценоз кишечника является свободным дополнительным органом, выполняющим множество функций по поддержанию гомеостаза [113]. За счет участия внешних механизмов в подавлении или стимуляции различных групп бактерий обеспечивается высокая стабильность функционирования микробиоценоза кишечника. В частности можно выделить иммунную систему организма как эффективный механизм управления микробиотой [161]. Большую роль в формировании микробного пейзажа играет наличие вирусов, 90% из которых, являются бактериофагами – вирусами бактерий [118]. Одной из важнейших функций кишечной микрофлоры является микробное пищеварение. Большая часть, поступающих в кишечник пищевых субстратов гидролизуются и всасываются в тонком кишечнике, а в толстый кишечник попадают полисахариды с бета-гликозидной связью, которые не усваиваются в тонком кишечнике из-за отсутствующих там ферментов [51]. В результате микробного пищеварения образуются микробные метаболиты – летучие жирные кислоты (ЛЖК), молочная кислота, аминокислоты, этиловый спирт, меркаптаны и другие химические вещества, которые принимают участие в коммуникативной связи макроорганизм-микрофлора, а так же способствуют регуляции микробного сообщества, во многом благодаря обеспечению колонизационной резистентности.

Детальное изучение микробиоценоза кишечника затруднено, так как есть определенные сложности в оценке пристеночной микрофлоры кишечника, связанные с высоким процентом некультивируемых микроорганизмов. Между колониями микроорганизмов имеется тесная структурная и функциональная взаимосвязь, которая имеет многофакторные параметры, связанные с исполнением многочисленных функций микробиоценоза кишечника, что делает бессмысленным изучение микробиоценоза без их учета [35].

Решение задач подобного уровня сложности подразумевает использование методов системной биологии и биоинформатики. Применение технологий метаболомики и метабономики является мировой тенденцией, и получает широкое развитие в медицинских и биологических исследованиях, с которым связывают ожидания научных и технологических прорывов в этих областях [92].

Применение биофизических подходов получило широкое применение в биотехнологии, как для создания новых пробиотических препаратов, как на этапе подбора рецептуры, так и на этапе клинико-лабораторных испытаний (неотъемлемого этапа создания препарата). Подбор наиболее эффективной композиции пробиотических препаратов, основанных на синергизме консорциума штаммов и прогнозирование их свойств, дает новые возможности для перехода к персонализированной, предсказательной медицине. [92]

Рассмотрение взаимосвязи макроорганизма и его микробиоценозов с позиций многомерной медицины и биологии требует новых критериев оценки микробиоценоза, иммунной системы, вириотности, метаболической активности микрофлоры, основанных на совокупности данных разных анализов. Подобный, комплексный подход, дает возможность персонифицировать подход к лечению, выявить надвигающуюся проблему, на момент, когда она решается профилактическими мерами и прогнозировать течение заболевания с большой степенью достоверности.

1.2. Микробиоценозы слизистых открытых полостей организма

Микробиоценоз открытых полостей организма является динамичной, открытой системой, где макроорганизм и его микробиоценоз являются составляющими компонентами. Микробиоценоз ротоглотки обладает большим разнообразием видов и имеет важное эпидемиологическое значение, так как здесь смешиваются микрофлора желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) и воздухоносных путей, и соответственно выделяются микроорганизмы, относящиеся к двум системам. Микробиоценоз ротоглотки представлен стрептококками (альфа-, гамма-гемолитическими), нейсериями, стафилококками *вайлеонеллы*, гемофильные бактерии, коринобактерии. Транзиторно встречаются энтеробактерии, бактероиды, грибы, энтерококки, лактобациллы, синегнойная палочка. [93]

Разделение на индигенную, добавочную и транзиторную микрофлору проводили по частоте обнаружения у здоровых лиц. К индгенной микрофлоре относятся: стрептококки, нейсерии, лактобациллы и бифидобактерии; к добавочной — стафилококки, коринобактерии и гемофилы; к транзиторной — бациллы, грибы рода *кандида*, микрококки, эширихии, клебсиеллы и синегнойная палочка [93]. У пациентов со сниженным иммунитетом представители нормальной микрофлоры могут быть возбудителями инфекции. Ключевое место

в защитной функции слизистой микрофлоры ротоглотки занимает коллонизационная резистентность. Коллонизационная резистентность это комплекс факторов местного иммунитета, а именно ингибиторы микробной адгезии, муцин, лизоцим, интерферон, лактоферрин, нормальная микрофлора, антитела, мерцательный эпителий. Активность антител внешних секретов кроме секреторных иммуноглобулинов классов А и М, содержат значительные количества иммуноглобулинов класса G. Роль иммуноглобулина А в нейтрализации вирусов, бактериальных токсинов, ферментов, в агглютинации бактерий. Постоянные виды бактерий и местный иммунитет поддерживают коллонизационную резистентность на слизистой зева. Дисбиотические нарушения характеризуются снижением численности постоянной микрофлоры и увеличением численности добавочной. Так, например, доказано, что носительство золотистого и эпидермального стафилококка, у часто болеющих детей (ЧБД) в 11,9 раза выше, чем у здоровых [95]. ЧБД особовыделяемая группа дошкольного и раннего школьного возраста, с рецидивирующей патологией в основном ЛОР органов. Для данной группы характерна низкая реактивность иммунной системы, что связано с дисбиотическими нарушениями микробиоценоза [49]. Инфекционные агенты представлены вирусами, вирусно-бактериальными ассоциациями и бактериями, такими как грипп, парагрипп, аденовирусы, РС, корона и риновирус, а так же *Chlamydomphila pneumonia*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* [84]. Изменения микрофлоры ротоглотки характерны для различных заболеваний ЛОР-органов. У здоровых детей в 99% случаев высевается альфа гемолитический стрептококк в ассоциации с нейсериями. Эти микроорганизмы образуют защитную биопленку. При местном гнойно-воспалительном процессе, ангине или пневмонии высевается монокультура или ассоциации добавочной и транзитной микрофлоры, но может не высеваться ничего. При вирусном инфекционном процессе высевается грамотрицательная микрофлора – клебсиеллы, а у ЧБД чаще высевается синегнойная палочка.

При отсутствии выраженного инфекционного процесса состояние дисбиоза оценивается с учетом клинического состояния пациентов и их преморбидного состояния и анамнеза. Частота эпизодов ОРВИ в году коррелирует с глубиной дисбиотических нарушений в ротоглотке. [88].

1.3. Микробиоценоз кишечника

Микробиоценоз кишечника необходимо рассматривать как элемент пищеварительного тракта, так как все процессы, происходящие в кишечнике, глубоко интегрированы с работой всего пищеварительного тракта. Желудочно-кишечный тракт считается высокоинтегрированной системой координирующей моторную и эвакуационную функции, он имеет прочные функциональные связи с поджелудочной железой и печенью. Не смотря на ряд значительных функций кишечной микрофлоры, она прежде всего является органом микробного

пищеварения, поэтому строение, состав и функционирование микрофлоры всегда связаны с ее главной функцией [99].

Известно, что мукозная микрофлора, колонизирующая пристенную зону слизистой оболочки, создаёт микроколонии, пребывающие в тесной связи с кишечной стенкой. Тесная структурная и функциональная связь между колониями микробов и доступными структурами дает возможность соединить их в неразделимый микробно-тканевой комплекс кишечника (МТКК). [33]. МТКК это не только микроколонии микробов и вырабатываемые ими экзополисахариды, но и иные представители биоценоза: вирусы, простейшие; пищевые субстраты, слизь, гликокаликс; эпителий, элементы межклеточного матрикса стромы слизистой оболочки кишечника, питающие ее сосуды, лимфоидные фолликулы и окончания сплетений энтеральной нервной системы. Нормальная микрофлора кишечника оказывает влияние на структуру слизистой оболочки и её адсорбционную способность, в то время как сама пребывает под регуляторным воздействием макроорганизма. Это могут быть модуляции характера секреторных и моторно-эвакуаторных взаимосвязей в составе желудочно-кишечного тракта, а в свою очередь плазмореи – постоянного поступления элементов плазмы крови непосредственно в пристенную зону слизистой оболочки. Итак, количественные соотношения в составе микробиоценоза его метаболическая активность оперативно откликается на изменившийся статус внутренней среды макроорганизма [32].

Микробиота толстой кишки представлена пятью основными группами: *Bacteroidales*, *Clostridiales*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* и *Archea* [114]. Доминирующее положение в пристеночной микрофлоре принадлежит *Bacteroides* и *Clostridium* [144], в значимых количествах содержатся молочно-кислые бактерии *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Oenococcus*, *Weissella*, а так же *Fusobacterium prausnitzii*, *Peptostreptococcus products* и *Clostridium clostridiiforme*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides vulgaris*, *Eubacterium limosum* *Escherichia coli*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus acidophilus*

Кроме микроорганизмов в МТКК присутствует большое число вирусов бактерий – бактериофагов. Бактериофаги необходимы для нормального функционирования микробиоценоза, они регулируют численность микрофлоры и являются неотъемлемой частью микробиоценоза. Кроме вирулентных фагов, которые разрушают бактериальную клетку, в МТКК присутствуют умеренные, волокнистые фаги, которые заражают бактерию и размножаются в ней. При этом умеренный фаг защищает микроорганизм от заражения близкородственным вирулентным фагом [120]. Бактериофаги могут защищать макроорганизм от вирусных инфекций, так как способствуют выработке интерферона, конкурируют с вирусом

за клеточные рецепторы и индуцируют противовирусные антитела. У каждого человека сформирован свой консорциум фагов, поэтому нельзя выделить типичный набор фагов, характерный для здорового человека. Так же сложно по составу, имеющихся в кишечнике фагов, оценивать состояние микрофлоры. Основная функция бактериофагов кишечного тракта препятствовать росту одних видов микроорганизмов и способствовать росту других [119]. Поэтому, появление среди добавочной и транзиторной микрофлоры микроорганизмов с повышенной чувствительностью к бактериофагам может служить маркером снижения биоразнообразия виroma кишечника — дисбаланса вирусного сообщества, связанного с имеющимся или прогнозируемым дисбиозом.

Большое влияние на состав функциональную активность кишечной микрофлоры оказывает субстрат, поступающий из верхних отделов ЖКТ. Изменение типа избыточного субстрата может быть связано с нарушением функции желудка и кишечника в виде изменения их моторной, всасывающей и переваривающей способности. Нарушения функций органов пищеварительной системы, так как гастриты, энтериты, гастроэнтериты и колиты объединяют в копрологические синдромы. Кроме орального синдрома (недостаточность жевания) выделяют гастрогенный синдром, синдром недостаточности панкреатического пищеварения, синдром недостаточности желчеотделения, энтеральный синдром, синдром недостаточности пищеварения в толстом кишечнике. Для оценки состояния микробиоценоза кишечника важно выделить тип избыточного субстрата: мяса и прочих белков — креаторея, углеводов — амилорея, жиров — стеаторея [68]. Принимая во внимание устойчивость микробиоценоза микрофлоры кишечника, а так же доминирующую функцию микробного пищеварения и детоксикации, можно с уверенностью сказать, что дисбиотические нарушения, связанные с нарушением пищеварения в верхних отделах ЖКТ, могут быть компенсационными и не требуют активного воздействия антибактериальными препаратами, пробиотиками и бактериофагами. Такие дисбиозы исчезают при устранении причины их возникновения — нарушений ферментного пищеварения.

Как любая живая экосистема — микросимбиоценоз считается открытой системой, где микросимбионты производят обмен элементов и энергии с окружающей средой, так и самоуправляемой, саморегулирующейся конструкцией, перерабатывающей информацию для обслуживания своей структуры и регулирования процессами метаболизма.

Трофическая конструкция микробного сообщества обуславливается взаимодействиями между функциональными группами бактерий сообразно трем узловым компонентам биомассы пептолитического, липолитического и сахаролитического пути переработки биомассы. Микроорганизмы-гидролитики переводят элементы твердой фазы в раствор, гидролизуя их за пределами клетки под воздействием подходящих экзоферментов-гидролаз, а именно протеаз,

липаз, целлюлаз. Гидролиз приводит к появлению унифицированных мономеров из полимеров. Далее деградация биомассы осуществляется несколькими специализированными группами организмов: гидролитиков, диссипотрофов, употребляющих низкомолекулярные органические вещества, вторичных окислителей, использующих конечные продукты обмена. Таким образом, осуществляется пристеночное пищеварение, дальнейшее переваривание происходит внутри клеток и называется мембранным [99].

В результате переваривания полисахаров, белков и жиров микрофлорой образуется большое количество нутриентов прочих продуктов распада пищи, среди которых можно отметить низкомолекулярные летучие жирные кислоты (ЛЖК). ЛЖК вырабатываются в просвете толстой кишки ферментацией неперевариваемых углеводов, пищевых и эндогенных белков [140]. В составе ЛЖК выделяются основные – уксусная, пропионовая и масляная кислоты и сопутствующие, валериановая, капроновая и их изомеры. Уксусная и пропионовая кислоты поступают в кровь, достигают печени, значительная часть уксусной, пропионовой кислот сжигается в пероксисомах гепатоцитов. В крови, оттекающей от печени, концентрация ЛЖК существенно слабее и полной метаболизации кислоты подвергаются в клетках периферических тканей [133]. По данным литературы концентрация масляной кислоты в стуле человека меняется от 11 до 25 ммоль/г [139]. Диапазон соотношений основных ЛЖК уксусной:пропионовой:масляной от 48:29:23 до 70:15:15 при среднем значении 60:20:20 [103]. Определить общую продукцию ЛЖК сложно, так как 95% ЛЖК быстро абсорбируются и метаболизируются организмом-хозяина, поэтому концентрация меняется в широких пределах в зависимости от скорости транзита [155]. Так измерения концентрации ЛЖК в отделяемом трансверзуме показывают, что суммарная концентрация ЛЖК составляла 1400 ммоль/г, а в образцах полученных из сигмостомы 550 ммоль/г. Это совпадало с концентрацией в кале у здоровых лиц [168]. ЛЖК являются слабыми кислотами, поэтому 90% находятся в форме диссоциированных анионов [193]. Для транспорта через апикальную мембрану коллоноцитов отмечена диффузия недиссоциированной формы ЛЖК — HCO_3^- [193] и активный транспорт диссоциированной формы изоформой 1(MCT1) [152] и SLC5A8 [125]. Большая часть масляной кислоты метаболизируется кишечным эпителием, в портальной вене отмечается концентрация масляной кислоты 1,3 до 14,4 ммоль/г, а в сыворотке венозной крови 0,5 – 3,3 ммоль/г. Сывороточные концентрации уксусной кислоты 98 – 143, , пропионовой — 3,8 - 5,4 ммоль/г [162]. Источником масляной кислоты являются растворимые (олигофруктоза, инулин, псилум) и нерастворимые волокна (целлюлоза, лигнин) [169; 172; 173; 181; 192;].

Столь пристальное внимание к масляной кислоте обусловлено большим набором важнейших функций, которые продемонстрированы в большом количестве в научной литературе. Прежде всего, отмечается влияние масляной кислоты на канцерогенез в толстой

кишке. Кроме выявленной обратной зависимости между приемом пищевых волокон и частотой возникновения колоректального рака [117; 174; 180], отмечается снижение концентрации переносчиков ЛЖК — МСТ1 и SMCT в раковой опухоли толстой кишки человека [156]. Антиканцерогенный эффект масляной кислоты подтвержден на многочисленных моделях на животных [115; 164; 199]. Так же доказан эффект масляной кислоты в отношении язвенного колита. Клизмы с масляной кислотой на 60% повышают пролиферацию слизистой толстой кишки [184]. Отмечается положительное влияние масляной кислоты на продукцию муцина бокаловидными клетками [130]. Масляная кислота, как показано на модели колита у крыс, восстанавливала содержание трансклутаминазы в толстой кишке [127]. Масляная кислота, как показано в исследованиях *in vitro*, участвует в процессах репарации толстой кишки [196]. Имеются данные [110; 179; 185; 187] о влиянии масляной кислоты на оксидативный стресс, который подтвержден опытами на изолированных коллоноцитах крыс и человека. Масляная кислота влияет на аппетит, благодаря увеличению концентрации глюкагоноподобного пептида GLP-1, пептида PYY и оксинтомодулина, участвующих в регуляции аппетита [129]. Отмечается влияние масляной кислоты на регуляцию слабого управляемого воспаления, подавляющего восприимчивость человека к нормофлоре [170].

Проведенные ранее исследования показали, что микрофлору пристеночного муцина ЖКТ человека отличает выраженная изменчивость и способность влиять на инсулинорезистентность и хроническое системное воспаление [21; 22; 23]. Состояние микрофлоры, регенерация нормального состава микробиоты кишечника за счет угнетения патогенной и условно-патогенной микрофлоры улучшает толерантность к пероральной нагрузке глюкозой и уменьшает выраженность стеатоза печени. Так же снижение условно-патогенной микрофлоры в слепой кишке коррелирует со снижением липополисахарида (ЛПС) в крови [124]. Снижение концентрации ЛПС в крови связано со снижением провоспалительного цитокина ФНО- α , продуцируемого кишечником [166]. Таким образом, первичное расстройство МТКК, а именно изменение количественного и качественного состава микрофлоры приводит к слабовыраженному хроническому системному воспалению и инсулинорезистентности [166].

Таким образом, типичное состояние всех элементов МТКК, а именно оптимизированный состав и метаболическая активность облигатной микрофлоры, адекватное микроциркуляторное и нейрогуморальное обеспечение эпителиоцитов, достаточное поступание пищевых волокон, витаминов и минералов с пищей, а так же действенная секреторная, моторно-эвакуаторная деятельность желудочно-кишечного тракта, обнаруживается основным фактором защиты кишечного тракта от его заселения болезнетворными и условно-патогенными бактериями

1.3.1. Комплексный подход оценки микробиоценоза человека, основные критерии, интегральные показатели.

Традиционно исследование микробиоценоза кишечника проводится микробиологическим методом. В практическом здравоохранении используется расширенный бактериологический анализ фекалий [108]. Метод определения степени кишечного дисбиоза ранжирован соответственно дефициту бифидобактерий, лактобацилл и эшерихий, при усилении роста ассоциаций условно-патогенной микрофлоры [37]. В качестве недостатка метода отмечается невозможность определения дисбиоза кишечника на первоначальной стадии, а так же неточность измерения связанная с субъективностью [31].

Этот метод трудно назвать прямым, так как на сегодняшний день известно о 3500 видов бактерий, обнаруженных в желудочно-кишечном тракте, из которых большинство неферментируемые и не поддаются культивированию. Так же данный метод не дает полного представления о пристеночной автохтонной микрофлоре так как наряду с определением внутрипросветной флоры, выделяется большое количество транзитной (пассажной). Из недостатков можно отметить так же срок получения результатов, невозможность работы в реальном масштабе времени, применение дорогих питательных сред, преимущественное и ней, разнородность выделения бактерий из разных участков испражнений, невысокая надежность результатов, а так же низкая чувствительность данного метода может показывать ложноотрицательные результаты [72].

По мере развития представлений о структуре и функционировании ЖКТ предлагаются различные методики оценки нарушений микробного пищеварения и самого кишечного микробиоценоза. Многочисленными исследованиями показано большое количественное и качественное разнообразие микроорганизмов населяющих ЖКТ. При нарушении кишечного биоценоза многие свойства микрофлоры ЖКТ, такие как - пищеварительная, иммунная, метаболическая, барьерная и симбиотическая функции значительно изменяются. Для оценки этих изменений применяются различные косвенные диагностические тесты. Уровень метаболитов кишечной микрофлоры определяют по концентрации индикана, п-крезола и фенола в моче; водорода и метана в выдыхаемом воздухе; летучих жирных кислот в содержимом тощей кишки или в фекалиях; аммиак в крови, в фекалиях или в выдыхаемом воздухе. Перечисленные методы позволяют оценить дисбиоз при выраженном дисбалансе кишечника и мало информативны на ранней стадии кишечного дисбиоза [94].

Очень эффективным, но косвенным методом выявления дисбиотических нарушений в кишечнике является определение степени антагонистической активности фекальных микроорганизмов. В качестве недостатка отмечается длительность исследования [40].

Известны и другие косвенные методы изучения дисбиозов желудочно-кишечного тракта, как правило, биохимические, изучающие изменения разных субстратов под действием микрофлоры кишечника, образование метаболитов и т.д. [5; 17; 83].

К этим методам относятся:

- Определение кислотности копрофильтратов [72; 60].
- Определение метаболитов кишечной микрофлоры [78].
- Определение в испражнениях муцина и тканевого белка [62].
- Определение протеолитических ферментов в копрофильтратах [61].
- Углубленное изучение биологических свойств микроорганизмов [1; 12; 13; 86; 65; 102]:

А) Изучение адгезивности бактерий [42].

Б) Изучение патогенных свойств [10]

В) Изучение персистентных характеристик и др.

- Создание моделей на животных для уточнения механизма взаимодействия микроорганизмов с организмом хозяина [20; 66; 85] .

Каждый из указанных методов имеет свои особенности. Из кала высевается не более 1% микроорганизмов микробиоценоза кишечника. На свойствах этой непредставительной выборки делается заключение о состоянии микробиоценоза кишечника. В связи с тем, что процессы, протекающие в микробно-тканевом комплексе кишечника, сложны, и многоэтапны все вышеперечисленные методы дают лишь косвенную и довольно грубую оценку. Сложность вызывает еще и тот факт, что кал не отвечает за изменения в локальном месте ЖКТ, и за счёт большой периодичности дефекаций, можно судить лишь об интегральной оценке произошедшего за день, без возможности получить оперативную информацию, более детализированную по времени. Недостаток информации может быть компенсирован комплексным подходом, когда показатели разных диагностических тестов анализируются одновременно, взаимозависимо друг от друга. Такой подход продемонстрирован в ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора [51] в комплексных анализах микрофлоры кишечника и ротоглотки.

У человека присутствует ферментативное и микробное пищеварение. Нарушение ферментативного пищеварения в большинстве случаев влечет нарушение микробного пищеварения, так как микрофлора реагирует на избыток определенного субстрата изменением численности и состава, а так же концентрацией и соотношением метаболитов [4; 6; 9; 39;76]. Отмечается реакция микробиоценоза, повышением уровня летучих жирных кислот на внесение в рацион пищевых волокон, что было не однократно использовано в коррекции энергодефицитных состояний, показано, что при использовании комплексного препарата Дубинина в состав которого входят 5 видов отрубей (ржаные, пшеничные и т.д.) увеличивается

суммарный уровень ЛЖК в кале, что положительно сказывается на качестве жизни пациентов [38; 55; 58]. Комплексный подход помогает выявить закономерности между концентрациями метаболитов и содержанием углеводов в кале у детей первого года жизни при лактазной недостаточности. Показано, что увеличение содержания углеводов в кале коррелирует с концентрацией пропионовой и масляной кислоты до уровня 0,7%, после чего наблюдается обратная зависимость, что связывается с преобладанием в популяции сахаролитических клостридий [69]. Благодаря комплексному подходу появилась возможность инструментально дифференцировать тип функционального нарушения при вирусных диареях, ОКИ и оценить эффективность пробиотиков в их лечении [45; 46; 47; 54; 56; 57; 67; 68; 70; 71]. Применение комплексного подхода к оценке микрофлоры ротоглотки более перспективно, так как доступность микробиоценоза и его метаболитов не ограничивает нас одномерным сравнением параметров при различных патологиях, таких как ксеростомия [53; 97], но дает возможность применения многомерных регрессионных методов статистики — дискриминантного анализа [44]. Благодаря применению дискриминантного анализа для подбора материала протезов зубов у целевой группы больных диабетом стало возможным не только определить наиболее инертный материал протеза, но и дать количественную оценку эффективности его применения.

1.4. Современные методы оценки микробиоценоза – omics технологии

Благодаря применению –omics технологий в обозримом будущем ожидается пересмотр основных методических подходов исследования биологических объектов, и микробиоценозов в частности [109; 112; 197]. Практическое здравоохранение и медицинская, биологическая наука имеют достаточный потенциал для качественного перехода на принципы персонифицированной, профилактической превентивной медицины [145]. Omics технологии это оценка больших массивов данных о генах, белках или метаболитах биологического объекта средствами биофизики - обработки переменных средствами многомерной статистики, дисперсными регрессионными анализами, а так же программами распознавания образов [147]. Толчком к развитию -omics технологий послужил стремительный технологический рывок процессов секвенирования, массспектрометрии, хроматографии, интеграции баз данных и создания общедоступных библиотек посредством глобальной информационной сети интернет [18; 147]. Из большого спектра –omics технологий выделим геномику, протеомику и метаболомику.

Геномика – это область молекулярной генетики, посвящённая исследованию генома и генов живых организмов [100]. Один из разделов геномики структурная геномика изучает содержание и организацию геномной информации. В разделе функциональной геномики реализуется информация, записанная в геноме (от гена- к признаку). В разделе сравнительной

(эволюционной) геномики проводятся сравнительные изыскания содержания и системы геномов различных видов организмов [101; 104; 135; 136].

Метагеномика. Микробиоценоз человека часть супреорганизма человек - микробиота, имеющий большой набор генов и состоящий из отдельных микро-организмов. Таким образом, исследования геномики микробиоценозов выделилось в отдельное направление метагеномику [141]. Расшифровка метагенома заключается в секвенировании - расшифровке нуклеотидных последовательностей в молекулах ДНК. При традиционном секвенировании геномов микроорганизмов исследователи работают с культивируемыми клонами культур, а метагеномика имеет дело с набором абсолютно всех ДНК оказавшихся в изучаемой среде. Главным различием при применении метагеномного подхода представляется учет некультивируемых бактерий наравне с культивируемыми. Технологический подъём в предоставленном разделе молекулярной генетики дает возможность допустить, что поэтапно метагеномика сменит ПЦР-диагностику [200].

Благодаря деятельности международного консорциума MetaHIT («метагеномика кишечного тракта человека») [104; 150; 158; 159], был проведен ряд исследовательских работ, результаты которых заставляют пересмотреть многие методические подходы, к оценке микробиоценозов различных полостей организма. С помощью специального компьютерного программного обеспечения в данном массиве данных получилось прогнозировать 3,3 млн. вероятных генов. Это ориентировочно в 150 раз больше, чем численность генов в геноме человека. Практически все эти гены (99,1%) представляются бактериальными, только 0,1% являются эукариотическими или принадлежат вирусам, а остальные – относятся к археям. Помимо прочего обнаружилось, что в группе из 124 европейцев в итоге выявилось 1000-1150 доминирующих видов микробов, при этом у любого индивида в толстой кишке обитало не менее 160 видов микробов. Примерно 40% бактериальных генов, обнаруженных в образцах конкретного человека, находились опять же не менее чем у пятидесяти процентов участников исследуемой группы. Таким образом, 75 видов бактерий были у более чем 50% участников обследования, 57 видов находились у 90% участников и 18 видов присутствовали у всех участников. Ориентировочно 150 видов микробов содержатся везде, они имеют глобальное распространение и формируют ядро кишечной микрофлоры любого индивидуума. Остальное - это персональные различия. Суммарный геном «кишечных» бактерий содержит приблизительно 400 000–600 000 генов, в то время как геном человека включает ориентировочно 25 000 разных генов. По примерным оценкам суммарная численность бактериальных генов в 100 раз больше, чем генов макроорганизма. Тем не менее 40–45% всего генома человека - это разнообразные подвижные и повторяющиеся компоненты, имеющие возможность мигрировать по геному, то есть вирусоподобные объекты. Чтобы получить

суждение о типичном человеческом микробиоме, участники программы собрали образцы тканей из 15 участков на теле 129 мужчин и из 18 участков у 113 женщин [143; 176]. У каждого из них ученые брали по 3 образца слизистой с внутренней стороны щеки, носа, кожи за ухом и с локтевого сгиба, а кроме того фекалии. По результатам генетического исследования собранного материала установлено, что энтеробактериальных генов в человеке в 360 раз больше, чем непосредственно человеческих. Ведущим регуляторным механизмом макроорганизма считается изменение секреции и моторно-эвакуаторных отношений в составе ЖКТ [34; 131]. Результирующим обстоятельством в этих условиях представляется плазморея, а именно подача элементов плазмы крови прямо в пристеночную зону слизистой оболочки. Так бактерии толстого кишечника непрерывно и незамедлительно реагируют на модифицирующееся положение внутренней среды макроорганизма модуляцией собственной метаболической активности, а также численными соотношениями в микробиоценозе.

Численность микроорганизмов и состав бактерий тела человека находится в зависимости от генетических мутаций [101; 131; 148]. В рамках проекта "Микробиом человека" (Human Micro-biome Project) Блекхман с коллегами воспользовались данными о микробах, обитающих как внутри, так и на теле человека. В 15 областях тела человека они выявили 51 мутацию в генах, сопряженных с количеством энтеробактериальных колоний. Часть данных генетических изменений и сообразных им микробов оказалась сопряжена с заболеваниями. Было установлено, что у некоторых индивидуумов с изменениями в гене PCSK2 численность проживающих в толстой кишке *Bacteroides* существенно выше нормы. Мутации в том же гене сопряжены с заболеванием диабетом второго типа. На коже людей с изменениями в гене CXCL12 имелось существенно больше *Granulicatella*, чем в соответствии с нормой. Ген CXCL12 сопряжен с воспалительными процессами в организме человека, а "сообразная" ему энтобактерия - с кожными заболеваниями.

Постгеномные исследования — протеомика. Индивидуальность белков обеспечивается большим количеством возможных вариантов индивидуальных белков - 10^{80} за счет большого числа вариантов их соединений [109; 191]. Такое большое количество вариантов обеспечивает высокую специфичность биомаркеров белковой природы как для макроорганизма, так и для микробиоценоза и для суперорганизма макроорганизм - микробиота. Протеомика реализовывает сравнительный анализ большого количество белковых соединений - из всех белков, вовлеченных в биологический процесс [1; 132].

Превосходством протеомики перед геномикой можно считать большую полноту корреляции наличия белка и заболевания, чем наличие гена и заболевания. Присутствие гена в геноме не значит, что с него выполняется транскрипция, а присутствие транскрипта не значит, что с него происходит трансляция, а даже если происходит, то транскрипт не позволяет

недвусмысленно говорить о структуре белка, его созревании и локализации. Для разрешения этих вопросов нужны подходы протеомики. Основные инструменты протеомики - двумерный микроэлектрофорез в геле и масспектрометрический анализ (MS), с помощью которых изучаются посттрансляционные модификации белков и поиск биомаркеров [132].

Отбор и валидация биомаркеров болезней неосуществимы без количественного профилирования биообразцов. MS - физикохимический тип исследования, состоящий в ионизации молекул исследуемого образца с дальнейшим дроблением и регистрацией образующихся ионов. Особенно часто применяются время-пролетный (time offlight, TOF) MS, матрица-ассоциированная лазерная десорбция-ионизация (matrix-assisted laser desorption/ionization, MALDI) и интенсивная поверхность лазерная десорбция-ионизация (surface-enhanced laser desorption/ionization, SELDI) [183]. Единовременно улучшаются гибридные технологии, в которых хроматографическая сепарация пептидов/белков совмещается с MALDI-TOF MS [183]. Одновременно совершенствуются гибридные технологии, в которых хроматографическое разделение пептидов/белков сочетается с MALDI-TOF MS [151]. В микробиологии на сегодняшний день широкое распространение получила методика идентификации микроорганизмов по молекулярному «отпечатку пальца», с использованием MALDI Biotyper, который идентифицирует микроорганизмы с использованием время-пролетной МАЛДИ масс-спектрометрии (MALDI-TOF MS).

Протеомика микробиоценоза может дать ответы на многие вопросы связанные с качественным определением маркеров заболеваний, однако для оценки динамики лечения требуется более чувствительный инструмент, который может дать количественную оценку изменениям микробиоценоза. Таким инструментом является метаболомика или метабономика, использующая проекционные методы многомерной статистики, методы мультимерную регрессию и дисперсию.

Метаболомика - это «систематическое исследование оригинальных химических „отпечатков пальцев“ специфичных для процессов, проходящих в живых клетках». Метаболомика изучает низкомолекулярные метаболические профили продуктов деятельности биологической системы [128; 149; 177; 188]. Метаболом предполагает сумму всех метаболитов клетки, ткани, органа или организма. Метаболические профили могут дать моментальный снимок физиологических процессов в клетке, а данные об экспрессии генов и протеомного исследования не открывают динамики всех процессов, происходящих в клетке. Метаболомные данные это результаты разных измерений объектов в разнообразных условиях в цифровом формате списков концентраций метаболитов. В самом простом случае это таблица, в которой строки это образцы, а колонки - концентрации метаболитов.

Иными словами если методы клинической биохимии оценивают изменения микробиоценоза по одному признаку (например, достоверному отличию концентрации масляной кислоты, уксусной кислоты, изоформ), то методы метаболомики (метабономики) сравнивают отличия групп по дискриминантной функции в многомерном пространстве, что существенно усиливает мощность статистической обработки и даёт возможность качественного прогностического анализа.

Метабономика. Для изучения метаболомики необходимо анализировать все группы метаболитов, вырабатываемы микрофлорой, что затруднительно, так как многие метаболиты участвуют в обменных процессах с макроорганизмом и утилизируются самим микробным сообществом, поэтому применяется метабономика - анализирование части метаболома (отдельные группы метаболитов). Метабономика - это наука использования биохимических данных о метаболизме для определения профилей метаболических заболеваний [171]. Если обычная клиническая биохимия исследует отдельные продукты метаболизма микроорганизмов, применяя приёмы аналитической химии (хроматографию и другие методы), то метабономика использует компьютерные методы многомерной статистики при изучении тех или иных суммарных показателей [52].

Общим для -omics технологий можно считать акцентирование внимания на математическом аспекте — многомерной статистике и компьютерном моделировании, а так же на системах распознавания образов. Постепенно меняются терминология, методология и схемы диагностики. Нарушение микробиоценозов рассматривается уже не как самостоятельный синдром, требующий коррекции, а как разновидность реактивности суперорганизма (макроорганизм – микробиота), как маркер заболеваний на бессимптомной стадии.

1.4.1. Методы многомерной статистики –omics технологий, критерии, ограничения методов

Для исследования подобных данных применяются разные статистические методики, как правило это проекционные методики, а именно регрессия на главные компоненты и на проекциях на скрытые переменные.

Самым распространенным является дискриминантный анализ [2]. Дискриминантный анализ применяется с целью принятия заключения о том, какие переменные дискриминируют 2 или более образующиеся группы. Иными словами необходимо установить, различаются ли группы по среднему значению той или иной комбинации переменных, и потом применять эту комбинацию, с целью прогнозировать для новых членов их принадлежность к одной из групп наилучшим способом. Под наилучшим способом подразумевается минимальное значение математического ожидания потерь, или минимальное значение вероятности ошибочной

классификации. Медицина считается типичной сферой приложения дискриминантного анализа. Суть анализа сводится к построению решающего правила, позволяющего по результатам измерения параметров объекта (концентраций метаболитов микрофлоры) определить группу, к которой он принадлежит. Такое решающее правило выражается в классификационных функциях и расстояниях до центроидов (расстояние Махаланобиса) в дискриминантном пространстве. Дискриминантное пространство образуется при проведении дискриминантного анализа над случаями с заданной принадлежностью к группам.

В статистике расстояние Махаланобиса - евклидово расстояние между векторами случайных величин, которое было в 1936 году предложено индийским статистиком Махаланобисом [160]. Центроид это центр масс множества точек, которое задано набором точек, определённо принадлежащих данному множеству в N-мерном евклидовом пространстве. Центроид это аналог среднего в одномерной статистике, однако в многомерной статистике по минимальному расстоянию от центроида до исследуемой точки определяют класс, к которому она принадлежит. Однако также стоит учитывать, на каком размере области рассредоточены точки множества, чтобы оценить значимость расстояния между данной точкой и центроидом. Для этого используется среднеквадратичное отклонение точек множества от координат центроида, так как отдаление данной точки от центроида меньше среднеквадратичного отклонения.

Для выбора переменных сравнивают корреляции переменных между собой, чтобы отбросить скоррелированные переменные. Для оценки применимости дискриминантного анализа необходимо оценить отношение величины внутригрупповой изменчивости к величине общей изменчивости, что определяется лямбдой Вилксона. Wilk's Lambda — лямбда Уилкса (статистика Уилкса) — рассчитывается как частное детерминанта матрицы внутригрупповых дисперсий (ковариаций) к детерминанту суммарной ковариационной матрицы. Чем больше лямбда Уилкса, тем значительнее этот признак, а чем меньше общее значение этой статистики, тем лучше было выполнено разделение групп.

Partial Lambda — частная лямбда. Данная статистика указывает частное лямбды Уилкса после добавления значения этой переменной к лямбде Уилкса до прибавления переменной. В случае если переменная вносит заметный вклад в разделение групп, лямбда Уилкса снизится. Таким образом, снижение частной лямбды, увеличивает ценность данного признака.

F-remove — F-условие, относящееся к выключению настоящего признака из анализа, а p-level — это уровень его значимости. Значимость признака тем важнее, чем более значимое изменение влечет за собой его исключение в дискриминацию групп.

Толерантность - это критерий избыточности признака, который рассчитывается, как $1 - R^2$, где R^2 — коэффициент многократной корреляции этого признака со всеми прочими

признаками анализа. Признак тем сильнее связан со всеми остальными признаками, чем ниже толерантность. Чем выше коэффициент множественной корреляции, тем больше данный признак скоррелирован с другими, использованными в модели. [15]

Для интерпретации дискриминантной функции для исследуемых групп и выбранных переменных, необходимо сначала проверить значимость исследуемых функций и использовать исключительно значимые функции. Потом, для любой значащей функции нужно проанализировать стандартизованные коэффициенты бета. Чем выше стандартный коэффициент бета, тем выше относительный собственный вклад переменной в дискриминацию, исполняемую соответствующей дискриминантной функцией. Для снижения вероятности ложной классификации исследуется матрица факторной структуры с корреляциями между дискриминирующей функцией и исследуемыми переменными. Таким образом, необходимо оценить средние для значимых дискриминирующих функций для того, чтобы определить, какие функции и между какими совокупностями проводят дискриминацию.

При обработке качественных переменных (формализованных данных микроскопии, логарифмов концентраций микроорганизмов) применение регрессионных методов невозможно. Для качественных переменных применяются нейросети.

Нейронные сети -метод математического моделирования, который воссоздаёт сложные нелинейные зависимости со скрытыми соотношениями исходных параметров. Нейронные сети нелинейны. Линейное моделирование имеет неоспоримое преимущество, так как для него разработано большое количество процедур оптимизации. Но в заданиях, где линейная аппроксимация не дает приемлимых результатов применяются нейронные сети, которые справляются с задачами с большим числом переменных. Нейронные сети базируются на модели нервных систем. Нейронные сети не программируются, а обучаются на примерах. Исследователь подыскивает презентабельные данные, а потом запускает алгоритм обучения нейронной сети, который создает структуру данных. Нейронные сети были предложены как система распознавания образов по алгоритмам обработки информации биологическими нервными системами, которые способны обучаться и исправлять ошибки, имитируя низкоуровневое строение мозга [175] .

Мозг состоит из значительного числа нейронов, объединенных множественными связями. Нейроны - это клетки, распространяющие электрохимические сигналы. Нейрон обладает разветвленной структурой ввода информации через дендриты, и разветвляющиеся аксоны, которые связываются с дендритами других клеток синапсами. При активации нейрон отправляет электрохимический сигнал по собственному аксону. Посредством синапсов данный сигнал доносится до прочих нейронов, которые могут активизироваться. Нейрон активизируется когда общий уровень сигналов, в его ядре превзойдет порог активации.

Мощность сигнала, получаемого нейроном, находится в зависимости от активности синапсов. Любой синапс обладает длиной, и химические вещества транслируют сигнал вдоль синапса.

Мозг способен решать очень сложные задачи, хотя он построен из огромного числа примитивных элементов. Определение искусственного нейрона предоставляется следующей последовательностью:

Нейрон принимает входные сигналы посредством определенного числа входных каналов. Входной сигнал протекает через соединение с определенной интенсивностью; эта интенсивность отвечает синаптической активности нейрона. Для любого нейрона есть установленное пороговое значение. Рассчитывается взвешенная сумма входов, из которой вычитается установленное пороговое значение, что даёт значение активации нейрона.

Сигнал активации с помощью функции активации пересчитывается и получается выходной сигнал нейрона.

У искусственной нейронной сети должны быть входы - принимающие значения переменных из моделируемой системы и выходы - параметры системы. Так же, в сети присутствуют скрытые нейроны, которые выполняют внутренние функции. Связанные между собой входные, промежуточные и выходные нейроны составляют сеть. Значения входных переменных присваиваются входным элементам и далее функции обрабатывают сигналы в нейронах скрытых и выходного слоев. Для каждого нейрона вычисляется порог активации, который рассчитывается из взвешенной суммы выходов нейронов предыдущего слоя и отнимая из нее пороговое значение. Функция активации преобразует значение активации, и получается выходной сигнал нейрона. Выходные значения элементов выходного слоя формируются после того, как вся сеть обработает, выходные значения.

Нейронная сеть применяется когда между входами и выходами неизвестен точный вид связей, который можно моделировать прямо. Зависимость между входом и выходом формируется в процессе обучения сети, что отличает данный вид моделирования от других способов моделирования.

Многослойный персептрон (MLP)

Эта архитектура сети используется сейчас наиболее часто. Она была предложена в работе Rumelhart, McClelland (1986) [183] и подробно обсуждается почти во всех учебниках по нейронным сетям [121]. Каждый элемент сети строит взвешенную сумму своих входов с поправкой в виде слагаемого и затем пропускает эту величину активации через передаточную функцию, и таким образом получается выходное значение этого элемента. Элементы организованы в послойную топологию с прямой передачей сигнала. Такую сеть легко можно

интерпретировать как модель вход-выход, в которой веса и пороговые значения (смещения) являются свободными параметрами модели. Такая сеть может моделировать функцию практически любой степени сложности, причем число слоев и число элементов в каждом слое определяют сложность функции. Определение числа промежуточных слоев и числа элементов в них является важным вопросом при конструировании MLP [7; 121].

Количество входных и выходных элементов определяется условиями задачи. В качестве начального приближения можно взять один промежуточный слой, а число элементов в нем положить равным полусумме числа входных и выходных элементов.

Обучение многослойного персептрона

Первым шагом обучения сети является определение числа слоев и элементов искусственной нейронной сети, а следующим шагом будет подбор весов нахождение порогов активации для минимизации ошибки прогноза сети. Реализация данных шагов с применением значений весов и порогов активации, которые корректируются для минимизации ошибки в алгоритме обучения сети. Процесс обучения сети это подгонка модели, к обучающим данным. Ошибка сети определяется путем многократных итераций всех наблюдений и сопоставления выходных значений с целевыми. Сумма всех ошибок выходных нейронов возводится в квадрат и принимается как функция ошибок искусственной нейронной сети. Эта величина представляется пользователю при работе с пакетом ST Neural Networks как среднеквадратичная ошибка (RMS). Широкое применение получил алгоритма обучения искусственной нейронной сети - алгоритм обратного распространения [175]. При реализации алгоритма обратного распространения рассчитывается направление кратчайшего спуска по градиенту поверхности ошибок. Каждая итерация, которая сопровождается снижением значения ошибки называется эпохой, На каждой эпохе меняются веса и вычисляется ошибка, при этом входные значения пропускаются заново. Если начальная архитектура сети подбирается случайно, то при достижении определенного количества эпох или заданного порога ошибки искусственная нейронная сеть считается завершенной.

Дискриминантный анализ и автоматический подбор нейронных сетей реализованы в пакете программ Statistica. Эти инструменты решают задачи экспертной оценки степени микробиологических нарушений, поиском связей между фагочувствительностью и микробным пейзажем, дают возможность распознавания инфекционного агента без идентификации возбудителя. Дискриминантный анализ, кроме задач классификации может давать количественную оценку эффективности воздействия на микробиоценоз антимикробными, пробиотическими препаратами, бактериофагами и т. д.

1.5. Влияние про-, пребиотиков, антибиотиков и бактериофагов на микробиоценоз, методы оценки и критерии

Для подбора коррекции дисбиотических нарушений используется большой спектр антибактериальных препаратов, пробиотиков, пребиотиков, биологически-активных добавок к пище, бактериофагов.

Антибактериальные препараты используются для лечения бактериальной инфекции или удаления условно-патогенной микрофлоры, например эрадикация *Helicobacter pylori*. Антибиотики вызывают дисбиотические расстройства, поэтому изменения микробиоценоза под действием различных групп антибиотиков изучаются постоянно. Антибактериальные препараты тестируются на способность к широте спектра действия. Предпочтения отдается препаратам, подавляющим рост целевого микроорганизма, не затрагивающим при этом другую микрофлору биотопа [99]. Кроме изменения численности микроорганизмов антибактериальные средства изменяют соотношения и количества метаболитов, а так же увеличивают количество антибиотикорезистентных штаммов условно-патогенной микрофлоры. Поэтому антибиотикотерапия сопровождается приёмом пробиотических и пребиотических препаратов, которые должны оказывать протективное действие на нормальную (типичную) микрофлору исследуемого биотопа [106].

Использование бактериофагов для коррекции микрофлоры является перспективным направлением, так как бактериофаги обладают высокой специфичностью. Бактериофаги присутствуют в микробиоценозе в норме и составляют большую долю вириобиома организма [198]. Научный интерес к системе вирусов, находящихся в нормальной микрофлоре человека возрос после секвенирования метагенома человека, где доля ДНК и РНК вирусных частиц оказалась значительной по встречаемости и биоразнообразию [142; 167; 178]. Дальнейшие исследования установили связь между наличием определенных бактериофагов и нормального функционирования иммунной системы [146; 163]. Бактериофагам приписывается роль регулятора численности микроорганизмов [119]. Бактериофаги действуют строго специфично на микроорганизм или группу микроорганизмов, при этом для размножения используют репаративный аппарат микроорганизма хозяина. Поэтому бактериофаги после удаления микроорганизмов прекращают размножение.

Различают вирулентные и умеренные бактериофаги (профаги). Инфицирование бактерии вирулентным бактериофагом приводит к заражению микроорганизма, размножению в нем бактериофага и разрушению микроорганизма хозяина. Заражение профагом не приводит к разрушению клетки микроорганизма хозяина. Профаг интегрируется в хромосому хозяина и реплицируется вместе с ней [157].

При введении бактериофагов они проникают в ЖКТ, при этом не воздействуют на нормальную микрофлору кишечника, так как нормальная микрофлора устойчива к действию бактериофагов [64].

Применение бактериофагов в кишечнике может быть менее эффективным, чем *in vitro*, в ротоглотке и прочих открытых полостях организма, так как в кишечнике бактерии окутаны слизью, и перемешаны с фекалиями. Так же сложность может представлять высокая степень биоразнообразия микрофлоры в этом биотопе, и фагочувствительная микрофлора, может быть замещена фагорезистентной микрофлорой [137]. Существуют другие сдерживающие факторы размножения умеренных бактериофагов. Доказано, что многие соединения, такие как гистидин, глутатион, эрготионин, цистеин индуцируют бактериофаги. Использование бактериофагов при коррекции дисбиотических нарушений может избирательно убирать целые группы бактерий, что не всегда способствует правильному распределению компонентов субстрата между компонентами микробиоценоза. Таким образом, перспективным является использование комплексных препаратов включающих в себя антибактериальный, фаговый, пробиотический и пребиотические компоненты в заданных пропорциях [99].

Положительный эффект пробиотиков отмечался И.И. Мечниковым [73] при введении живых культур молочнокислых бактерий как антогонистов гнилостных микробов. Лактобациллин, предложенный Мечниковым, представлял собой сквашенное культурами молочнокислого стрептококка и болгарской палочки, молоко.

Рассматривают следующие механизмы действия пробиотиков: приживание бактерий-симбионтов, содержащихся в пробиотическом препарате, к слизистой кишечника, биоактивностью их метаболитов и стимулированию иммунитета [11; 63; 134; 194].

Известно, что пробиотики имеют иммуностимулирующее действие. Живые нейтрофилы при реакции с жизнеспособными микробами промышленных штаммов *B. bifidum* 1, *L. plantarum* 8P-A3 и *E. coli* M-17 *in vitro* создают во внеклеточном пространстве внеклеточные ловушки, максимально воплощенные при взаимодействии с бифидобактериями [36].

Образраспознающие рецепторы: NOD-рецепторы, маннозо-лек-тиновые рецепторы и TLR распознают различные образы — лиганды, принадлежащие, микробам и вирусам, извещают об их появлении и организуют каскад реакций, которые обеспечивают к ядру иммунокомпетентной клетки передачу сигнала. Для передачи сигнала используются адапторная молекула MyD88 и транскрипционный фактор NF-kB, что приводит к образованию различных медиаторов, а именно: про- и противовоспалительных цитокинов, интерферонов, стимуляции регенерации и апоптозу. Консервативные плазматические белки, которые присутствуют во всех клетках человека, представляют транскрипционный фактор NF-kB. При стимуляции эти белки перебрасываются в ядро, где соединяются с промоторными участками

многих генов. Гены, отвечающие за синтез интерлейкинов, факторов некроза опухоли, а также адгезивных молекул межклеточного взаимодействия служат мишенями, NO-синтазы, циклооксигеназы-2, р-дефенсины, молекул главного комплекса гистосовместимости и регуляторов апоптоза [96; 154; 165]. Происходит реакция с протеином MyD88, который отвечает за разделение миелоидов. TLR-рецепторы через домен TIR активируют MyD88, который служит рецептором интерлейкина 1. Затем распространение сигнала выполняется посредством протеинкиназы IRAK, группированной с IL-1R, и посредством фактора TRAF6, связанного с рецептором TNF- α , активирует фактор NF- κ B, а так же MAP-киназы, что приводит к преобразованиям разных биологически активных веществ. Индигенная микрофлора кишечника непрерывно ведет взаимодействие с TLR и осуществляет множество функций в организме человека. Благодаря активному взаимодействию лигандов индигенной микрофлоры TLR имеют возможность участвовать в защите микробиоценоза от инфекции и поддержании тканевого гомеостаза.

Пробиотическое влияние отдельных штаммов обуславливается присутствием в структуре таких ДНК, олигонуклеотидов стимулирующих иммунитет. В научной работе [153]. по результатам исследования девяти штаммов *Lactobacillus* и шести штаммов *Streptococcus thermophilus* установлено, что иммуностимулирующую активность имела лишь ДНК из штамма *L. bulgaricus* NIAI B6, включающая CpG-подобный олигонуклеотид. Повышенная иммуностимулирующая активность обнаружена у фрагмента ДНК штамма *L. gasseri* 2716, содержащий AT-олигодезоксинуклеотиды с 6-основной самостабилизирующейся петлей. Набор оснований ДНК с иммуностимулирующей активностью выявлена у *Bifidobacterium longum* BB536. Его ДНК останавливало создание IgE В-клетками. Таким образом, объясняется механизм противоаллергического влияния бактерий *B. longum* BB536 [153]. Липотейхоевые углекислоты из штаммов *Lactobacillus johnsonii* La1 и *Lactobacillus acidophilus* La10 сдерживали ответ клеток кишечника HT29 на эндотоксин грамотрицательных микробов [194].

По определению пребиотики – это препараты, корректирующие индигенную микрофлору через создание подходящих условий для жизнедеятельности. Пребиотики организуют субстратное конкурентное преимущество определенным группам микроорганизмов. Подавление роста условно-патогенных микробов из микробиоценоза кишечника, способствует подавлению передачи факторов вирулентности в популяции условно-патогенных микробов.

К пребиотикам причисляют разные фруктоолигосахариды, инулин, лактулозу, лизоцим и т.д. Дополнение пищевого рациона увеличивает концентрацию ЛЖК, и масляной кислоты в частности. Пребиотики, которые состоят из неперевариваемых в кишечнике ингредиентов разнообразного происхождения, оказывающие положительный эффект на организм через

избирательную стимуляцию роста нормальной микрофлоры кишечника. Применение метода субстратного выкармливания индигенной микрофлоры помогает улучшить состояние кишечного микробиоценоза. Рост концентраций ЛЖК и улучшение клинической картины происходит за счёт избирательной стимуляции собственной микрофлоры кишечника, которая имеет наибольшую комплиментарность к рецепторам слизистой данного индивидуума.

Пищевые волокна не перевариваются эндогенными секретами верхних отделов ЖКТ и доходят до толстого кишечника практически в неизменном виде, далее они метаболизируются анаэробной микрофлорой до летучих жирных кислот (ЛЖК). ЛЖК (уксусная, пропионовая и масляная кислоты) представляются ключевыми энергетическими субстратами для питания эпителия толстой кишки, который участвует в стимуляции пролиферации клеток и трофику слизистой. Экструдированные пищевые волокна образуют лишнюю поверхность, на которой укрепляются собственные бактерии, что ведет к значительному повышению их количества и росту метаболической активности. Пищевые волокна так же обладают элиминационным эффектом в отношении болезнетворных бактерий и их токсинов.

В практическом здравоохранении на сегодняшний день для коррекции дисбиоза среди всего спектра, представленных выше препаратов, лидерство утвердилось за применением пробиотиков [98]. Конструирование пробиотических препаратов остается актуальной задачей, цель которой оптимизация рецептур путем комбинации штаммов, для максимального эффекта пробиотического препарата.

Правила оптимального конструирования микробных препаратов [98] включают критерии антагонистической активности, умеренного кислотообразования, учёт адгезивности, природного синергизма [50; 81]. Кроме того, несомненно важными, можно признать:

- конкретные органолептические особенности продукта;
- регулируемость коэффициента кислотности в пределах 60-100 °Т;
- концентрация живых клеток в объёме продукта и время сквашивания молока;
- биохимические особенности штаммов (брожение углеводов, протеолитическая, лизоцимная активность, диаминооксидазная активность);
- конкретная антагонистическая активность лактобацилл к болезнетворным штаммам с различной антибиотикорезистентностью; [81].

Рассматривая, описанный выше механизм молекулярно-клеточного иммуномодулирующего действия пробиотиков, можно отметить, что значительную роль играют живые бактериальные клетки, их метаболиты, антигенные сложные комплексы, определяющие сигнальные пути после прекращения лиганд-рецепторного контакта с дендритными, эпителиальными и другими иммунокомпетентными клетками. Таким образом,

продукция ЛЖК консорциумом пробиотических микроорганизмов является важным параметром оптимизации состава.

При совместном культивировании лактобактерий двух различных видов, увеличивается биоразнообразие и устойчивость системы с усилением, ослаблением или усреднением значений исследуемых параметров. Как следует из литературы [50] эффективность консорциума можно оценивать по кислотности продукта. Изменяемым параметром является соотношение микроорганизмов. Важным параметром является структурный индекс или доля уксусной кислоты, производимой консорциумом, так как увеличение доли уксусной кислоты приводит к ускорению метаболизма субстрата и к ослаблению способности консорциума к производству органических кислот с более длинной цепью.

1.6. Заключение

Накопленный материал по дисбиотическим нарушениям различных биотопов организма, который представлен в литературном обзоре, дает основание заключить тезис о важности и актуальности исследований нарушения микробиоценозов с новых позиций многомерной биологии и медицины. Недооцененность информационного потенциала столь масштабного органа, как микробиоценоз человека - очевидна. Прежде всего, требуется оценка доступности и информативности показателей в зависимости от локализации микробиоценоза в организме. Необходимо более широкое применение средств многомерной статистики и систем классификации на основании методик по распознаванию образов, которые получили широкое распространение во многих областях медицины, биологии и других сферах деятельности. Оценка дисбиотических нарушений может рассматриваться как индикатор реактивности суперорганизма макроорганизм – микробиота, что автоматически требует новых подходов к оценке, диагностике и лечению. Благодаря определению зависимости между этиологией заболеваний и особенностями дисбиотических нарушений выраженные в конкретных дискриминантных функциях или нейросетевых программах, есть возможность ранней диагностики с возможным прогнозом и выбора необходимых средств профилактики. Таким образом, реализуется принцип медицины XXI века – превентивной, профилактической и персонализированной.

Результаты собственных исследований

Глава 2 Комплексный микробиологический и метаболитный паспорт здорового человека.

Цель составления комплексного микробиологического и метаболитного паспорта здорового человека состоит в определении значимых критериев состояния микробиоценозов различных биотопов и их референсных значений. В связи с тем, что микробиоценозы различных биотопов выполняют неодинаковые функции, и способы получения информации о них различны, мы определим набор критериев по ряду показателей характеризующих функцию исследуемых биотопов.

Микробиоценоз ротоглотки выполняет барьерную функцию, есть возможность определения содержания микроорганизмов непосредственно на слизистой, а так же определения резистентности к антимикробным препаратам и бактериофагам. Метаболические свойства микробиоценоза можно исследовать путем определения продуктов жизнедеятельности микроорганизмов — концентраций летучих жирных кислот в слюне. С помощью методов математического моделирования определим критерии оценки микробиоценозов и их количественное выражение. Полученные критерии, используем в дальнейшем для интегральной оценки изменений микробиоценоза ротоглотки и сопоставим их с изменениями в микробиоценозе, связанными с влиянием респираторных, кишечных и онкологических заболеваний с помощью средств математического моделирования.

Микробиоценоз кишечника выполняет функции связанные с микробным пищеварением, защитой организма от бактерий, вирусов и токсинов, а так же функцией обеспечения организма теплом и субстратами. Определение содержания микроорганизмов и вирусов микробиоценоза кишечника затруднено, так как строение кишечника не предполагает прямого доступа к слизистой. Микрофлора кала отличается от микрофлоры кишечника, хотя по исследованиям ряда авторов, кал содержит ДНК всех микроорганизмов кишечника. Микроорганизмы, которые выделяются из кала сложно культивируются и в большинство из них не сохраняют жизнеспособность. Поэтому количество и соотношение микроорганизмов в кале существенно отличается от количества и соотношения микроорганизмов в кишечнике. Принимая это во внимание, информация бактериологического анализа кала рассматривается как косвенное исследование микрофлоры кишечника. Определена градация критериев состояния микробиоценоза по степени микробиологических нарушений, суть которой сводится к степени дисбаланса между микрофлорой типичной для кала (нормофлорой) и нетипичной (условно-патогенной). Однако, критерии определения степени микробиологических нарушений не имеют однозначного толкования, поэтому требуют интерпретации специалистом, что вносит элемент

субъективности. Используем искусственную нейронную сеть на данных бактериологического анализа кала для моделирования состояния микробиоценоза кишечника по степеням микробиологических нарушений.

Важной характеристикой микробиоценоза является его метаболическая активность. Из всего спектра химических соединений, образующихся в результате сбраживания субстрата, мы выбрали для характеристики низкомолекулярные монокарбоновые кислоты. Содержание летучих жирных кислот в кале ниже, чем в кишечнике, так как большое количество уксусной и пропионовой кислот всасывается в кровь, а масляная кислота утилизируется эпителием. Поэтому концентрации летучих жирных кислот в кале имеют большой разброс значений и сильно зависят от индивидуальных особенностей человека, характера питания и других факторов не связанных с дисбиотическими нарушениями. Для характеристики микробиоценоза кишечника используются концентрация масляной кислоты, суммарная концентрация кислот, отношение суммы кислот анаэробной микрофлоры к уксусной кислоте (структурный индекс) и отношение суммы изоформ к линейным формам масляной, валериановой и капроновой кислот (индекс изокилот). Важным является соотношение концентраций уксусной, пропионовой и масляной кислот.

Чтобы характеризовать микробиоценоз здорового человека необходимо отобрать пациентов без нарушений ферментного пищеварения, так как избыток неперваренных субстратов будет влиять на состав микрофлоры и метаболическую активность. Оценка ферментного пищеварения проводилась при помощи копрологического анализа. Для определения копрологических синдромов использовали формализацию полуколичественных данных с дальнейшим определением копрологического синдрома по логическим алгоритмам.

Для подбора пациентов с целью составления комплексного микробиологического и метаболитного паспорта из 3175 пациентов консультационно-диагностического центра при МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского, выполнявших комплексный анализ микрофлоры кишечника, было отобраны пациенты с нормальным копрологическим синдромом и отсутствием микробиологических нарушений согласно ОСТ «Протокол ведения больных с дисбактериозом». Возраст пациентов ограничивался от 4 до 80 лет.

Для составления паспорта было решено исследовать следующие показатели:

- Встречаемость параметров лабораторной диагностики кала, таких как микроскопия, макроскопия, биохимические исследования.
- Встречаемость условно-патогенных микроорганизмов, выделенных из кала на агаризованных жидких питательных средах и встречаемость их ассоциации;
- Концентрации летучих жирных кислот и их производные;

- Встречаемость условно-патогенных микроорганизмов чувствительных к бактериофагам и коктейлям бактериофагов;

2.1. Нормальные значения показателей ферментативного пищеварения для здорового человека.

Как известно из литературы [99] значительное влияние на состав просветной микрофлоры толстой кишки имеет субстрат, поступающий из верхних отделов ЖКТ. В свою очередь, изменения состава субстрата зависят от пищевых предпочтений человека и нарушений в работе органов, обеспечивающих переваривание поступающих субстратов. Методы лабораторной диагностики кала, позволяющие выявить нарушения деятельности органов пищеварения, объединены в копрологическое исследование, по результатам которых (копрограмма) определяется копрологический синдром. В состав копрологического исследования кала входят признаки с полуколичественным значением, а определение копрологического синдрома происходит по логическому сочетанию этих параметров. Для автоматизированной обработки данных копрологии и определению копрологических синдромов была выполнена формализация полуколичественных признаков (таблица 4) и разработаны алгоритмы для определения копрологических синдромов.

Копрологический анализ позволяет определить копрологические синдромы по типам: норма; ахилия; ахолия; энтеральный синдром; бродильная диспепсия; гнилостная диспепсия; замедленная эвакуация; колит. Так же при помощи копрологии можно определить нарушение, которое приводит к избыточному содержанию белков - креаторея, жиров - стеаторея и углеводов - амилорея. Значения копрологических показателей, в результате формализации показателей представлены в таблице 4.

По известным признакам копрологических показателей [79] были определены копрологические синдромы. Алгоритмы определения копрологических синдромов представлены на рисунках (рисунки 1-6) Для чтения алгоритмов представленных на рисунках (Рисунок 1-6) необходимо использовать таблицу формализованных признаков (таблица 4). В условиях алгоритмов признаки обозначены двойной цифрой разделенной точкой. Первая часть цифры – это признак (номер строки в таблице 4), а вторая часть значение признака (номер столбца в таблице 4).

Таблица 4 - Формализация показателей копрологического анализа.

№	Параметр	Значения								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	Масса	0 - 2 г.	2 - 50 г.	50 - 100 г.	100 - 250 г.	250 - 500 г.				
2	Консистенция	плотная	кашицеобразная	мягкая	твердая	жидкая	мазевидная	пенистая	вязкая	---
3	Форма	цилиндрическая	неоформленная	лентообразная	"Овечий кал"	ссохшихся комочков	---	---	---	---
4	Цвет	коричневый	желтый	темно-коричневый	светло-коричневый	желто-зеленый	зеленоватый			
5	Запах	Отсутствует	без особенностей	резкий зловонный	кислый	гнилостный	"Прогорклое масло"	"сырости"	---	---
6	Слизь	Отсутствует	в норме, покрывает каловый столбик	в виде стекловидно-прозрачных масс	смешана с каловым детритом	в виде плотных тяжей	в виде тонких комочков	---	---	---
7	Жир	Отсутствует	есть	---	---	---	---	---	---	---
8	Кровь	Отсутствует	в виде прожилок	алая	смешана с калом (мелена)	---	---	---	---	---
9	Остатки непереваренной пищи	Отсутствует	в допустимом кол-ве	в большом кол-ве		---	---	---	---	---
10	Мышечные волокна непереваренные	Отсутствует	единичные, разрозненные	единичные скопления	разрозненные во всех п/зрения	скопления во всех п/зрения	---	---	---	---
11	Мышечные волокна полупереваренные	Отсутствует	единичные в п/зрения	умеренное кол-во	в большом кол-ве	---	---	---	---	---
12	Мышечные волокна переваренные	Отсутствует	единичные в п/зрения	умеренное кол-во	в большом кол-ве	---	---	---	---	---
13	Соединительная ткань	Отсутствует	скудное кол-во	умеренное кол-во	---	---	---	---	---	---
14	Растительная клетчатка непереваримая	Отсутствует	есть	---	---	---	---	---	---	---

Продолжение таблицы 4 - Формализация показателей копрологического анализа.

№	Параметр	Значения								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
15	Растительная клетчатка переваримая	Отсутствует	единичные клетки в п/зрения	умеренное кол-во	в большом кол-ве	пласты	---	---	---	---
16	Крахмал внеклеточный	Отсутствует	единичные непереваренные зерна в п/зрения	единичные полупереваренные зерна в п/зрения	непереваренный в умеренном кол-ве	полупереваренный в умеренном кол-ве	непереваренный в большом кол-ве	полупереваренный в большом кол-ве	---	---
17	Крахмал внутриклеточный	Отсутствует	единичные непереваренные зерна в п/зрения	единичные полупереваренные зерна в п/зрения	непереваренный в умеренном кол-ве	полупереваренный в умеренном кол-ве	непереваренный в большом кол-ве	полупереваренный в большом кол-ве	---	---
18	Иодофильная флора нормальная	Отсутствует	единичные скопления в п/зрения	в умеренном кол-ве	в большом кол-ве	---	---	---	---	---
19	Иодофильная флора патогенная	Отсутствует	единичные микроорганизмы в п/зрения	в умеренном кол-ве	в большом кол-ве	---	---	---	---	---
20	Дрожжевые грибы	Отсутствует	единичные споры в п/зрения	в умеренном кол-ве	в большом кол-ве	споры и псевдомицелий	---	---	---	---
21	Слизь	Отсутствует	есть	---	---	---	---	---	---	---
22	Лейкоциты	Отсутствует	0 - 1	1 - 2	3 - 5	5 - 8	8 - 10	10 - 15	Все поля зрения	---
23	Эритроциты	Отсутствует	0 - 1	1 - 2	3 - 5	5 - 8	8 - 10	10 - 15	Все поля зрения	---
24	Жир нейтральный	Отсутствует	единичные капли	в умеренном кол-ве	в большом кол-ве	---	---	---	---	---
25	Жирные кислоты	Отсутствует	в скудном кол-ве	в умеренном кол-ве	в большом кол-ве	---	---	---	---	---
26	Соли жирных кислот	Отсутствует	в скудном кол-ве	в умеренном кол-ве	в большом кол-ве	---	---	---	---	---
27	Кристаллы Шарко-Лейдена	Отсутствует	есть	---	---	---	---	---	---	---
28	Кристаллы Оксалаты	Отсутствует	скудное кол-во	в умеренном кол-ве	в большом кол-ве	---	---	---	---	---

Продолжение таблицы 4 - Формализация показателей копрологического анализа.

№	Параметр	Значения								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
29	Кристаллы Фосфаты	Отсутствует	скудное кол-во	в умеренном кол-ве	в большом кол-ве	---	---	---	---	---
30	Эпителий	Отсутствует	0 - 1	1 - 2	3 - 5	5 - 8	8 - 10	10 - 15	Все поля зрения	---
31	Яйца глист	Отсутствует	подозрение	---	---	---	---	---	---	---
32	цисты простейших	Отсутствует	подозрение	---	---	---	---	---	---	---
33	Стеркобилин	отрицательная	слабо-положительная	положительная	резко-положительная	---	---	---	---	---
34	Билирубин	отрицательная	слабо-положительная	положительная	резко-положительная	---	---	---	---	---
35	Скрытая кровь, реакция	отрицательная	слабо-положительная	положительная	резко-положительная	---	---	---	---	---
36	Реакция (рН)	5	5,5	6	6,5	7	7,5	8	8,5	9
37	Воспалительный белок	0	0,3	1	5					

Алгоритм определения копросиндромов и нарушений ферментативного пищеварения копрологическим методом представлены на рисунках 1 - 6:

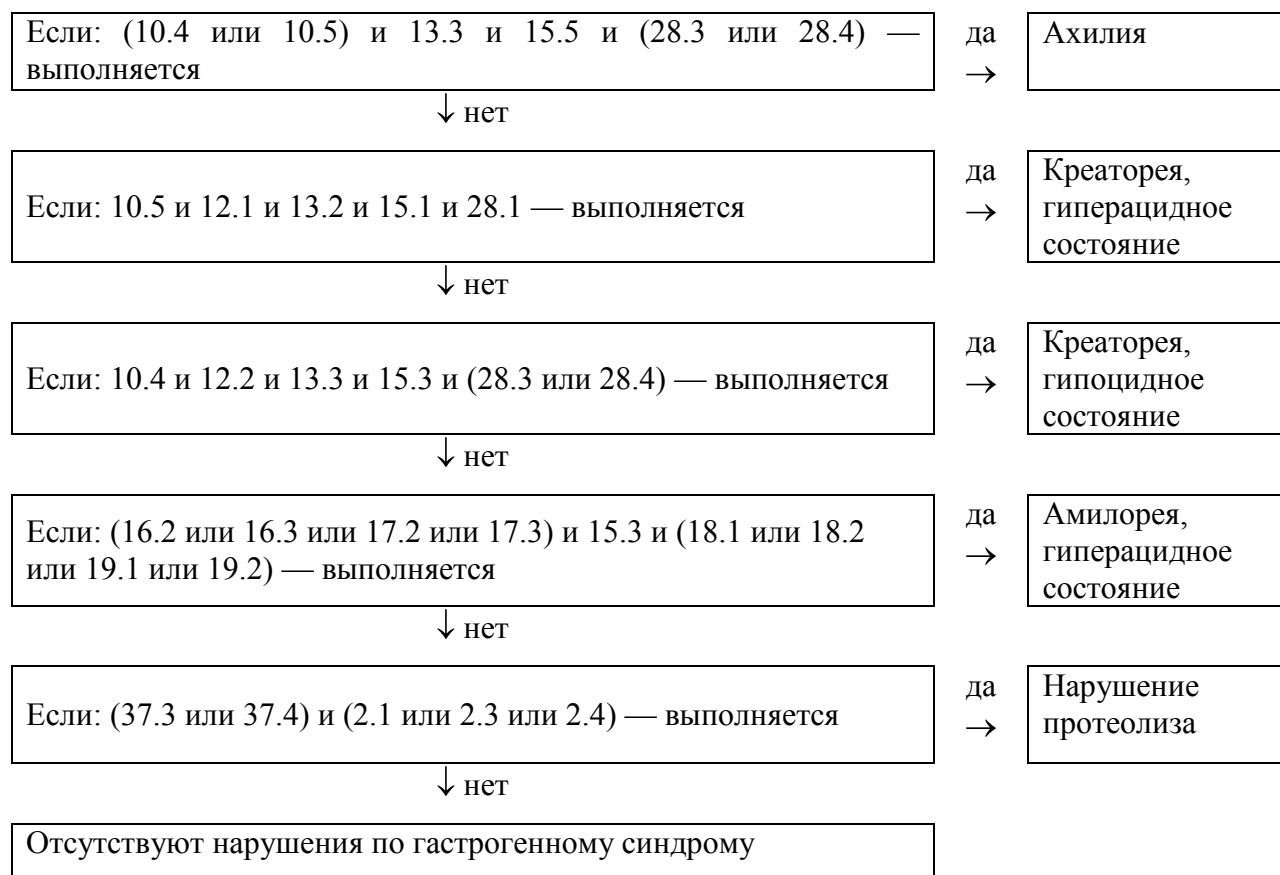


Рисунок 1 - Алгоритм определения копрологического синдрома гастрогенный синдром.

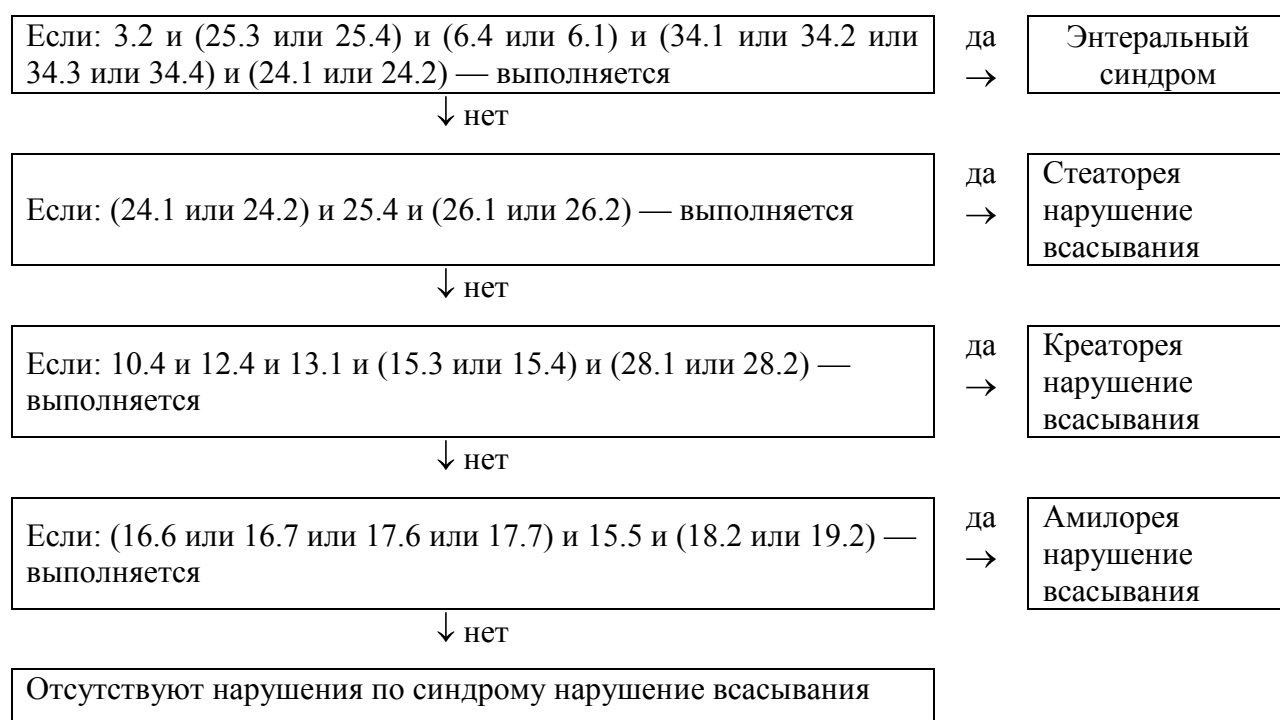


Рисунок 2 - Алгоритм определения копрологического синдрома нарушение всасывания.

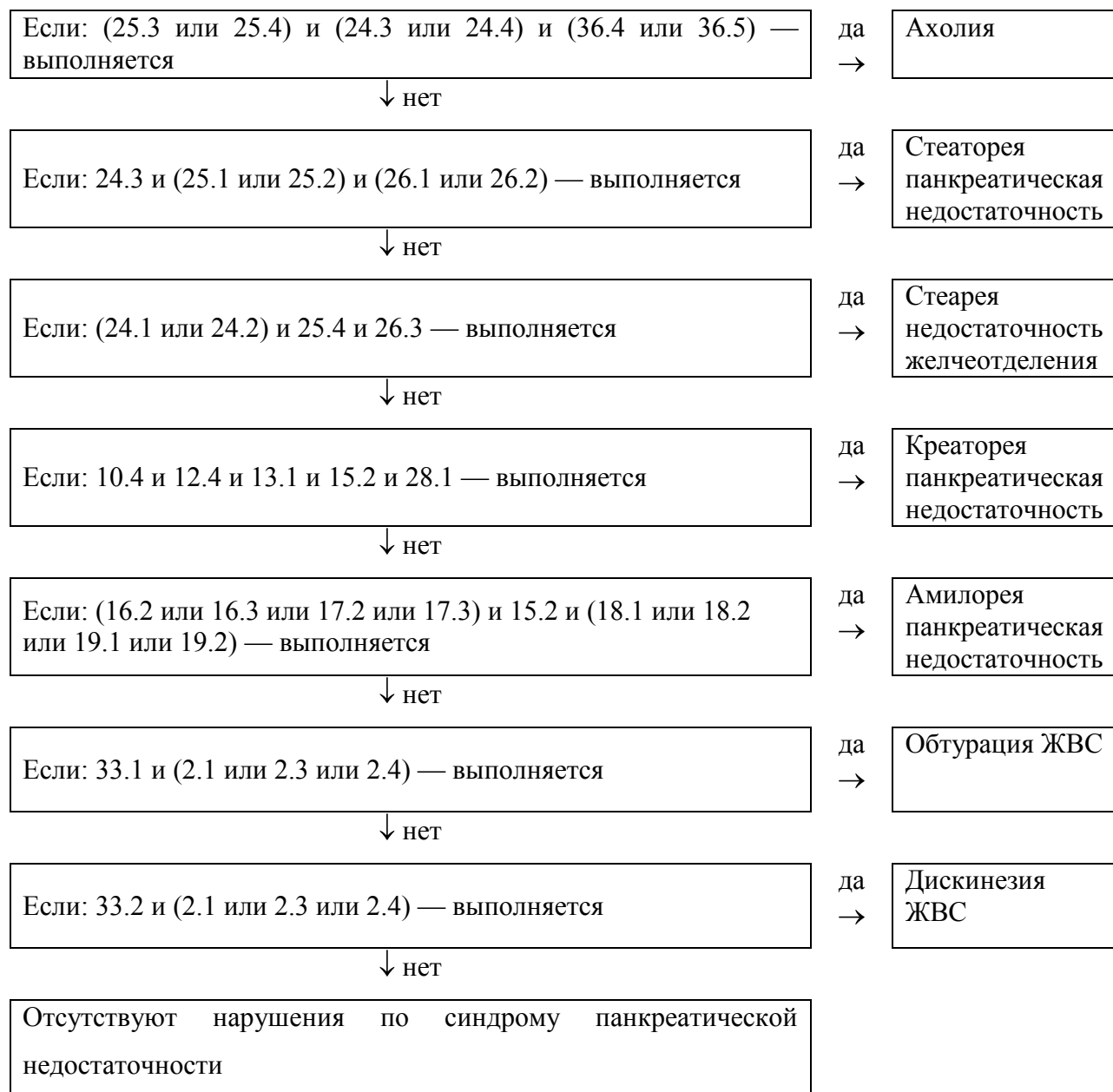


Рисунок 3 - Алгоритм определения копрологического синдрома панкреатической недостаточности.

Алгоритмы определения копрологических синдромов были реализованы в программе Microsoft Excel. Тестирование правильности получаемых данных было проведено с участием врачей, ведущих амбулаторный прием населения в консультативно-диагностическом центре при МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского. Результат использования алгоритмов определения копрологических синдромов показал 98,7% совпадений положительных ответов и отсутствие ложных синдромов при отсутствии синдромов, определенных по результатам других инструментальных исследований.

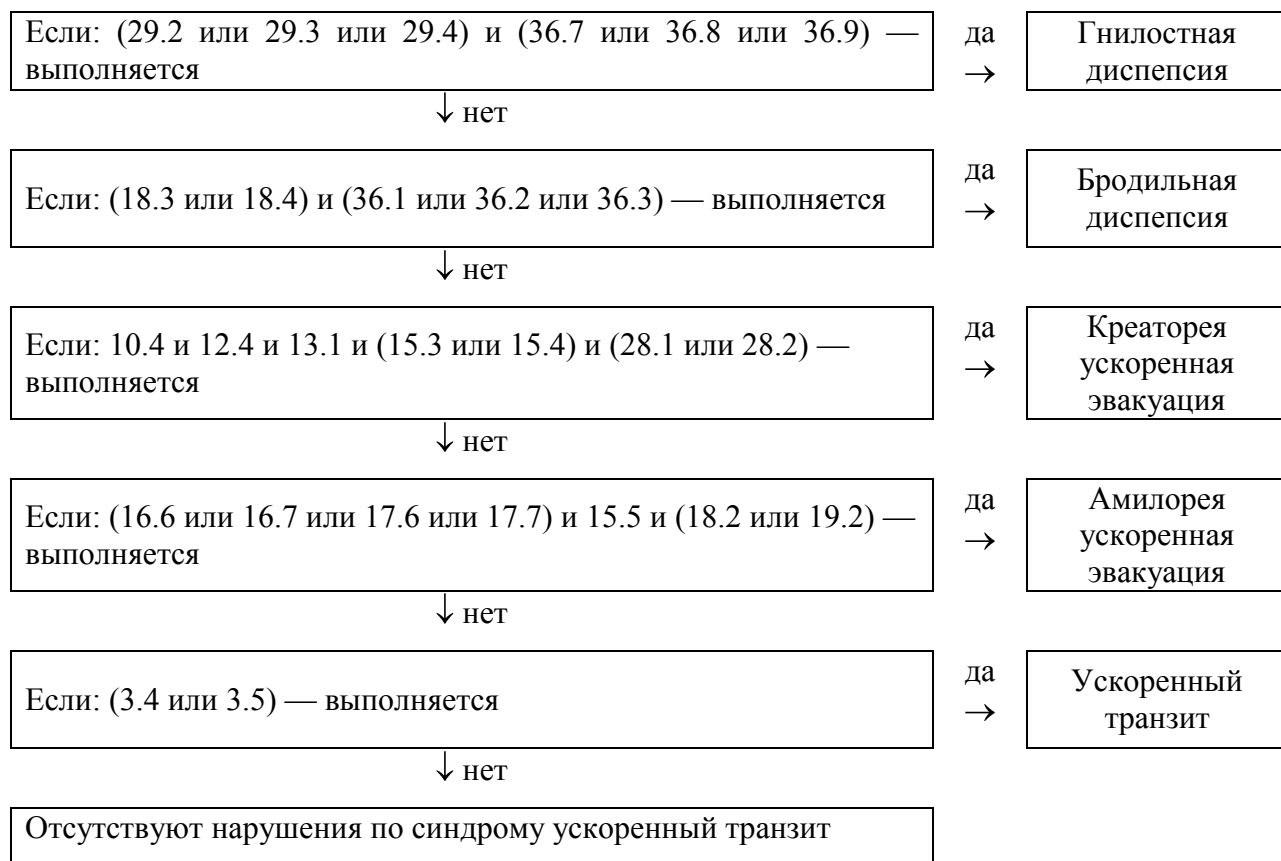


Рисунок 4 - Алгоритм определения копрологического синдрома ускоренный транзит.

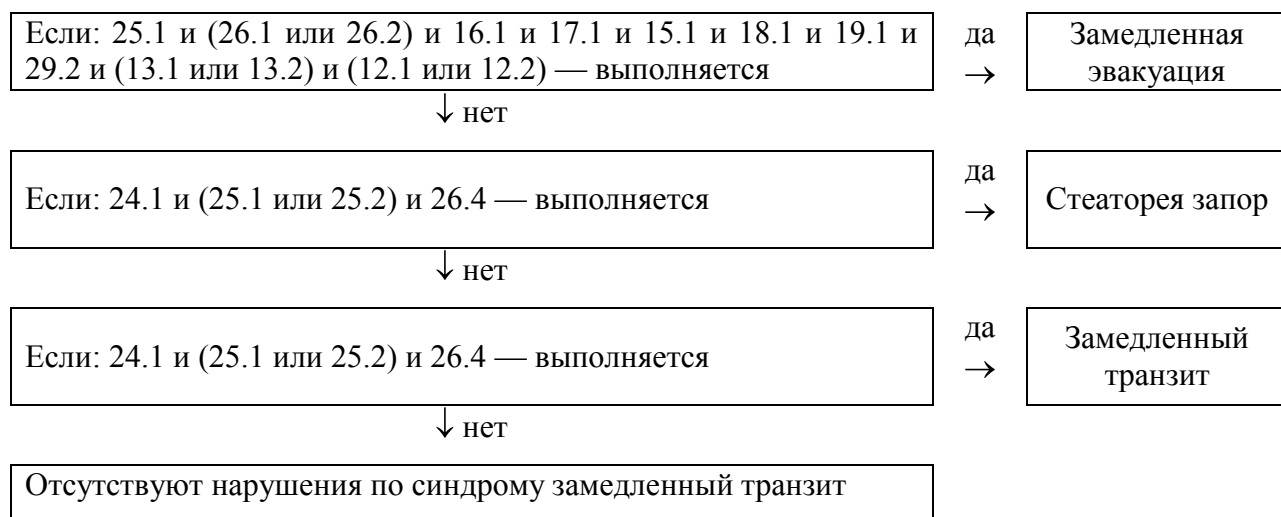


Рисунок 5 - Алгоритм определения копрологического синдрома замедленный транзит.

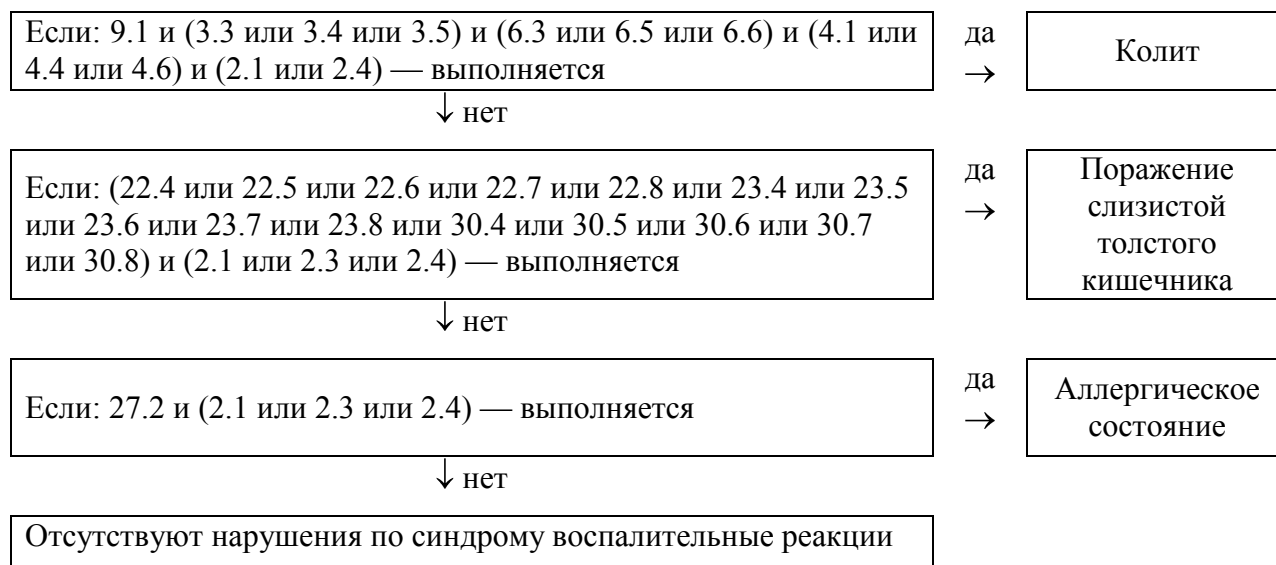


Рисунок 6 - Алгоритм определения копрологического синдрома воспалительные реакции.

Для оценки устойчивости показателей копрологического анализа в зависимости от возраста пациентов проведем сравнение встречаемости копрологических показателей с различными значениями в группе с нормальным копрологическим синдромом (Приложение 1). Результаты копрологических анализов ранжировали по возрасту пациентов и разделили на равные группы по 10 человек. В таблицах (таблицы 5-6) представлены значения частот встречаемости в подгруппах. Значение возраста определено как среднеарифметическое в подгруппе.

Таблица 5 - Встречаемость показателей копрограмм здоровых людей (Макроскопия)

Параметр	Возраст, лет					
	10,3	23,2	28,4	32,7	40,8	57,0
Консистенция						
Плотная	44%	30%	11%	40%	25%	33%
Мягкая	56%	70%	89%	60%	75%	67%
Форма						
Цилиндрическая	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Цвет						
Коричневый	67%	70%	67%	100%	50%	56%
Темно-коричневый	33%	30%	33%	0%	38%	33%
Светло-коричневый	0%	0%	0%	0%	13%	11%
Запах						
Нет	0%	0%	11%	0%	0%	0%
Без особенностей	0%	20%	0%	10%	13%	22%
Слизь						
Отсутствует	0%	10%	11%	30%	13%	22%
В норме, покрывает каловый столбик	100%	90%	89%	70%	88%	78%

Таблица 5 Встречаемость показателей копрограмм здоровых людей (Макроскопия)
(Продолжение)

Параметр	Возраст, лет					
	10,3	23,2	28,4	32,7	40,8	57,0
Жир						
Отсутствует	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Кровь						
Отсутствует	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Остатки непереваренной пищи						
Отсутствуют	22%	0%	22%	30%	13%	11%
В допустимом кол-ве	78%	100%	78%	70%	75%	89%
В большом кол-ве	0%	0%	0%	0%	13%	0%

Таблица 6 - Встречаемость показателей копрограмм здоровых людей (Микроскопия)

Параметр	Возраст, лет					
	10,3	23,2	28,4	32,7	40,8	57,0
Мышечные волокна непереваренные						
Отсутствует	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Мышечные волокна полупереваренные						
Отсутствует	33%	70%	78%	50%	25%	56%
Единичные волокна в поле зрения	67%	30%	22%	50%	75%	44%
Мышечные волокна переваренные						
Отсутствует	11%	40%	56%	30%	13%	44%
Единичные волокна в поле зрения	89%	60%	44%	70%	88%	56%
Соединительная ткань						
Отсутствует	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Растительная клетчатка непереваримая						
Есть	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Растительная клетчатка переваримая						
Отсутствует	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Крахмал внеклеточный						
Отсутствует	100%	90%	100%	100%	100%	100%
Единичные в поле зрения	0%	10%	0%	0%	0%	0%
Крахмал внутриклеточный						
Отсутствует	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Иодофильная флора нормальная						
Отсутствует	56%	80%	33%	40%	75%	78%
Единичные в поле зрения	44%	20%	67%	60%	25%	22%
Иодофильная флора патогенная						
Отсутствует	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Дрожжевые грибы						
Отсутствует	100%	100%	100%	100%	100%	100%

**Таблица 6- Встречаемость показателей копрограмм здоровых людей (Микроскопия)
(продолжение)**

Параметр	Возраст, лет					
	10,3	23,2	28,4	32,7	40,8	57,0
Слизь						
Отсутствует	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Лейкоциты						
Отсутствует	0%	20%	0%	0%	0%	0%
0 – 1	44%	50%	67%	30%	13%	22%
1 – 2	56%	30%	33%	70%	88%	78%
Эритроциты						
Отсутствует	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Жир нейтральный						
Отсутствует	44%	60%	56%	60%	38%	33%
единичные капли	56%	40%	44%	40%	63%	67%
Жирные кислоты						
Отсутствует	78%	60%	44%	60%	50%	67%
в скудном кол-ве	22%	40%	56%	40%	50%	33%
Соли жирных кислот						
Отсутствует	0%	10%	0%	10%	0%	0%
в скудном кол-ве	100%	90%	100%	90%	100%	100%
Кристаллы Шарко-Лейдена						
Отсутствует	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Кристаллы Оксалаты						
Отсутствует	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Кристаллы Фосфаты						
Отсутствует	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Эпителий						
Отсутствует	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Яйца глист						
Отсутствует	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Цисты простейших						
Отсутствует	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Стеркобилин						
Положительная	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Билирубин						
Отрицательная реакция	100%	100%	100%	100%	100%	100%

Из таблиц 5 и 6 видно, что показатели встречаемости анализов для всех значений копрологических показателей не имеют достоверных отличий в зависимости от возраста. Вследствие этого не требуется разделение группы в возрасте от 4 до 90 лет на подгруппы.

2.2. Нормальные значения показателей состава и концентраций микроорганизмов кала для здорового человека.

С целью создания микробиологического и метаболического паспорта здорового человека необходимо определить состав микрофлоры кала и определить алгоритм его оценки. Известны, состав и количество микрофлоры, для нормального микробиоценоза кишечника [90]. Заданные в ОСТе (приложение 2) показатели микрофлоры встречаются у большинства пациентов с нормальным микробиоценозом, но есть представители условно-патогенной микрофлоры, которые так же могут встречаться в кале здорового человека. Границы различных степеней микробиологических нарушений заданы с определенными допущениями, которые приводят к неоднозначности их интерпритации. Для успешного решения задачи определения степенем микробиологических нарушений микрофлоры кишечника по бактериологическому анализу кала необходимо применить метод математического моделирования, так как численность микроорганизмов по данным последних исследований составляет более 3500 видов а в кале определяется не более 20 ти видов. С позиции математического моделирования количество данных о системе микробиоценоза очень ограничено и не имеет простой прапорциональной зависимости, поэтому для решения данной задачи был выбран метод построения искусственных нейронных сетей. Для отбора пациентов с микробиоценозами кишечника с различными степенями микробиологических нарушений экспертами микробиологами были проанализированы результаты бактериологических анализов кала выборки из 3175 анализов по критериям заложенным в отраслевом стандарте (приложение 3, приказ Минздрава РФ №231 от 9 июля 2003 г. [90]).

В результате работы экспертов по определению степени микробиологических нарушений микрофлоры кишечника в группы были отобраны результаты анализов: Норма – 1623; 1 степень микробиологических нарушений – 570; 2-я степень микробиологических нарушений – 206; 3-я степень микробиологических нарушений не была определена ни в одном из представленных результатов анализов.

Для формирования группы пациентов с 3-ей степенью микробиологических нарушений были выбраны пациенты с изменениями в микробиоценозах связанные с кардинальным изменением характера питания. Группа из 21 пациента с частичным энтеральным питанием была найдена в отделении реанимации и интенсивной терапии НИИ нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко Росздрава. Микробиологические показатели бактериологического анализа кала соответствовали описанию 3-ей степени микробиологических нарушений.

Тестовая и обучающая выборка для искусственной нейронной сети формировались из одной базы данных 3050 пациентов, из которых 2440 пациентов (80%) было выбрано случайным образом для обучающей выборки и 610 пациентов (20%) для контрольной выборки.

В результате обработки данных пакетом Automate Neural Networks программы Statistica была создана, обучена и протестирована искусственная нейронная сеть (ИНС) с многослойным персептроном (MPL93-14-4) с 14 входными нейронами, 93-мя скрытыми и 4 выходными. При обучении контролировали величины ошибки по лифтовым картам и сравнивали производительности (корректной классификации объектов) предлагаемых архитектур нейросетевых алгоритмов. ИНС MPL93-14-4 показала максимальную производительность для обучающей (99,9%) и тестовой выборки (97,4%). Классификация объектов (результатов бактериологического анализа микрофлоры кишечника) представлена в таблице 7

Таблица 7 - Классификация объектов по группам искусственной нейронной сетью MPL93-14-4

Группы	1 степень (Gr-1)	2 степень (Gr-2)	3 степень (Gr-3)	Норма (Gr-5)
Корректно	515	204	21	1617
Не корректно	55	2	0	6
Корректно (%)	90,351	99,024	100	99,63
Не корректно (%)	9,649	0,976	0	0,37
Всего	570	206	21	1623

Распределение корректно и некорректно классифицированных объектов по группам представлено в классификационной матрице (таблица 8).

Таблица 8 - Матрица классификации объектов по группам искусственной нейронной сетью MPL93-14-4

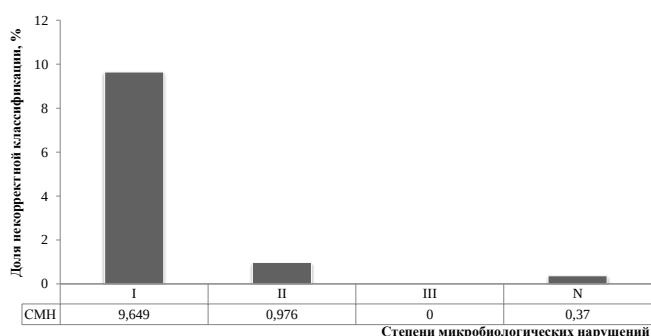
Результаты выходного нейрона	Доля объектов с заданной классификацией, определённой ИНС MPL 93-14-4, %			
	1 степень (Gr-1)	2 степень (Gr-2)	3 степень (Gr-3)	Норма (Gr-5)
1.MLP 93-14-4-1	98,47	0,38	0,00	1,15
1.MLP 93-14-4-2	5,08	94,92	0,00	0,00
1.MLP 93-14-4-3	0,00	0,00	100,00	0,00
1.MLP 93-14-4-5	2,59	0,00	0,00	97,41

Рассмотрим гистограмму распределения ложной классификации объектов.

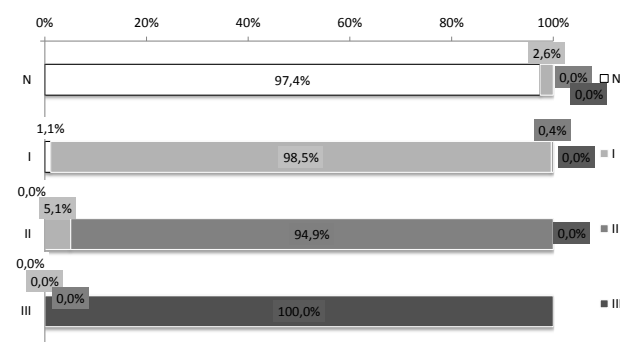
Из графиков (рисунок 7а, б) видно, что выявлена наименьшая вероятность ложной классификации между пациентами из группы «норма» и пациентами со 2-й степенью микробиологических нарушений, что коррелирует с количественным соотношением микроорганизмов в исследуемых группах.

Высокая достоверность распределения анализов искусственной нейронной сетью по группам в тестовой и обучающей выборке подтверждает наличие соотношений концентраций микроорганизмов, характерных для определенной степени микробиологических нарушений, так как существует алгоритм, для определения степени микробиологических нарушений по бактериологическому анализу кала. Для оценки микробиологического пейзажа микробиоценозов различных степеней микробиологических нарушений сравним встречаемость микроорганизмов и их сочетаний (ассоциаций) в разных подгруппах. Частоты встречаемости

микроорганизмов в подгруппах соответствующих различным степеням микробиологических нарушений представлены в таблице 9.



а) Доля корректной классификации результатов бактериологического анализа кала по степеням микробиологических нарушений



б) Распределение результатов классификации анализов ИНС по степеням микробиологических нарушений

Рисунок 7 - Значения корректной классификации результатов бактериологического анализа кала по степеням микробиологических нарушений ИНС MLP 93-39-4.

Таблица 9 – Распределение частот встречаемости и интенсивности обсемененности микроорганизмов между группами норма, 1 и 2-й степени микробиологических нарушений.

Микроорганизм	Норма		1 степень		2 степень	
	Частота встречаемости	Интенсивность обсемененности Lg КОЕ/г.	Частота встречаемости	Интенсивность обсемененности Lg КОЕ/г.	Частота встречаемости	Интенсивность обсемененности Lg КОЕ/г.
<i>Bifidobacterium spp.</i>	100%	8,88	100%	8,49	100%	7,49
<i>Lactobacillus spp.</i>	100%	6,80	100%	5,85	100%	5,23
<i>Escherichia coli</i>	99%	7,65	94%	7,23	90%	6,44
<i>Escherichia coli lac+</i>	0%	0,00	0,3%	7,85	0%	0,00
<i>Escherichia coli lac-</i>	5%	6,60	15%	7,43	7%	6,91
<i>Escherichia coli hem+</i>	9%	6,82	12%	7,26	17%	6,79
<i>Enterococcus spp.</i>	80%	5,43	71%	5,36	76%	5,31
<i>Proteus spp.</i>	4%	6,54	4%	6,82	17%	6,73
<i>Klebsiella spp.</i>	42%	6,90	34%	7,18	56%	7,15
<i>Citrobacter spp.</i>	1%	7,77	1%	7,15	1%	6,62
<i>Enterobacter spp.</i>	30%	7,04	25%	7,23	16%	6,66
<i>Hafnia spp.</i>	0,4%	6,00	1%	7,16	1%	6,00
<i>Pseudomonas spp.</i>	1%	5,74	4%	5,94	5%	5,83
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	7%	4,88	12%	5,43	17%	5,57
<i>Staphylococcus aureus</i>	0%	0,00	1%	6,20	2%	6,41

Примечание: Достоверные отличия отмечены **полужирным курсивом**.

В таблице 9 показано, что распределение по степеням микробиологических нарушений дает близкие значения по большинству показателей не различающиеся при стандартном уровне достоверности 95%. Исследуем ассоциаты микроорганизмов, высеваемых из кала. Для облегчения восприятия данных рассмотрим, все высеваемые микроорганизмы, кроме микроорганизмов, которые присутствуют в более чем 95% анализов – *Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.*, и типичные *Escherichia coli*.

Сравним частоты встречаемости ассоциатов микроорганизмов в подгруппах с различными степенями микробиологических нарушений (таблица 10).

Таблица 10 – Частоты встречаемости ассоциаций микроорганизмов при различных степенях микробиологических нарушений

Код	Ассоциация микроорганизмов	Частота встречаемости ассоциаций микроорганизмов, %				Достоверность отличий от нормы		
		Норма	1 степень	2 степень	3 степень	p(n-1)	p(n-2)	p(n-3)
48	<i>Klebsiella spp / Enterococcus spp.</i>	27,16	22,06	27,65	10,34	0,47	0,95	0,01
68	<i>Enterobacter spp. / Enterococcus spp.</i>	22,23	14,10	11,45	0,00	0,18	0,06	0,00
8	<i>Enterococcus spp.</i>	11,76	6,64	2,51	3,45	0,23	0,01	0,03
4	<i>Klebsiella spp</i>	6,49	10,73	2,79	3,45	0,31	0,22	0,33
6	<i>Enterobacter spp.</i>	4,14	5,31	0,28	3,45	0,70	0,07	0,80
18	<i>Escherichia coli hem+ / Enterococcus spp.</i>	3,58	5,01	3,63	0,00	0,63	0,99	0,06
89	<i>Enterococcus spp. / Staphylococcus spp.</i>	3,19	2,25	2,51	10,34	0,69	0,78	0,05
28	<i>Escherichia coli lac- / Enterococcus spp.</i>	2,80	6,54	3,07	10,34	0,22	0,91	0,04
1	<i>Escherichia coli hem+</i>	2,35	3,98	4,19	0,00	0,52	0,47	0,13
689	<i>Enterobacter spp. / Enterococcus spp. / Staphylococcus spp.</i>	2,30	1,12	1,40	0,00	0,53	0,64	0,13
2	<i>Escherichia coli lac-</i>	2,18	3,37	0,84	0,00	0,61	0,44	0,14
489	<i>Klebsiella spp / Enterococcus spp./ Staphylococcus spp.</i>	1,85	1,43	2,79	6,90	0,82	0,66	0,09
9	<i>Staphylococcus spp.</i>	1,57	1,43	0,56	3,45	0,94	0,49	0,40
468	<i>Klebsiella spp / Enterobacter spp. / Enterococcus spp.</i>	1,29	1,23	2,79	0,00	0,97	0,46	0,26
38	<i>Proteus spp. / Enterococcus spp.</i>	1,06	2,25	4,47	3,45	0,52	0,15	0,26
3	<i>Proteus spp.</i>	0,95	1,33	1,12	6,90	0,80	0,91	0,03
58	<i>Citrobacter spp / Enterococcus spp.</i>	0,62	0,31	0,56	0,00	0,75	0,96	0,43
78	<i>Pseudomonas spp. / Enterococcus spp.</i>	0,50	0,92	0,56	0,00	0,73	0,96	0,48
49	<i>Klebsiella spp / Staphylococcus spp.</i>	0,50	0,72	1,40	3,45	0,85	0,52	0,14

Таблица 10 – Частоты встречаемости ассоциаций микроорганизмов при различных степенях микробиологических нарушений (продолжение).

Код	Ассоциация микроорганизмов	Частота встречаемости ассоциаций микроорганизмов, %				Достоверность отличий от нормы		
		Норма	1 степень	2 степень	3 степень	p(n-1)	p(n-2)	p(n-3)
168	<i>Escherichia coli hem+ / Enterobacter spp / Enterococcus spp.</i>	0,45	0,31	0,84	0,00	0,87	0,73	0,50
69	<i>Enterobacter spp / Staphylococcus spp.</i>	0,45	0,20	0,56	0,00	0,76	0,91	0,50
148	<i>Escherichia coli hem+ / Klebsiella spp / Enterococcus spp.</i>	0,39	0,20	2,23	0,00	0,81	0,26	0,53
14	<i>Escherichia coli hem+ / Klebsiella spp</i>	0,28	0,41	1,96	0,00	0,88	0,26	0,60
5	<i>Citrobacter spp</i>	0,28	0,20	0,00	0,00	0,91	0,60	0,60
7	<i>Pseudomonas spp.</i>	0,17	1,33	0,00	3,45	0,34	0,68	0,08
289	<i>Escherichia coli lac- / Enterococcus spp. / Staphylococcus spp.</i>	0,17	0,61	0,00	0,00	0,61	0,68	0,68
348	<i>Proteus spp. / Klebsiella spp / Enterococcus spp.</i>	0,17	0,41	3,91	0,00	0,75	0,06	0,68
34	<i>Proteus spp. / Klebsiella spp</i>	0,17	0,31	2,51	0,00	0,84	0,15	0,68
16	<i>Escherichia coli hem+ / Enterobacter spp.</i>	0,17	0,10	0,84	0,00	0,90	0,50	0,68
189	<i>Escherichia coli hem+ / Enterococcus spp. / Staphylococcus spp.</i>	0,11	0,72	0,84	3,45	0,51	0,46	0,08
19	<i>Escherichia coli hem+ / Staphylococcus spp.</i>	0,11	0,41	0,84	3,45	0,68	0,46	0,08
478	<i>Klebsiella spp / Pseudomonas spp / Enterococcus spp.</i>	0,11	0,10	0,84	0,00	0,98	0,46	0,74
4689	<i>Klebsiella spp Enterobacter spp. / Enterococcus spp. / Staphylococcus spp.</i>	0,11	0,00	0,00	0,00	0,74	0,74	0,74
46	<i>Klebsiella spp / Enterobacter spp.</i>	0,06	0,41	0,56	3,45	0,60	0,52	0,07
389	<i>Proteus spp. / Enterococcus spp. / Staphylococcus spp.</i>	0,06	0,20	0,84	0,00	0,77	0,41	0,81
789	<i>Pseudomonas spp / Enterococcus spp. / Staphylococcus spp.</i>	0,06	0,20	0,56	3,45	0,77	0,52	0,07
469	<i>Klebsiella spp / Enterobacter spp. / Staphylococcus spp.</i>	0,06	0,10	0,00	0,00	0,91	0,81	0,81
12	<i>Escherichia coli hem+ / Escherichia coli lac-</i>	0,06	0,00	1,40	0,00	0,81	0,27	0,81
258	<i>Escherichia coli lac- / Citrobacter spp / Enterococcus spp.</i>	0,06	0,00	0,00	0,00	0,81	0,81	0,81
248	<i>Escherichia coli lac- / Klebsiella spp / Enterococcus spp.</i>	0,00	0,41	0,00	0,00	0,52		
24	<i>Escherichia coli lac- / Klebsiella spp</i>	0,00	0,31	0,00	3,45	0,58		0,06
29	<i>Escherichia coli lac- / Staphylococcus spp.</i>	0,00	0,20	0,28	3,45	0,65	0,60	0,06

Таблица 10 – Частоты встречаемости ассоциаций микроорганизмов при различных степенях микробиологических нарушений (продолжение).

Код	Ассоциация микроорганизмов	Частота встречаемости ассоциаций микроорганизмов, %				Достоверность отличий от нормы		
		Норма	1 степень	2 степень	3 степень	p(n-1)	p(n-2)	p(n-3)
128	<i>Escherichia coli hem+</i> / <i>Escherichia coli lac-</i> / <i>Enterococcus spp.</i>	0,00	0,10	1,12	0,00	0,75	0,29	
13	<i>Escherichia coli hem+</i> / <i>Proteus spp.</i>	0,00	0,10	0,28	0,00	0,75	0,60	
36	<i>Proteus spp.</i> / <i>Enterobacter spp.</i>	0,00	0,10	0,28	0,00	0,75	0,60	
39	<i>Proteus spp.</i> / <i>Staphylococcus spp.</i>	0,00	0,10	0,28	0,00	0,75	0,60	
67	<i>Enterobacter spp.</i> / <i>Pseudomonas spp.</i>	0,00	0,10	0,28	0,00	0,75	0,60	
368	<i>Proteus spp.</i> / <i>Enterobacter spp.</i> / <i>Enterococcus spp.</i>	0,00	0,10	0,28	0,00	0,75	0,60	
4589	<i>Klebsiella spp</i> / <i>Citrobacter spp</i> / <i>Enterococcus spp.</i> / <i>Staphylococcus spp.</i>	0,00	0,10	0,00	3,45	0,75		0,06
59	<i>Citrobacter spp</i> / <i>Staphylococcus spp.</i>	0,00	0,10	0,00	0,00	0,75		
146	<i>Escherichia coli hem+</i> / <i>Klebsiella spp</i> / <i>Enterobacter spp.</i>	0,00	0,10	0,00	0,00	0,75		
158	<i>Escherichia coli hem+</i> / <i>Citrobacter spp</i> / <i>Enterococcus spp.</i>	0,00	0,10	0,00	0,00	0,75		
159	<i>Escherichia coli hem+</i> / <i>Citrobacter spp</i> / <i>Staphylococcus spp.</i>	0,00	0,10	0,00	0,00	0,75		
169	<i>Escherichia coli hem+</i> / <i>Enterobacter spp.</i> / <i>Staphylococcus spp.</i>	0,00	0,10	0,00	0,00	0,75		
678	<i>Enterobacter spp.</i> / <i>Pseudomonas spp.</i> / <i>Enterococcus spp.</i>	0,00	0,10	0,00	0,00	0,75		
679	<i>Enterobacter spp.</i> / <i>Pseudomonas spp.</i> / <i>Staphylococcus spp.</i>	0,00	0,10	0,00	0,00	0,75		
1248	<i>Escherichia coli hem+</i> / <i>Escherichia coli lac-</i> / <i>Klebsiella spp</i> / <i>Enterococcus spp.</i>	0,00	0,10	0,00	0,00	0,75		
1258	<i>Escherichia coli hem+</i> / <i>Escherichia coli lac-</i> / <i>Citrobacter spp</i> / <i>Enterococcus spp.</i>	0,00	0,10	0,00	0,00	0,75		
1289	<i>Escherichia coli hem+</i> / <i>Escherichia coli lac-</i> / <i>Enterococcus spp.</i> / <i>Staphylococcus spp.</i>	0,00	0,10	0,00	0,00	0,75		
1489	<i>Escherichia coli hem+</i> / <i>Klebsiella spp</i> / <i>Enterococcus spp.</i> / <i>Staphylococcus spp.</i>	0,00	0,10	0,00	0,00	0,75		

Таблица 10 – Частоты встречаемости ассоциаций микроорганизмов при различных степенях микробиологических нарушений (продолжение).

Код	Ассоциация микроорганизмов	Частота встречаемости ассоциаций микроорганизмов, %				Достоверность отличий от нормы		
		Норма	1 степень	2 степень	3 степень	p(n-1)	p(n-2)	p(n-3)
1589	<i>Escherichia coli hem+</i> / <i>Citrobacter spp</i> / <i>Enterococcus spp.</i> / <i>Staphylococcus spp.</i>	0,00	0,10	0,00	0,00	0,75		
1789	<i>Escherichia coli hem+</i> / <i>Pseudomonas spp.</i> / <i>Enterococcus spp.</i> / <i>Staphylococcus spp.</i>	0,00	0,10	0,00	0,00	0,75		
4789	<i>Klebsiella spp</i> / <i>Pseudomonas spp.</i> / <i>Enterococcus spp.</i> / <i>Staphylococcus spp.</i>	0,00	0,10	0,00	0,00	0,75		
26	<i>Escherichia coli lac-</i> / <i>Enterobacter spp.</i>	0,00	0,00	0,56	0,00		0,45	
47	<i>Klebsiella spp</i> / <i>Pseudomonas spp.</i>	0,00	0,00	0,56	0,00		0,45	
149	<i>Escherichia coli hem+</i> / <i>Klebsiella spp</i> / <i>Staphylococcus spp.</i>	0,00	0,00	0,28	3,45		0,60	0,06
17	<i>Escherichia coli hem+</i> / <i>Pseudomonas spp.</i>	0,00	0,00	0,28	0,00		0,60	
27	<i>Escherichia coli lac-</i> / <i>Pseudomonas spp.</i>	0,00	0,00	0,28	0,00		0,60	
138	<i>Escherichia coli hem+</i> / <i>Proteus spp.</i> / <i>Enterococcus spp.</i>	0,00	0,00	0,28	0,00		0,60	
278	<i>Escherichia coli lac-</i> / <i>Pseudomonas spp.</i> / <i>Enterococcus spp.</i>	0,00	0,00	0,28	0,00		0,60	
578	<i>Citrobacter spp</i> / <i>Pseudomonas spp.</i> / <i>Enterococcus spp.</i>	0,00	0,00	0,28	0,00		0,60	
2489	<i>Escherichia coli lac-</i> / <i>Klebsiella spp</i> / <i>Enterococcus spp.</i> / <i>Staphylococcus spp.</i>	0,00	0,00	0,28	0,00		0,60	
3468	<i>Proteus spp.</i> / <i>Klebsiella spp</i> / <i>Enterobacter spp.</i> / <i>Enterococcus spp.</i>	0,00	0,00	0,28	0,00		0,60	
3489	<i>Proteus spp.</i> / <i>Klebsiella spp</i> / <i>Enterococcus spp.</i> / <i>Staphylococcus spp.</i>	0,00	0,00	0,28	0,00		0,60	
6789	<i>Enterobacter spp.</i> / <i>Pseudomonas spp.</i> / <i>Enterococcus spp.</i> / <i>Staphylococcus spp.</i>	0,00	0,00	0,28	0,00		0,60	
269	<i>Escherichia coli lac-</i> / <i>Enterobacter spp.</i> / <i>Staphylococcus spp.</i>	0,00	0,00	0,00	3,45			0,06

Примечание: Достоверные отличия отмечены **полужирным курсивом**.

В таблице 10 показано, что среди всех ассоциатов микроорганизмов 75% приходится на различные комбинации *Enterococcus spp.*, *Klebsiella spp.* и *Enterobacter spp.*. С увеличением степени микробиологических нарушений снижается разнообразие ассоциатов микроорганизмов в кале. Тем не менее, увеличивается разнообразие ассоциатов микроорганизмов, которые встречаются редко. В подгруппе 1 степень микробиологических нарушений встречаемость

ассоциаций достоверно не отличается от нормы. В группе 2-я степень микробиологических нарушений встречаемость *Enterococcus spp.* ($p=0,01$) снижается относительно нормы. В группе 3-я степень микробиологических нарушений достоверно ($p<0,05$) снижена встречаемость следующих ассоциаций: *Enterococcus spp.* — *Klebsiella spp.*, *Enterococcus spp.* — *Enterobacter spp.*, *Enterococcus spp.* — *Escherichia coli lac-*.

В группе норма встречаются ассоциации микроорганизмов, которые не присутствуют в других группах – *Enterococcus spp.* — *Enterobacter spp.* — *Klebsiella spp.* — *Staphylococcus spp.*, а так же *Enterococcus spp.* — *Citrobacter spp.* — *Escherichia coli lac-*. Суммарная встречаемость уникальных для группы норма ассоциатов составляет 0,71%. В группе 1 степень микробиологических нарушений встречаемость уникальных ассоциатов составляет 1,84%, в группе 2-я степень микробиологических нарушений — 3,63%, в группе 3-я степень микробиологических нарушений — 3,45%. Большое количество уникальных ассоциатов представлены в группе 1-я степень микробиологических нарушений, в различных комбинациях в ассоциатах находится большинство микроорганизмов, исключение составляет *Proteus spp.*, который не встречается в ассоциациях данной группы. В группе 3-я степень микробиологических нарушений установлена одна уникальная ассоциация микроорганизмов: *Enterobacter spp.* — *Staphylococcus spp.* — *Escherichia coli lac-*. В группе 2-я степень микробиологических нарушений ассоциаций включают в себя большинство микроорганизмов в различных комбинациях.

Указанные ассоциации в группах микробиоценозов с различными степенями микробиологических нарушений являются маркерами, позволяющими составить математическую модель – искусственную нейронную сеть, однозначно определяющую степень микробиологических нарушений по бактериологическому анализу кала.

Известно, что избытки непереваренных в верхних отделах ЖКТ субстратов влияют на состав и количество и соотношения микроорганизмов в кале. Избыток субстрата даёт преимущество для роста определенной группы микроорганизмов. Исследуем состав микроорганизмов выделенных из кала пациентов с признаками избытка субстратов и разделим их на подгруппы согласно типу непереваренного субстрата. Группа с избытком жиров в кале обозначим как — стеаторея, с избытком белков — креаторея, с избытком углеводов — амилорея.

Исследуем частоты встречаемости микроорганизмов (таблица 11) и их ассоциатов (таблица 12) в кале в подгруппах стеаторея, креаторея и амилорея.

Таблица 11 - Встречаемость микроорганизмов в кале при различных нарушениях ферментного пищеварения

Микроорганизмы	Встречаемость микроорганизмов				Достоверность отличий от нормы		
	Норма	Креаторея	Стеаторея	Амилорея	Креаторея	Стеаторея	Амилорея
<i>Enterococcus spp.</i>	70,63	62,50	74,66	74,10	0,48	0,74	0,77
<i>Klebsiella spp</i>	42,81	39,29	41,78	36,75	0,70	0,91	0,50
<i>Enterobacter spp.</i>	21,56	28,57	26,03	27,11	0,32	0,52	0,43
<i>Escherichia coli hem+</i>	13,13	21,43	9,59	10,84	0,16	0,46	0,64
<i>Staphylococcus spp.</i>	9,38	12,50	5,48	9,64	0,50	0,31	0,95
<i>Escherichia coli lac-</i>	9,06	3,57	8,90	4,22	0,12	0,97	0,18
<i>Proteus spp.</i>	2,81	7,14	2,74	12,65	0,17	0,98	0,01
<i>Citrobacter spp.</i>	1,25	0,00	2,74	1,20	0,26	0,46	0,98
<i>Pseudomonas spp.</i>	1,25	1,79	6,85	3,01	0,76	0,05	0,39

Примечание: Достоверные отличия указаны *полужирным курсивом*.

Из таблицы 12 видно, что в группе стеаторея в бактериологическом анализе кала достоверно чаще встречается *Pseudomonas spp.*, а в группе амилорея — *Proteus spp.*.

Встречаемость ассоциаций микроорганизмов в бактериологическом анализе кала для групп креаторея, стеаторея и амилорея представлена в таблице 12.

Таблица 12 - Встречаемость ассоциаций микроорганизмов в кале при различных нарушениях ферментного пищеварения

Код	Ассоциация микроорганизмов	Частота встречаемости, %				Достоверность отличий от нормы		
		Норма	Креаторея	Стеаторея	Амилорея	р (норма - креаторея)	р (норма - стеторея)	р (норма - амилорея)
48	<i>Klebsiella spp / Enterococcus spp.</i>	27,19	21,43	26,03	21,69	0,41	0,72	0,43
68	<i>Enterobacter spp./ Enterococcus spp.</i>	15,00	16,07	14,38	15,06	0,85	0,75	0,99
8	<i>Enterococcus spp.</i>	9,69	5,36	8,90	10,24	0,26	0,63	0,90
4	<i>Klebsiella spp</i>	8,75	7,14	10,27	6,02	0,69	0,44	0,48
18	<i>Escherichia coli hem+ / Enterococcus spp.</i>	5,00	5,36	2,05	4,82	0,91	0,02	0,95
1	<i>Escherichia coli hem+</i>	5,00	3,57	3,42	3,01	0,63	0,55	0,48
28	<i>Escherichia coli lac- / Enterococcus spp.</i>	4,38	3,57	6,16	2,41	0,78	0,33	0,45
6	<i>Enterobacter spp.</i>	3,44	7,14	6,16	4,22	0,25	0,47	0,78
2	<i>Escherichia coli lac-</i>	3,13	12,50	1,37	1,81	0,02	0,00	0,55
89	<i>Enterococcus spp./ Staphylococcus spp.</i>	2,19	1,79	0,68	3,01	0,84	0,09	0,72
489	<i>Klebsiella spp / Enterococcus spp. / Staphylococcus spp.</i>	1,88	1,79	2,05	0,60	0,96	0,87	0,42
9	<i>Staphylococcus spp.</i>	1,56	0,00	0,00	1,20	0,21		0,83
49	<i>Klebsiella spp / Staphylococcus spp.</i>	1,56	0,00	0,00	1,20	0,21		0,83

Таблица 12 - Встречаемость ассоциаций микроорганизмов в кале при различных нарушениях ферментного пищеварения (продолжение)

Код	Ассоциация микроорганизмов	Частота встречаемости, %				Достоверность отличий от нормы		
		Норма	Креаторея	Стеаторея	Амилорея	р (норма - креаторея)	р (норма - стеторея)	р (норма - амилорея)
58	<i>Citrobacter spp.</i> / <i>Enterococcus spp.</i>	1,25	0,00	2,05	0,60	0,26	0,30	0,63
38	<i>Proteus spp.</i> / <i>Enterococcus spp.</i>	0,94	0,00	1,37	4,82	0,33	0,43	0,11
14	<i>Escherichia coli hem+</i> / <i>Klebsiella spp</i>	0,94	5,36	0,00	0,00	0,08		0,33
3	<i>Proteus spp.</i>	0,63	7,14	0,00	4,82	0,02		0,07
168	<i>Escherichia coli hem+</i> / <i>Enterobacter spp.</i> / <i>Enterococcus spp.</i>	0,63	0,00	0,68	2,41	0,43	0,65	0,31
468	<i>Klebsiella spp</i> / <i>Enterobacter spp.</i> / <i>Enterococcus spp.</i>	0,63	1,79	2,74	1,81	0,45	0,22	0,45
7	<i>Pseudomonas spp.</i>	0,63	1,79	1,37	1,81	0,45	0,69	0,45
34	<i>Proteus spp.</i> / <i>Klebsiella spp</i>	0,63	0,00	0,00	1,20	0,43		0,67
78	<i>Pseudomonas spp.</i> / <i>Enterococcus spp</i>	0,63	0,00	3,42	0,60	0,43	0,05	0,98
148	<i>Escherichia coli hem+</i> / <i>Klebsiella spp</i> / <i>Enterococcus spp</i>	0,63	0,00	0,00	0,60	0,43		0,98
12	<i>Escherichia coli hem+</i> / <i>Escherichia coli lac-</i>	0,63	0,00	0,68	0,00	0,43	0,65	0,43
29	<i>Escherichia coli lac-</i> / <i>Staphylococcus spp.</i>	0,63	0,00	0,00	0,00	0,43		0,43
69	<i>Enterobacter spp.</i> / <i>Staphylococcus spp.</i>	0,63	0,00	0,00	0,00	0,43		0,43
348	<i>Proteus spp.</i> / <i>Klebsiella spp</i> / <i>Enterococcus spp</i>	0,31	0,00	0,68	1,81	0,58	0,49	0,30
689	<i>Enterobacter spp.</i> / <i>Enterococcus spp</i> / <i>Staphylococcus spp.</i>	0,31	0,00	0,68	1,81	0,58	0,49	0,30
16	<i>Escherichia coli hem+</i> / <i>Enterobacter spp.</i>	0,31	0,00	0,00	0,00	0,58		0,58
39	<i>Proteus spp.</i> / <i>Staphylococcus spp.</i>	0,31	0,00	0,00	0,00	0,58		0,58
46	<i>Klebsiella spp</i> / <i>Enterobacter spp.</i>	0,31	0,00	0,00	0,00	0,58		0,58
269	<i>Escherichia coli lac-</i> / <i>Enterobacter spp.</i> / <i>Staphylococcus spp.</i>	0,31	0,00	0,00	0,00	0,58		0,58
469	<i>Klebsiella spp</i> / <i>Enterobacter spp.</i> / <i>Staphylococcus spp.</i>	0,00	0,00	0,00	0,60			0,44
678	<i>Enterobacter spp.</i> / <i>Pseudomonas spp.</i> / <i>Enterococcus spp.</i>	0,00	0,00	0,00	0,60			0,44
4589	<i>Klebsiella spp</i> / <i>Citrobacter spp.</i> / <i>Enterococcus spp.</i> / <i>Staphylococcus spp.</i>	0,00	0,00	0,00	0,60			0,44

Таблица 12 - Встречаемость ассоциаций микроорганизмов в кале при различных нарушениях ферментного пищеварения (продолжение)

Код	Ассоциация микроорганизмов	Частота встречаемости, %				Достоверность отличий от нормы		
		Норма	Креаторея	Стеаторея	Амилорея	р (норма - креаторея)	р (норма - стеторея)	р (норма - амилорея)
4689	<i>Klebsiella spp.</i> / <i>Enterobacter spp.</i> / <i>Enterococcus spp.</i> / <i>Staphylococcus spp.</i>	0,00	0,00	0,00	0,60			0,44
17	<i>Escherichia coli hem+</i> / <i>Pseudomonas spp.</i>	0,00	0,00	0,68	0,00		0,31	
67	<i>Enterobacter spp.</i> / <i>Pseudomonas spp.</i>	0,00	0,00	0,68	0,00		0,31	
158	<i>Escherichia coli hem+</i> / <i>Citrobacter spp.</i> / <i>Enterococcus spp.</i>	0,00	0,00	0,68	0,00		0,31	
169	<i>Escherichia coli hem+</i> / <i>Enterobacter spp.</i> / <i>Staphylococcus spp.</i>	0,00	0,00	0,68	0,00		0,31	
189	<i>Escherichia coli hem+</i> / <i>Enterococcus spp.</i> / <i>Staphylococcus spp.</i>	0,00	3,57	0,68	0,00	0,06	0,15	
278	<i>Escherichia coli lac-</i> / <i>Pseudomonas spp.</i> / <i>Enterococcus spp.</i>	0,00	0,00	0,68	0,00		0,31	
389	<i>Proteus spp.</i> / <i>Enterococcus spp.</i> / <i>Staphylococcus spp.</i>	0,00	0,00	0,68	0,00		0,31	

Примечание: Достоверные отличия указаны **полужирным курсивом**.

В таблице 12 показано, что для частот встречаемости микроорганизмов и их ассоциатов в бактериологическом анализе кала больше достоверных отличий чем, при сранении групп по степеням микробиологических нарушений. Частоты встречаемости в группе креаторея выше, чем в группе норма для микроорганизмов: *Escherichia coli lac-* и *Proteus spp.*. Встречаемость в группе стеаторея больше достоверных отличий, чем в группе норма для *Escherichia coli lac-* и ассоциата *Escherichia coli hem+* — *Enterococcus spp.*. Встречаемость микроорганизмов и ассоциатов в группе амилорея не имеет достоверных отличий от группы норма.

Процент встречаемости ассоциаций, которые не присутствуют в других группах — уникальные ассоциации для группы норма составляют — 2,5%, для группы креаторея — 0%, для группы стеаторея — 4,11%, для группы амилорея — 2,41%. В группе норма в бактериологическом анализе кала среди ассоциаций чаще других встречаются дввухвидовые ассоциации *Staphylococcus spp.* — *Klebsiella spp.*, в группе стеаторея — ассоциации из трех видов — *Escherichia coli hem+* — *Pseudomonas spp.*, в группе амилорея встречаются ассоциаты из 2 - 4 микроорганизмов с присутствием *Klebsiella spp* и *Staphylococcus spp.*.

В результате исследования встречаемости ассоциаций микроорганизмов в бактериологическом анализе кала в группах с различными нарушениями ферментного пищеварения отмечено заметное влияние избытка непереваренного субстрата на состав и соотношения микроорганизмов.

2.3. Критерий избытка фагочувствительной микрофлоры кишечника

Известно [41], что для микробиоценозов, в которых активизируется рост отдельных групп микроорганизмов, в связи с субстратным или иным преимуществом перед другими группами увеличивается количество микроорганизмов чувствительных к действию родственных бактериофагов. Это происходит по причине недостаточного количества вирулентных бактериофагов, способных сдерживать рост отдельных групп микроорганизмов. В результате такого «запаздывания» насыщения микробиоценоза бактериофагами в бактериологическом анализе кала увеличивается доля микроорганизмов чувствительных к родственным бактериофагам.

Результаты по встречаемости чувствительной к бактериофагам микрофлоры в группе норма представлены в таблице 13:

Таблица 13 - Встречаемость условно-патогенных микроорганизмов чувствительных к различным бактериофагам в фекалиях здорового человека.

№	Наименование бактериофага	Встречаемость, %
1	Пиополивалентный	38,5
2	Интенстинальный	28,6
3	Клебсиеллёзный	24,1
4	Колипротейный	17,7
5	Секстафаг	17,1
6	Стрептококковый	11,5

Из таблицы 13 видно, что встречаемость фагочувствительной микрофлоры составляет от 11,5 до 38,5%. Встречаемость микрофлоры чувствительной к смеси бактериофагов выше, чем к монофаговым препаратам.

Для того, чтобы определить влияние избытка субстрата на микробиоценоз кишечника определим встречаемость микрофлоры, чувствительной к бактериофагам в группах микробиоценозов с различными нарушениями ферментативного пищеварения.

Результаты встречаемости микробиоценозов с микроорганизмами, чувствительными к бактериофаговым препаратам в зависимости от типа нарушения ферментативного пищеварения представлены в таблице 14.

В таблице 14 показано, что встречаемость микробиоценозов с микроорганизмами чувствительными к бактериофаговым препаратам достоверно выше в группах амилорея, стеаторея и креаторея. Можно отметить, что признак появления в микробиоценозе микроорганизмов чувствительных к родственным бактериофагам свидетельствует о реакции микроорганизмов на избыток непереваренных субстратов бурным ростом.

Таблица 14 - Встречаемость условно-патогенной микрофлоры чувствительной к бактериофагам для групп различных нарушений ферментного пищеварения.

Бактериофаг	Встречаемость, %				Достоверность от группы норма		
	Норма	Амилорея	Стеаторея	Креаторея	Амилорея	Стеаторея	Креаторея
Пиополи- валентный	38,5	66,0	63,2	51,8	0,007	0,015	0,163
Интенс- тинальный	28,6	79,2	68,4	62,5	<i>p<0,001</i>	<i>p<0,001</i>	<i>p<0,001</i>
Клебси- елёзный	24,1	58,5	68,4	48,2	<i>p<0,001</i>	<i>p<0,001</i>	0,005
Коли- протейный	17,7	69,8	68,4	53,6	<i>p<0,001</i>	<i>p<0,001</i>	<i>p<0,001</i>
Секстафаг	17,1	62,3	68,4	69,6	<i>p<0,001</i>	<i>p<0,001</i>	<i>p<0,001</i>
Стрепто- кокковый	11,5	22,6	15,8	16,1	0,056	0,410	0,383

Достоверные отличия указаны полужирным курсивом.

Для того, чтобы оценить изменения встречаемости микробиоценозов с микроорганизмами чувствительными к родственным бактериофагам исследуем функцию зависимости от количества типичной и доли нетипичной микрофлоры в бактериальном анализе кала. На графиках (рисунки 8 - 11) по первой горизонтальной оси указано количество *Lactobacillus spp.* в логарифмической шкале, на второй горизонтальной оси указана доля нетипичной (условно-патогенной) микрофлоры в бактериологическом анализе кала. На вертикальной оси указана встречаемость микробиоценозов с микроорганизмами чувствительными к родственным бактериофагам.

На графике (рисунок 8) показана частота встречаемости микробиоценозов с микроорганизмами чувствительными к бактериофаговым препаратам, которая увеличивается при снижении количества *Lactobacillus spp.* и увеличении доли условно-патогенной микрофлоры, что соответствует дисбиотическим проявлениям. Таким образом, увеличение встречаемости микроорганизмов чувствительным к бактериофагам коррелирует с проявлением дисбиоза кишечника.

Оценим изменение встречаемости микробиоценозов с *Escherichia coli* и *Proteus spp.* чувствительными к колипротейному бактериофагу. На рисунке 9 показана частота встречаемости микробиоценозов с микрофлорой чувствительной к колипротейному бактериофагу, которая увеличивается с увеличением доли условнопатогенной микрофлоры в бактериологическом анализе кала. Зависимости встречаемости от количества *Lactobacillus spp.* не наблюдается.

На рисунке 10 показана частота встречаемость микрофлоры чувствительной к стрептококковому бактериофагу, которая существенно изменяется на значении доли условно-патогенной микрофлоры 40% . Изменения встречаемости микробиоценозов с чувствительной к

стрептококковому бактериофагу микрофлорой в зависимости от количества *Lactobacillus spp.* в бактериологическом анализе кала не наблюдается, за исключением значений доли условно-патогенной микрофлоры выше 80%.

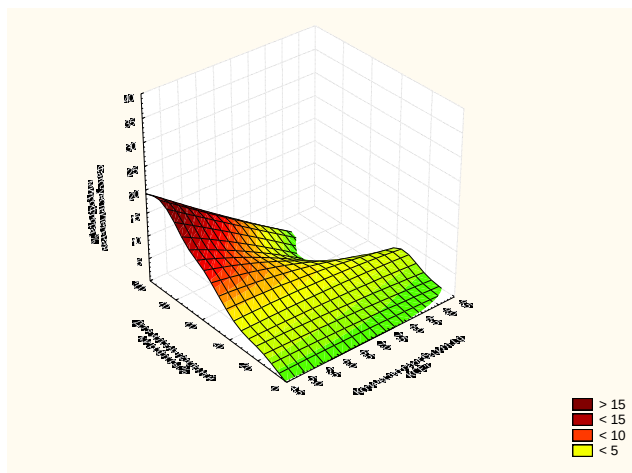


Рисунок 8 – Частоты встречаемости микробиоценозов с микроорганизмами чувствительными к бактериофагам в зависимости от доли условно-патогенной микрофлоры и количества Lg КОЕ/г лактобацилл.

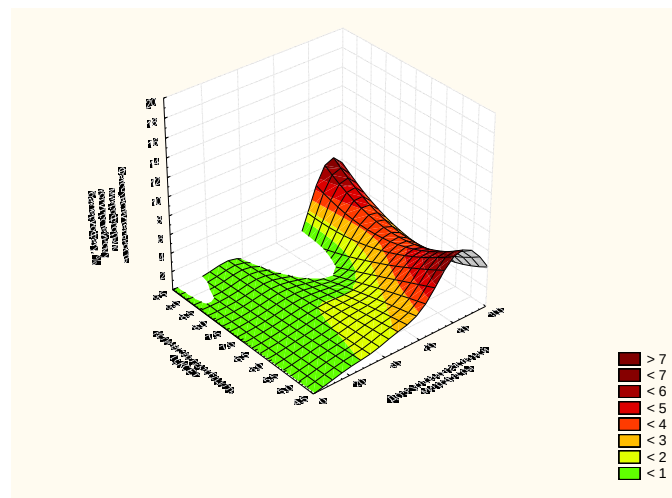


Рисунок 9 – Встречаемость микробиоценозов с микроорганизмами чувствительными к колипротейному бактериофагу в зависимости от доли условно-патогенной микрофлоры и количества Lg КОЕ/г лактобацилл.

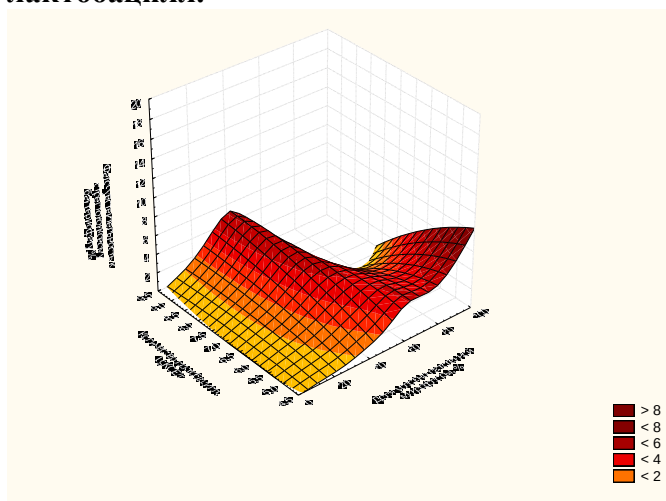


Рисунок 10 – Встречаемость микробиоценозов с микроорганизмами чувствительными к стрептококковому бактериофагу в зависимости от доли условно-патогенной микрофлоры и количества Lg КОЕ/г лактобацилл.

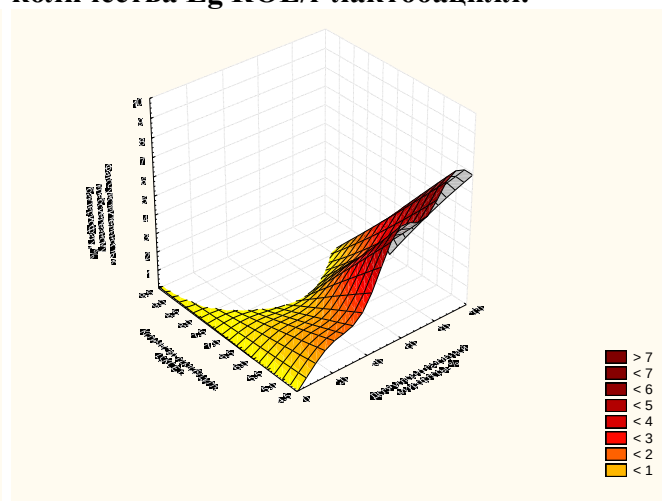


Рисунок 11 – Встречаемость микробиоценозов с микроорганизмами чувствительными к клебсиеллезному бактериофагу в зависимости от доли условно-патогенной микрофлоры и количества Lg КОЕ/г лактобацилл.

Из рисунка 11 видно, что встречаемость микробиоценозов с микрофлорой, чувствительной к клебсиеллезному бактериофагу увеличивается при снижении количества лактобацилл и увеличению доли условно-патогенной микрофлоры.

Из полученных данных следует, что появление чувствительной к бактериофагам микрофлоры становится более вероятно, при снижении титра постоянной микрофлоры – *Lactobacillus spp.*, и увеличению нетипичной просветной микрофлоры. Изменение параметра избытка фагочувствительной микрофлоры коррелирует с проявлениями дисбиоза. Этот признак может быть предложен в качестве одного из критериев оценки микробиоценозов.

Определим референсные значения для критерия избытка фагочувствительной микрофлоры по оценке изменения встречаемости микробиоценозов с фагочувствительной микрофлорой в зависимости от количества *Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.*, а так же концентраций масляной кислоты в кале.

Динамика встречаемости дефицитных концентраций *Bifidobacterium spp.*, и *Lactobacillus spp.* от доли чувствительной к бактериофагам условно-патогенной микрофлоры представлена на рисунке 12. Дефицитная концентрация состояние *Bifidobacterium spp.* составляет менее 9 lg КОЕ/г, а *Lactobacillus spp.* — 7 lg КОЕ/г.

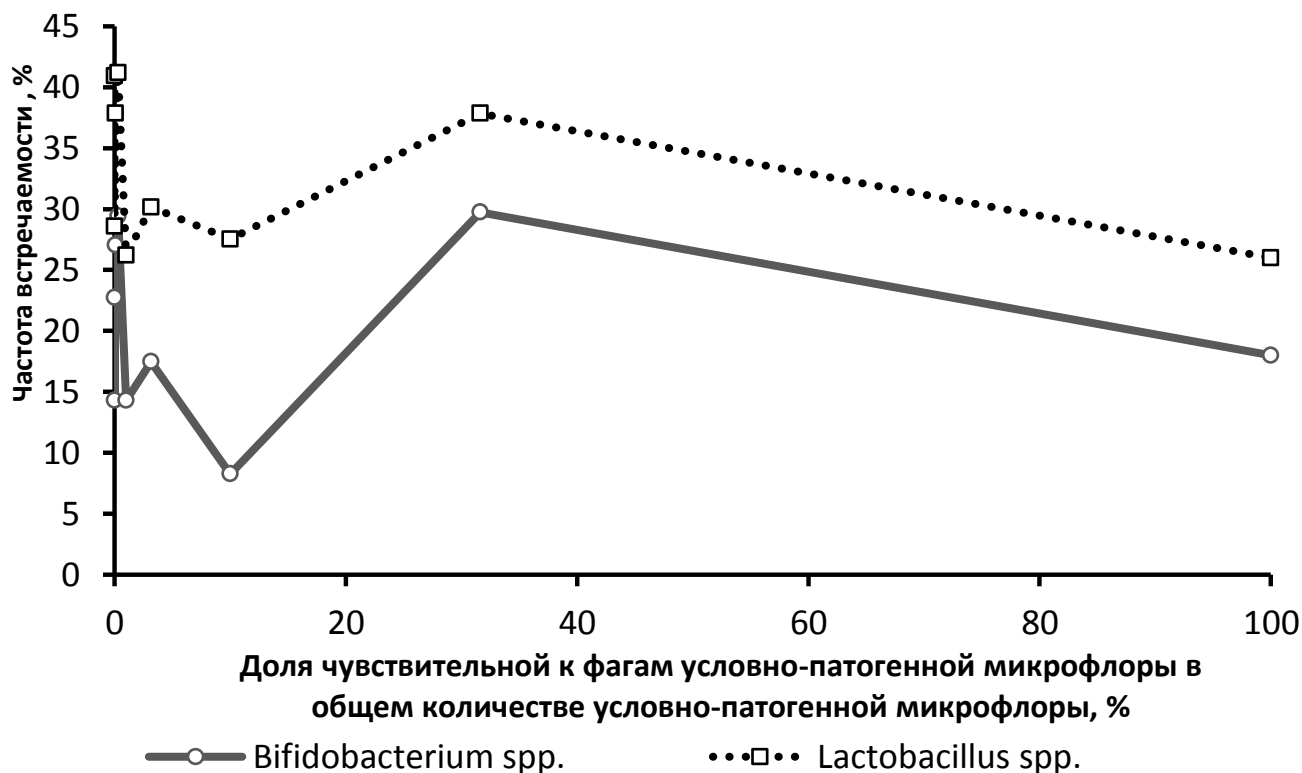


Рисунок 12 – Частота встречаемости дефицитных состояний бифидобактерий и лактобактерий при увеличении доли условно-патогенной микрофлоры чувствительной к родственным бактериофагам.

Из рисунка 12 можно выявить экстремум функции частоты встречаемости дефицита бифидобактерий и лактобацилл 10% фагочувствительной условно-патогенной микрофлоры к общему количеству условно-патогенной микрофлоры.

Исследуем динамику изменения концентраций летучих жирных кислот в кале.

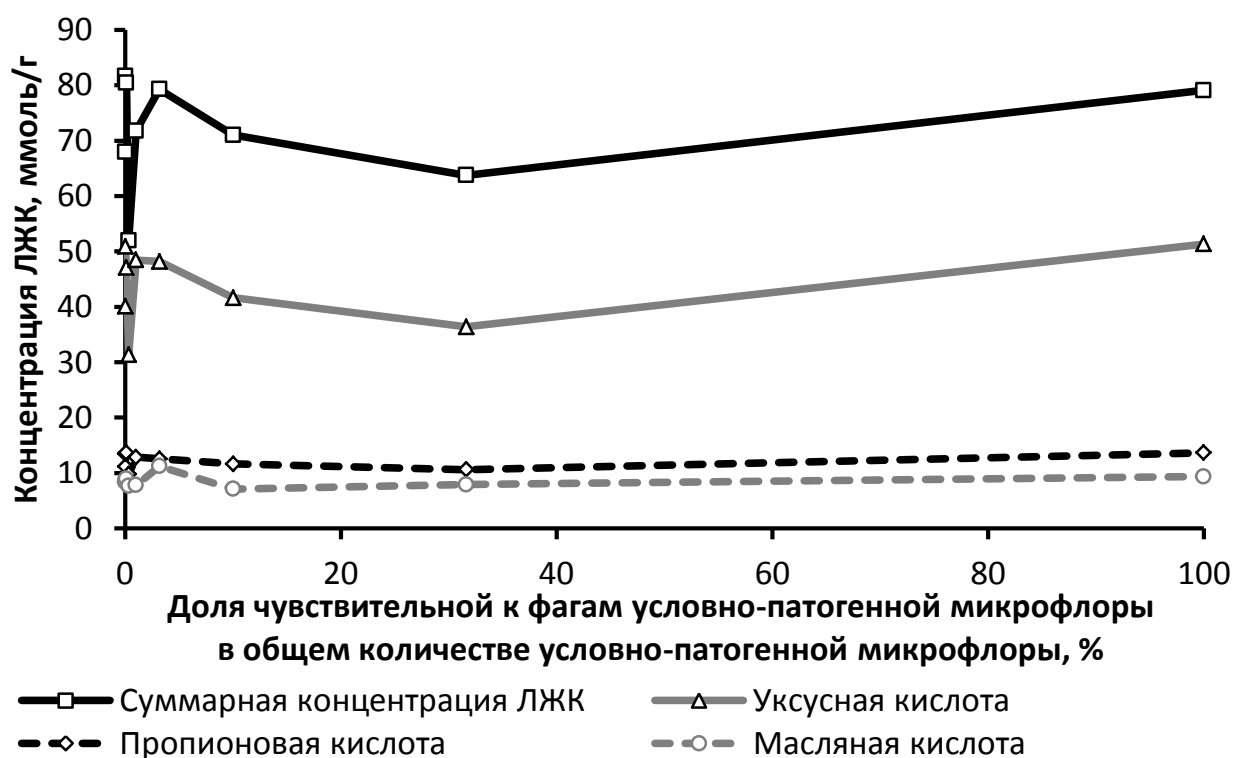


Рисунок 13 - Зависимость концентраций ЛЖК при увеличении доли условно-патогенной микрофлоры чувствительной к бактериофагам.

На рисунке 13 показано, что минимальное значение концентрации масляной кислоты находится на значении 10%. Из графика видно, что для значений более 10% доли микроорганизмов чувствительных к родственным бактериофагам в бактериологическом анализе кала наблюдаются концентрации масляной кислоты ниже, чем в группе норма и встречаемость дефицита *Bifidobacterium spp.* и *Lactobacillus spp.* выше, чем в группе норма. Предлагается использовать значение более 10% доли микроорганизмов чувствительных к родственным бактериофагам от общего количества микрофлоры, выделяемой в бактериологическом анализе кала в качестве референсного показателя дисбиотического нарушения.

Оценка соотношений и количества микроорганизмов можно оценить по встречаемости ассоциатов микроорганизмов во всей выборке и в подгруппе с присутствием в бактериологическом анализе кала микроорганизмов с чувствительностью к родственным бактериофагам (таблица 15).

Таблица 15 - Сравнение ассоциаций микроорганизмов групп с высоким содержанием микрофлоры чувствительной к бактериофагам и исследуемой выборки без этого признака.

Код	Ассоциации микроорганизмов	Общая выборка	Выборка с фагочувствительной микрофлорой	Достоверность отличий
48	<i>Klebsiella spp</i> / <i>Enterococcus spp.</i>	25,58	23,48	0,76
68	<i>Enterobacter spp.</i> / <i>Enterococcus spp.</i>	19,70	6,06	0,01
8	<i>Enterococcus spp.</i>	9,03	12,88	0,41
4	<i>Klebsiella spp</i>	6,80	9,85	0,45
6	<i>Enterobacter spp.</i>	4,20	3,03	0,66
18	<i>Escherichia coli hem+</i> / <i>Enterococcus spp.</i>	3,80	5,30	0,62
28	<i>Escherichia coli lac-</i> / <i>Enterococcus spp.</i>	3,36	13,64	0,01
1	<i>Escherichia coli hem+</i>	3,00	1,52	0,49
89	<i>Enterococcus spp.</i> / <i>Staphylococcus spp.</i>	2,96	4,55	0,56
2	<i>Escherichia coli lac-</i>	2,12	3,79	0,49
689	<i>Enterobacter spp.</i> / <i>Enterococcus spp.</i> / <i>Staphylococcus spp.</i>	1,94	0,76	0,47
489	<i>Klebsiella spp</i> / <i>Enterococcus spp.</i> / <i>Staphylococcus spp.</i>	1,86	1,52	0,85
38	<i>Proteus spp.</i> / <i>Enterococcus spp.</i>	1,72	0,76	0,54
9	<i>Staphylococcus spp.</i>	1,54	1,52	0,99
468	<i>Klebsiella spp</i> / <i>Enterobacter spp.</i> / <i>Enterococcus spp.</i>	1,50	0,00	0,22
3	<i>Proteus spp.</i>	1,10	2,27	0,52
49	<i>Klebsiella spp</i> / <i>Staphylococcus spp.</i>	0,80	0,00	0,37
78	<i>Pseudomonas spp.</i> / <i>Enterococcus spp.</i>	0,66	0,76	0,93
348	<i>Proteus spp.</i> / <i>Klebsiella spp</i> <i>Enterococcus spp.</i>	0,66	0,00	0,42
148	<i>Escherichia coli hem+</i> / <i>Klebsiella spp</i> / <i>Enterococcus spp.</i>	0,58	0,00	0,44
7	<i>Pseudomonas spp.</i>	0,55	0,00	0,46
58	<i>Citrobacter spp.</i> / <i>Enterococcus spp.</i>	0,55	0,00	0,46
14	<i>Escherichia coli hem+</i> / <i>Klebsiella spp</i>	0,51	0,00	0,47
168	<i>Escherichia coli hem+</i> / <i>Enterobacter spp.</i> / <i>Enterococcus spp.</i>	0,51	0,00	0,47
34	<i>Proteus spp.</i> / <i>Klebsiella spp</i>	0,48	0,00	0,49
69	<i>Enterobacter spp.</i> / <i>Staphylococcus spp.</i>	0,44	0,00	0,51
189	<i>Escherichia coli hem+</i> / <i>Enterococcus spp.</i> / <i>Staphylococcus spp.</i>	0,44	0,00	0,51
19	<i>Escherichia coli hem+</i> / <i>Staphylococcus spp.</i>	0,29	0,76	0,65
46	<i>Klebsiella spp</i> / <i>Enterobacter spp.</i>	0,22	0,76	0,59
5	<i>Citrobacter spp.</i>	0,22	0,00	0,64
12	<i>Escherichia coli hem+</i> / <i>Escherichia coli lac-</i>	0,22	0,00	0,64
16	<i>Escherichia coli hem+</i> / <i>Enterobacter spp.</i>	0,22	0,00	0,64
289	<i>Escherichia coli lac-</i> / <i>Enterococcus spp.</i> <i>Staphylococcus spp.</i>	0,22	0,00	0,64
789	<i>Pseudomonas spp.</i> / <i>Enterococcus spp.</i> / <i>Staphylococcus spp.</i>	0,22	0,00	0,64
389	<i>Proteus spp.</i> / <i>Enterococcus spp.</i> <i>Staphylococcus spp.</i>	0,18	0,76	0,55
478	<i>Klebsiella spp</i> / <i>Pseudomonas spp.</i> / <i>Enterococcus spp.</i>	0,18	0,00	0,67
128	<i>Escherichia coli hem+</i> / <i>Escherichia coli lac-</i> / <i>Enterococcus spp.</i>	0,15	0,00	0,70
29	<i>Escherichia coli lac-</i> / <i>Staphylococcus spp.</i>	0,11	0,00	0,74

Таблица 15 - Сравнение ассоциаций микроорганизмов групп с высоким содержанием микрофлоры чувствительной к бактериофагам и исследуемой выборки без этого признака (продолжение)

Код	Ассоциации микроорганизмов	Общая выборка	Выборка с фагочувствительной микрофлорой	Достоверность отличий
24	<i>Escherichia coli lac-</i> / <i>Klebsiella spp</i>	0,07	1,52	0,25
248	<i>Escherichia coli lac-</i> / <i>Klebsiella spp</i> / <i>Enterococcus spp.</i>	0,07	1,52	0,25
13	<i>Escherichia coli hem+</i> / <i>Proteus spp.</i>	0,07	0,00	0,79
26	<i>Escherichia coli lac-</i> / <i>Enterobacter spp.</i>	0,07	0,00	0,79
47	<i>Klebsiella spp</i> / <i>Pseudomonas spp.</i>	0,07	0,00	0,79
149	<i>Escherichia coli hem+</i> / <i>Klebsiella spp</i> / <i>Staphylococcus spp.</i>	0,07	0,00	0,79
469	<i>Klebsiella spp</i> / <i>Enterobacter spp.</i> / <i>Staphylococcus spp.</i>	0,07	0,00	0,79
4589	<i>Klebsiella spp</i> / <i>Citrobacter spp.</i> / <i>Enterococcus spp.</i> / <i>Staphylococcus spp.</i>	0,07	0,00	0,79
4689	<i>Klebsiella spp</i> / <i>Enterobacter spp.</i> / <i>Enterococcus spp.</i> / <i>Staphylococcus spp.</i>	0,07	0,00	0,79
36	<i>Proteus spp.</i> / <i>Enterobacter spp.</i>	0,04	0,76	0,42
17	<i>Escherichia coli hem+</i> / <i>Pseudomonas spp.</i>	0,04	0,00	0,85
27	<i>Escherichia coli lac-</i> / <i>Pseudomonas spp.</i>	0,04	0,00	0,85
39	<i>Proteus spp.</i> / <i>Staphylococcus spp.</i>	0,04	0,00	0,85
59	<i>Citrobacter spp.</i> / <i>Staphylococcus spp.</i>	0,04	0,00	0,85
67	<i>Enterobacter spp.</i> / <i>Pseudomonas spp.</i>	0,04	0,00	0,85
138	<i>Escherichia coli hem+</i> / <i>Proteus spp.</i> / <i>Enterococcus spp.</i>	0,04	0,00	0,85
258	<i>Escherichia coli lac-</i> / <i>Citrobacter spp.</i> / <i>Enterococcus spp.</i>	0,04	0,00	0,85
269	<i>Escherichia coli lac-</i> / <i>Enterobacter spp.</i> / <i>Staphylococcus spp.</i>	0,04	0,00	0,85
278	<i>Escherichia coli lac-</i> / <i>Pseudomonas spp.</i> / <i>Enterococcus spp.</i>	0,04	0,00	0,85
368	<i>Proteus spp.</i> / <i>Enterobacter spp.</i> / <i>Enterococcus spp.</i>	0,04	0,00	0,85
578	<i>Citrobacter spp.</i> / <i>Pseudomonas spp.</i> / <i>Enterococcus spp.</i>	0,04	0,00	0,85
679	<i>Enterobacter spp.</i> / <i>Pseudomonas spp.</i> / <i>Staphylococcus spp.</i>	0,04	0,00	0,85
1248	<i>Escherichia coli hem+</i> / <i>Escherichia coli lac-</i> / <i>Klebsiella spp</i> / <i>Enterococcus spp.</i>	0,04	0,00	0,85
1258	<i>Escherichia coli hem+</i> / <i>Escherichia coli lac-</i> / <i>Citrobacter spp.</i> / <i>Enterococcus spp.</i>	0,04	0,00	0,85
1289	<i>Escherichia coli hem+</i> / <i>Escherichia coli lac-</i> / <i>Enterococcus spp.</i> / <i>Staphylococcus spp.</i>	0,04	0,00	0,85
2489	<i>Escherichia coli lac-</i> / <i>Klebsiella spp</i> / <i>Enterococcus spp.</i> / <i>Staphylococcus spp.</i>	0,04	0,00	0,85
3468	<i>Proteus spp.</i> / <i>Klebsiella spp</i> / <i>Enterobacter spp.</i> / <i>Enterococcus spp.</i>	0,04	0,00	0,85
3489	<i>Proteus spp.</i> / <i>Klebsiella spp</i> / <i>Enterococcus spp.</i> / <i>Staphylococcus spp.</i>	0,04	0,00	0,85
6789	<i>Enterobacter spp.</i> / <i>Pseudomonas spp.</i> / <i>Enterococcus spp.</i> / <i>Staphylococcus spp.</i>	0,04	0,00	0,85
146	<i>Escherichia coli hem+</i> / <i>Klebsiella spp</i> / <i>Enterobacter spp.</i>	0,00	0,76	0,38
678	<i>Enterobacter spp.</i> / <i>Pseudomonas spp.</i> / <i>Enterococcus spp.</i>	0,00	0,76	0,38
1489	<i>Escherichia coli hem+</i> / <i>Klebsiella spp</i> / <i>Enterococcus spp.</i> / <i>Staphylococcus spp.</i>	0,00	0,76	0,38

Примечание: Достоверные отличия указаны **полужирным курсивом**.

В таблице 15 показано, что существуют варианты ассоциации *Enterobacter spp.* и *Enterococcus spp.*, для которого встречаемость в общей выборке достоверно выше, чем в целевой, и так же существует вариант ассоциации *Escherichia coli lac*- и *Enterococcus spp.*, для которого встречаемость в общей выборке достоверно ниже, чем в целевой. Изменение в составе микробиоценоза и как следствие соотношения микроорганизмов в бактериологическом анализе кала, а так же соотношений концентраций летучих жирных кислот можно оценить средствами математического моделирования – искусственными нейронными сетями.

Из исследуемой базы данных было отобрано 2213 результатов бактериологического исследования кала и результатов концентраций ЛЖК в кале. При выявлении микроорганизмов *Escherichia coli* и *Proteus spp.* в титре более 10^4 КОЕ/г, чувствительных к колипротейному бактериофагу результаты бактериологического посева и концентраций ЛЖК относили к группе микробиоценозов, чувствительных к колипротейному бактериофагу (SKp). Если выделенные микроорганизмы *Escherichia coli* и *Proteus spp.* были резистентны к колипротейному бактериофагу микробиоценозы были отнесены к группе резистентных к колипротейному бактериофагу (RKp). Аналогичным образом были выделены группы с чувствительными и резистентными *Klebsiella spp.* к клебсиеллезному бактериофагу (SKl и RKl), *Enterococcus spp.* к стрептококковому (SSc и RSc). В группу «норма» включались микробиоценозы с концентрацией вышеперечисленных микроорганизмов ниже 10^4 КОЕ/г.

Полученные группы были обработаны в программе по подбору и обучению нейросетей Statistica 8.0. В качестве переменных нейросети были приняты значения десятичных логарифмов концентраций микроорганизмов в кале. Значения округлялись до целого числа, отсутствующие микроорганизмы обозначали как 0. Концентрации ЛЖК для уксусной, пропионовой, масляной, валериановой, капроновой кислот, а так же их изомеров обрабатывались как непрерывные переменные (continuous inputs), а логарифмы концентраций микроорганизмов как категориальные переменные (categorical inputs).

Подбор и обучение ИНС проводилось для следующих групп по логарифмам концентраций микроорганизмов, а так же по концентрациям ЛЖК в кале для групп:

1. Чувствительные, резистентные микроорганизмы к клебсиеллезному бактериофагу, норма — SKl, RKl, N.
2. Чувствительные, резистентные микроорганизмы к колипротейному бактериофагу, норма — SKp, RKp, N.
3. Чувствительные, резистентные микроорганизмы к стрептококковому бактериофагу, норма — SSc, RSc, N.
4. Чувствительные микроорганизмы к клебсиеллезному, колипротейному, стрептококковому бактериофагам, норма — SKl, SKp, SSc, N.

5. Резистентные микроорганизмы к клебсиелёзному, колипротейному, стрептококковому бактериофагам, норма — RKl, RKp, RSc, N.

Результаты обработки нейросети оценивали по проценту корректно идентифицированных анализов.

Тестовая и обучающая выборка формировались из одной базы данных 2213 пациентов, из которых 1770 пациентов (80%) было выбрано случайным образом для обучающей выборки и 443 пациента (20%) для контрольной выборки. В результате обработки данных пакетом Automatet Neural Networks программы Statistica были выбраны искусственные нейронные сети для данных бактериологического анализа и для данных концентраций ЛЖК в кале. При обучении контролировали величины ошибки по лифтовым картам и сравнивали производительности (корректной классификации объектов) предлагаемых архитектур нейросетевых алгоритмов. Созданные ИНС имели минимальное количество некорректных классификаций среди 5 наиболее производительных ИНС для данных бактериологического анализа и концентраций ЛЖК в кале. Архитектура искусственных нейросетей и численность групп представлены в таблице 16.

Таблица 16 - Численность групп и архитектуры ИНС

Наименования групп	Архитектура ИНС для данных по		Численность выборки		
	бактериологии	концентрациям ЛЖК	Общая	Обучающая 80%	Тестовая 20%
Чувствительность - резистентность к бактериофагам:					
клебсиелёзному (N - SKl - RKl)	MLP 59-12-3	MLP 8-12-3	478	382	96
колипротейному (N - SKp - RKp)	MLP 61-12-3	MLP 8-11-3	331	265	66
стрептококковому (N - SSc - RSc)	MLP 61-32-3	MLP 8-4-3	376	301	75
Чувствительность к бактериофагам (N - SKl -SKp -SSc)	MLP 63-15-4	MLP 8-10-4	294	235	59
Резистентность к бактериофагам (N - RKl -RKp -RSc)	MLP 66-22-4	MLP 8-5-4	734	587	147

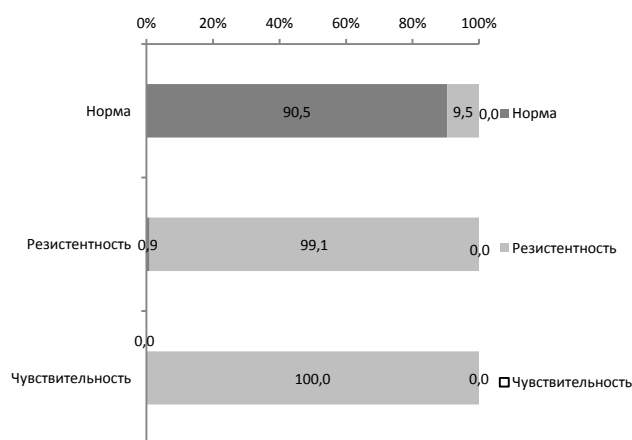
Результаты классификации объектов (результатов бактериологического анализа микрофлоры кишечника и концентраций ЛЖК в кале) представлены в таблицах (таблицы 17 - 21) и на рисунках (рисунки 14 - 18).

Из анализа доли корректной классификации результатов бактериологического анализа кала (таблица 17), можно отметить, что количество корректно классифицированных анализов больше для данных бактериологического анализа, чем для данных концентраций ЛЖК. По данным бактериологического анализа ИНС MLP 59-12-3 в группе с микроорганизмами чувствительными к клебсиелёзному бактериофагу не было определено микробиоценозов, а микробиоценозы данной группы на 100% были классифицированы как резистентные к клебсиелёзному бактериофагу (рисунок 14а). В результате классификации по данным

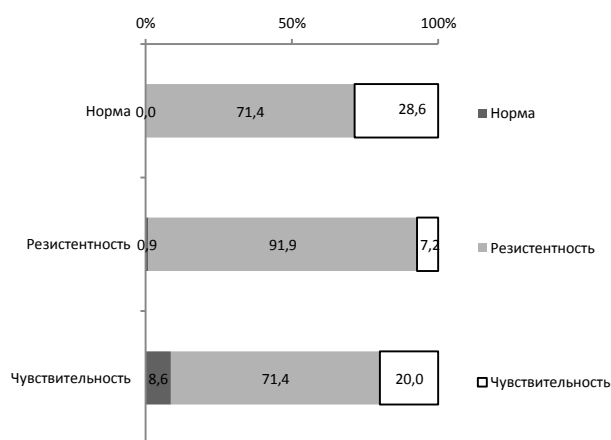
концентраций ЛЖК в кале ИНС MLP 8-12-3 в группу норма не было определено микробиоценозов, а в группу чувствительные к клебсиелёзному бактериофагу было корректно классифицировано только 20% (рисунок 14 б).

Таблица 17 - Результаты классификации анализов ИНС по группам чувствительных и резистентных к клебсиелёзному бактериофагу на основании бактериологического анализа и анализа концентраций ЛЖК в кале.

Группы	Норма (N)	Резистентность (RKI)	Чувствительность (SKI)
ИНС MLP 59-12-3 – бактериологический анализ кала			
Всего	126	221	35
Корректно	116	218	0
Не корректно	10	3	35
Корректно (%)	93	99	0
Не корректно (%)	7	1	100
ИНС MLP 8-12-3 – анализ концентраций ЛЖК в кале			
Всего	126	221	35
Корректно	36	203	3
Не корректно	90	18	32
Корректно (%)	28	91	8
Не корректно (%)	71	8	91



а) по данным бактериологического анализа



б) по данным анализа концентраций ЛЖК в кале

Рисунок 14 - Распределение результатов классификации анализов ИНС по группам чувствительных и резистентных к клебсиелёзному бактериофагу

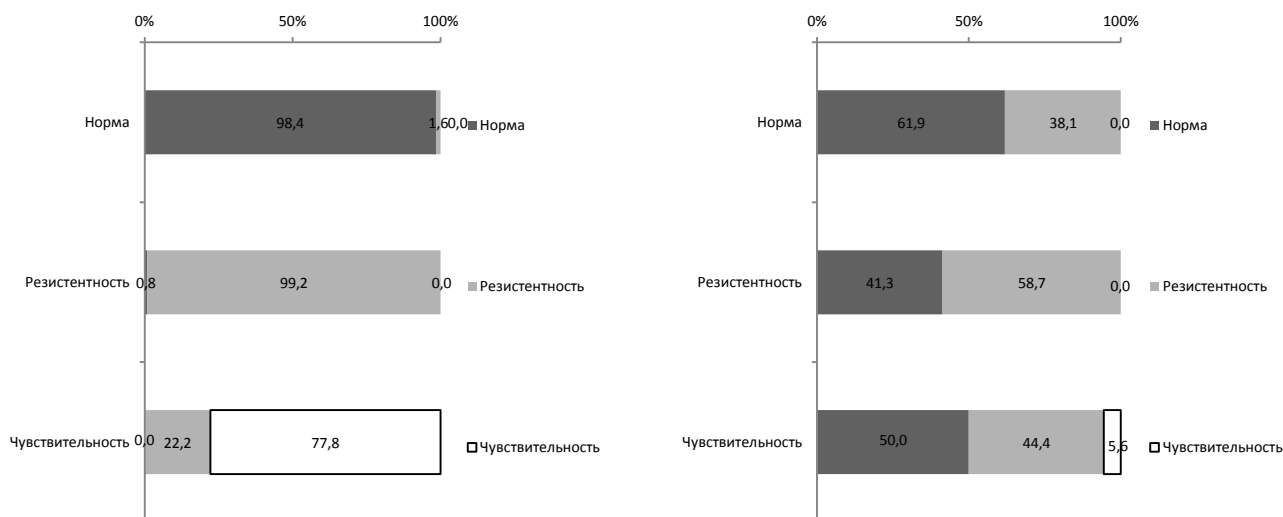
Из анализа доли корректной классификации результатов бактериологического анализа кала (таблица 18), можно отметить, что количество корректно классифицированных анализов больше для данных бактериологического анализа, чем для данных концентраций ЛЖК. По данным бактериологического анализа значения корректной классификации ИНС MLP 61-12-3 варьировались от 77,8% до 98,4%. (рисунок 15а). По данным концентраций ЛЖК в кале ИНС

MLP 8-11-3 были корректно классифицированы группы с низкими значениями долей от 5,6% до 61,9% (рисунок 15б).

Таблица 18 - Результаты классификации анализов ИНС по группам чувствительных и резистентных к колипротейному бактериофагу на основании бактериологического анализа и анализа концентраций ЛЖК.

	Норма (N)	Резистентность (RKp)	Чувствительность (SKp)
ИНС MLP 61-12-3 – бактериологический анализ кала			
Всего	126	121	18
Корректно	124	120	14
Не корректно	2	1	4
Корректно (%)	98	99	77
Не корректно (%)	1	0	22
ИНС MLP 8-11-3– анализ концентраций ЛЖК в кале			
Всего	126	121	18
Корректно	78	71	1
Не корректно	48	50	17
Корректно (%)	61	58	5
Не корректно (%)	38	41	94

Распределение корректно и некорректно классифицированных объектов по группам представлено на гистограммах (рисунок 15):



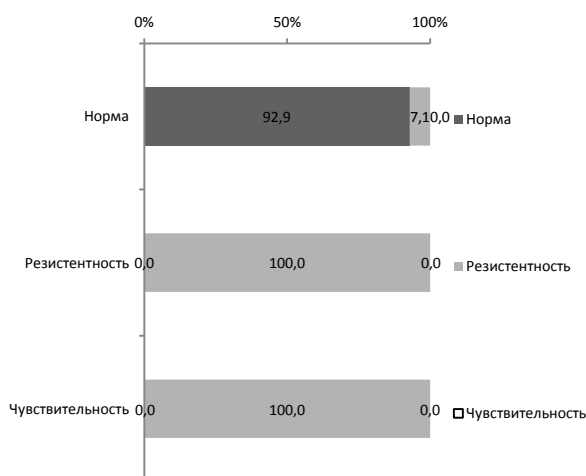
а) по данным бактериологического анализа

б) по данным анализа концентраций ЛЖК в кале

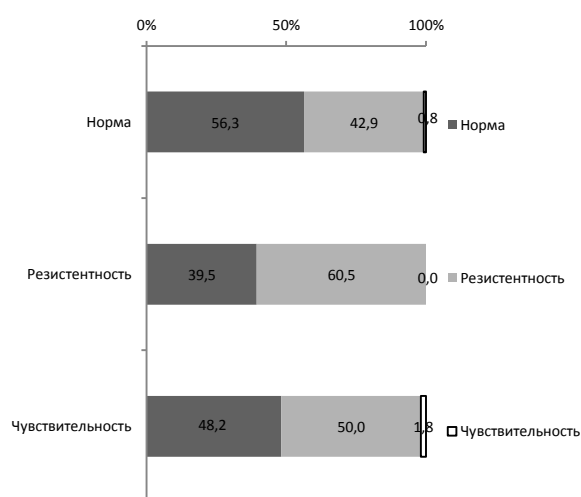
Рисунок 15 - Распределение результатов классификации анализов ИНС по группам чувствительных и резистентных к колипротейному бактериофагу.

Таблица 19 - Результаты классификации анализов ИНС по группам чувствительных и резистентных к стрептококковому бактериофагу на основании бактериологического анализа и анализа концентраций ЛЖК.

	Норма (N)	Резистентность (RSc)	Чувствительность (RSc)
ИНС MLP 61-32-3 – бактериологический анализ кала			
Всего	126	119	56
Корректно	117	119	0
Не корректно	9	0	56
Корректно (%)	92	100	0
Не корректно (%)	7	0	100
ИНС MLP 8-4-3 – анализ концентраций ЛЖК в кале			
Всего	126	119	56
Корректно	71	72	1
Не корректно	55	47	55
Корректно (%)	56	60	1
Не корректно (%)	43	39	98



а) по данным бактериологического анализа



б) по данным анализа концентраций ЛЖК в кале

Рисунок 16 - Распределение результатов классификации анализов ИНС по группам чувствительных и резистентных к стрептококковому бактериофагу.

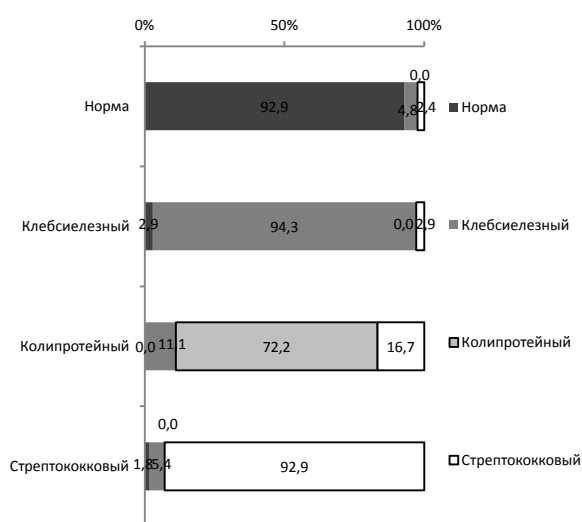
Из анализа доли корректной классификации результатов бактериологического анализа кала (таблица 19), можно отметить, что количество корректно классифицированных анализов больше для данных бактериологического анализа, чем для данных концентраций ЛЖК. Классификацией по данным бактериологического анализа ИНС MLP 59-12-3 не было определено микробиоценозов в группу с микроорганизмами чувствительными к стрептококковому бактериофагу, а анализы данной группы на 100% были ложно классифицированы как резистентные к стрептококковому бактериофагу. (рисунок 16а).

Классификацией по данным концентраций ЛЖК в кале ИНС MLP 8-12-3 были определены группы с низкими долями корректной классификации от 1,8% до 60,5% (рисунок 16б).

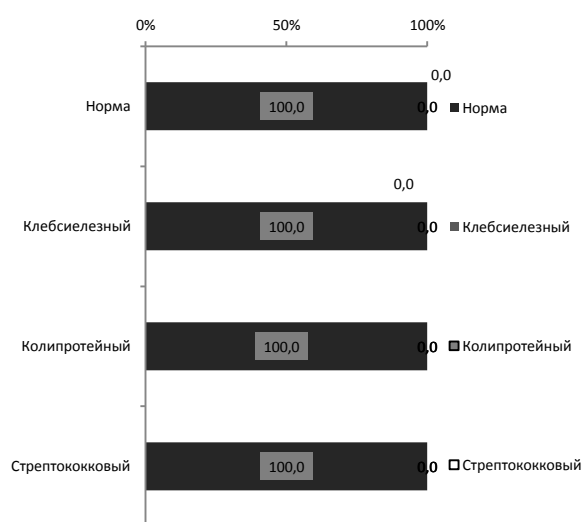
Результаты классификации объектов (результатов бактериологического анализа микрофлоры кишечника и концентраций ЛЖК в кале) для групп с чувствительными микроорганизмами (N, SKI, SKp, SSc) к различным бактериофагам и для групп с резистентными микроорганизмами (N, RKI, RKp, RSc) к различным бактериофагам представлены в таблицах (таблицы 20 - 21) и на рисунках (рисунки 17 - 18):

Таблица 20 - Результаты классификации анализов ИНС по группам чувствительных к различным бактериофагам на основании бактериологического анализа и анализа концентраций ЛЖК.

	N	SKI	SKp	SSc
ИНС MLP 63-15-4 – бактериологический анализ кала				
Всего	126	35	18	56
Корректно	117	33	13	52
Не корректно	9	2	5	4
Корректно (%)	92	94	72	92
Не корректно (%)	7	5	27	7
ИНС MLP MLP 8-10-4 – анализ концентраций ЛЖК в кале				
Всего	126	35	18	56
Корректно	126	0	0	0
Не корректно	0	35	18	56
Корректно (%)	100	0	0	0
Не корректно (%)	126	35	18	56



а) по данным бактериологического анализа



б) по данным анализа концентраций ЛЖК в кале

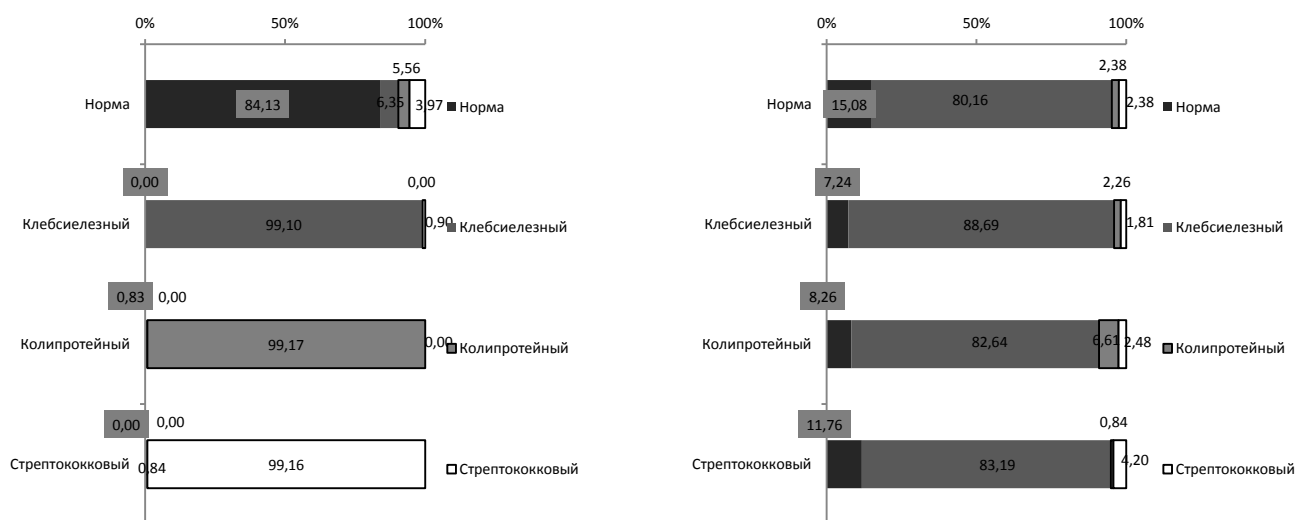
Рисунок 17 - Распределение результатов классификации анализов ИНС по группам чувствительных к различным бактериофагам.

Из анализа величин корректной классификации анализов с чувствительными микроорганизмами к различным бактериофагам (таблица 20) на основании данных по бактериологическому анализу и анализу концентраций ЛЖК можно отметить высокие величины от 72,2% до 94,3% для данных бактериологического анализа (рисунок 17а) и невозможность классификации ИНС MLP 8-10-4 по данным концентраций ЛЖК в кале (рисунок 17б). Таким образом, можно отметить, что появление в микробиоценозе микроорганизмов чувствительных к бактериофагам не влияет на метаболическую активность микробиоценоза кишечника. Для классификации ИНС MLP 63-15-4 по данным бактериологического анализа наиболее высокие значения корректной классификации в группе клебсиелёзного бактериофага, а наименьшие значения для группы колипротейного бактериофага.

Таблица 21 - Результаты классификации анализов ИНС по группам резистентных к различным бактериофагам на основании бактериологического анализа и анализа концентраций ЛЖК.

	N	RKl	RKp	RSc
ИНС MLP 66-22-4 – бактериологический анализ кала				
Всего	126	221	121	119
Корректно	106	219	120	118
Не корректно	20	2	1	1
Корректно (%)	84	99	99	99
Не корректно (%)	126	221	121	119
ИНС MLP 8-5-4 – анализ концентраций ЛЖК в кале				
Всего	126	221	121	119
Корректно	19	196	8	5
Не корректно	107	25	113	114
Корректно (%)	15	88	6	4
Не корректно (%)	84	11	93	95

Из анализа величин корректной классификации анализов с резистентными микроорганизмами к различным бактериофагам (таблица 21) на основании данных по бактериологическому анализу и анализу концентраций ЛЖК можно отметить высокие значения корректной классификации ИНС MLP 66-22-4 — от 84% до 99% для данных бактериологического анализа и низкие ИНС MLP 8-5-4 — от 4% до 88% для данных концентраций ЛЖК. Из гистограмм (рисунок 18) видно, что по данным концентраций ЛЖК в кале невозможно классифицировать микробиоценозы по наличию резистентных микроорганизмов в микробиоценозе кишечника (рисунок 18б). Для классификации ИНС MLP 63-15-4 по данным бактериологического анализа (рисунок 18а) наиболее высокие значения корректной классификации в группе колипротейного бактериофага, а наименьшие значения для группы клебсиелёзного бактериофага.



а) по данным бактериологического анализа

б) по данным анализа концентраций ЛЖК в кале

Рисунок 18 - Распределение результатов классификации анализов ИНС по группам резистентных к различным бактериофагам.

Из анализа доли корректной классификации результатов бактериологического анализа кала, можно отметить, что количество корректно классифицированных анализов больше для данных бактериологического анализа, чем для данных концентраций ЛЖК. Это объясняется тем, что фагорезистентность микроорганизмов в большей степени влияет на состав микрофлоры выделяемой из кала, чем на функциональную активность микробиоценоза. Так же отмечаются низкие значения количеств корректно классифицированных анализов для групп с микроорганизмами чувствительными к бактериофагам, чем для групп с резистентными микроорганизмами. При ложной классификации результатов анализов группы с чувствительными к бактериофагам микроорганизмами ИНС классифицирует их как принадлежащими к группе резистентных к бактериофагам микроорганизмов. Таким образом, прослеживается влияние на классификацию присутствие самого микроорганизма, для которого определялась фагорезистентность.

В результате проведенного исследования установлено следующее.

При выборе данных для классификации микробиоценозов в зависимости от наличия микрофлоры чувствительной или резистентной к различным бактериофагам искусственными нейросетями следует отдать предпочтение данным бактериологического анализа кала перед анализом концентраций ЛЖК в кале. Проведенное исследование показало более высокие значения корректной классификации искусственными нейронными сетями в различных комбинациях исследуемых групп.

Для групп с микроорганизмами чувствительными к бактериофагам значения корректной классификации ИНС ниже, чем для групп с резистентными микроорганизмами к различным

бактериофагам. Состав микробиоценозов кишечника имеет больше особенностей, выявляемых искусственными нейросетями, в присутствии микроорганизмов резистентных к различным бактериофагам.

При сравнении значений корректной классификации микробиоценозов с чувствительными к различным бактериофагам микроорганизмами значения увеличиваются в ряду колипротейный – стрептококковый – клебсиелезный бактериофаг, а для резистентных микроорганизмов к бактериофагам — увеличиваются в ряду клебсиелёзный – стрептококковый – колипротейный.

Вероятность ложной классификации для классификации микробиоценозов с микроорганизмами резистентными к различным бактериофагам менее 1%, что позволяет использовать данную искусственную нейросеть для корректной классификации микробиоценозов по заданному признаку.

2.4. Критерии метаболической активности микрофлоры кишечника

Для определения критериев метаболической активности микрофлоры кишечника оценим изменчивость концентраций летучих жирных кислот в группе норма в базе данных пациентов консультационно-диагностического центра при МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского. Исследуем изменения концентраций летучих жирных кислот в кале в зависимости от возраста пациентов. Для этого оценим линейные тренды медианных значений концентраций летучих жирных кислот и их интерквартильных размахов (Рисунок 19 - 22). Для каждого графика выполнена линейная аппроксимация и представлены уравнения регрессии с величиной достоверности аппроксимации R^2 .

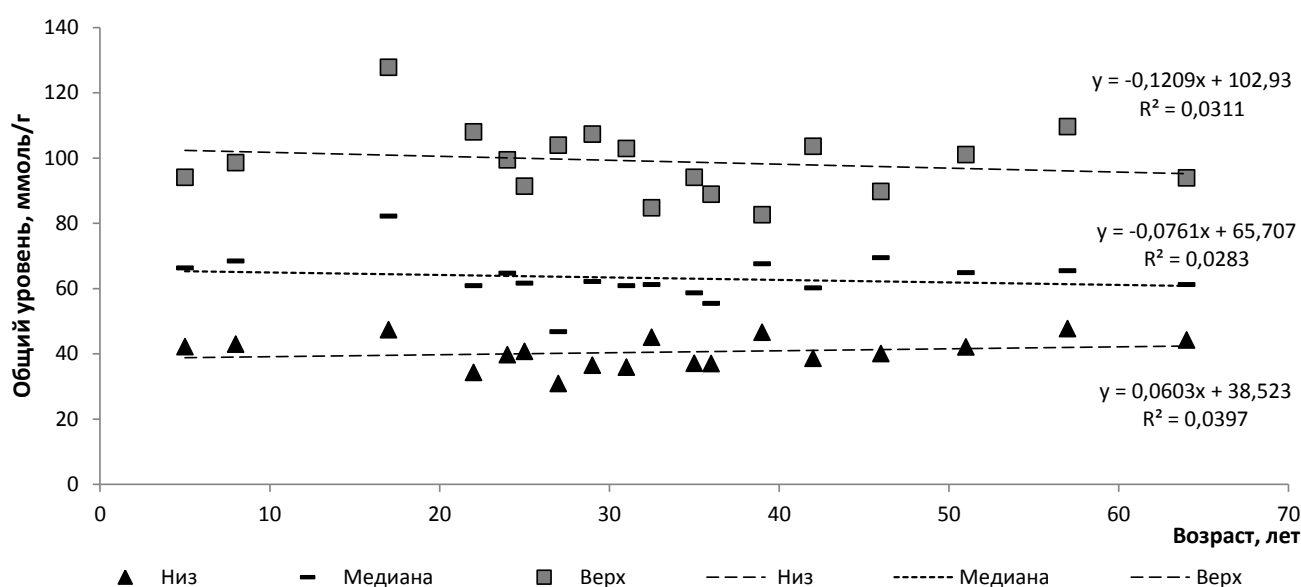


Рисунок19 - Зависимость медианы суммарной концентрации ЛЖК от возраста с интерквантильным размахом.

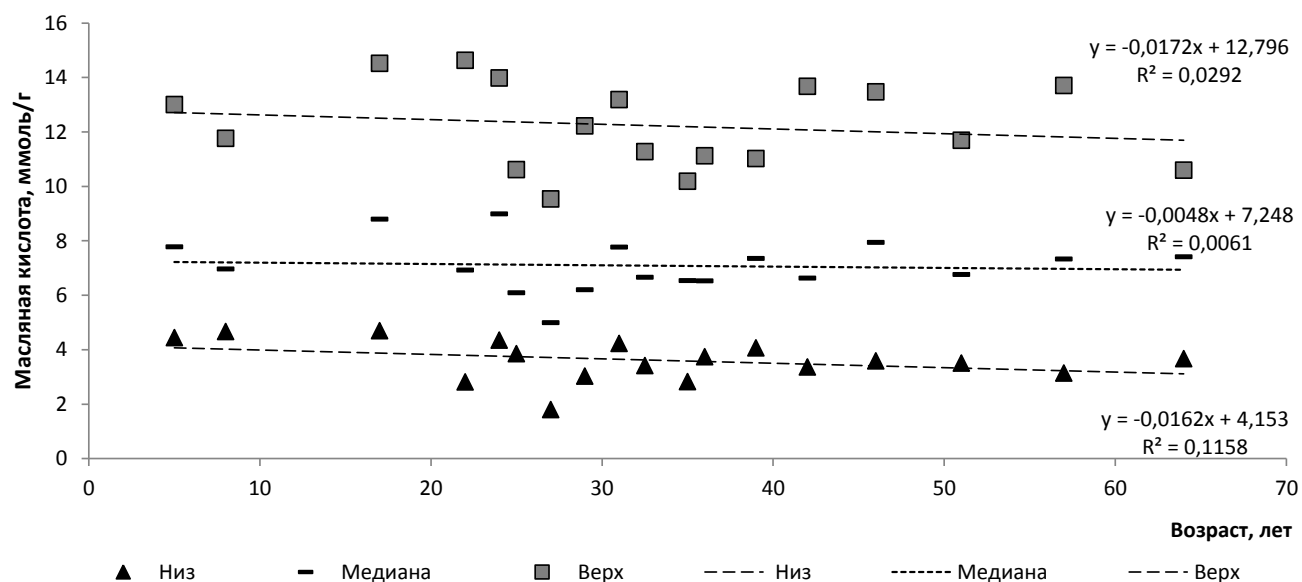


Рисунок 20 - Зависимость медианы концентрации масляной кислоты от возраста с интерквантильным размахом.

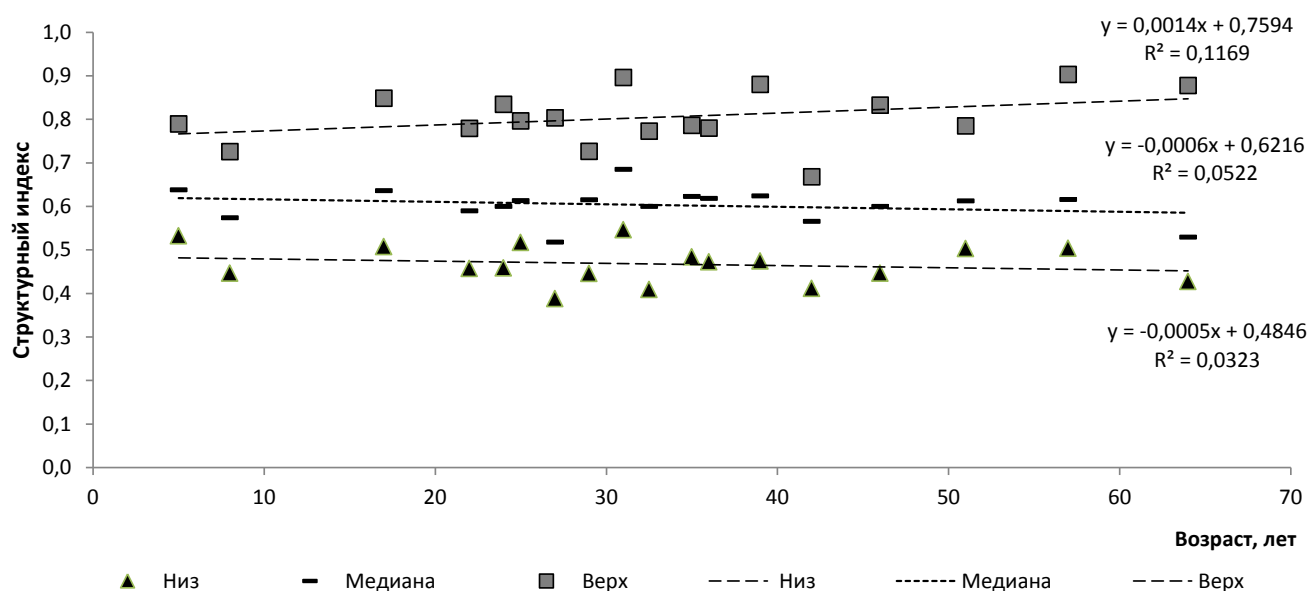
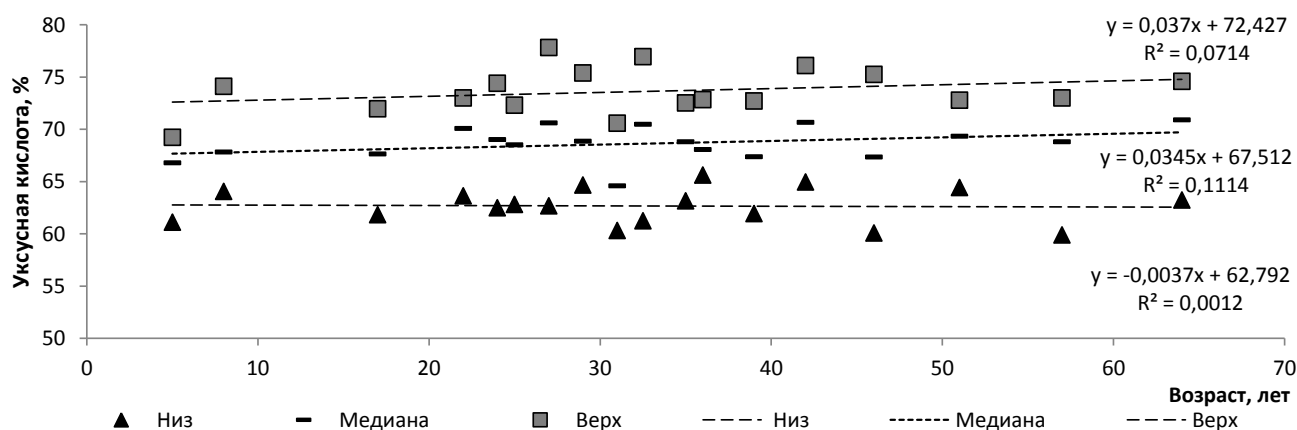
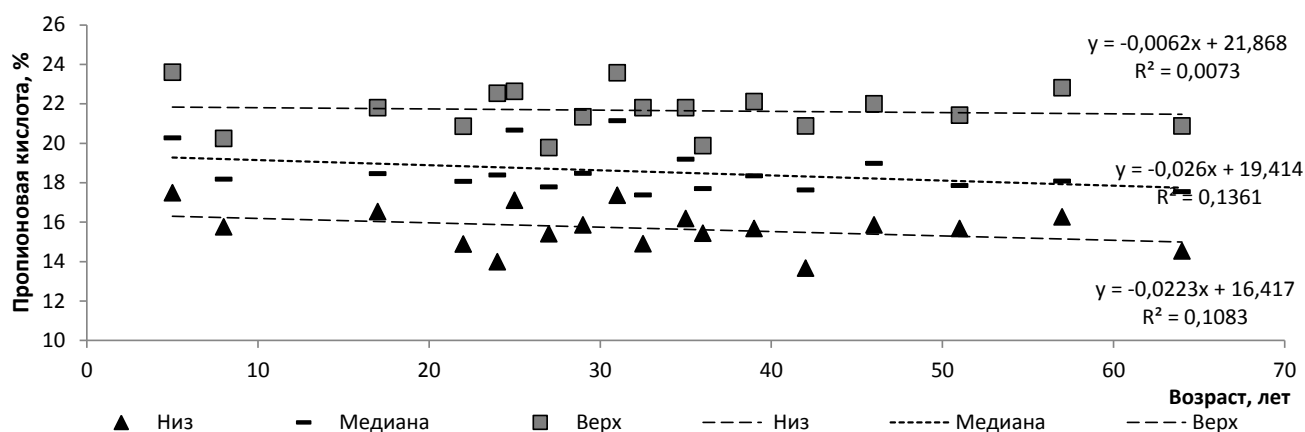


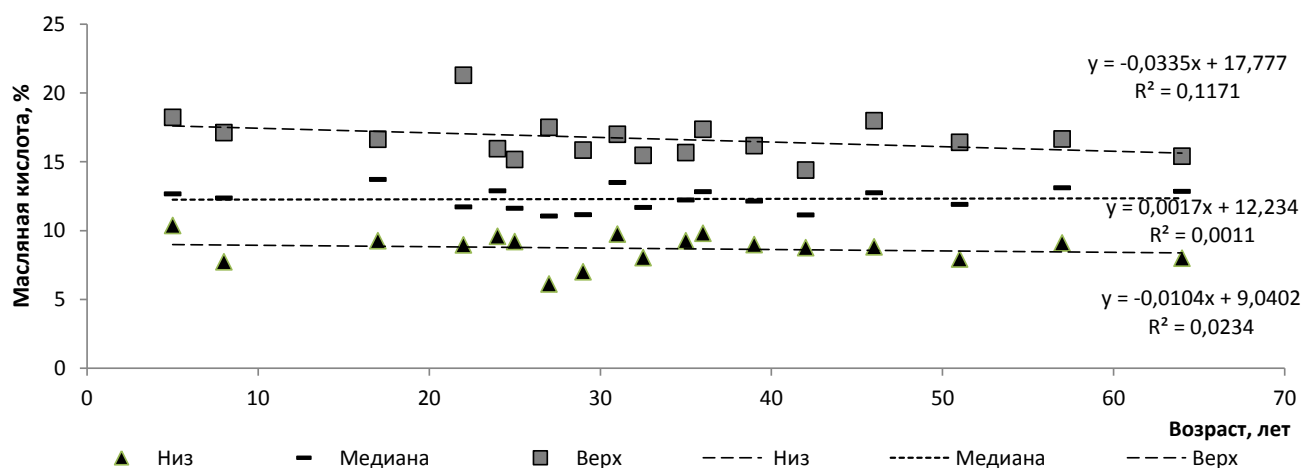
Рисунок 21 - Зависимость медианы структурного индекса от возраста с интерквантильным размахом



а) доля уксусной кислоты



б) доля пропионовой кислоты



в) доля масляной кислоты

Рисунок 22 - Зависимость медианы доли а) уксусной; б) пропионовой и в) масляной кислоты в соотношении этих кислот от возраста с интерквартильным размахом.

На графиках (рисунки 19 - 22) показано, что тангенс угла наклона – множитель x близок к нулю, следовательно, угол наклона так же близок к нулю, что позволяет говорить о стабильных значениях показателей для всего интервала возрастов. Таким образом, средние

значения медиан и интерквартильного размаха могут быть предложены как показатели метаболического паспорта и представлены в таблице 22.

Таблица 22 - Метаболический паспорт здорового человека.

№	Наименование показателя	Обозначение	Среднее значение	Интерквартильный размах	
				Нижнее значение	Верхнее значение
1.	Общий уровень ЛЖК, ммоль/г.	ОУ	65,7	38,5	102,9
2.	Масляная кислота, ммоль/г	С4	7,2	4,2	12,8
3.	Уксусная кислота, %	С2%	67,5	62,8	72,4
4.	Пропионовая кислота, %	С3%	19,4	16,4	21,9
5.	Масляная кислота, %	С4%	12,2	9,0	17,8
6.	Доля протеолитических ЛЖК, %	С4+иС5%	4,5	3,4	6,1
7.	Структурный индекс	СИ	0,62	0,48	0,76
8.	Доля уксусной кислоты	pC2	0,62	0,57	0,67
9.	Доля пропионовой кислоты	pC3	0,17	0,15	0,20
10.	Доля изомасляной кислоты	piC4	0,019	0,013	0,035
11.	Доля масляной кислоты	pC4	0,11	0,08	0,16
12.	Доля изовалериановой кислоты	piC5	0,032	0,021	0,042
13.	Доля валериановой кислоты	pC5	0,020	0,015	0,025
14.	Доля изокапроновой кислоты	piC6	0,0002	0,00001	0,0002
15.	Доля капроновой кислоты	pC6	0,0002	0,0001	0,0011

Оценим влияние избытка неперваренного субстрата на метаболическую активность микрофлоры кишечника. Для этого сравним средние значения концентраций летучих жирных кислот и их производных в подгруппах с нарушениями ферментного пищеварения и оценим достоверность их различий с группой норма. Результаты сравнения концентраций ЛЖК в подгруппах с нарушениями ферментного пищеварения по типу амилорея, креаторея и статорея представлены в таблице 23.

Таблица 23 - Концентрации ЛЖК и их производных при различных копросиндромах

Метаболит	Концентрации ЛЖК, ммоль/г				Достоверность от нормы		
	Норма	Амилорея	Стеаторея	Креаторея	Амилорея	Стеаторея	Креаторея
Уксусная кислота	39,61	59,49	54,57	52,69	p<0,001	0,002	0,092
Пропионовая кислота	10,75	15,49	15,35	16,45	p<0,001	0,003	0,183
Изомасляная кислота	1,77	1,61	2,16	1,77	p<0,001	0,011	0,016
Масляная кислота	6,94	14,92	14,92	14,35	p<0,001	0,004	0,043
Изовалериановая кислота	1,99	1,51	2,54	2,06	0,002	0,003	0,022
Валериановая кислота	1,28	1,50	1,80	1,78	p<0,001	0,049	p<0,001
Изокапроновая кислота	0,01	0,01	0,01	0,01	0,036	0,179	0,212
Капроновая кислота	0,01	0,01	0,01	0,01	0,041	0,170	0,003
Общий уровень ЛЖК	61,87	97,49	93,19	92,21	p<0,001	0,003	0,113
Структурный индекс	0,61	0,62	0,73	0,71	p<0,001	p<0,001	p<0,001

Таблица 23 - Концентрации ЛЖК и их производных при различных копросиндромах

Метаболит	Концентрации ЛЖК, ммоль/г				Достоверность от нормы		
	Норма	Амилорея	Стеаторея	Креаторея	Амилорея	Стеаторея	Креаторея
Индекс изокислот	0,49	0,19	0,31	0,29	<i>p<0,001</i>	0,959	0,625
Доля уксусной кислоты, %	68,80	65,18	61,60	64,54	0,036	0,696	0,751
Доля пропионовой кислоты, %	18,27	18,15	20,11	21,00	0,024	0,019	<i>p<0,001</i>
Доля масляной кислоты, %	12,29	16,40	15,87	15,21	<i>p<0,001</i>	<i>p<0,001</i>	<i>p<0,001</i>
Доля изомасляной и валериановой кислот, %	4,88	3,20	5,06	4,47	0,345	0,195	0,004

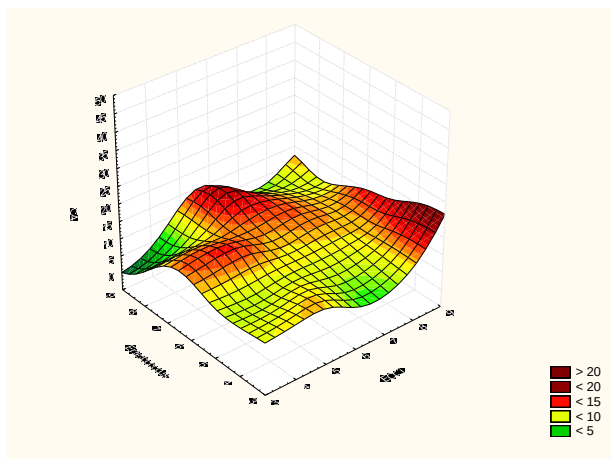
Достоверные отличия указаны **полужирным курсивом**.

В таблице 23 показано, что концентрации ЛЖК при избытке непереваренных субстратов увеличиваются. При ферментативном нарушении переваривания углеводов (амилорея) увеличивается доля уксусной и масляной кислот, а доля пропионовой кислоты снижается. При избытке жиров (стеаторея) и белков (креаторея) доля уксусной кислоты не увеличивается, а доля пропионовой и масляной кислот увеличивается. Избыток углеводов стимулирует рост сахаролитической микрофлоры, поэтому структурный индекс увеличивается на меньшую величину, чем в группах стеаторея и креаторея, а индекс изокислот достоверно снижен.

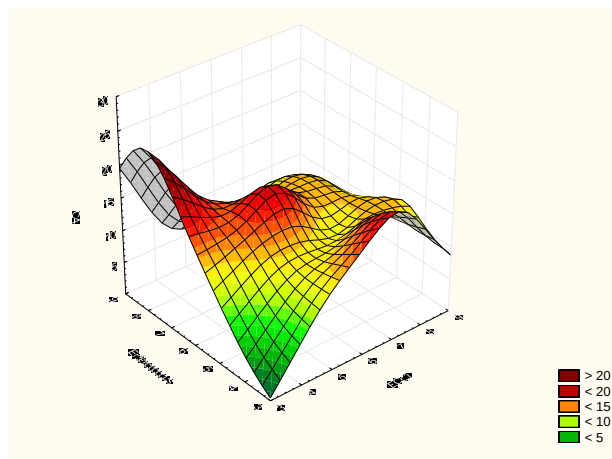
Для оценки изменчивости концентраций ЛЖК в кале в зависимости от количества микроорганизмов выделенных при бактериологическом анализе кала рассмотрим функции их зависимости (рисунки 23 - 29).

Из графиков (рисунок 23) видно, что изменения концентрации масляной кислоты в координатах *Escherichia coli* — *Enterococcus spp.* не имеет ярко выраженных экстремумов (рисунок 23а). Снижение концентрации масляной кислоты происходит при одновременном снижении количества *Enterococcus spp.* и *Escherichia coli* в группах амилорея (рисунок 23б), стеаторея (рисунок 23в). Снижение концентрации масляной кислоты происходит при низких концентрациях *Escherichia coli* и при повышении концентрации *Enterococcus spp.*.

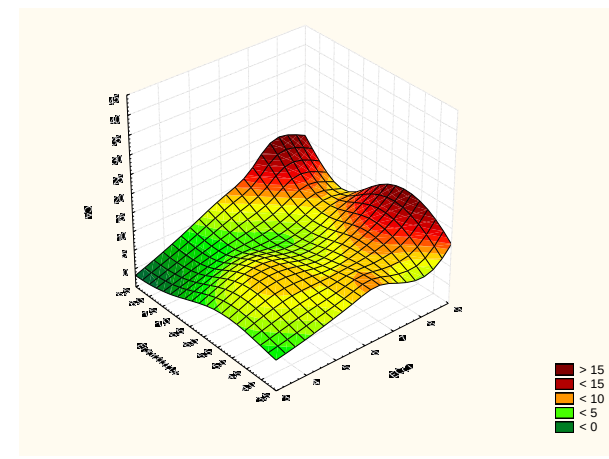
В области значений низких концентраций клебсиеллы (рисунок 23г) повышенная концентрация масляной кислоты наблюдается при низких и высоких концентрациях *Escherichia coli*, при высоких концентрациях *Klebsiella spp.* концентрация масляной кислоты снижается в этих областях. В группе амилорея (рисунок 23д) снижение масляной кислоты наблюдается при снижении одновременно *Klebsiella spp.* и *Escherichia coli* и при высоких концентрациях *Escherichia coli* и низких концентрациях *Klebsiella spp.*. В группе стеаторея (рисунок 23е) снижение масляной кислоты связано со снижением концентрации *Escherichia coli* и *Klebsiella spp.*.



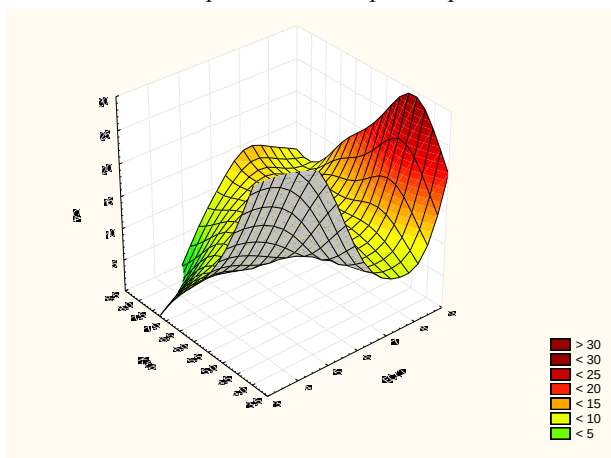
а) Изменения концентрации масляной кислоты в координатах интенсивности обсемененности *Enterococcus* spp. – *Escherichia coli* для нормального копросиндрома



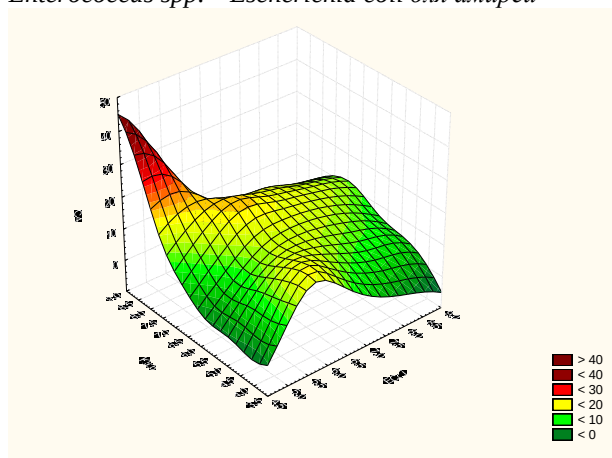
б) Изменения концентрации масляной кислоты в координатах интенсивности обсемененности *Enterococcus* spp. – *Escherichia coli* для амуреи



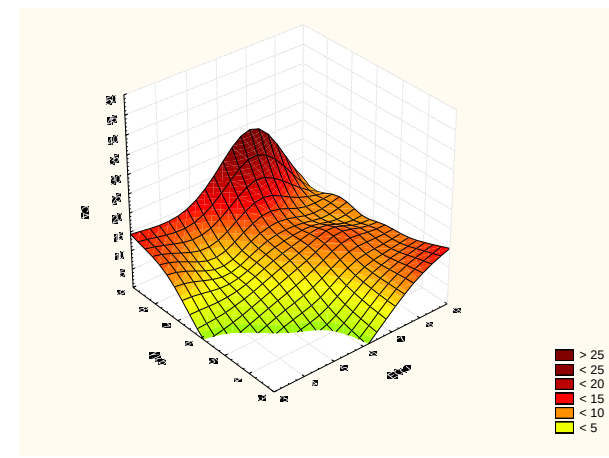
в) Изменения концентрации масляной кислоты в координатах интенсивности обсемененности *Enterococcus* spp. – *Escherichia coli* для стеареи



г) Изменения концентрации масляной кислоты в координатах интенсивности обсемененности *Klebsiella* spp. – *Escherichia coli* для нормального копросиндрома

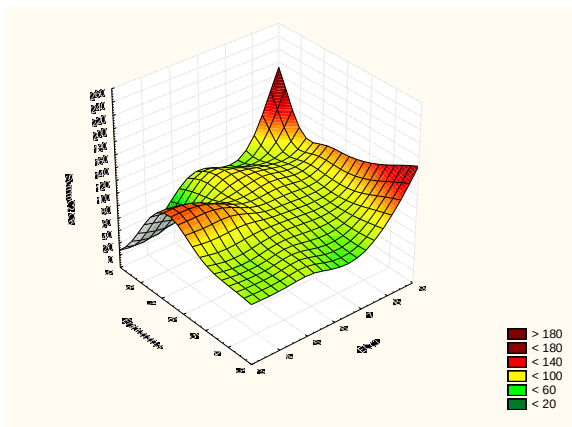


д) Изменения концентрации масляной кислоты в координатах интенсивности обсемененности *Klebsiella* spp. – *Escherichia coli* для амуреи

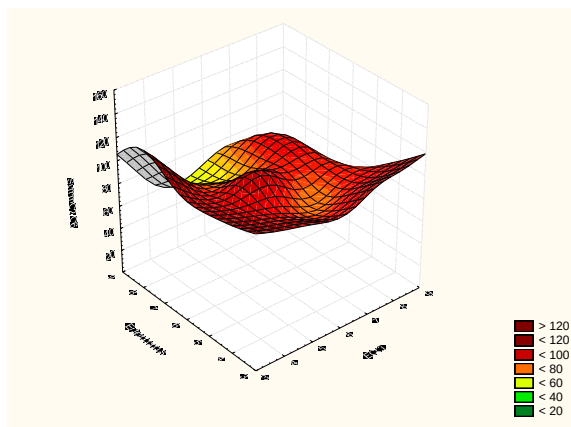


е) Изменения концентрации масляной кислоты в координатах интенсивности обсемененности *Klebsiella* spp. – *Escherichia coli* для стеареи

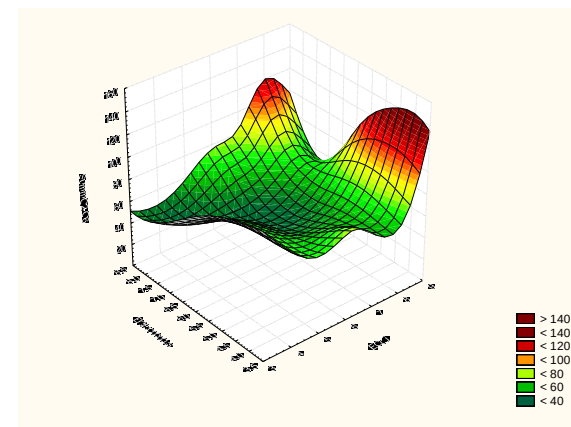
Рисунок 23 - Изменение концентраций масляной кислоты в кале в зависимости от концентраций *Escherichia coli* и *Enterococcus* spp., *Escherichia coli* и *Klebsiella* spp. при различных копрологических синдромах.



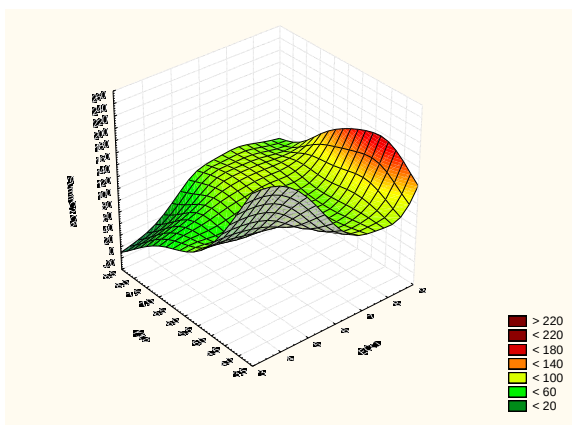
а) Изменения суммарной концентрации ЛЖК в координатах интенсивности обсемененности *Enterococcus* spp. – *Escherichia coli* для нормального копросиндрома



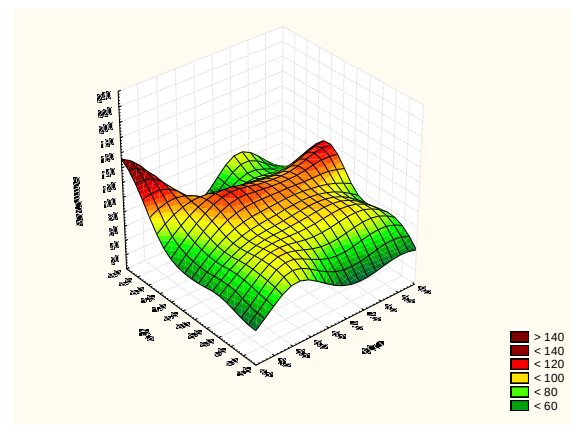
б) Изменения суммарной концентрации ЛЖК в координатах интенсивности обсемененности *Enterococcus* spp. – *Escherichia coli* для амуреи



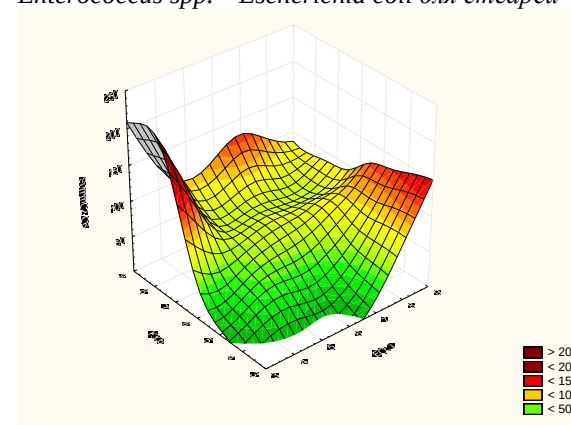
в) Изменения суммарной концентрации ЛЖК в координатах интенсивности обсемененности *Enterococcus* spp. – *Escherichia coli* для стеареи



г) Изменения суммарной концентрации ЛЖК в координатах интенсивности обсемененности *Klebsiella* spp. – *Escherichia coli* для нормального копросиндрома

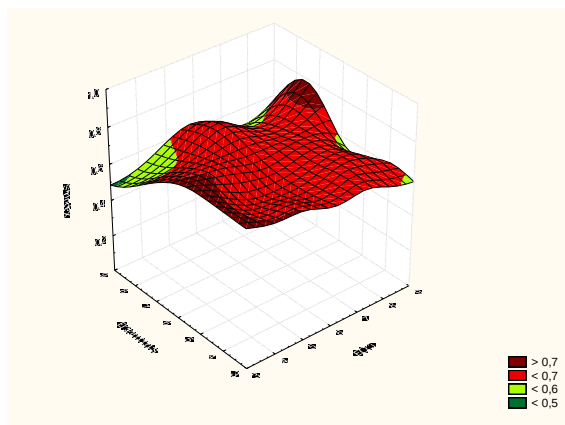


д) Изменения суммарной концентрации ЛЖК в координатах интенсивности обсемененности *Klebsiella* spp. – *Escherichia coli* для амуреи

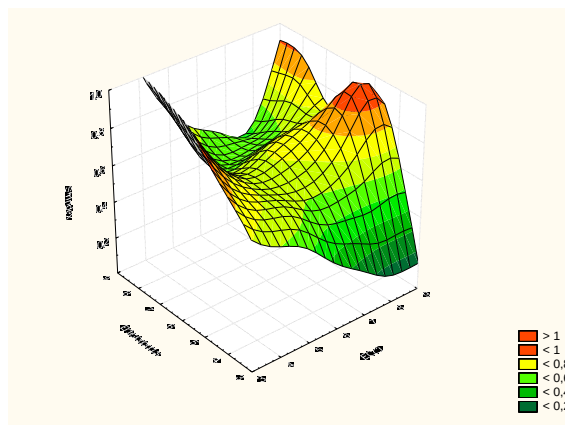


е) Изменения суммарной концентрации ЛЖК в координатах интенсивности обсемененности *Klebsiella* spp. – *Escherichia coli* для стеареи

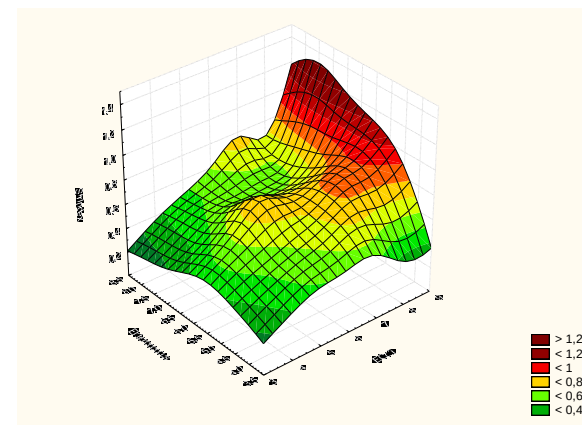
Рисунок 24 - Изменение суммарной концентрации ЛЖК в кале в зависимости от концентраций *Escherichia coli* и *Enterococcus* spp., *Escherichia coli* и *Klebsiella* spp. при различных копрологических синдромах.



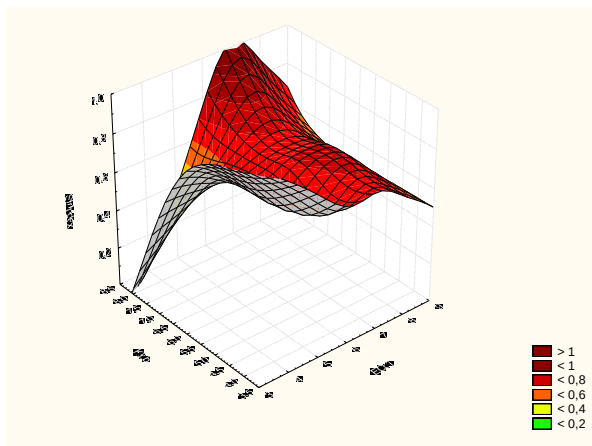
а) Изменения структурного индекса в координатах интенсивности обсемененности *Enterococcus spp.* – *Escherichia coli* для нормального копросиндрома



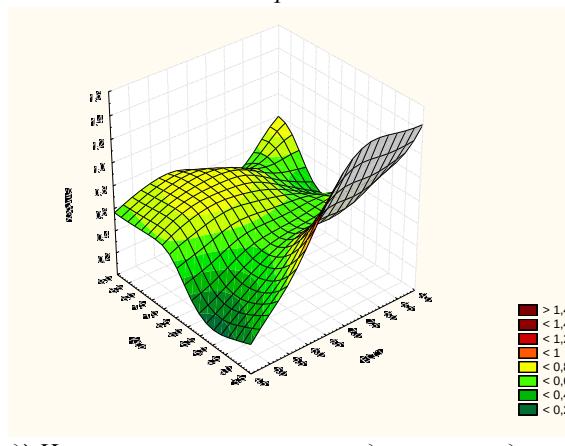
б) Изменения структурного индекса в координатах интенсивности обсемененности *Enterococcus spp.* – *Escherichia coli* для амуреи



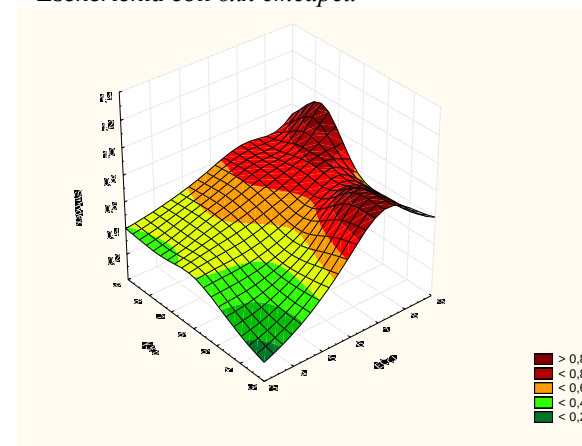
в) Изменения структурного индекса в координатах интенсивности обсемененности *Enterococcus spp.* – *Escherichia coli* для стеареу



г) Изменения структурного индекса в координатах интенсивности обсемененности *Klebsiella spp.* – *Escherichia coli* для нормального копросиндрома

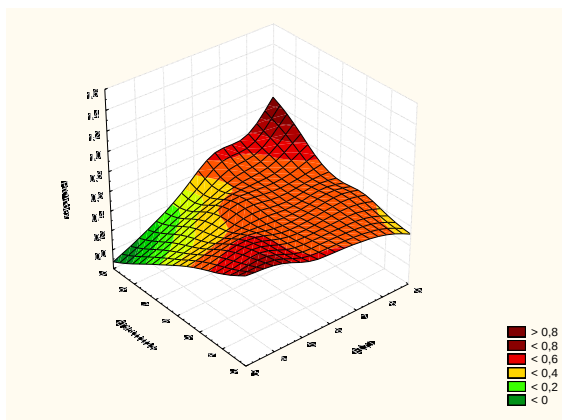


д) Изменения структурного индекса в координатах интенсивности обсемененности *Klebsiella spp.* – *Escherichia coli* палочка для амуреи

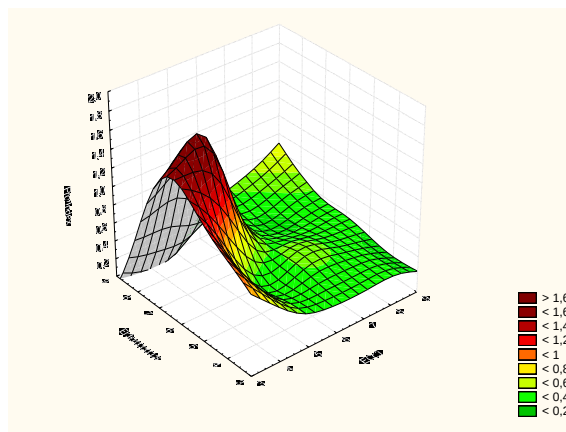


е) Изменения структурного индекса в координатах интенсивности обсемененности *Klebsiella spp.* – *Escherichia coli* для стеареу

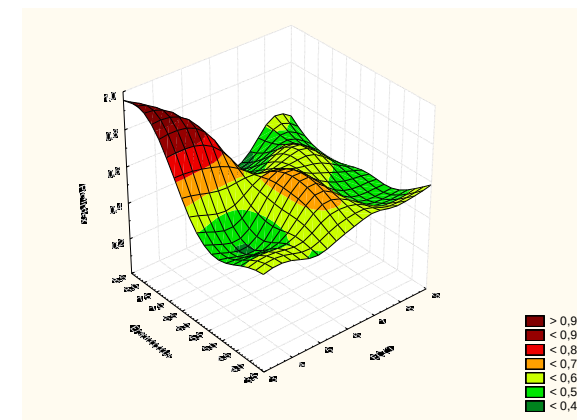
Рисунок 25 - Изменение структурного индекса в зависимости от концентраций *Escherichia coli* и *Enterococcus spp.*, *Escherichia coli* и *Klebsiella spp.* при различных копрологических синдромах



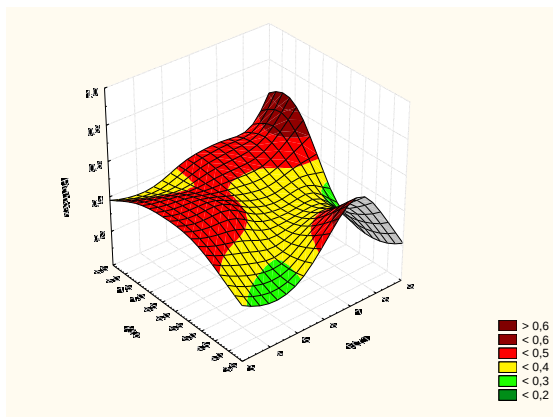
а) Изменения индекса изокислот в координатах интенсивности обсемененности *Enterococcus* spp. – *Escherichia coli* для нормального копросиндрома



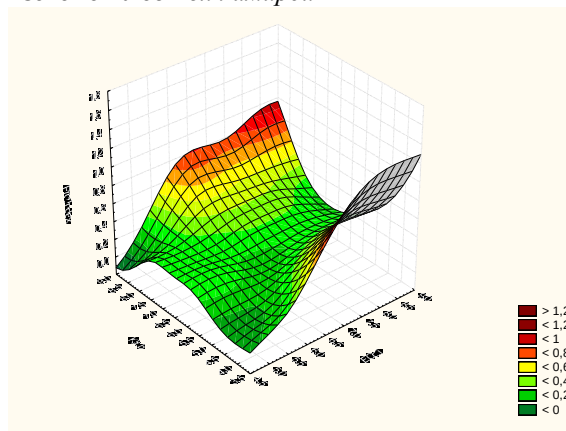
б) Изменения индекса изокислот в координатах интенсивности обсемененности *Enterococcus* spp. – *Escherichia coli* для амиреу



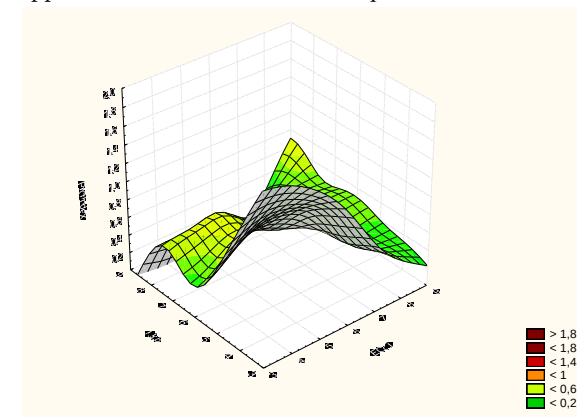
в) Изменения индекса изокислот в координатах интенсивности обсемененности *Enterococcus* spp. – *Escherichia coli* для стеареу



г) Изменения индекса изокислот в координатах интенсивности обсемененности *Klebsiella* spp. – *Escherichia coli* для нормального копросиндрома

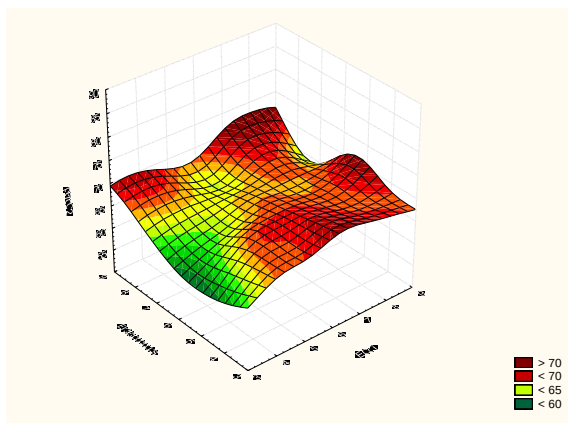


д) Изменения индекса изокислот в координатах интенсивности обсемененности *Klebsiella* spp. – *Escherichia coli* для амиреу

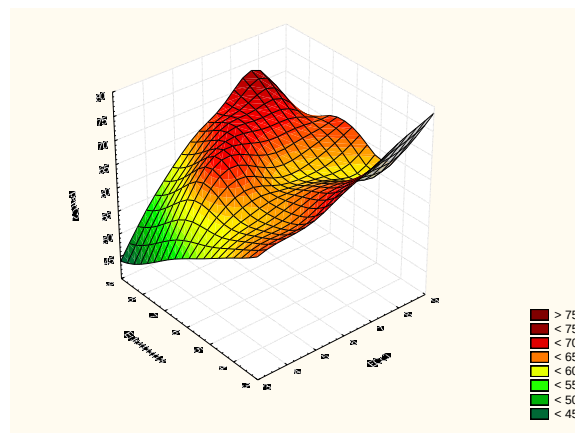


е) Изменения индекса изокислот в координатах интенсивности обсемененности *Klebsiella* spp. – *Escherichia coli* для стеареу

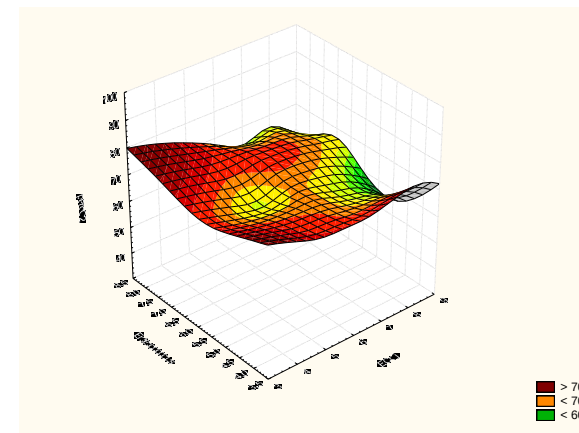
Рисунок 26 - Изменение индекса изокислот в зависимости от концентраций *Escherichia coli* и *Enterococcus* spp., *Escherichia coli* и *Klebsiella* spp. при различных копрологических синдромах



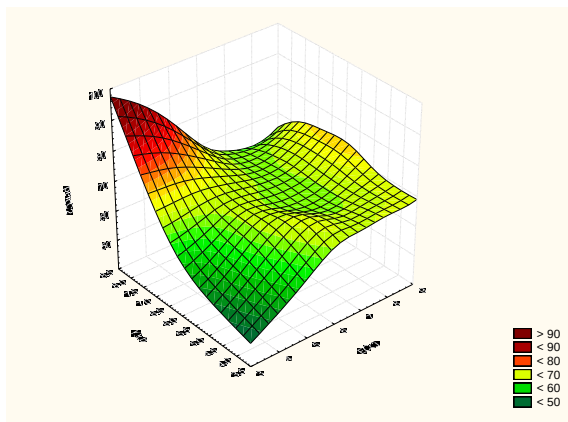
а) Изменения доли уксусной кислоты в координатах интенсивности обсемененности *Enterococcus* spp. – *Escherichia coli* для нормального копросиндрома



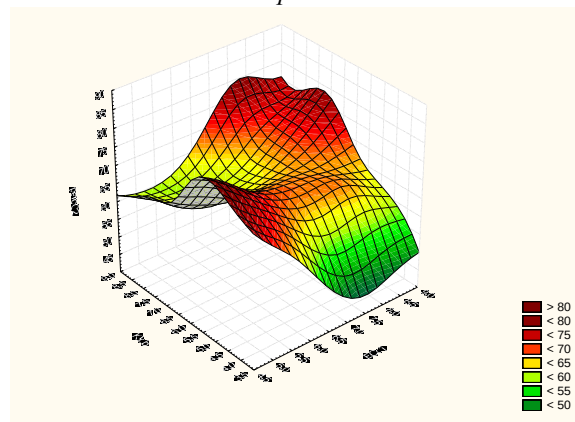
б) Изменения доли уксусной кислоты в координатах интенсивности обсемененности *Enterococcus* spp. – *Escherichia coli* для амуреи



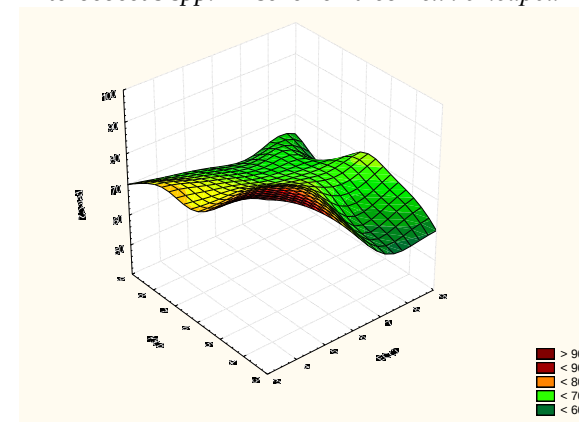
в) Изменения доли уксусной кислоты в координатах интенсивности обсемененности *Enterococcus* spp. – *Escherichia coli* для стеареи



г) Изменения доли уксусной кислоты в координатах интенсивности обсемененности *Klebsiella* spp. – *Escherichia coli* для нормального копросиндрома

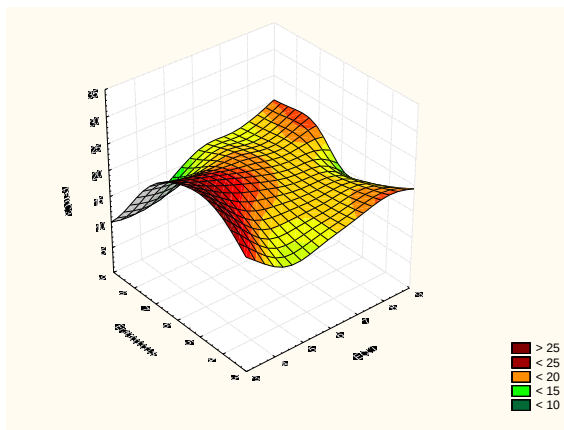


д) Изменения доли уксусной кислоты в координатах интенсивности обсемененности *Klebsiella* spp. – *Escherichia coli* для амуреи

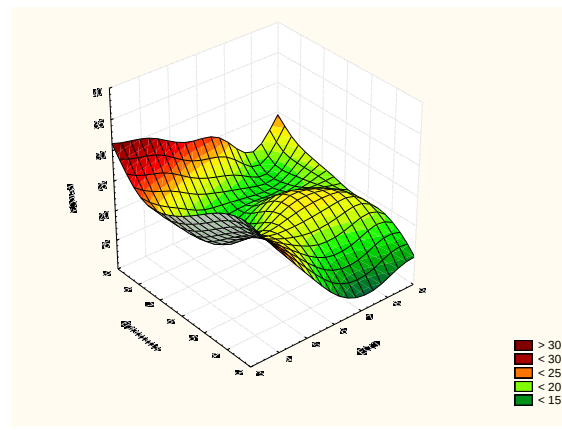


е) Изменения доли уксусной кислоты в координатах интенсивности обсемененности *Klebsiella* spp. – *Escherichia coli* для стеареи

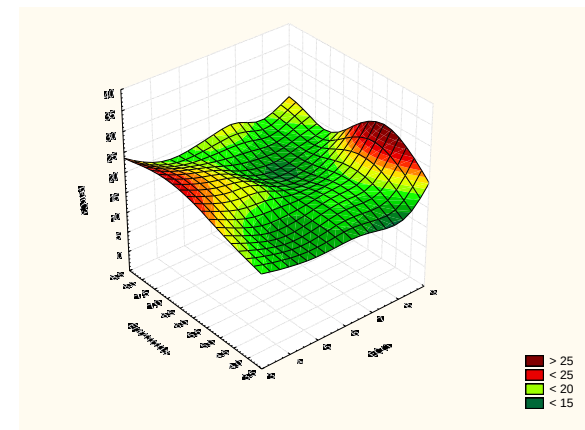
Рисунок 27 - Изменение доли уксусной кислоты в зависимости от концентраций *Escherichia coli* и *Enterococcus* spp., *Escherichia coli* и *Klebsiella* spp. при различных копрологических синдромах



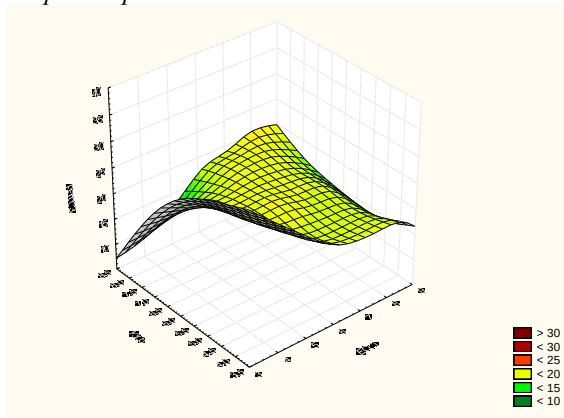
а) Изменения доли пропионовой кислоты в координатах интенсивности обсемененности *Enterococcus spp.* – *Escherichia coli* для нормального копросиндрома



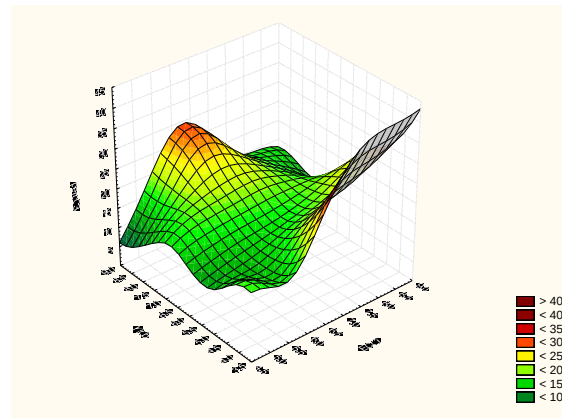
б) Изменения доли пропионовой кислоты в координатах интенсивности обсемененности *Enterococcus spp.* – *Escherichia coli* для амиреи



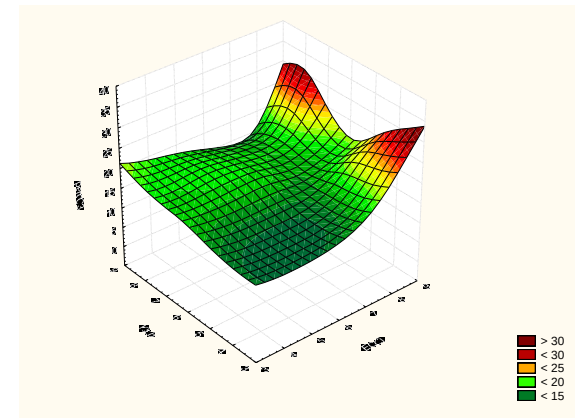
в) Изменения доли пропионовой кислоты в координатах интенсивности обсемененности *Enterococcus spp.* – *Escherichia coli* для стеареи



г) Изменения доли пропионовой кислоты в координатах интенсивности обсемененности *Klebsiella spp.* – *Escherichia coli* для нормального копросиндрома

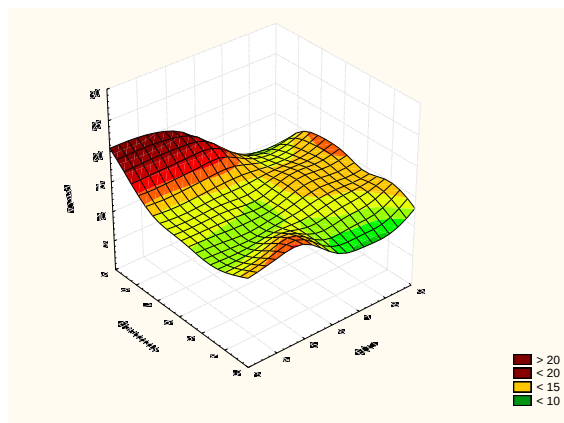


д) Изменения доли пропионовой кислоты в координатах интенсивности обсемененности *Klebsiella spp.* – *Escherichia coli* для амиреи

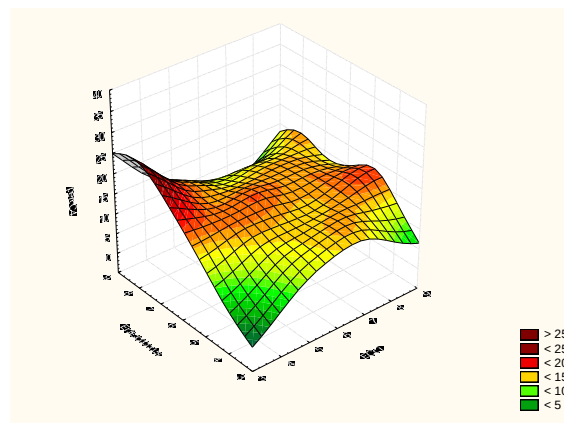


е) Изменения доли пропионовой кислоты в координатах интенсивности обсемененности *Klebsiella spp.* – *Escherichia coli* для стеареи

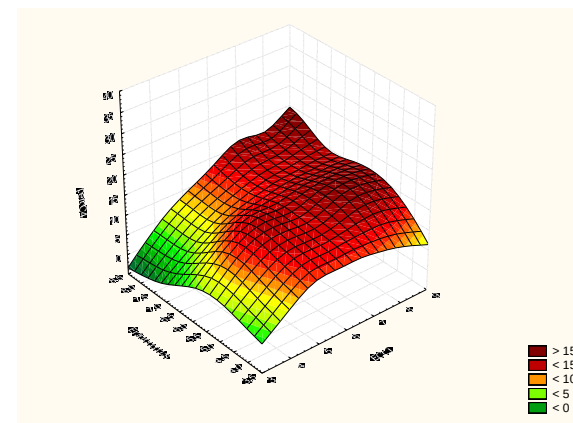
Рисунок 28 - Изменение доли пропионовой кислоты в зависимости от концентраций *Escherichia coli* и *Enterococcus spp.*, *Escherichia coli* и *Klebsiella spp.* при различных копрологических синдромах



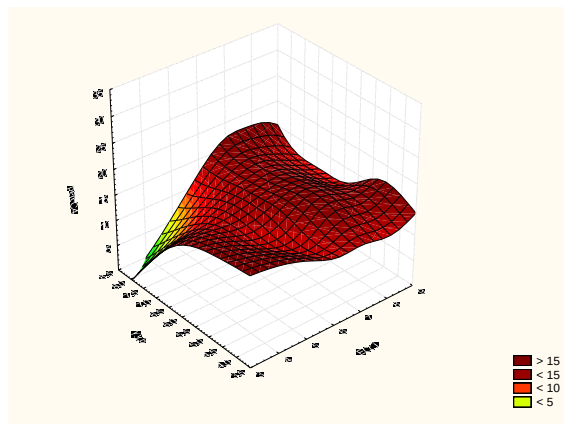
а) Изменения доли масляной кислоты в координатах интенсивности обсемененности *Enterococcus* spp. – *Escherichia coli* для нормального копросиндрома



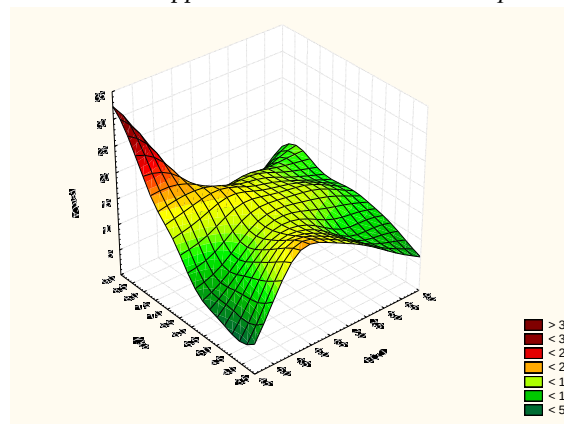
б) Изменения доли масляной кислоты в координатах интенсивности обсемененности *Enterococcus* spp. – *Escherichia coli* для амуреи



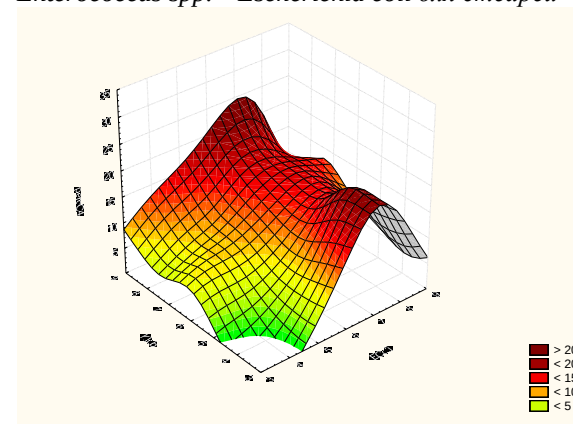
в) Изменения доли масляной кислоты в координатах интенсивности обсемененности *Enterococcus* spp. – *Escherichia coli* для стеареи



г) Изменения доли масляной кислоты в координатах интенсивности обсемененности *Klebsiella* spp. – *Escherichia coli* для нормального копросиндрома



д) Изменения доли масляной кислоты в координатах интенсивности обсемененности *Klebsiella* spp. – *Escherichia coli* для амуреи



е) Изменения доли масляной кислоты в координатах интенсивности обсемененности *Klebsiella* spp. – *Escherichia coli* для стеареи

Рисунок 29 - Изменение доли масляной кислоты в зависимости от концентраций *Escherichia coli* и *Enterococcus* spp., *Escherichia coli* и *Klebsiella* spp. при различных копрологических синдромах

Концентрация масляной кислоты очень изменчива и разнонаправлена, что не даёт возможности определить универсальную функцию, которая описывала бы влияние нескольких факторов на ее концентрацию.

Сравнение концентрации масляной кислоты и суммарного уровня ЛЖК (рисунок 24 а,з) в тех же координатах при одинаковых нарушениях ферментативного пищеварения (рисунок 24 в,д,е) дает основание заключить, что за исключением поведения в координатах *Enterococcus spp.* – *Escherichia coli* при амилорее (рисунок 24б), графики показывают пропорциональные функции.

Изменение концентрации масляной кислоты связано с концентрациями уксусной и пропионовой кислот, что показывает сохраненность пропорций между кислотами. Снижение концентрации масляной кислоты при амилорее, не связанное со снижением общего уровня кислот говорит об изменении структуры микробиоценоза при одновременном снижении *Enterococcus spp.* и *Escherichia coli*.

Снижение структурного индекса коррелирует с увеличением доли уксусной кислоты и увеличением активности аэробной микрофлоры (рисунок 25, рисунок 27). Наиболее существенное снижение структурного индекса отмечается в группах амилорея (рисунок 25 б,д) и стеаторея (рисунок 25 в,з). В группе с нормальной копрологией (рисунок 25 а,з) снижение структурного индекса наблюдается в области низких концентраций *Enterococcus spp.* и в области высоких концентраций *Klebsiella spp.*. В группе амилорея (рисунок 25 б,д) снижение структурного индекса наблюдается в области высоких концентраций *Escherichia coli* и в области низких концентраций *Enterococcus spp.*, а так же в поле низких концентраций кишечной палочки и *Klebsiella spp.*. Поведение функции структурного индекса в группе стеаторея (рисунок 25 в,з) указывает на доминирующую прямую зависимость от концентрации *Escherichia coli* и слабую зависимость от концентрации *Enterococcus spp.* и *Klebsiella spp.*. Изменение концентрации кишечной палочки пропорционально связано с концентрациями летучих жирных кислот в группе стеаторея.

При переваривании белков происходит деградация аминных групп с образованием изоформ кислот. Отношение суммы изоформ к линейным формам кислот характеризует протеолитическую активность и называется индексом изокислот. Увеличение количества белковой пищи, которую переваривает микрофлора, приводит к повышению индекса изокислот (рисунок 26 а,б,в,г,д,е). Функция изменения изокислот в группе амилорея в координатах *Escherichia coli* – *Enterococcus spp.* (рисунок 26б) имеет максимум в области низких концентраций *Escherichia coli* и в области средних концентраций *Enterococcus spp.*, а в группе стеаторея (рисунок 26в) максимум оказывается в области более высоких концентраций

Enterococcus spp.. При высоких концентрациях *Escherichia coli* и *Enterococcus spp.* индекс изокислот показывает средние значения (рисунок 26в). В координатах *Escherichia coli* – *Klebsiella spp.* увеличение значений индекса изокислот в группе амилорея (рисунок 26д) наблюдается в области значений высоких и низких концентраций *Klebsiella spp.* и высоких концентраций *Escherichia coli*. В группе стеаторея (рисунок 26е) повышение функции индекса изокислот наблюдается в области одновременного снижения *Klebsiella spp.* и *Escherichia coli*. Функциональные нарушения пищеварения влияют на протеолитическую активность микрофлоры кишечника в области низких концентраций *Escherichia coli* и высоких концентраций *Enterococcus spp.* (рисунок 26 а,б,в). Изменение функции индекса изокислот разнонаправлено при увеличении концентраций *Escherichia coli* и *Klebsiella spp.* (рисунок 26 г,д,е).

Исходя из формулы расчета структурного индекса доля уксусной кислоты изменяется обратно пропорциональна структурному индексу (рисунок 27а,б,в,г,д,е). Доля масляной кислоты (рисунок 29 а,б,в,г,д,е) изменяется пропорционально концентрации масляной кислоты. Изменяемость доли пропионовой кислоты в координатах *Escherichia coli* – *Enterococcus spp.* и *Escherichia coli* — *Klebsiella spp.* не существенна при различных вариантах нарушений ферментативного пищеварения и в норме (рисунок 28 а,б,в,г,д,е).

Высокая изменчивость функций ЛЖК в зависимости от нарушения ферментативного пищеварения и изменения частовстречающейся микрофлоры кишечника указывает на высокую чувствительность метаболома кишечника, индивидуальность процессов метаболизма и большие выбросы значений концентраций ЛЖК. Это затрудняет использование концентраций летучих жирных кислот для оценки микрофлоры кишечника.

Величина интерквартильного размаха концентраций летучих жирных кислот и их производных зависит от численности группы норма. Поэтому референсные значения метаболической активности микрофлоры кишечника должны быть получены на микробиоценозах, функциональная активность которых, достоверно снижена. Исследуем метаболическую активность группы пациентов со сниженной метаболической активностью микрофлоры кишечника из отделения реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) НИИ нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко. Пациенты этой группы получают питание парентерально. Состояние пациентов, находящихся в состоянии комы или оглушенном состоянии, накладывает ограничение на метаболическую активность не только микрофлоры кишечника, но многих метаболических процессов в макроорганизме. Характеристика ферментного пищеварения для этой группы пациентов не может быть получена на основе микроскопии кала, так как получаемое питание специфично.

Для сравнения состава микрофлоры кала сравним встречаемость и концентрацию микроорганизмов в исследуемой группе (В) и группах с нормальным копрологическим синдромом и нормой, 1-й и 2-й степенью микробиологических нарушений (N5, N1, N2). Так же для сравнения подберем группу с наиболее близким состоянием ферментативного переваривания копрологическим синдромом колитное раздражение слизистой с нормой и 1-й, 2-й степенью микробиологических нарушений (V5, V1, V2). Сравнение встречаемости и концентрации микроорганизмов в бактериологическом анализе кала представлено в таблице 24.

Таблица 24 - Концентрации и встречаемость микроорганизмов у различных групп пациентов и в группе В

Группы	Нормальный копросиндром, без микробиологических нарушений		Нормальный копросиндром, 1 степень микробиологических нарушений		Нормальный копросиндром, 2 степень микробиологических нарушений		Воспалительный процесс, без микробиологических нарушений		Воспалительный процесс, без микробиологических нарушений		Воспалительный процесс, без микробиологических нарушений		Пациенты ОРИТ группа В	
Bifido-bacterium	100%	8,99	100%	8,57	100%	7,57	100%	8,31	100%	7,31	100%	8,96	100%	7,52
Lacto-bacillus	100%	6,96	100%	5,76	100%	5,23	100%	5,53	100%	5,00	100%	6,98	100%	5,39
E.Coli	100%	7,75	92%	7,06	87%	6,46	98%	7,20	92%	6,92	100%	7,60	90%	5,14
Entero-coccus	75%	5,48	69%	5,33	72%	5,44	67%	5,07	69%	5,00	72%	5,55	87%	5,59
Klebsiella	39%	6,90	31%	7,20	51%	7,22	27%	7,17	62%	7,50	47%	6,94	42%	7,38
Entero-bacterium	28%	7,00	22%	7,29	18%	6,52	36%	7,25	23%	7,33	32%	6,84	13%	7,25
L-. E.Coli	6%	6,20	19%	7,51	8%	6,83	7%	7,00	15%	7,50	4%	6,00	10%	7,33
Staphilo-coccus spp.	11%	5,20	14%	5,90	21%	5,58	27%	4,83	8%	4,00	8%	4,63	16%	4,60
Hem. E.Coli	10%	6,81	13%	7,36	17%	6,92	11%	6,40	23%	6,00	5%	6,40	10%	6,33
Pseudo-monadus	0,5%	5,00	4%	6,25	5%	4,86	2%	8,00	0%	-	1%	6,00	26%	6,25
Proteus	2%	6,07	3%	6,83	11%	6,63	0%	-	15%	7,00	3%	6,00	16%	7,00
Staphilo-coccus aur.	0,5%	4,00	2%	7,00	1%	7,50	2%	6,00	0%	-	1%	6,00	6%	5,00
Citrobacter	1%	7,11	1%	7,33	0%	-	2%	8,00	0%	-	1%	8,00	0%	-
Hafnia	1%	7,75	0,5%	7,00	1%	7,00	0%	-	0%	-	2%	7,50	0%	-
Сл. ферм. E.Coli	1%	5,60	0%	-	0%	-	2%	8,00	0%	-	0%	-	0%	-

В таблице 24 показано, что в группе В наблюдается низкое значение встречаемости и концентрации нормальной кишечной палочки по сравнению с другими группами, а так же увеличенное значение встречаемости протей и псевдомонад.

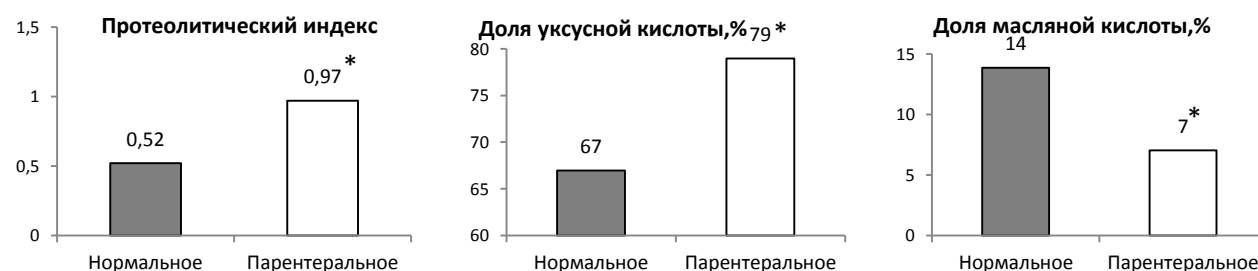
Для оценки метаболической активности микробиоценоза группы В сравним значения концентрации ЛЖК в кале у пациентов с нормальным и парентеральным питанием (рисунок 30).

На гистограммах (рисунок 30) показано, что концентрации ЛЖК в кале для группы пациентов ОРИТ (В) достоверно ниже чем для группы норма. В группе В наблюдается

повышенное значение доли уксусной кислоты и сниженное значение масляной и пропионовой кислот по сравнению с группой пациентов получающих нормальное питание.



а) Суммарная концентрация ЛЖК, ммоль/г б) Концентрация масляной кислоты, ммоль/г в) Структурный индекс



г) Протеолитический индекс д) Доля уксусной кислоты, % е) Доля масляной кислоты, %

* - достоверное отличие от пациентов получающих нормальное питание

Рисунок 30 - Критерии метаболической активности микрофлоры кишечника

Таблица 25 - Концентрации ЛЖК в кале у различных групп пациентов и у пациентов группы В (ОРИТ).

Группы	Нормальный копросиндром, 1 ст. м/б нар		Нормальный копросиндром, 2 ст. м/б нар		Нормальный копросиндром, без м/б нар		Воспалительные процессы, 1 ст. м/б нар		Воспалительные процессы, 2 ст. м/б нар		Воспалительные процессы, без м/б нар		В
	Значение	р	Значение	р	Значение	р	Значение	р	Значение	р	Значение	р	
C2	38,48	0,0067	54,07	<i>p<0,001</i>	42,01	<i>p<0,001</i>	51,85	<i>p<0,001</i>	48,24	0,0094	41,29	<i>p<0,001</i>	20,19
C3	10,26	0,0092	14,16	<i>p<0,001</i>	11,55	<i>p<0,001</i>	15,03	<i>p<0,001</i>	14,59	0,0045	13,09	<i>p<0,001</i>	3,97
iC4	1,60	0,5455	2,31	0,7842	1,86	0,6491	1,85	0,6302	1,83	0,6435	2,00	0,6532	0,67
C4	6,54	<i>p<0,001</i>	9,46	<i>p<0,001</i>	8,00	<i>p<0,001</i>	9,59	<i>p<0,001</i>	9,63	0,0034	8,55	<i>p<0,001</i>	1,33
iC5	1,77	<i>p<0,001</i>	2,61	<i>p<0,001</i>	2,08	<i>p<0,001</i>	2,01	<i>p<0,001</i>	1,95	0,008	2,01	<i>p<0,001</i>	0,38
C5	1,28	<i>p<0,001</i>	1,78	<i>p<0,001</i>	1,42	<i>p<0,001</i>	1,29	<i>p<0,001</i>	1,84	0,0025	1,52	<i>p<0,001</i>	0,21
iC6	0,009	0,1027	0,009	0,2704	0,009	0,1415	0,007	0,0971	0,008	0,0919	0,007	0,0854	0,009
C6	0,009	0,0012	0,009	0,0011	0,009	<i>p<0,001</i>	0,007	0,3841	0,010	0,245	0,009	<i>p<0,001</i>	0,009
Summa C2-6	62,02	0,0102	87,33	<i>p<0,001</i>	69,65	<i>p<0,001</i>	85,89	<i>p<0,001</i>	80,66	0,0068	74,07	<i>p<0,001</i>	27,68
Index Anaerob	0,59	<i>p<0,001</i>	0,58	<i>p<0,001</i>	0,62	<i>p<0,001</i>	0,64	<i>p<0,001</i>	0,56	0,0107	0,70	<i>p<0,001</i>	0,34
Index Proteolit	0,47	0,0071	0,44	0,0031	0,46	0,0056	0,41	0,0033	0,37	<i>p<0,001</i>	0,45	0,0044	0,68
C2%	68,55	<i>p<0,001</i>	68,89	<i>p<0,001</i>	67,70	<i>p<0,001</i>	65,46	<i>p<0,001</i>	67,96	<i>p<0,001</i>	65,02	<i>p<0,001</i>	80,40
C3%	18,55	<i>p<0,001</i>	18,26	<i>p<0,001</i>	18,64	<i>p<0,001</i>	20,16	<i>p<0,001</i>	17,12	0,0033	19,27	<i>p<0,001</i>	14,47
C4%	12,31	<i>p<0,001</i>	12,23	<i>p<0,001</i>	12,91	<i>p<0,001</i>	12,83	<i>p<0,001</i>	11,52	0,003	14,05	<i>p<0,001</i>	4,98
iC4+C5%	4,96	0,2425	4,57	0,5683	4,93	0,2142	4,30	0,7019	4,40	0,9887	5,34	0,1281	3,16

Примечание: Достоверные отличия указаны *полужирным курсивом*.

В таблице 25 показано, что в исследуемых группах с различными степенями микробиологических нарушений все показатели концентраций ЛЖК и их производные за исключением концентраций изокапроновой и капроновой кислот, а так же доли изомасляной и валериановой кислот в общем пуле ЛЖК достоверно отличаются от группы В. Таким образом, состояние микробиоценоза у пациентов ОРИТ находится в состоянии малоактивного метаболизма. Концентрации ЛЖК в кале у пациентов этой группы достоверно ниже, чем в группах с различными микробиологическими нарушениями и нарушениями ферментного переваривания.

Суммарный уровень ЛЖК, так как этим параметром характеризуется возможность кишечной микрофлоры переваривать субстрат.

Уровень масляной кислоты, так как недостаточное количество масляной кислоты приводит к снижению коллонизационной резистентности, всасываемости метаболитов коллоноцитами и многим другим негативным эффектам.

Соотношение летучих жирных кислот, которые занимают 90% всего производимого пула ЛЖК в кишечнике – это уксусная, пропионовая и масляная кислоты.

Протеолитическая активность – отношение изокилот к нормальным формам.

Из таблицы 26 видно, что данные параметры могут быть референсными значениями для оценки микробиоценоза по концентрациям ЛЖК в кале.

Таблица 26 - Референсные значения 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

Изменения концентраций ЛЖК в кале имеют временную зависимость, так как кал насыщен микроорганизмами, которые продолжают процесс переваривания субстрата, после того как кал окажется вне кишечника. При этом преимущество получают аэробные микроорганизмы, которые из всего спектра ЛЖК продуцируют уксусную кислоту. Таким образом, концентрации ЛЖК в кале зависят от времени экспозиции кала. Так же можно оценить влияние скорости транзита на коэффициенты корреляций ЛЖК в кале. Коэффициенты

корреляции концентраций ЛЖК в кале для групп с различными копрологическими синдромами представлены в таблицах 27 - 31.

Таблица 27 - Корреляции концентраций ЛЖК в кале при копрологическом синдроме замедленный транзит

Замедленный транзит	C2	C3	iC4	C4	iC5	C5	iC6	C6
C2	1	0,64	0,24	0,65	0,25	0,4	0,13	0,04
C3	0,639	1	0,37	0,53	0,32	0,51	0,07	-0
iC4	0,24	0,37	1	0,22	0,7	0,42	0,17	0,01
C4	0,649	0,53	0,22	1	0,22	0,43	0,05	0,08
iC5	0,248	0,32	0,7	0,22	1	0,51	0,13	0,02
C5	0,405	0,51	0,42	0,43	0,51	1	0,03	0,19
iC6	0,135	0,07	0,17	0,05	0,13	0,03	1	0,02
C6	0,042	-0	0,01	0,08	0,02	0,19	0,02	1

Примечание: Полужирным курсивом отмечены значения между -0,66 и 0,66.

Таблица 28 - Корреляции концентраций ЛЖК в кале при копрологическом синдроме амилорея

Амилорея	C2	C3	iC4	C4	iC5	C5	iC6	C6
C2	1	0,69	0,5	0,78	0,56	0,46	-0,1	-0
C3	0,694	1	0,58	0,71	0,58	0,46	-0,1	0,01
iC4	0,502	0,58	1	0,61	0,88	0,56	0,22	0,04
C4	0,777	0,71	0,61	1	0,63	0,63	-0,1	0
iC5	0,561	0,58	0,88	0,63	1	0,6	0,12	0,09
C5	0,464	0,46	0,56	0,63	0,6	1	0,08	0,25
iC6	-0,126	-0,1	0,22	-0,1	0,12	0,08	1	-0,1
C6	-0,034	0,01	0,04	0	0,09	0,25	-0,1	1

Примечание: Полужирным курсивом отмечены значения между -0,66 и 0,66.

Таблица 29 - Корреляции концентраций ЛЖК в кале при копрологическом синдроме нормальный копрологический синдром

Норма	C2	C3	iC4	C4	iC5	C5	iC6	C6
C2	1	0,73	0,49	0,65	0,46	0,54	0,3	-0,1
C3	0,726	1	0,67	0,68	0,58	0,71	0,18	-0,1
iC4	0,494	0,67	1	0,58	0,9	0,77	0,17	0
C4	0,653	0,68	0,58	1	0,56	0,67	0,08	0,05
iC5	0,461	0,58	0,9	0,56	1	0,79	0,17	0,01
C5	0,538	0,71	0,77	0,67	0,79	1	0,13	0,07
iC6	0,298	0,18	0,17	0,08	0,17	0,13	1	-0
C6	-0,092	-0,1	0	0,05	0,01	0,07	-0	1

Примечание: Полужирным курсивом отмечены значения между -0,66 и 0,66.

Таблица 30 . Корреляции концентраций ЛЖК в кале при копрологическом синдроме стеаторея

Стеаторея	C2	C3	iC4	C4	iC5	C5	iC6	C6
C2	1	0,83	0,53	0,68	0,53	0,68	0,3	-0,2
C3	0,831	1	0,69	0,83	0,62	0,78	0,22	-0,1
iC4	0,533	0,69	1	0,57	0,86	0,81	0,33	0,07
C4	0,676	0,83	0,57	1	0,5	0,71	0,2	0,01
iC5	0,531	0,62	0,86	0,5	1	0,85	0,24	-0
C5	0,679	0,78	0,81	0,71	0,85	1	0,28	0,02
iC6	0,3	0,22	0,33	0,2	0,24	0,28	1	0,15
C6	-0,168	-0,1	0,07	0,01	-0	0,02	0,15	1

Примечание: Полужирным курсивом отмечены значения между -0,66 и 0,66.

Таблица 31 . Корреляции концентраций ЛЖК в кале при копрологическом синдроме ускоренный транзит

Ускоренный транзит	C2	C3	iC4	C4	iC5	C5	iC6	C6
C2	1	0,8	0,58	0,67	0,56	0,59	0,37	-0,1
C3	0,802	1	0,64	0,74	0,56	0,63	0,25	-0,1
iC4	0,578	0,64	1	0,64	0,82	0,67	0,23	0,08
C4	0,667	0,74	0,64	1	0,66	0,76	0,11	-0
iC5	0,559	0,56	0,82	0,66	1	0,8	0,19	0,09
C5	0,592	0,63	0,67	0,76	0,8	1	0,2	0,02
iC6	0,367	0,25	0,23	0,11	0,19	0,2	1	0,05
C6	-0,089	-0,1	0,08	-0	0,09	0,02	0,05	1

Примечание: Полужирным курсивом отмечены значения между -0,66 и 0,66.

По данным приведенным в таблицах 27 - 31 видно, что количество переменных между которыми обнаружена корреляция увеличивается с увеличением скорости транзита кала (рисунок 31). Максимальное значение количества скоррелированных переменных составляет 31%. Минимальная комбинация переменных для применения в дискриминантном анализе C2 – iC5 – iC6 – C6.

Таким образом, подтверждается предположение о высокой изменчивости функций ЛЖК в зависимости от нарушений ферментативного пищеварения, в частности от скорости транзита. Высокая доля скоррелированных данных существенно осложняет применение концентраций ЛЖК в математическом моделировании с использованием регрессионных методов многомерной статистики или искусственных нейронных сетей.

Изучение и оценка микробиоценозов организма, расширение возможностей диагностики и прогноза заболеваний требует новых подходов и критериев оценки и их систематизации. Комплексный подход к оценке микробиоценозов, предложенный в исследовании, позволяет интерпретировать реакцию закрытых систем на воздействия различные внешних факторов. К

таким факторам относятся инфекции, агрессивное воздействие окружающей среды, применение химиотерапии и химиопрепаратов, влияние про- и пребиотиков.

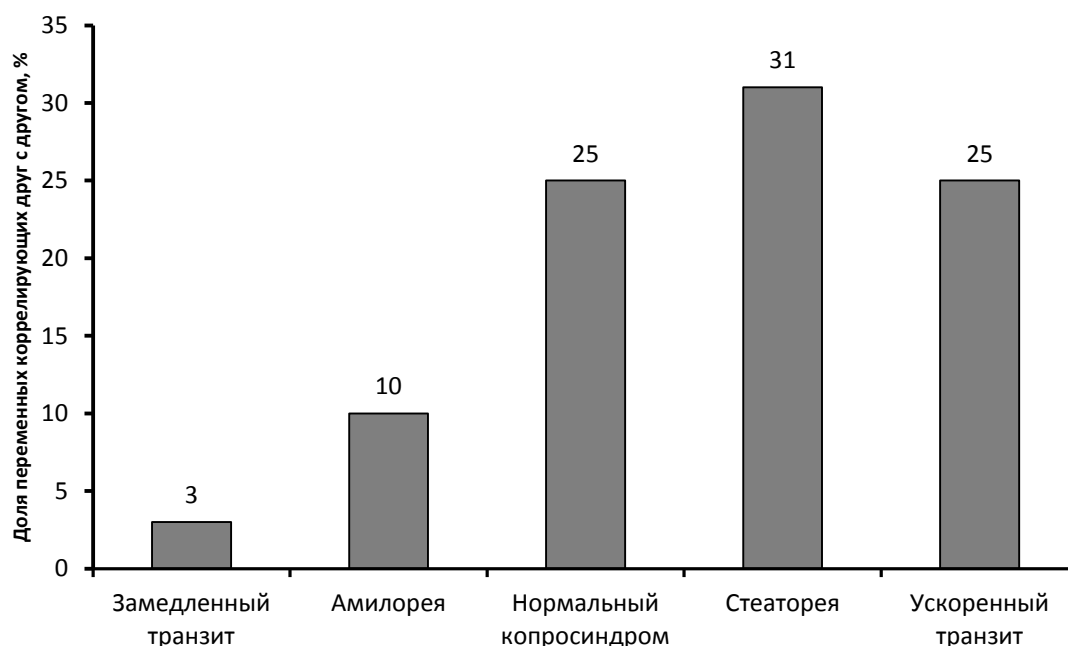


Рисунок 31 - Доля скоррелированных переменных при различных копрологических синдромах и скорости транзита.

Для того чтобы оценить величину и вектор изменений системы необходима унификация параметров и их формализация.

Современные требования персонифицированной медицины основываются на интегральной оценке микробиоценозов организма и комплексного подхода к их изучению. В научной работе представлена система изучения микробиоценозов (на примере кишечника и ротоглотки) которая позволяет проводить интегральную оценку микробиоценозов биотопов с использованием биотехнологических методов исследования микрофлоры. Система интегральной оценки состояния микробиоценоза биотопов желудочно-кишечного тракта использованная в исследовании представлена на рисунке (рисунок 32).

Как видно, из предлагаемой схемы (рисунок 32), 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. В научной работе подтверждены выводы исследователей [9] о том, что под влиянием эндогенных и экзогенных факторов наблюдаются нарушение ферментативного пищеварения и избыточный рост просветной микрофлоры (таблица 11). Кроме того показано, что выявленные нарушения ферментативного пищеварения приводят к увеличению в 2 раза встречаемости микроорганизмов чувствительных

к бактериофагам (рисунок 14). В связи с увеличением количества микроорганизмов просветной микрофлоры последняя получает субстратное преимущество перед индигенной, что приводит к подавлению ее роста [98]. 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). Известно, что снижение концентрации масляной кислоты приводит к изменению большинства физиологических функций в организме человека (таблица 23), основными из которых, являются поддержание гомеостаза, в т.ч. водно–электролитного баланса, энергообеспечение колоноцитов, участие в регуляции моторики и иммунокоррекции [3]. Эти изменения способствует снижению колонизационной резистентности (таблица 24). Нормальная собственная микрофлора кишечника человека является важнейшим регулятором иммунологического процесса и индуцирует формирование иммунитета в целом всего организма [133]. Дисбиотические изменения в кишечнике могут приводить к дефектам развития иммунитета, в частности, нарушениям переключения синтеза антител класса IgE на IgA (sIgA), стимуляции дифференцировки Тх преимущественно в Тх2-клетки [43]. Все изложенное, как следствие, приводит развитию патологических процессов.

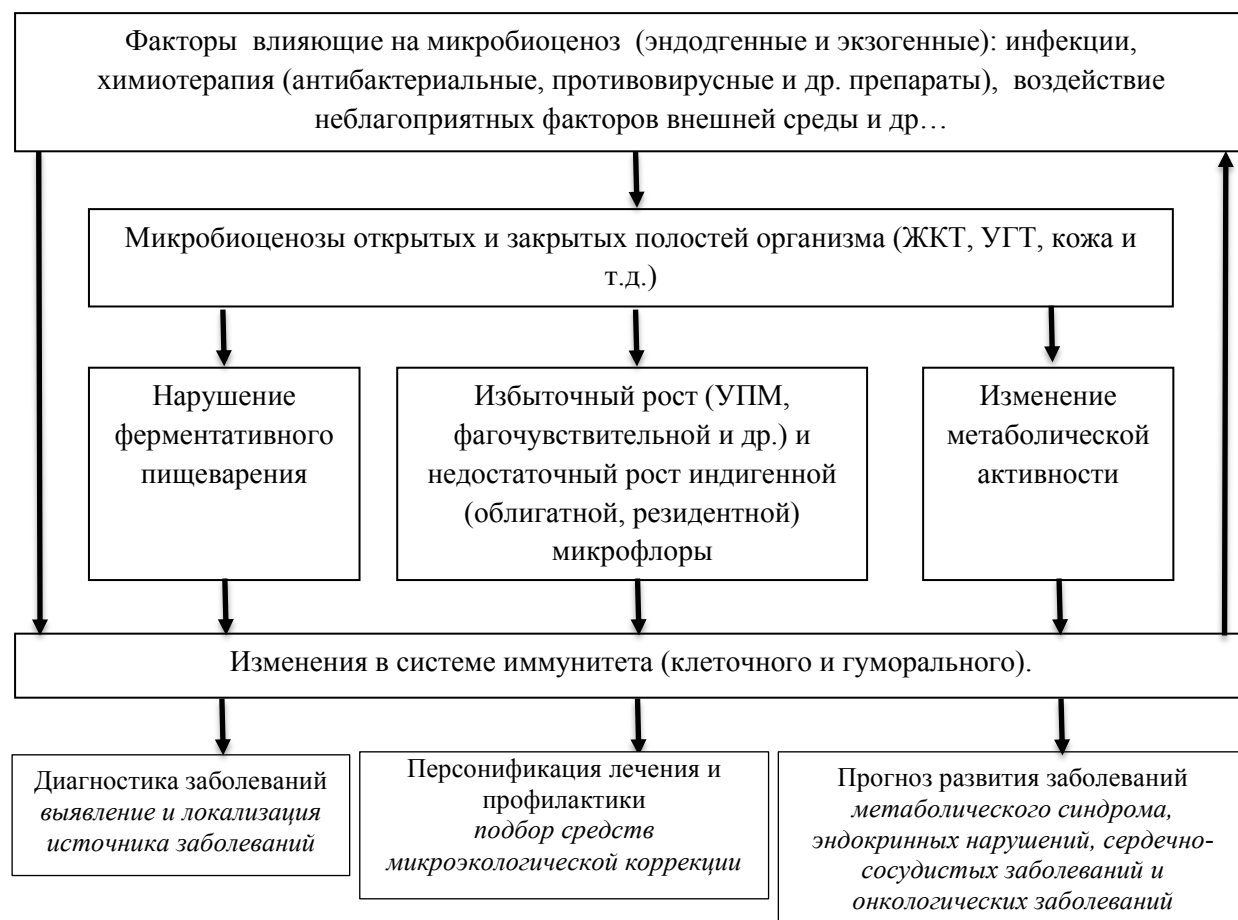


Рисунок 32 - Система интегральной оценки состояния микробиоценозов биотопов ЖКТ.

Комплексным подходом (Рисунок 32), можно определить нарушения по основным критериям, а именно:

- нарушение ферментного пищеварения (копрологический синдром);
- нарушения микробиоценоза кишечника, связанное с появлением (более 10%) чувствительной к бактериофагам просветной микрофлоры от общего числа просветной микрофлоры;
- дефицит роста индигенной микрофлоры (2-я, 3-я степени дисбиоза);
- дефицит метаболической активности микрофлоры (снижение уровня общего уровня ЛЖК, масляной кислоты и соотношения уксусной:пропионовой:масляной в пользу уксусной).

2.5. Метаболический и микробиологический паспорт микрофлоры ротоглотки здорового человека

Для подбора пациентов с целью составления комплексного микробиологического и метаболитного паспорта микрофлоры ротоглотки из 424 пациентов консультационно-диагностического центра при МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского, выполнявших комплексный анализ микрофлоры ротоглотки, было отобрано 30 пациентов, с микробиологией соответствующей нормальному микробиоценозу согласно УМП «Микроэкология и гуморальный иммунитет слизистых открытых полостей человека в норме и при патологических состояниях» [183]. Возраст пациентов ограничивался от 4 до 80 лет.

Частота встречаемости и интенсивность обсемененности микроорганизмов, определенных бактериологическим анализом мазка со слизистой задней стенки глотки представлены в таблице 32. Встречаемость микроорганизмов чувствительных к бактериофагам представлена на рисунке 33:

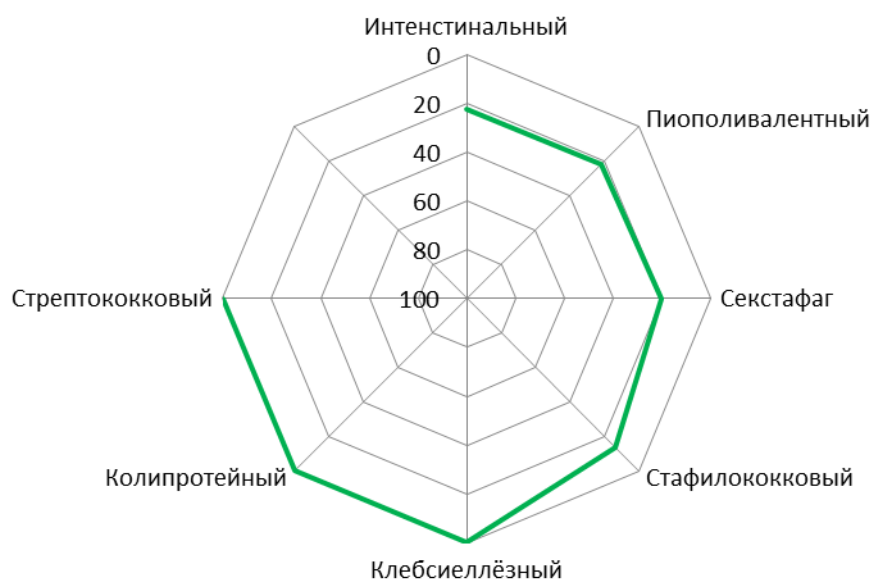


Рисунок 33 – Частота встречаемости микроорганизмов чувствительных к бактериофагам в ротоглотке.

Для группы «Норма» определены средние значения и интерквартильный размах концентраций метаболитов и их производных.

Таблица 32 - Средние значения концентраций метаболитов микрофлоры ротоглотки в слюне в норме.

Параметр	Среднее (медиана)	Интерквартильный размах	
		Нижний квартиль	Верхний квартиль
Концентрации ммоль/г			
Уксусная кислота	6,446	3,959	8,929
Пропионовая кислота	1,175	0,598	2,105
Изомасляная кислота	0,073	0,014	0,187
Масляная кислота	0,365	0,122	0,741
Изовалериановая кислота	0,073	0,012	0,204
Валериановая кислота	0,006	0,004	0,026
Изокапроновая кислота	0,004	0,003	0,006
Капроновая кислота	0,004	0,003	0,006
Суммарный уровень	8,572	4,780	13,790
Структурный индекс	0,308	0,254	0,423
Протеолитический индекс	0,646	0,304	1,116
Доля уксусной кислоты	78,9	72,6	83,1
Доля пропионовой кислоты	16,4	12,2	19,5
Доля масляной кислоты	4,6	1,7	8,3
Профили, доля			
Уксусная кислота	0,764	0,703	0,797
Пропионовая кислота	0,155	0,120	0,181
Изомасляная кислота	0,011	0,005	0,019
Масляная кислота	0,045	0,016	0,080
Изовалериановая кислота	0,014	0,007	0,020
Валериановая кислота	0,001	0,000	0,007
Изокапроновая кислота	0,001	0,000	0,001
Капроновая кислота	0,001	0,000	0,001

Изменения состава микробиоценоза ротоглотки по степеням микробиологических нарушений было выполнено врачом-экспертом по параметрам (таблица 4) предложенным в УМП «Микроэкология и гуморальный иммунитет слизистых открытых полостей человека в норме и при патологических состояниях» [183].

Для подбора и обучения искусственной нейронной сети по данным бактериологического анализа со слизистой задней стенки глотки из выборки пациентов консультационно-диагностического центра при МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского, выполнявших комплексный анализ микрофлоры кишечника, было отобрано 424 пациента, выполнявших комплексный анализ микрофлоры ротоглотки и разделены на группы по степени дисбиоза ротоглотки. Возраст пациентов ограничивался от 4 до 80 лет.

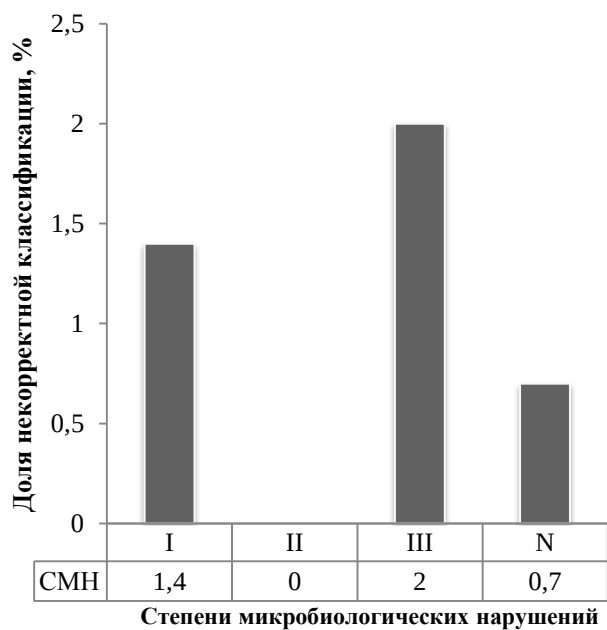
Для составления паспорта было решено разделить группы по следующему алгоритму:

1 шаг: Разделить пациентов по микробиологическим показателям согласно рекомендациям пособия [183]:

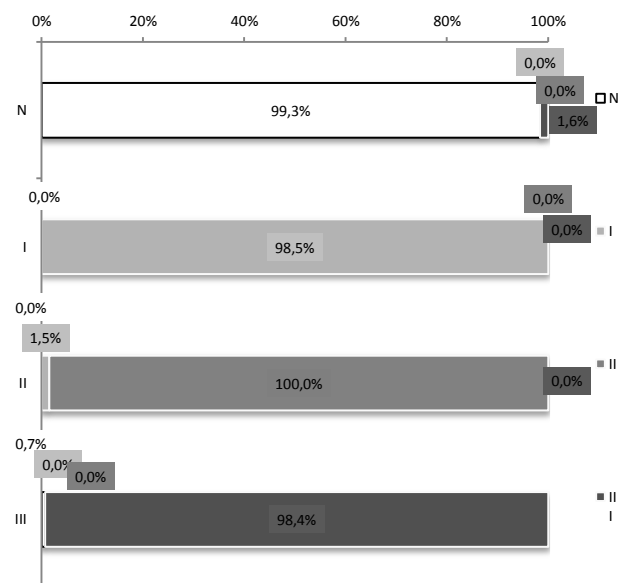
2 шаг: Применение искусственных нейронных сетей для уточнения экспертной оценки степени дисбиоза.

Данные микробиологического исследования микрофлоры ротоглотки 144 пациента были оценены врачом экспертом. Степень дисбиоза обозначалась соответствующей цифрой: 1 – 1-я степень; 2- 2-я степень; 3 – 3-я степень дисбиоза; 5 - отсутствие микробиологических нарушений.

Тестовая и обучающая выборка формировались из одной базы данных 424 пациентов, из которых 340 пациентов (80%) было выбрано случайным образом для обучающей выборки и 85 пациентов (20%) для контрольной выборки. В результате обработки данных пакетом Automatet Neural Networks программы Statistica была создана, обучена и протестирована искусственная нейронная сеть (ИНС) с многослойным персептроном (MPL 58-30-4) с 13 входными нейронами, 58 скрытыми и 4 выходными. При обучении ИНС MPL 58-30-4 были достигнуты результаты максимально корректной классификации объектов для обучающей (98,8%) и тестовой выборки (99,2%) из всех вариантов ИНС предлагаемых библиотек программы Statistica. Полученные в исследовании, значения корректной классификации результатов бактериологического анализа мазка с ЗСГ по степеням микробиологических нарушений, представлены на рисунке 34а, а распределение корректно классифицированных микробиоценозов между группами на рисунке 34б.



а) Доля корректной классификации результатов бактериологического анализа мазка ЗСГ по степеням микробиологических нарушений



б) Распределение результатов классификации анализов ИНС по степеням микробиологических нарушений

Рисунок 34 - Значения корректной классификации результатов бактериологического анализа мазка с ЗСГ по степеням микробиологических нарушений ИНС MLP 58-30-4.

Из представленных графиков (рисунок 34а) видно, что между нормой и 3-й степенью микробиологических нарушений вероятность ложной классификации выше для групп норма – 1 и 2 степень, а так же 1 – 3 степень микробиологических нарушений. Это свидетельствует о несоответствии количественного выражения степени микробиологических нарушений и глубины изменений в соотношениях микроорганизмов.

Для оценки метаболической активности микробного сообщества ротоглотки использовали метод дискриминантного анализа концентраций летучих жирных кислот. Целесообразность данного шага продиктована тем, что среди микроорганизмов на слизистой ротоглотки не все микроорганизмы могут быть выделены и идентифицированы на имеющихся средах, в то же время метаболиты в слюне отражают работу всего микробиоценоза биотопа как аэробной, так и анаэробной части.

Переменные дискриминантного анализа – концентрации ЛЖК слюны были исследованы на корреляционные взаимосвязи между собой:

Таблица 33 - Корреляционные связи концентраций ЛЖК слюны.

	Means	Std. Dev.	C2	C3	iC4	C4	iC5	C5	iC6	C6
C2	7,01	4,19	1,00	0,82	0,59	0,47	0,58	0,22	0,01	0,00
C3	1,66	1,55	0,82	1,00	0,75	0,53	0,76	0,30	0,19	0,13
iC4	0,13	0,17	0,59	0,75	1,00	0,55	0,92	0,56	0,48	0,45
C4	0,50	0,63	0,47	0,53	0,55	1,00	0,58	0,43	0,17	0,18
iC5	0,12	0,16	0,58	0,76	0,92	0,58	1,00	0,49	0,44	0,36
C5	0,06	0,13	0,22	0,30	0,56	0,43	0,49	1,00	0,48	0,61
iC6	0,02	0,05	0,01	0,19	0,48	0,17	0,44	0,48	1,00	0,88
C6	0,01	0,04	0,00	0,13	0,45	0,18	0,36	0,61	0,88	1,00

В таблице 33 показано, что для дискриминантного анализа подходят 5 переменных, корреляционная связь которых между собой больше -0,66 и ниже 0,66, а именно - уксусная (C2), изомасляная (iC4), масляная (C4), валериановая (C5), изокапроновая (iC6) кислоты.

Таким образом, при первой итерации в классификационной матрице дискриминантного анализа были получены данные пациентов некорректно отнесенные к соответствующим группам. Перевод пациентов в другую группу проводился исходя из предположения, что реальное значение концентраций микроорганизмов может быть выше имеющегося, так как многие микроорганизмы не поддаются культивированию в предложенных условиях, а значит реальные концентрации микрофлоры могут быть выше.

В результате разделения были получены группы, которые достоверно (таблица 34) отличаются друг от друга представлены на рисунке 35:

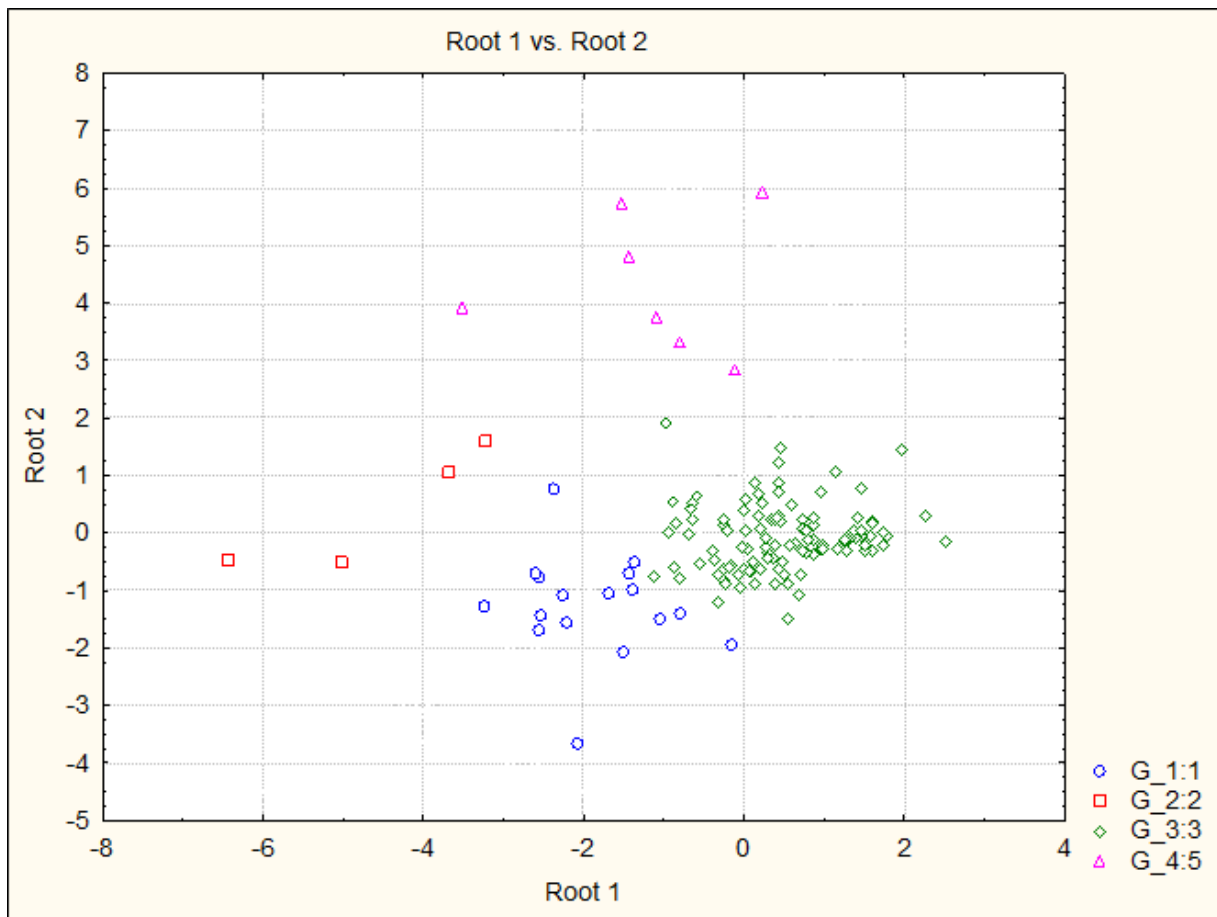


Рисунок 35 - Распределение пациентов по группам

Примечание: G_1:1 – промежуточный тип, G_2:2 – дисбиоз, G_3:3 – выраженный воспалительный процесс, G_4:5 – нормоценоз, в проекции 2 дискриминантных функций (Root 1, Root 2)

Таблица 34 - Достоверность распределения по группам ($P < 0,05$).

	Промежуточный тип (G_1:1)	Дисбиоз (G_2:2)	Выраженный воспалительный процесс (G_3:3)	Нормоценоз (G_4:5)
Промежуточный тип (G_1:1)		$2,57 \cdot 10^{-6}$	$1,19 \cdot 10^{-11}$	$2,61 \cdot 10^{-12}$
Дисбиоз (G_2:2)	$2,57 \cdot 10^{-6}$		$4,32 \cdot 10^{-13}$	$4,82 \cdot 10^{-9}$
Выраженный воспалительный процесс (G_3:3)	$1,19 \cdot 10^{-11}$	$4,32 \cdot 10^{-13}$		$1,90 \cdot 10^{-11}$
Нормоценоз (G_4:5)	$2,61 \cdot 10^{-12}$	$4,82 \cdot 10^{-9}$	$1,90 \cdot 10^{-11}$	

Полученные классификационные функции позволяют определить степень дисбиоза ротоглотки по наибольшему значению классификационной функции (таблица 35).

Таблица 35 - Классификационные функции:

Степень дисбиоза	Классификационная функция
Промежуточный тип	$G_{1:1} = 1,51 \cdot C_2 - 27,27 \cdot iC_4 + 0,42 \cdot C_4 + 8,51 \cdot C_5 + 53,6 \cdot iC_6 - 8,01$
Дисбиоз	$G_{2:2} = 2,4 \cdot C_2 - 46,1 \cdot iC_4 + 4,38 \cdot C_4 - 6,04 \cdot C_5 + 104,28 \cdot iC_6 - 21,93$
Выраженный воспалительный процесс	$G_{3:3} = 0,77 \cdot C_2 - 10,88 \cdot iC_4 + 0,35 \cdot C_4 + 0,76 \cdot C_5 + 26,97 \cdot iC_6 - 2,19$
Нормоценоз	$G_{4:5} = 0,43 \cdot C_2 - 22,04 \cdot iC_4 + 11,4 \cdot C_4 - 11,47 \cdot C_5 + 33,03 \cdot iC_6 - 15,56$

Где C2, iC4, C4, C5, iC6 –концентрации уксусной, изомасляной, масляной, валериановой и изокапроновой кислот в слюне в ммоль/г.

Распределение центроидов групп в трехмерной проекции дискриминантного пространства представлено на рисунке 36, а координаты в таблице 36:

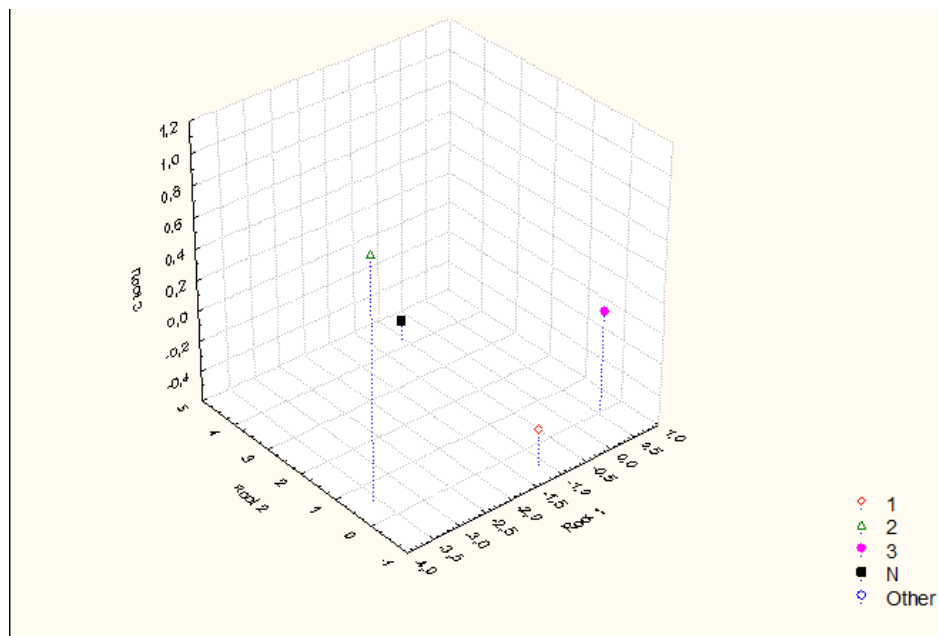


Рисунок 36 - Расположение центроидов групп в трехмерной проекции дискриминантного пространства, где 1 – промежуточный тип, 2 – дисбиоз, 3 – выраженный воспалительный процесс, N – нормоценоз.

Таблица 36 - Координаты расположения центроидов в трехмерной проекции дискриминантного пространства:

	Root 1	Root 2	Root 3
G_1:1	-1,12978	-0,537223	-0,356070
G_2:2	-3,63740	0,468803	0,976129
G_3:3	0,53189	-0,025016	0,077439
G_4:5	-0,52659	4,227882	-0,474029

Получены расстояния Махалонобиса взаимного удаления центроидов друг от друга (таблица 37).

Из графика (рисунок 37) видно, что удаление центроида 3-я степень дисбиоза от нормы меньше, чем у групп 1-я и 2-я степени. Следовательно, соотношение концентраций ЛЖК указывает на большую схожесть нормы и 3-ей степени, чем 1-я и 2-я степени микробиологических нарушений.

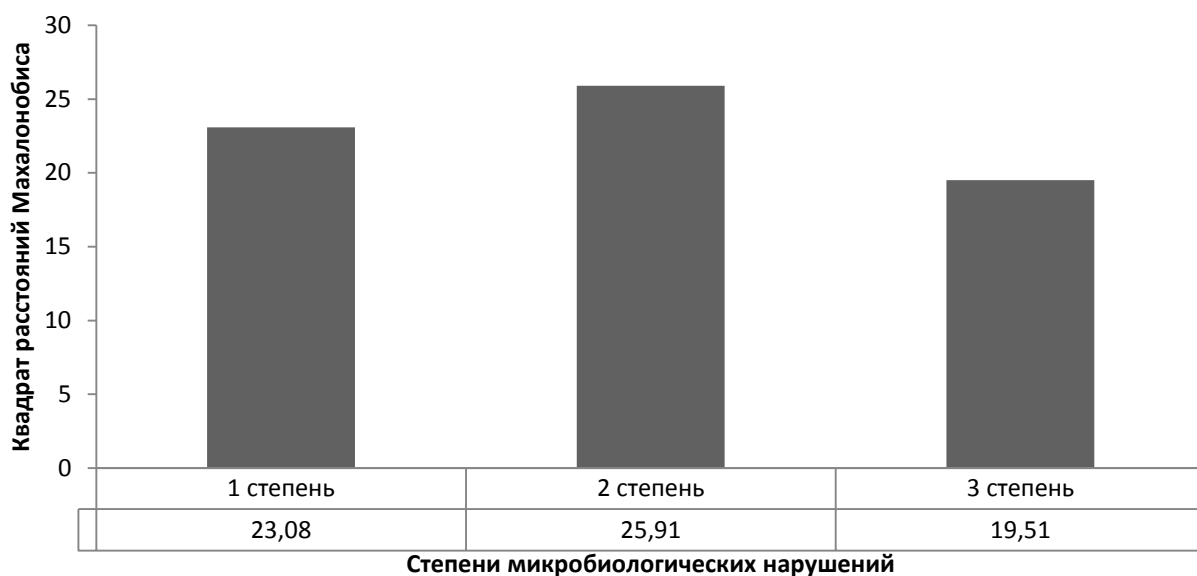


Рисунок 37 – Квадрат расстояний Махалонобиса для групп с различными степенями микробиологических нарушений микробиоценоза ротоглотки от группы «Норма»

Таблица 37 - Расстояния Махалонобиса взаимного удаления центроидов друг от друга.

	G_1:1	G_2:2	G_3:3	G_4:5
G_1:1	0,00	9,07	3,21	23,08
G_2:2	9,07	0,00	18,43	25,91
G_3:3	3,21	18,43	0,00	19,51
G_4:5	23,08	25,91	19,51	0,00

Полученные в результате группировки данные по микрофлоре ротоглотки характеризуются следующими микробиологическими показателями (таблица 38).

Таблица 38 - Микробиологические показатели групп по микрофлоре ротоглотки.

Микроорганизмы	Норма		Промежуточный тип		Дисбиоз		Выраженный воспалительный процесс	
	Встречаемость, %	Средний логарифм КОЕ	Встречаемость, %	Средний логарифм КОЕ	Встречаемость, %	Средний логарифм КОЕ	Встречаемость, %	Средний логарифм КОЕ
<i>Streptococcus spp. α-hem+</i>	100,0	6,4	94,1	6,5	100,0	6,5	98,3	6,8
<i>Streptococcus spp. γ-hem+</i>	14,3	6,0	11,8	4,7	0,0		7,0	5,6
<i>Neisseria spp.</i>	71,4	3,5	70,6	4,0	50,0	3,5	49,6	3,8
<i>Streptococcus spp. β-hem+</i>	0,0		5,9	4,3	0,0		1,7	4,3
<i>Staphylococcus spp.</i>	42,9	4,7	35,3	5,0	25,0	4,0	30,4	4,4
<i>Staphylococcus spp. hem+</i>	14,3	6,0	11,8	5,0	0,0		3,5	4,5
<i>Staphylococcus aureus</i>	42,9	4,7	35,3	5,0	25,0	4,0	30,4	4,4
<i>Klebsiella spp</i>	0,0		11,8	5,6	0,0		4,3	5,3
<i>Escherichia coli</i>	0,0		0,0		0,0		3,5	3,8
<i>Candida spp.</i>	14,3	3,0	23,5	3,8	25,0	5,8	12,2	4,1

Таблица 38 - Микробиологические показатели групп по микрофлоре ротоглотки (продолжение)

Микроорганизмы	Норма		Промежуточный тип		Дисбиоз		Выраженный воспалительный процесс	
	Встречаемость, %	Средний логарифм КОЕ	Встречаемость, %	Средний логарифм КОЕ	Встречаемость, %	Средний логарифм КОЕ	Встречаемость, %	Средний логарифм КОЕ
<i>Enterobacter spp.</i>	0,0		0,0		0,0		1,7	4,2
<i>Proteus spp.</i>	0,0		0,0		0,0		2,6	5,4
<i>Pseudomonas spp.</i>	0,0		11,8	4,9	0,0		0,0	
<i>Aspergillus spp.</i>	0,0		0,0		0,0		0,0	

Из таблицы 38 видно, что с увеличением степени дисбиоза увеличивается концентрация нетипичной микрофлоры при несущественном увеличении её встречаемости. Это объясняется непостоянством нетипичной микрофлоры и случайным характером её колонизации. При этом с ростом концентрации микрофлоры ротоглотки увеличивается встречаемость микрофлоры чувствительной к родственным бактериофагам, что представлено на рисунке 38:

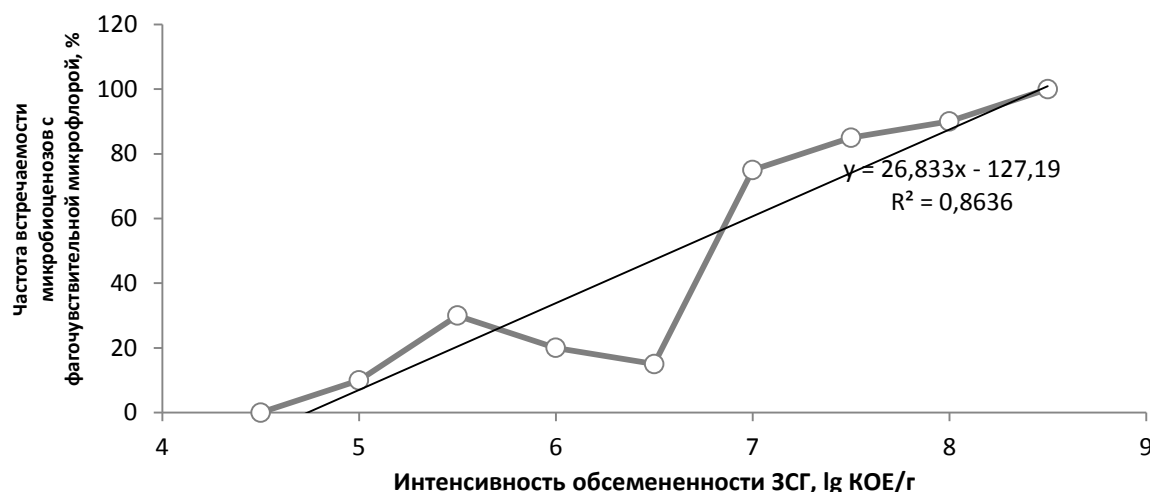


Рисунок 38 – Частота встречаемости микробиоценозов с фагочувствительной микрофлорой в зависимости от интенсивности обсемененности задней стенки глотки (ЗСГ)

Из графика (рисунок 38) видно, что встречаемость фагочувствительной микрофлоры увеличивается при увеличении количества микроорганизмов выделяемых бактериологическим анализом из мазка с ЗСГ. Отмечается высокая степень корреляции ($R^2=0,895$), что подтверждает неслучайный характер роста встречаемости. В области значений обсемененности более 6,5 Lg КОЕ наблюдается излом функции, с дальнейшим увеличением роста встречаемости фагочувствительной микрофлоры в микробиоценозе ротоглотки. Согласно, описанию степеней микробиологических нарушений микрофлоры ротоглотки [183] (приложение 4) высокая обсемененность является одним из параметров определяющим 3-ю степень микробиологических нарушений или воспалительный процесс.

Таким образом, увеличение встречаемости микрофлоры чувствительной к родственным бактериофагам является признаком микробиологических нарушений.

Глава 3. Исследование эффективности применения лактулозы на модели антибиотико-ассоциированного дисбиоза у мышей

Известно, что пробиотики, и пребиотики оказывают стимулирующее действие на микробиоценоз кишечника при помощи различных механизмов. Пробиотики и пребиотики назначают вместе с антимикробными препаратами при лечении инфекционных и прочих заболеваний для защиты микробиоценоза от их побочного действия. Для оценки протективного действия пребиотиков используем метод дискриминантного анализа концентраций летучих жирных кислот в содержимом кишечника мышей. Рассмотрим протективное действие лактулозы на модели антибиотико-ассоциированного дисбиоза у мышей.

3.1. Построение дискриминантного пространства концентраций ЛЖК на модели антибиотико-ассоциированной диареи у мышей

С целью определения глубины и направленности эффекта действия различных химиопрепаратов на концентрации летучих жирных кислот в кишечнике мышей воспользуемся дискриминантным анализом концентраций ЛЖК в кале.

Для моделирования антибиотик-ассоциированного дисбиоза использовались мыши белые лабораторные (питомник филиал «Столбовая» ФГБУН «Научного центра биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства»), беспородные, самцы, вес 12-14г — 192 особи. Старшим научным сотрудником, кандидатом биологических наук Мелиховой А.М. из мышей были сформированы группы по 11 особей, которые получали антимикробные, противоопухолевые и гормональные препараты в дозах рекомендованных производителями с пересчетом на массу тела. Обозначения групп и наименования препаратов представлены в таблице 3. Для исследования влияния протективного действия пребиотических препаратов использовался сироп «Лактулоза» группы (Л) в состав препарата входят лактулоза 66,7%, лимонная кислота 0,05% и очищенная вода. (ООО АВВА Рус, Россия)

Подопытным мышам перорально вводили антимикробный препарат в дозе на массу тела и очередности указанных в инструкции по применению антимикробных препаратов. В конце курса антибиотика подопытных мышей забивали и вскрывали. Содержимое кишечника исследовали газожидкостной хроматографией для определения концентраций (ммоль/г) летучих жирных кислот: C2 – уксусной, C3 – пропионовой, iC4 –изомасляной, C4 – масляной, iC5 – изовалериановой, C5 – валериановой, iC6 – изокапроновой C6 - капроновой. Полученные концентрации усредняли по группам и использовали в дальнейших расчетах.

Для выбора переменных (концентраций летучих жирных кислот) участвующих в дискриминантном анализе мы исследовали их на отсутствие корреляционных связей с фактором воздействия на микробиоту и величину отношения внутригрупповой изменчивости

показателя к его общей изменчивости (лямбда Уилкса). Факторами воздействия являются антимикробные препараты, которые давали экспериментальным животным. Так как отличия между препаратами носят качественный характер, то отсутствие корреляции мы определим как достоверное отличие значений переменных по группам между собой. Значения достоверности различий по группам представлено в таблице 39.

Таблица 39 - Степени функциональных нарушений микрофлоры содержимого кишечника мышей исследуемых групп

Досто- верность отличий	C2	C3	iC4	C4	iC5	C5	iC6	C6
АМЦ								
ЛВФ	0,074	0,307	0,143	0,057	0,702	0,083	0,001	0,402
ЦФК	0,162	0,257	5·10⁻⁴	8·10⁻⁵	0,005	0,005	0,519	0,271
ФСМ	0,002*	0,417	0,656	0,247	0,847	0,128	0,003	0,266
КЛТ	6·10⁻⁵*	0,058	0,004	0,252	0,056	0,296	0,002	0,36
АЗТ	0,12	3·10⁻⁵	0,112	0,123	0,059	0,497	0,054	0,793
МТР	0,233	0,014	0,027	0,001	0,145	0,016	8·10⁻⁵	0,649
ПНЗ	0,402	0,058	0,067	1·10⁻⁴	0,591	0,053	0,007	0,046
Контроль	0,379	0,002	3·10⁻⁴	5·10⁻⁹	0,015	0,007	0,008	0,027
ЛВФ								
ЦФК	0,024	0,011	8·10⁻⁵	0,007	0,004	0,989	0,055	0,032
ФСМ	0,254	0,873	0,594	0,051	0,94	0,059	0,473	0,637
КЛТ	0,069	0,093	0,17	0,05	0,326	0,121	0,715	0,95
АЗТ	0,005*	3·10⁻⁶	0,038	0,086	0,058	0,071	0,004	0,1
МТР	0,472	2·10⁻⁴	0,003	0,155	0,149	0,142	5·10⁻⁷	0,042
ПНЗ	0,241	7·10⁻⁴*	0,032	0,02	0,458	0,276	0,549	0,006
Контроль	0,024	5·10⁻⁵*	6·10⁻⁵	5·10⁻⁴	0,016	0,116	0,138	8·10⁻⁴
ЦФК								
ФСМ	0,004*	0,031*	8·10⁻⁴	7·10⁻⁵	0,009	0,002	0,089	0,019
КЛТ	0,002*	4·10⁻⁴*	1·10⁻⁵	7·10⁻⁵	9·10⁻⁴	0,012	0,073	0,023
АЗТ	0,603	9·10⁻⁵*	0,243	1·10⁻⁴	0,047	0,003	0,429	0,267
МТР	0,072	0,076	0,083	0,147	0,03	0,11	0,007	0,388
ПНЗ	0,075	0,364	0,942	0,495	0,02	0,246	0,123	0,23
Контроль	0,397	0,009*	0,496	0,878	0,135	0,084	0,16	0,233
ФСМ								
КЛТ	0,545	0,186	0,2	0,928	0,446	0,032	0,768	0,63
АЗТ	1·10⁻⁴*	6·10⁻⁶*	0,092	0,055	0,152	0,048	0,028	0,048
МТР	0,048	8·10⁻⁴*	0,039	0,001	0,335	0,013	4·10⁻⁵	0,021
ПНЗ	0,012	0,003*	0,056	1·10⁻⁴	0,578	0,046	0,886	0,004
Контроль	0,001*	1·10⁻⁴*	4·10⁻⁴	4·10⁻⁹	0,053	0,006	0,439	5·10⁻⁴

Таблица 39 - Степени функциональных нарушений микрофлоры содержимого кишечника мышей исследуемых групп (продолжение)

Досто- верность отличий	C2	C3	iC4	C4	iC5	C5	iC6	C6
КЛТ								
АЗТ	<i>5·10⁻⁶*</i>	<i>9·10⁻⁷*</i>	<i>0,015</i>	0,054	<i>0,002</i>	0,102	<i>0,016</i>	0,056
МТР	<i>0,003*</i>	<i>8·10⁻⁶*</i>	<i>3·10⁻⁴</i>	0,001	<i>0,001</i>	<i>0,02</i>	<i>9·10⁻⁵</i>	0,014
ПНЗ	<i>4·10⁻⁴*</i>	<i>2·10⁻⁵*</i>	<i>0,018</i>	<i>1·10⁻⁴</i>	0,121	0,064	0,729	0,005
Контроль	<i>8·10⁻⁵*</i>	<i>6·10⁻⁶*</i>	<i>2·10⁻⁵</i>	<i>4·10⁻⁹</i>	<i>6·10⁻⁴</i>	<i>0,009</i>	0,302	<i>4·10⁻⁴</i>
АЗТ								
МТР	<i>0,018*</i>	<i>0,004*</i>	0,827	<i>0,002</i>	0,481	<i>0,014</i>	<i>2·10⁻⁶</i>	0,741
ПНЗ	<i>0,025*</i>	<i>3·10⁻⁴*</i>	0,473	<i>2·10⁻⁴</i>	0,39	<i>0,05</i>	0,119	0,038
Контроль	0,578	<i>0,019*</i>	0,102	<i>9·10⁻⁹</i>	0,423	<i>0,006</i>	0,152	0,013
МТР								
ПНЗ	0,649	0,29	0,381	0,361	0,726	0,805	<i>0,005</i>	0,072
Контроль	0,081	0,271	<i>0,032</i>	0,062	0,156	0,914	<i>4·10⁻⁵</i>	<i>0,027</i>
ПНЗ								
Контроль	0,12	<i>0,038*</i>	0,617	0,459	0,148	0,86	0,666	0,775

Примечание: * - $p < 0,05$ - достоверные отличия от соответствующей группы указаны *полужирным курсивом*,

АМЦ – амоксициллин; КЛТ – кларитромицин; АЗТ – азитромицин; ЛВЦ – левофлоксацин; ЦФС – цефиксим; ФМЦ – фосфомицин; МТР – метотрексат; ПНЗ – преднизолон.

При расчете процента достоверных отличий групп между собой было получено, что 48,6% переменных достоверно $p < 0,05$ отличаются между собой, что позволяет использовать данные переменные для дискриминантного анализа.

Полученные концентрации подвергли корреляционному анализу (таблица 40), по результатам которого были определены наиболее не коррелирующие друг с другом метаболиты. Из 8 - ми исследуемых летучих жирных кислот коэффициент корреляции ниже 0,6 был отмечен у пропионовой, валериановой, изокапроновой и капроновой кислот.

Таблица 40 - Корреляции концентраций ЛЖК в содержимом кишечника мышей.

Корреляции	Уксус- ная	Пропи- оновая	Изомас- ляная	Мас- ляная	Изовале- риановая	Валери- ановая	Изокап- роновая	Капро- новая
Уксусная		<i>0,53*</i>	<i>0,54*</i>	<i>0,49*</i>	<i>0,51*</i>	<i>0,22*</i>	<i>0,35*</i>	<i>0,34*</i>
Пропионовая	<i>0,53*</i>		<i>0,44*</i>	<i>0,33*</i>	<i>0,48*</i>	<i>0,26*</i>	<i>-0,19*</i>	<i>0,09*</i>
Изомасляная	<i>0,54*</i>	<i>0,44*</i>		0,64	0,64	<i>0,51*</i>	<i>0,15*</i>	0,67
Масляная	<i>0,49*</i>	<i>0,33*</i>	0,64		<i>0,53*</i>	<i>0,59*</i>	<i>-0,08*</i>	<i>0,40*</i>
Изовалериановая	<i>0,51*</i>	<i>0,48*</i>	0,64	<i>0,53*</i>		<i>0,41*</i>	<i>0,03*</i>	<i>0,15*</i>
Валериановая	<i>0,22*</i>	<i>0,26*</i>	<i>0,51*</i>	<i>0,59*</i>	<i>0,41*</i>		<i>-0,23*</i>	<i>0,29*</i>
Изокапроновая	<i>0,35*</i>	<i>-0,19*</i>	<i>0,15*</i>	<i>-0,08*</i>	<i>0,03*</i>	<i>-0,23*</i>		<i>0,40*</i>
Капроновая	<i>0,34*</i>	<i>0,09*</i>	0,67	<i>0,40*</i>	<i>0,15*</i>	<i>0,29*</i>	<i>0,40*</i>	
Корреляции более 0,6	нет	нет	есть	есть	есть	нет	нет	есть

Примечание: * - $r < 0,6$ - отсутствие корреляции указаны *полужирным курсивом*

На этих переменных была построена дискриминантная функция с помощью пакета Discriminant Analysis программы Statistica 8.0. На рисунке 39 представлена трехмерная проекция расположения центроидов исследуемых групп в координатах дискриминантной функции пропионовой, валериановой и изокароновой кислот.

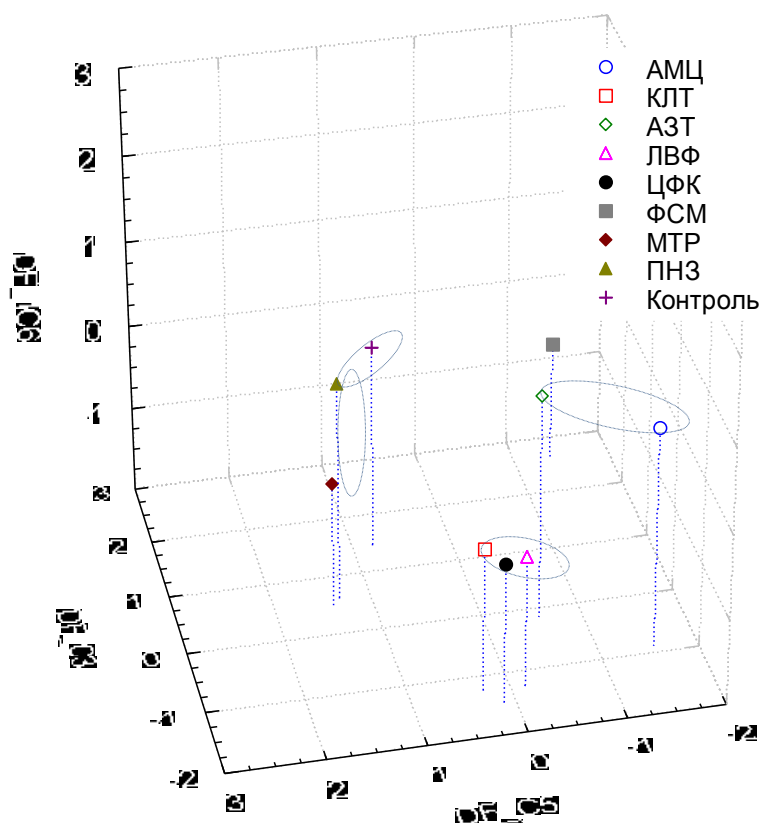


Рисунок 39 - Распределение центроидов групп и достоверность отличий между группами.

Примечание: АМЦ – амоксициллин; КЛТ – кларитромицин; АЗТ – азитромицин; ЛВЦ – левофлоксацин; ЦФС – цеффиксим; ФМЦ – фосфомицин; МТР – метотрексат; ПНЗ – преднизолон.

Графическое распределение центроидов в дискриминантном пространстве с указанием достоверных отличий представлено на трехмерной проекции (рисунок 39). Центроиды, которые не имеют достоверного разделения областей ($p < 0,05$) сгруппированы, а группы обозначены областями овальной формы. На рисунке показано, что препараты метотрексат и преднизолон не имеют достоверных отличий, а действие преднизолона вообще достоверно не отличается от группы контроля. Так же сгруппированы антибиотики бактерицидного принципа действия: клиндамицин; левофлоксацин и цефалексим. Более "мягкий" антибиотик фосфомицин не группируется с другими антибиотиками бактерицидного принципа действия. Однако из рисунка видно, что в группах амоксициллин (бактерицидный принцип действия) и азитромицин

(бактериостатический) не имеют достоверных отличий между собой, находятся на одной прямой относительно центроида норма. Из рисунка (Рисунок 39) видно, что группы с антибиотиками разного принципа действия группируются не зависимо от принципа действия.

Для определения относительной величины влияния антимикробного препарата на концентрации ЛЖК кишечника определяют удаленность центроидов от центроида группы сравнения, геометрическим сложением проекций векторов. Полученное расстояние называется расстоянием Махаланобиса (квадрат расстояний Махаланобиса). Результаты расстояний Махаланобиса между центроидами исследуемых групп представлены в таблице 41

Таблица 41 - Расстояние Махаланобиса между центроидами групп

0	АМЦ	КЛТ	АЗТ	ЛВТ	ЦФК	ФСМ	МТР	ПНЗ	N
АМЦ	—	4,71*	1,71	3,69*	4,63*	15,43*	13,2*	11,85*	12,19*
КЛТ	4,71*	—	3,07*	0,33	0,24	19,87*	4,88*	6,07*	8,88*
АЗТ	1,71	3,07*	—	2,9*	3,6*	11,13*	6,35*	4,68*	4,94*
ЛВТ	3,69*	0,33	2,9*	—	0,14	18,56*	6,42*	7,4*	9,98*
ЦФК	4,63*	0,24	3,6*	0,14	—	21,37*	6,58*	7,36*	10,72*
ФСМ	15,43*	19,87*	11,13*	18,56*	21,37*	—	13,96*	14,3*	8,02*
МТР	13,2*	4,88*	6,35*	6,42*	6,58*	13,96*	—	1,83	2,45*
ПНЗ	11,85*	6,07*	4,68*	7,4*	7,36*	14,3*	1,83	—	1,27
N	12,19*	8,88*	4,94*	9,98*	10,72*	8,02*	2,45*	1,27	—

Примечание: * - $p < 0,05$ - достоверное отличие от группы контроля указано **полужирным курсивом**

где АМЦ – амоксициллин; КЛТ – кларитромицин; АЗТ – азитромицин; ЛВЦ – левофлоксацин; ЦФС – цефиксим; ФМЦ – фосфомицин; МТР – метотрексат; ПНЗ – преднизолон.

Из таблицы 41 по соотношению расстояний Махаланобиса между группами видно, что наибольшую степень влияния на метаболические процессы микрофлоры кишечника оказывает амоксициллин, а наименьшую - преднизолон, который не относится к классу антибиотиков. Метатрексата, который является противоопухолевым средством, и так же не относится к классу антибиотиков оказывает достоверное но не большое влияние на метаболизм микрофлоры кишечника. Азитромицин, антибиотик бактериостатическим принципом действия оказывает значительное влияние на функциональную активность, но гораздо меньшую, чем антибиотики бактерицидного принципа действия.

3.2. Исследование концентрационной зависимости лактулозы на степень нарушения микробиоценоза кишечника мышей

Исследуем протективный эффект дозы пребиотика лактулозы на микрофлору кишечника в условиях приема амоксициклина. Амоксициклин антибиотик класс пенициллинов, бактерицидного механизма действия, который имеет спектр активности на энтеробактерии, а именно кишечную палочку, шигеллы, сальмонеллы и *proteus mirabilis*. Лактулоза синтетичесиз

дисахарид, который включает в состав молекулы галактозу и фруктозу и является стереоизометом молочного сахара, который не встречается в природе. Это свойство молекулы лактулозы позволяет ей попадать к микрофлоре кишечника в неизменном виде, так как ферментативный аппарат верхних отделов ЖКТ не подвергает её ферментации. При попадании лактулозы в кишечник селективно стимулируется сахаролитическая (бродильная) микрофлора за счет субстратного преимущества перед протеолитической (гнилостной) микрофлорой.

В эксперименте на группах лабораторных мышей сравнивали сочетанное действие на метаболическую активность микрофлоры кишечника смеси амоксициллина с лактулозой при варьировании разовой дозы лактулозы от 0 до 20 мг с контрольной группой, группой которой вводили только амоксициллин. Животным вводили смесь по 0,5 мл, перорально, 1 раз в сутки, в течение 6 дней. Группа АМЦ получала дневную дозу 10 мг амоксициллина, группа АМЦ50Л — амоксициллин и 0,5 мг лактулозы, группа АМЦ500Л — 5 мг, группа АМЦ2000Л — 20 мг.

Таблица 42 - Дозы лактулозы, применяемой в опыте.

Группы амоксициклин (10 мг.) + лактулоза	Доза лактулозы
АМЦ	0 мг.
АМЦ50Л	0,5 мг.
АМЦ500Л	5 мг.
АМЦ2000Л	20 мг.

Сравнивали средние величины концентраций ЛЖК и их производных в исследуемых группах. Данные приведены в таблицах 43 - 46:

Таблица 43 - Влияние лактулозы на концентрации уксусной, пропионовой и масляной кислот в содержимом кишечника мышей у разных экспериментальных групп

Группы	Концентрации ЛЖК, ммоль/г		
	уксусной	пропионовой	масляной
АМЦ	13,41 ± 2,56	<i>0,86 ± 0,6 *</i>	<i>0,15 ± 0,06*</i>
АМЦ 50Л	<i>8,26 ± 1,69 (p=0,004) * **</i>	<i>0,32 ± 0,06 (p=0,097) *</i>	<i>0,11 ± 0,03 (p=0,291) *</i>
АМЦ 500Л	13,4 ± 2,59 (p=0,997)	<i>0,72 ± 0,33 (p=0,69) *</i>	<i>0,1 ± 0,04 (p=0,219) *</i>
АМЦ 2000Л	<i>7,86 ± 1,65 (p=0,002) * **</i>	<i>0,66 ± 0,54 (p=0,635) *</i>	<i>0,09 ± 0,02 (p=0,07) *</i>

Примечание: * - $p < 0,05$ - достоверное отличие от группы контроля указаны **полужирным курсивом**

** - $p < 0,05$ - достоверное отличие для групп от группы АМЦ указаны **полужирным курсивом**

В таблице 43 показано, что влияние лактозы на концентрацию уксусной кислоты не имеет линейной зависимости с концентрацией лактулозы. Изменения концентрации пропионовой кислоты так же разнонаправлены при увеличении дозы лактулозы, а для концентрации масляной кислоты можно выделить тренд на снижение с увеличением дозы лактулозы.

Концентрации изокилот, а также валериановой и капроновой кислоты представлены в таблице 44

Таблица 44 - Влияние лактулозы на концентрации изокилот, валериановой и капроновой кислоты в содержимом кишечника мышей у разных экспериментальных групп

Группы	Концентрации ЛЖК, ммоль/г				
	изо масляной	изо валериановой	изо капроновой	валериановой	капроновой
АМЦ	<i>0,16 ± 0,05 *</i>	<i>0,15 ± 0,06 *</i>	<i>0,13 ± 0,04 *</i>	<i>0,02 ± 0,01 *</i>	<i>0,01 ± 0 *</i>
АМЦ50Л	<i>0,15 ± 0,12 (p=0,893)*</i>	<i>0,11 ± 0,04 (p=0,249)*</i>	<i>0,1 ± 0,02 (p=0,145)*</i>	<i>0,03 ± 0,03 (p=0,406)*</i>	<i>0,01 ± 0 (p=0,48)*</i>
АМЦ500Л	<i>0,12 ± 0,08 (p=0,53)*</i>	<i>0,13 ± 0,07 (p=0,537)*</i>	<i>0,12 ± 0,04 (p=0,646)*</i>	<i>0,01 ± 0,01 (p=0,599)*</i>	<i>0,01 ± 0 (p=0,786)*</i>
АМЦ2000Л	<i>0,13 ± 0,04 (p=0,437)*</i>	<i>0,12 ± 0,06 (p=0,404)*</i>	<i>0,08 ± 0,02 (p=0,03)**</i>	<i>0,05 ± 0,05 (p=0,295)*</i>	<i>0,01 ± 0 (p=0,763)*</i>

Примечание: * - $p < 0,05$ - достоверное отличие от группы контроля указаны *полужирным курсивом*

** - $p < 0,05$ - достоверное отличие для групп от группы АМЦ указаны *полужирным курсивом*

В таблице 44 показано, что в группе АМЦ2000Л отмечается достоверное снижение концентрации изокапроновой кислоты по сравнению с группой АМЦ. Значения концентраций других кислот, в представленной таблице ниже, чем в группе сравнения, что означает отсутствие стимулирующего эффекта на микроорганизмы, продуцирующие данные кислоты.

Таблица 45 - Влияние лактулозы на суммарную концентрацию и индексы ЛЖК микрофлоры содержимого кишечника мышей различных экспериментальных групп

Группы	Расчетные величины и индексы ЛЖК		
	Суммарная концентрация, ммоль/г	Структурный индекс	Индекс изокилот
АМЦ	<i>14,89 ± 3,06*</i>	<i>0,1 ± 0,03*</i>	<i>3,22 ± 1,44*</i>
АМЦ50Л	<i>9,09 ± 1,76 (p=0,004)* **</i>	<i>0,11 ± 0,03 (p=0,806)*</i>	<i>2,36 ± 0,59 (p=0,291)*</i>
АМЦ500Л	<i>14,62 ± 2,95 (p=0,902)*</i>	<i>0,09 ± 0,02 (p=0,365)*</i>	<i>2,72 ± 0,57 (p=0,535)*</i>
АМЦ2000Л	<i>9 ± 1,93 (p=0,005)*</i>	<i>0,15 ± 0,06 (p=0,18)*</i>	<i>2,6 ± 0,82 (p=0,474)*</i>

Примечание: * - $p < 0,05$ - достоверное отличие от группы контроля указаны *полужирным курсивом*

** - $p < 0,05$ - достоверное отличие для групп от группы АМЦ указаны *полужирным курсивом*

В таблице 45 показано, что функция суммарной концентрации ЛЖК разнонаправлена при увеличении дозы лактулозы. Так же не прослеживается определенных тенденций для структурного индекса и индекса изокилот при увеличении дозы лактулозы.

В таблице 46 показано, что функция доли уксусной и пропионовой кислот разнонаправлены. Доля масляной кислоты снижена и не изменяется при увеличении дозы лактулозы.

Таблица 46 - Соотношение уксусной, пропионовой и масляной кислот в содержимом кишечника мышей у разных экспериментальных групп.

Группы	Расчетные величины и индексы ЛЖК		
	Уксусная, %	Пропионовая, %	Масляная, %
АМЦ	<i>94 ± 2 (p<0,0001) *</i>	5 ± 2 (p=0,005)	<i>1 ± 0 (p<0,0001) *</i>
АМЦ50Л	<i>95 ± 1 (p<0,0001) *</i>	<i>4 ± 1 (p<0,0001) *</i>	<i>1 ± 0 (p<0,0001) *</i>
АМЦ500Л	<i>95 ± 1 (p<0,0001) *</i>	<i>5 ± 1 (p<0,0001) *</i>	<i>1 ± 0 (p<0,0001) *</i>
АМЦ2000Л	<i>92 ± 4 (p<0,0001) *</i>	6 ± 4 (p=0,088)	<i>1 ± 1 (p<0,0001) *</i>

Примечание: * - $p < 0,05$ - достоверное отличие от группы контроля указаны **полужирным курсивом**

** - $p < 0,05$ - достоверное отличие для групп от группы АМЦ указаны **полужирным курсивом**

Комплексная оценка функциональной активности по концентрации масляной кислоты, соотношению кислот и суммарной концентрации ЛЖК показывает наличие нарушения функциональной активности. Отмечается снижение суммарной концентрации ЛЖК, масляной кислоты и преобладание в соотношении C2:C3:C4 уксусной кислоты при дефиците масляной кислоты. Не отмечается выраженного протективного действия лактулозы при различных концентрациях лактулозы.

Используем дискриминантный анализ концентраций ЛЖК в содержимом кишечника мышей для оценки эффективности действия дозы лактулозы при приеме амоксициллина. На рисунке 40 представлена трехмерная проекция расположения центроидов исследуемых групп в координатах дискриминантной функции пропионовой, валериановой и изокароновой кислот:

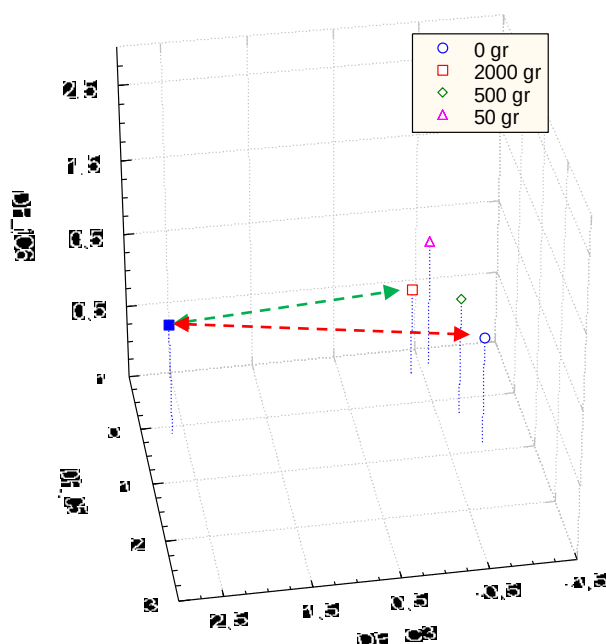


Рисунок 40 - Расположение центроидов исследуемых групп в трехмерной проекции по функциям дискриминантного анализа

Расстояния между центроидами исследуемых групп и центроидом группы норма представлены в таблице 47.

Таблица 47 - Расстояние между расположением центроидов (расстояние Махаланобиса), полученных в дискриминантном пространстве концентраций ЛЖК в содержимом кишечника мышей у разных экспериментальных групп.

Группа	Доза лактулозы, мг	Расстояние Махаланобиса до центроида группы контроль
АМЦ	0	9,43
АМЦ50Л	50	8,93
АМЦ500Л	500	11,47
АМЦ2000Л	2000	8,02

В таблице 47 показано, снижение расстояние между группами АМЦ2000Л, АМЦ50Л и группой норма по сравнению расстояния группы нормой с группой АМЦ. Учитывая достоверность значений расстояния Махаланобиса этих групп, можно отметить эффективность протективного действия Лактулозы для доз 50 и 2000 мг.

Рассчитаем эффективность протективного действия лактулозы по формуле:

$$\Delta = 1 - \frac{M_i}{M_{a/b}} \cdot 100\%,$$

где

- Δ - эффективность,
- M_i - расстояние Махаланобиса измеряемой концентрации,
- $M_{a/b}$ - расстояние Махаланобиса, по отношению к которому измеряется эффективность.

Показатели эффективности для данного исследования представлены в таблице 48 и на графике (рисунок 41):

Таблица 48 - Эффективность действия лактулозы рассчитанная на основании расстояния Махаланобиса у разных экспериментальных групп.

Группа	Эффективность, %
АМЦ	0,00
АМЦ+50Л	5,31
АМЦ+500Л	-21,59
АМЦ+2000Л	14,97

Из графика (рисунок 41) видно, что наибольшая эффективность в дозе - 20 мг. лактулозы. При исследовании эффективности лактулозы по отдельным метаболитам (концентрации масляной кислоты и суммарному уровню ЛЖК) и соотношению метаболитов также отмечалась недостаточная эффективность дозы лактулозы 5 мг., но из-за недостоверных различий групп можно было опираться только на тенденции и тренды. При использовании дискриминантного анализа все группы достоверно отличаются друг от друга, так как сравнение происходит не в одномерном пространстве, а в многомерном, где увеличивается число степеней свободы и за счет этого увеличивается разрешающая способность метода.

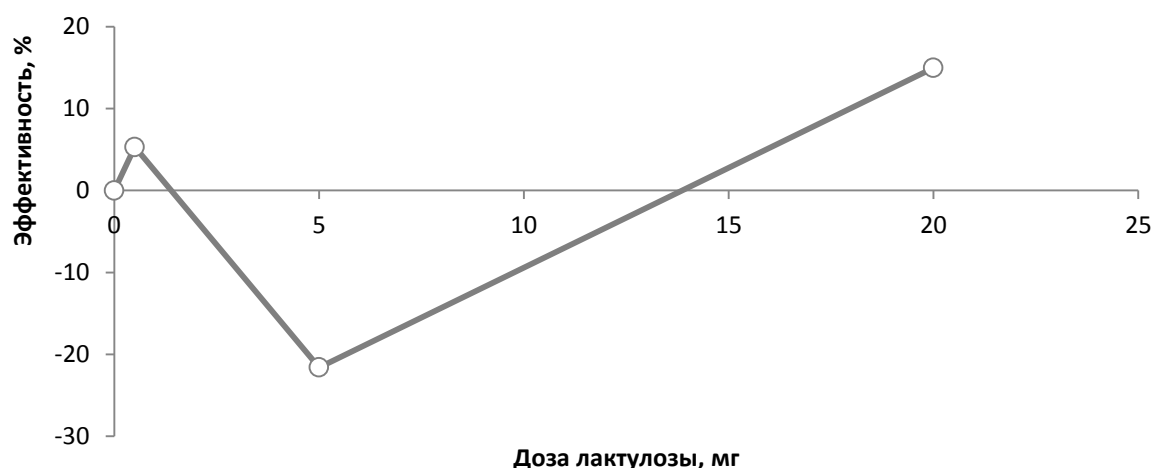


Рисунок 41 - Эффективность действия лактулозы рассчитанная на основании расстояния Махалонобиса у разных экспериментальных групп.

3.3. Исследование зависимости экспозиции лактулозы на степень нарушения микробиоценоза кишечника мышей.

Исследуем протективный эффект дозы и экспозиции пребиотика лактулозы на микрофлору кишечника в условиях приема азитромицина. Азитромицин антибиотик класса азалидов. Действует бактериостатически, а в высоких концентрациях бактерицидно. Является средством широкого спектра действия и активен в отношении *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Haemophilus*, *Moraxella*, *Bordetella*, *Legionella*, *Campylobacter*, *Neisseria*, *Gardnerella*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Chlamydia*, *Mycoplasma*, *Mycobacterium*, *Ureaplasma*, *Treponema*, *Borrelia*.

В эксперименте на группах лабораторных мышей сравнивали сочетанное действие на метаболическую активность микрофлоры кишечника смеси азитромицина с лактулозой при варьировании разовой дозы лактулозы от 0 до 1,2 мг и экспозиции 3 и 6 дней с контрольной группой, группой которой вводили только азитромицин. Особенность действия азитромицина (продолгованность) заключается в механизме его действия. Вещество частично выводится с калом, а частично всасывается в кишечнике и вновь поступает в кишечник с желчью. Поэтому в схеме эксперимента предусмотрены два периода: первые 3 дня, когда животным вводили азитромицин и следующие 3 дня, когда азитромицин не давали, но за счет его частичного сохранения в организме считали, что его действие на микробиоценоз сохраняется. Животным вводили смесь по 0,5 мл, перорально, 1 раз в сутки, в течение 3 и 6 дней. Группы АЗТЗ и АЗТ7 получала дневную дозу 2 мг азитромицина 3 и 6 дней. Группы АЗТЗЛ и АЗТ7Л — азитромицин и 0,6 мг лактулозы 3 и 6 дней соответственно. Группы АЗТЗЛ5 и АЗТ7Л5 — азитромицин и 1,2 мг лактулозы 3 и 6 дней соответственной. Группа ЛЗ, Л7, 5ЛЗ и 5Л7 получали раствор лактулозы в дозах 0,6 мг 3 дня, 0,6 мг 6 дней, 1,2 мг 3 дня, 1,2 мг 6 дней соответственно. Дозы и

экспозиции применяемые в опыте представлены в таблице 49.

Таблица 49 - Дозы лактулозы и экспозиция, применяемые в опыте.

Группы азитромицин + лактулоза	Доза азитромицина, мг	Доза лактулозы, мг	Экспозиция (длительность опыта), сут.
Контроль	—	—	6
A3T3	2	—	3
A3T7	2	—	6
A3T3Л	2	0,6	3
A3T7Л	2	0,6	6
A3T3Л5	2	1,2	3
A3T7Л5	2	1,2	6

Используем дискриминантный анализ концентраций ЛЖК в содержимом кишечника мышей для оценки эффективности действия дозы и экспозиции лактулозы при приеме азитромицина. На рисунке 42 представлена трехмерная проекция расположения центроидов исследуемых групп в координатах дискриминантной функции пропионовой, валериановой и изокароновой кислот:

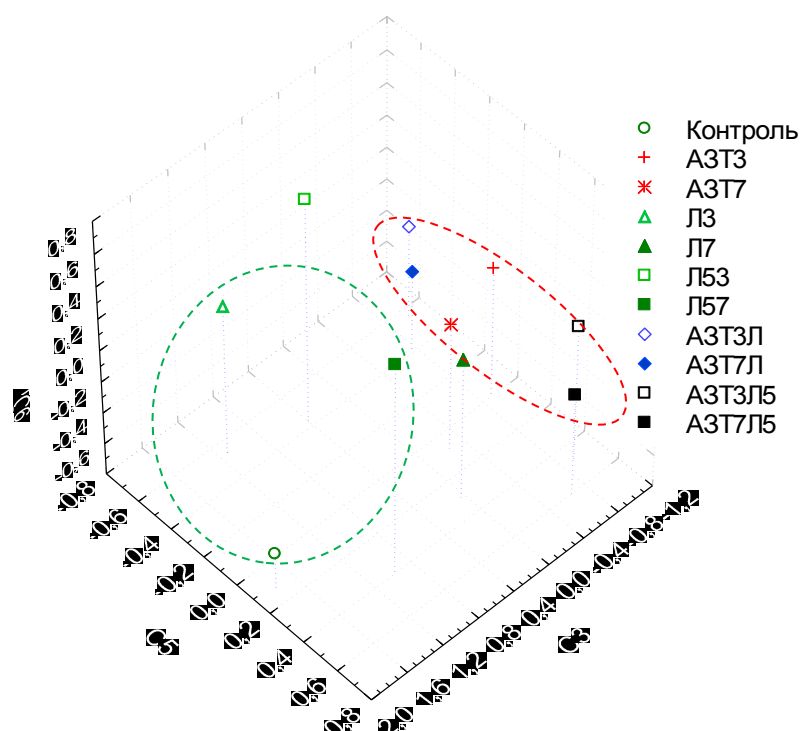


Рисунок 42 - Расположение центроидов исследуемых групп в трехмерной проекции по функциям дискриминантного анализа

Расстояния между центроидами исследуемых групп и центроидом группы норма представлены в таблице 50

Таблица 50 - Расстояние между расположением центроидов (расстояние Махаланобиса), полученных в дискриминантном пространстве полученным по концентрациям ЛЖК в содержимом кишечника мышей у разных экспериментальных групп.

	ктр	A3T3	азт7	Л3	Л7	5Л3	5Л7	A3T3Л	A3T7Л	A3T3Л5	A3T7Л5
ктр		8,55*	5,02*	1,66	3,99*	4,05*	2,18	9,46*	7,75*	8,85*	7,28*
A3T3	8,55*		0,51	5,05*	1,17	2,58*	4,56*	0,45	0,3	0,28	0,6
A3T7	5,02*	0,51		2,65*	0,17	1,2	2,13	1,2	0,69	0,7	0,61
Л3	1,66	5,05*	2,65*		2,25	0,87	1,36	5,5*	4,34*	5,95*	5,12*
Л7	3,99*	1,17	0,17	2,25		1,06	1,19	2,21	1,54	1,1	0,86
5Л3	4,05*	2,58*	1,2	0,87	1,06		1,2	3,1*	2,49	3,26*	3,15
5Л7	2,18	4,56*	2,13	1,36	1,19	1,2		6,03*	4,97*	4,35*	3,76*
A3T3Л	9,46*	0,45	1,2	5,5*	2,21	3,1*	6,03*		0,16	1,36	1,94
A3T7Л	7,75*	0,3	0,69	4,34*	1,54	2,49	4,97*	0,16		1,08	1,29
A3T3Л5	8,85*	0,28	0,7	5,95*	1,1	3,26*	4,35*	1,36	1,08		0,22
A3T7Л5	7,28*	0,6	0,61	5,12*	0,86	3,15	3,76*	1,94	1,29	0,22	

Примечание: * - $p < 0,05$ - достоверное отличие между группами.

На рисунке 42 показано, что расстояние от центроида группы Контроль до центроида групп с Л3, Л7 меньше, чем расстояния — 5Л3 и 5Л7. Так же показано, что центроиды групп 5Л3 и 5Л7 достоверно отличаются от Контроля. Прием лактулозы в дозе 1,2 мг достоверно влияет на метаболическую активность микрофлоры кишечника.

Расстояния от центроида группы Контроль до центроидов групп АЗТ3 и АЗТ7 больше, чем расстояния до центроидов групп Л3, Л7, 5Л3, 5Л7. Действие азитромицина влияет на метаболическую активность микробиоценоза кишечника больше, чем лактулоза и имеет такую же направленность, так как векторы расстояния не имеют противоположных направлений в заданных координатах дискриминантной функции.

Расстояние от центроида группы Контроль до центроида группы АЗТ3 больше, чем расстояние до центроида группы АЗТ7. Те же пропорции расстояний наблюдаются в группах АЗТ3Л и АЗТ7Л, и в группах АЗТ3Л5 и АЗТ7Л5. Действие азитромицина на микробиоценоз кишечника после приема препарата становится менее выраженным, при различных вариантах схем, доз и экспозиций сочетанного действия азитромицина и лактулозы.

Расстояние от центроида группы Контроль до центроида группы АЗТ3 и АЗТ7 больше, чем до центроида группы АЗТ3Л и АЗТ7Л соответственно, что свидетельствует об отрицательном эффекте лактулозы на микробиоценоз кишечника мышей. Такой же эффект мы наблюдаем при сравнении расстояний между центроидами контроля и центроидами групп АЗТ3 и АЗТ с центроидами групп АЗТ3Л5 и АЗТ7Л5. Однако, при учете действия лактулозы нам необходимо сравнивать расстояния не с группой Контроль, а с группами Л3, Л7 и Л53, Л57.

Расчеты эффективности представлены в таблицах 51 - 52.

Таблица 51 - Эффективность действия лактулозы рассчитанная на основании расстояния Махалонобиса у разных экспериментальных групп без учета взаимодействия лактулозы с азитромицином.

Название	Доза лактулозы, мг.	Эффективность, %	
		3 дня	6 дней
Азитромицин+лактозула/азитромицин	1,2	-10,66	-54,38
Азитромицин+лактозула/азитромицин	6	-3,54	-45,00

Отрицательная эффективность действия лактулозы представленная в таблице 51 неочевидна, так как из таблицы 52 видно, что изменения функциональной активности групп АЗТЗ, АЗТ7 и групп АЗТЗЛ, АЗТ7Л, АЗТЗЛ5, АЗТ7Л5 разнонаправлены. Если допустить, что применение лактулозы положительно влияет на функциональную активность микробиоценоза, то можно учесть в расчетах влияние самой лактулозы на микробиоценоз и определить приведеную эффективность, перенеся точку опоры с центроида контроля на соответствующие центроиды лактулозы.

Таблица 52 - Эффективность действия лактулозы рассчитанная с учетом воздействия на микрофлору самой лактулозы, на основании расстояния Махалонобиса у разных экспериментальных групп.

Название	Доза лактулозы, мг.	Эффективность, %	
		3 дня	6 дней
Азитромицин+лактозула/азитромицин	1,2	35,72	69,41
Азитромицин+лактозула/азитромицин	6	30,47	82,88

Из таблицы 52 видно, что максимальный эффект достигается при максимальной дозе лактулозы на 6 день.

Глава 4. Применение интегральной оценки микробиоценозов у пациентов различных нозологий и при применении пробиотических препаратов.

Оценка микробиоценозов кишечника и ротоглотки имеет важное значение, при лечении различных нозологий. Многие системы организма зависят от стабильности и полноты работы кишечника. Кишечная микрофлора очень пластична и устойчива, так как имеет много уровней защиты и управления состоянием микробиоценоза. Однако, многие заболевания и лекарственные препараты, используемые для лечения этих заболеваний, дестабилизируют работу кишечной микрофлоры и снижают ее защитную и другие функции. Компроментация микрофлоры ротоглотки приводит к снижению ее барьерной функции и прочих механизмов защиты. Оценка влияния разнонаправленных факторов на разные системы микробиоценозов наиболее эффективна с использованием интегральной системой оценки микробиоценозов. В настоящей главе будут рассмотрены изменения микробиоценозов кишечника и ротоглотки у пациентов с заболеваниями инфекционной нозологии, с последствиями перенесенных гастроуденитов и онкологических заболеваний. Так же будет исследовано действие синбиотиков Бифидум Мульти и Нормоспектрум на микрофлору кишечника и ротоглотки.

4.1. Изменения микробиоценоза ротоглотки и кишечника у больных с острым бронхитом и острой пневмонией при антимикробной и противовирусной терапии и эффективность микрoэкологической коррекции синбиотиком Бифидум Мульти.

Для оценки микробиоценозов ротоглотки у пациентов с острыми респираторными заболеваниями (ОРЗ), были взяты результаты анализов пациентов, проходивших лечение в отделении детских инфекций детской городской клинической больницы имени святого Владимира – 47 человек из них 14 (29,8%) женщины и 33 (70,2%) мужчины. Исследовали слюну на содержание ЛЖК с дальнейшим разделением концентраций по 3 степеням метаболических нарушений дискриминантным анализом. Мазки с задней стенки ротоглотки исследовали микробиологическим методом. Результат оценивали по степени микробиологических нарушений, классифицированных искусственной нейронной сетью, а так же определяли долю микроорганизмов, чувствительных к бактериофагам. Проводили микробиологическое исследование кала с определением чувствительности к бактериофагам, а так же определяли концентрации ЛЖК в кале. Концентрации ЛЖК сравнивали с референсными значениями, а микробиологические анализы кала оценивали по степени микробиологических нарушений и количеству микроорганизмов, чувствительных к бактериофагам. 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 виды *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. longum* и *B. adolescentis* а так же пребиотические компоненты: пектин, олигофруктоза и инулин. (ЗАО "АМФИТА", Россия). Схема включения и дозировка комбинированного пробиотика «Бифидум Мульти» была регламентирована в отраслевом стандарте [90] и учебном пособии Факультета усовершенствования врачей ГУ МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского [96].

Результаты бактериологического анализа кала для групп острый бронхит (ОБ) и острая пневмония (ОП) представлены в таблице 53.

Таблица 53 - Встречаемость и концентрации микрофлоры кишечника до и после лечения острого бронхита в группах с пробиотиком Бифидум Мульти (ОБ+БМ) и без него (ОБ).

Микроорганизм	До лечения		Антибиотикотерапия (ОБ)			С пробиотиком (ОБ+БМ)		
	Встр-сть, %	Кол-во, Lg КОЕ/г	Встр-сть, %	Кол-во, Lg КОЕ/г	Дост-сть Р	Встр-сть, %	Кол-во, Lg КОЕ/г	Дост-сть Р
<i>Bifidobacterium spp.</i>	100	8,68	100,0	8,33	1,000	100,0	8,71	1,000
<i>Lactobacillus spp.</i>	100	6,21	100,0	6,22	1,000	100,0	6,14	1,000
<i>Escherichia coli</i>	94,73	6,89	88,9	7,25	0,666	85,7	7,50	0,502
<i>Enterococcus spp.</i>	68,42	5,46	100,0	6,56	0,015	100,0	5,29	0,015
<i>Escherichia coli lac-</i>	21,05	7,00	0,0	-	<i>p<0,001</i>	0,0	-	<i>p<0,001</i>
<i>Klebsiella spp.</i>	15,78	6,00	22,2	6,50	0,297	28,6	6,50	0,055
<i>Pseudomonas spp.</i>	15,78	5,67	11,1	4,00	0,367	0,0	-	<i>p<0,001</i>
<i>Candida spp.</i>	15,78	4,67	0,0	-	<i>p<0,001</i>	0,0	-	<i>p<0,001</i>
<i>Proteus spp.</i>	10,52	8,00	0,0	-	0,001	0,0	-	0,001
<i>Staphylococcus spp.</i>	10,52	4,00	11,1	6,00	0,900	14,3	4,00	0,450
<i>Enterobacter spp.</i>	5,263	6,00	22,2	8,50	0,001	14,3	8,00	0,041
<i>Staphylococcus aureus.</i>	0	-	0,0	-	<i>p<0,001</i>	14,3	4,00	<i>p<0,001</i>

Примечание: Достоверные отличия указаны полужирным курсивом.

В таблице 53 видно, что в результате проведенной антибактериальной и противовирусной терапии снижается количество высеваемых микроорганизмов. В группе ОБ после лечения увеличивается концентрация нетипичных для данного биотопа микроорганизмов: *Enterobacter spp.* и *Pseudomonas spp.* Различия в группах с применением синбиотика Бифидум Мульти по бактериологическому анализу кала существуют. В группе ОБ выделены *Pseudomonas spp.*, а в группе ОБ+БМ — не выделены. В группе ОБ+БМ выделен *Staphylococcus aureus*, а в группе ОБ — не выделен. Имеющиеся различия не затрагивают

индигенную микрофлору кишечника (*Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.* и *Escherichia coli*), поэтому нельзя считать их значимыми.

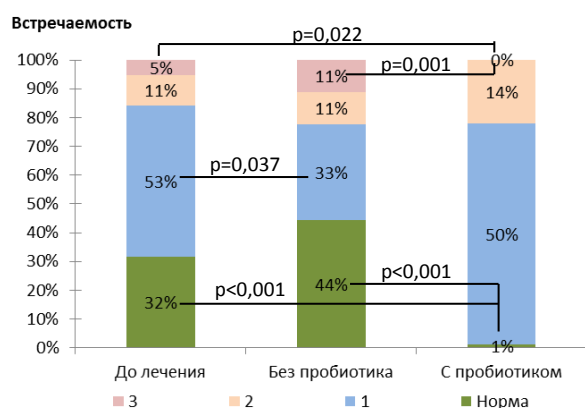
Таблица 54 - Встречаемость и концентрация микрофлоры кишечника до и после лечения пневмонии с пробиотиком и без него.

Микроорганизм	До лечения		Антибиотикотерапия ОП			С пробиотиком ОП+БМ		
	Встр-сть, %	Кол-во, Lg КОЕ/г	Встр-сть, %	Кол-во, Lg КОЕ/г	Дост-сть Р	Встр-сть, %	Кол-во, Lg КОЕ/г	Дост-сть Р
<i>Bifidobacterium spp.</i>	100	8,68	100,0	8,27	1,000	100,0	8,38	1,000
<i>Lactobacillus spp.</i>	100	6,21	100,0	6,18	1,000	100,0	6,08	1,000
<i>Escherichia coli</i>	94,73	6,89	81,8	5,44	0,331	100,0	6,31	0,706
<i>Enterococcus spp.</i>	68,42	5,46	90,9	5,50	0,075	100,0	5,31	0,015
<i>Escherichia coli lac-</i>	21,05	7,00	18,2	7,50	0,647	7,7	8,00	0,013
<i>Klebsiella spp.</i>	15,78	6,00	9,1	4,00	0,179	7,7	4,00	0,095
<i>Pseudomonas spp.</i>	15,78	5,67	0,0	-	<i>p<0,001</i>	23,1	5,00	0,242
<i>Candida spp.</i>	15,78	4,67	0,0	-	<i>p<0,001</i>	0,0	-	<i>p<0,001</i>
<i>Proteus spp.</i>	10,52	8,00	0,0	-	0,001	0,0	-	0,001
<i>Staphylococcus spp.</i>	10,52	4,00	27,3	4,67	0,006	7,7	5,00	0,507
<i>Enterobacter spp.</i>	5,263	6,00	45,5	7,00	<i>p<0,001</i>	30,8	6,25	<i>p<0,001</i>
<i>Staphylococcus aureus.</i>	0	-	9,1	4,00	0,003	0,0	-	<i>p<0,001</i>

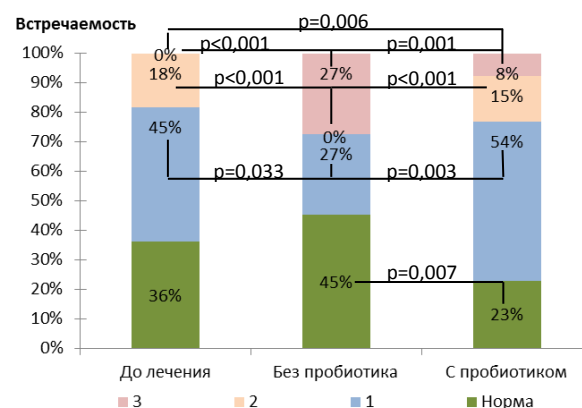
Примечание: Достоверные отличия указаны **полужирным курсивом**.

В таблице 54 показано, что в результате проведенной антимикробной и противовирусной терапии снизилось количество и встречаемость условно-патогенной микрофлоры в группе ОП. В группе ОП+БМ снизилась частота встречаемости *Escherichia coli lac-* и увеличилось частота встречаемости *Enterococcus spp.*. При сравнении групп ОП и ОП+БМ отмечено увеличенное количество *Pseudomonas spp.*, и отсутствие *Staphylococcus aureus.*. Имеющиеся различия не затрагивают индигенную микрофлору кишечника, поэтому нельзя считать их значимыми.

Для интегральной оценки микробиоценоза кишечника и определение глубины и вектора изменений в результате антимикробной и противовирусной терапии, а так же влияния пробиотика Бифидум мульти используем показатель встречаемости микробиоценозов с различной степенью микробиологических нарушений. Для определения степени микробиологических нарушений микрофлоры кишечника используем нейросеть MLP 93-14-4, рассчитанную в главе 2.2. Результаты частоты встречаемости пациентов в группах до лечения, ОБ, ОП, ОБ+БМ и ОП+БМ по степеням дисбиоза представлены на рисунке 43:



а) группа ОБ

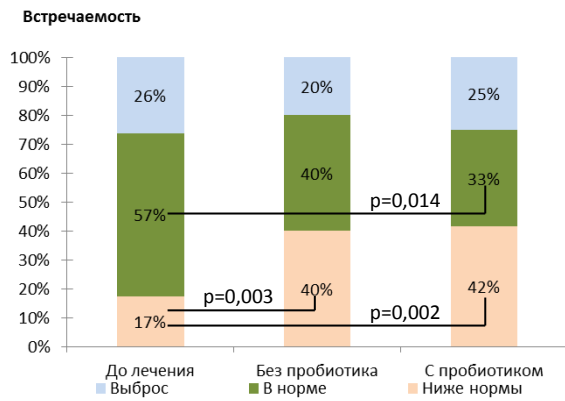


б) группа ОП

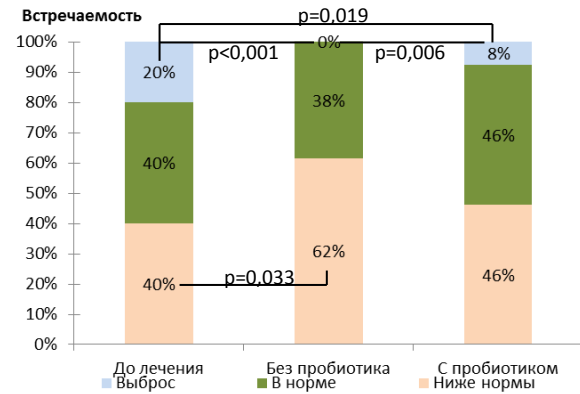
Рисунок 43 – Частота встречаемости в группах по степеням дисбиоза кишечника до и после лечения с пробиотиком и без него.

На графиках (рисунок 43) показано, что в группах ОБ (рисунок 43а) достоверно снижена частота встречаемости микробиоценозов кишечника без микробиологических нарушений, и увеличены 1-я и 3-я степени микробиологических нарушений. В группе ОП (рисунок 43б) достоверно снижается встречаемость микробиоценозов с 1-й и 2-й степенью микробиологических нарушений и увеличивается встречаемость с 3-ей степенью микробиологических нарушений. Таким образом, влияние антимикробной и противовирусной терапии на встречаемость микробиоценозов без микробиологических нарушений не отмечается, а увеличение встречаемости микробиоценозов со 2-й и 3-й степени микробиологических нарушений происходит за счёт снижения встречаемости микробиоценозов с 1-й степенью микробиологических нарушений. Влияние синбиотика Бифидум Мульти для группы ОБ отмечено снижением встречаемости микробиоценозов без степени микробиологических нарушений и с 3-ей степенью. Для группы ОП отмечено снижение встречаемости микробиоценозов без микробиологических нарушений и с 3-ей степенью микробиологических нарушений и увеличение встречаемости 1-й и 2-й степени микробиологических нарушений.

Для оценки изменений метаболической активности микрофлоры используем референсные значения, полученные в главе 2.2. для микробиоценоза 3-й степени дисбиоза (таблица 26), а так же оценим количество пациентов со значениями, превышающими значения показателей ЛЖК метаболического паспорта здорового человека — глава 2.3 таблица 22. Частота встречаемости микробиоценозов пациентов представлена на графиках (рисунки 46- 50):

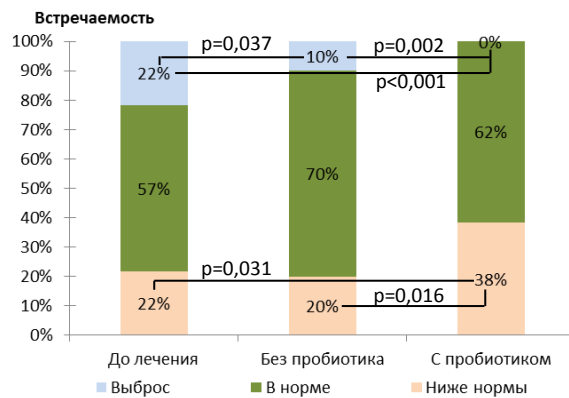


а) группа ОБ

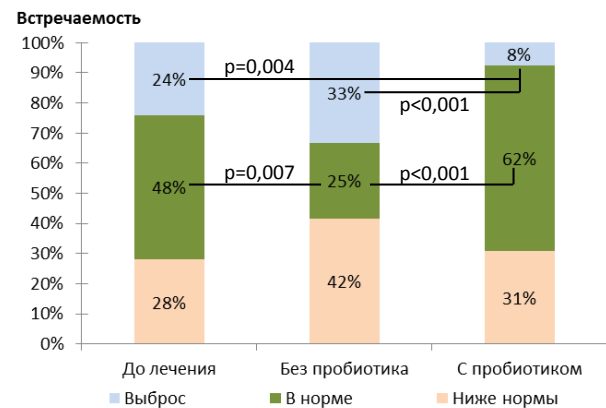


б) группа ОП

Рисунок 44 - Встречаемость нормальных значений общего уровня ЛЖК, а так же ниже и выше нормы при а) бронхите и б) пневмонии

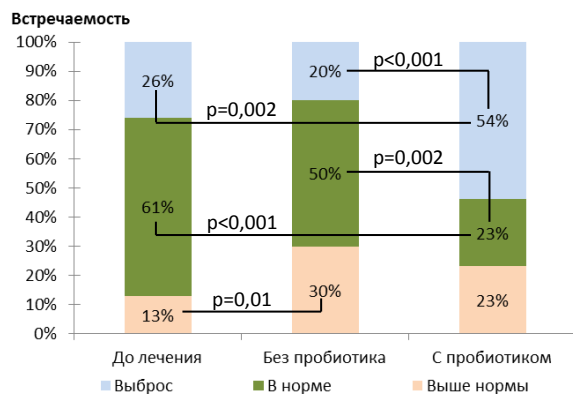


а) группа ОБ

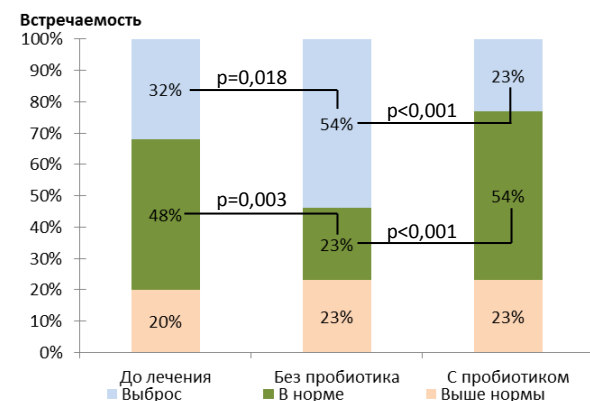


б) группа ОП

Рисунок 45 - Встречаемость нормальных значений масляной кислоты, а так же ниже и выше нормы при а) бронхите и б) пневмонии

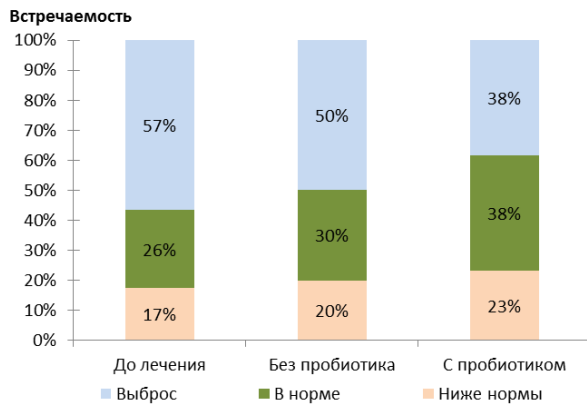


а) группа ОБ

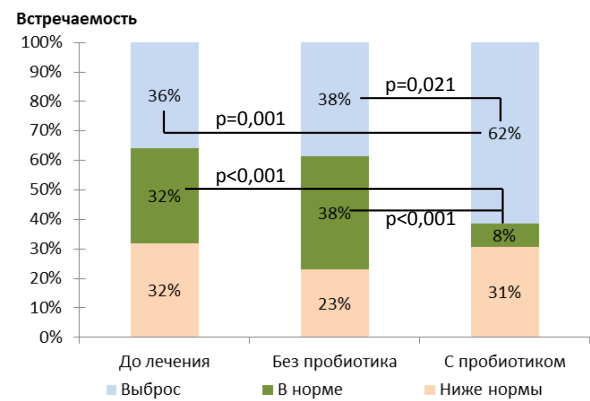


б) группа ОП

Рисунок 46 - Встречаемость нормальных значений доли уксусной кислоты, а так же ниже и выше нормы при а) бронхите и б) пневмонии

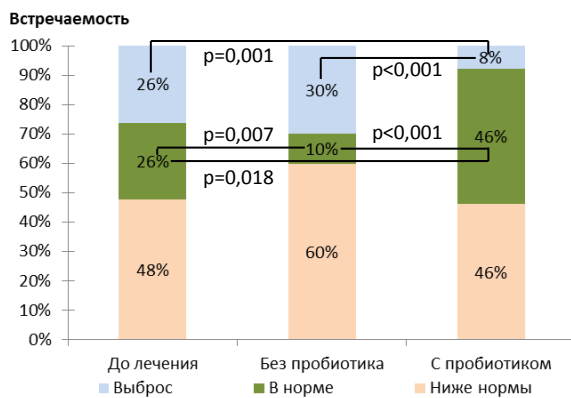


а) группа ОБ

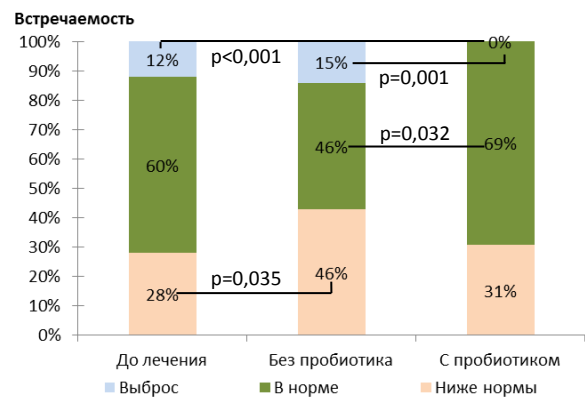


б) группа ОП

Рисунок 47 - Встречаемость нормальных значений доли пропионовой кислоты, а так же ниже и выше нормы при а) бронхите и б) пневмонии

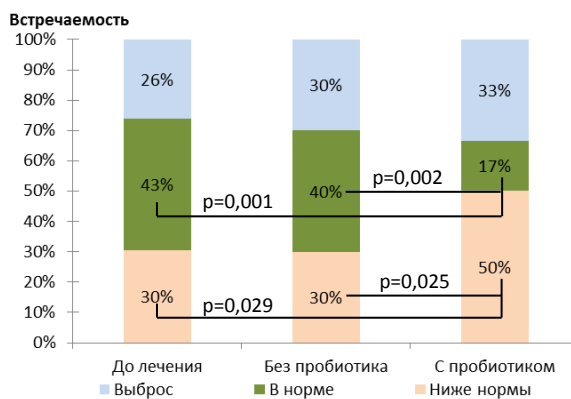


а) группа ОБ

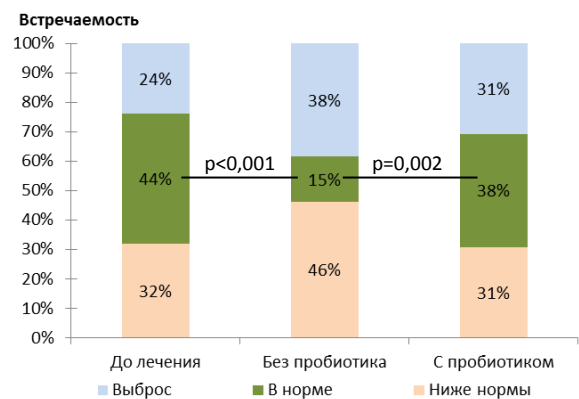


б) группа ОП

Рисунок 48 - Встречаемость нормальных значений доли масляной кислоты, а так же ниже и выше нормы при а) бронхите и б) пневмонии

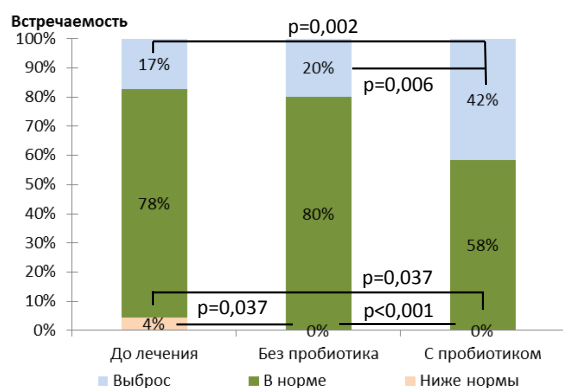


а) группа ОБ

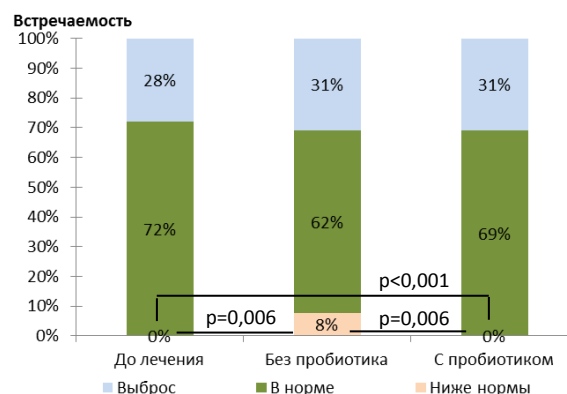


б) группа ОП

Рисунок 49 - Встречаемость нормальных значений структурного индекса, а так же ниже и выше нормы при а) бронхите и б) пневмонии



а) группа ОБ



б) группа ОП

Рисунок 50 - Встречаемость нормальных значений индекса изокапрола, а так же ниже и выше нормы при а) бронхите и б) пневмонии

На графиках (рисунок 44) показано, что встречаемость микробиоценозов с суммарной концентрацией ЛЖК ниже нормы увеличивается в результате антимикробной и противовирусной терапии в группах ОБ (рисунок 44а) и ОП (рисунок 44б). В группе ОБ (рисунок 46а) увеличивается встречаемость микробиоценозов со сниженной долей уксусной кислоты, а в группе ОП — с долей масляной (рисунок 48б). В группе ОБ+БМ увеличивается встречаемость микробиоценозов со сниженным значением суммарного уровня кислот (рисунок 44а), масляной кислоты (рисунок 48а) и структурного индекса (рисунок 49а), а так же увеличивается встречаемость микробиоценозов с долей масляной кислоты в рамках референсных значений (рисунок 48а). В группе ОП+БМ увеличивается частота встречаемости микробиоценозов со следующими показателями в рамках референсных значений: концентрации масляной кислоты (рисунок 45б); доли уксусной (рисунок 46а), масляной кислоты (рисунок 48б) и структурного индекса (рисунок 49б).

Таким образом, протективное действие синбиотика Бифидум Мульти более выражено для группы ОП, так как не отмечается увеличения частоты встречаемости микробиоценозов с показателями ниже референсных значений, а встречаемость микробиоценозов с показателями в рамках референсных значений больше чем в группе ОБ.

Результаты исследования микробиоценозов с избытком фагочувствительной микрофлоры у пациентов исследуемых групп представлено на рисунке 51.

Доля фагочувствительной микрофлоры, %

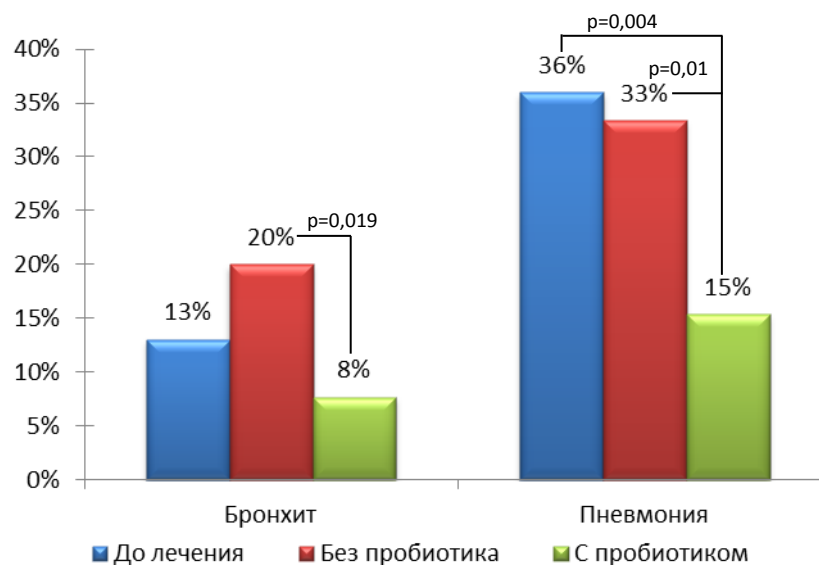


Рисунок 51 - Встречаемость микробиоценозов с присутствием фагочувствительной микрофлоры в группах до лечения и ОБ, ОБ+БМ, ОП, ОП+БМ.

На рисунке 51 показано, что в группе ОБ и ОП встречаемость микробиоценозов с избытком фагочувствительной микрофлоры не меняется, а в группах ОБ+БМ и ОП+БМ достоверно снижается. Таким образом, в результате включения в антимикробную и противовирусную терапию синбиотика Бифидум Мульти снижается встречаемость микробиоценозов с признаком избытка фагочувствительной микрофлоры, характерным для дисбитических нарушений микробиоценоза кишечника.

Исследование встречаемости и концентрации микрофлоры задней стенки глотки представлено в таблицах 55 и 56.

Таблица 55 - Встречаемость и концентрация микрофлоры ротоглотки до и после лечения острого бронхита с пробиотиком и без него.

Микроорганизмы	До лечения		Без пробиотика (ОБ)		С пробиотиком (ОБ+БМ)	
<i>Streptococcus spp. α-hem+</i>	100%	6,58	100%	6,78	100%	6,63
<i>Neisseria spp.</i>	95%	6,39	100%	6,67	100%	6,63
<i>Staphylococcus spp.</i>	26%	3,80	44%*	4,75	0%* **	-
<i>Candida spp.</i>	26%	4,40	33%	4,67	13%* **	6,00
<i>Staphylococcus aureus.</i>	21%	5,00	22%	5,00	38%* **	4,33
<i>Klebsiella spp</i>	11%	5,00	0%*	-	0%*	-
<i>Streptococcus spp. β-hem+</i>	5%	7,00	0%*	-	0%*	-
<i>Escherichia coli</i>	0%	-	22%*	5,00	0% **	-
<i>Enterobacter spp.</i>	0%	-	11%*	5,00	0% **	-
<i>Pseudomonas spp</i>	0%	-	0%	-	13%* **	6,00

Примечание: * - достоверное отличие от значения группы «До лечения» ($p < 0,05$)

** - достоверное отличие значений в группах ОБ и ОБ+БМ ($p < 0,05$)

Таблица 56 - Встречаемость и концентрация микрофлоры ротоглотки до и после лечения острой пневмонии с пробиотиком и без него.

Микроорганизмы	До		Без пробиотика (ОП)		С пробиотиком (ОП+БМ)	
<i>Streptococcus spp. α-hem+</i>	100%	6,35	100%	6,42	100%	6,56
<i>Neisseria spp.</i>	91%	6,48	100%	6,42	100%	6,56
<i>Staphylococcus spp.</i>	52%	3,50	42%	3,80	67%* **	3,83
<i>Staphylococcus aureus</i>	17%	4,50	8%	5,00	11%	5,00
<i>Candida spp.</i>	17%	4,75	33%*	4,25	22%	5,00
<i>Klebsiella spp</i>	9%	5,00	8%	5,00	22%* **	4,50
<i>Enterobacter spp.</i>	9%	5,00	8%	3,00	0%* **	-
<i>Pseudomonas spp.</i>	9%	4,00	0%*	-	11%* **	4,00

Примечание: * - достоверное отличие от значения группы «До лечения» ($p < 0,05$)

** - достоверное отличие значений в группах ОП и ОП+БМ ($p < 0,05$)

В таблицах (таблица 55, 56) показано, что в группе ОБ в результате антимикробной и противовирусной терапии подавлен рост *Klebsiella spp.* и *Streptococcus spp. β-hem+*, а микроорганизмы *Staphylococcus spp.*, *E.Coli*, *Enterobacter spp.* – увеличили встречаемость и титр. В группе ОП подавлен рост *Pseudomonas* и снижен рост *Candida spp.*. В группе ОБ+БМ подавлен рост и снижена встречаемость и концентрация всех условно-патогенных микроорганизмов, кроме *Pseudomonas spp.*, а в группе ОП+БМ подавлен рост *Enterobacter spp.* и увеличилось количество микроорганизмов *Staphylococcus spp.*, *Klebsiella spp.*, *Pseudomonas spp.*. Имеющиеся различия не затрагивают индигенную микрофлору ротоглотки (*Streptococcus spp. α-hem+* и *Neisseria spp.*), поэтому нельзя считать их значимыми.

Для интегральной оценки микробиоценоза ротоглотки и определение глубины и вектора изменений в результате антимикробной и противовирусной терапии, а так же влияния пробиотика Бифидум мульти используем показатель частот встречаемости микробиоценозов с различной степенью микробиологических нарушений. Оценим изменения микрофлоры ротоглотки по степеням микробиологических нарушений определяемых нейронной сетью MLP 93-39-4.

В таблице 57 показано, что в группе ОБ достоверно снижается встречаемость микробиоценозов без микробиологических нарушений и увеличивается встречаемость микробиоценозов со 2-й степенью микробиологических нарушений. В группе ОП достоверно увеличивается встречаемость микробиоценозов со 2-й степенью микробиологических нарушений. В группе ОБ+БМ достоверно снижается встречаемость микробиоценозов с 3-й степенью микробиологических нарушений и без микробиологических нарушений. В группе ОП+БМ достоверно снижается встречаемость микробиоценозов со 2-й степенью микробиологических нарушений. Таким образом, в результате включения в антимикробную и противовирусную пневмонию синбиотика Бифидум Мульти средняя степень

микробиологических нарушений снижается, за счет снижения частоты встречаемости микробиоценозов с высокими степенями микробиологических нарушений.

Таблица 57 – Частоты встречаемости микробиоценозов разных степеней микробиологических нарушений у пациентов с а) бронхитом, б) пневмонией.

Степень микробиологических нарушений микробиоценоза ротоглотки	До лечения	Без Пробиотика	с пробиотиком
Бронхит			
Норма	37%	0%*	8%* **
1	26%	22%	33%
2	26%	56%*	50%*
3	11%	22%	8%**
Пневмония			
Норма	17%	13%	22%
1	65%	50%	22%* **
2	17%	38%*	56%*
3	0%	0%	0%

Примечание: * - достоверное отличие от значения группы «До лечения» ($p < 0,05$)

** - достоверное отличие значений в группах ОБ (ОП) и ОБ+БМ (ОП+БМ) ($p < 0,05$)

Для оценки метаболической активности микрофлоры ротоглотки по концентрациям ЛЖК в слюне используем классификационные уравнения дискриминантной функции, полученные в главе 4.4. Результаты изменения метаболической активности микрофлоры ротоглотки по встречаемости микробиоценозов с различными степенями микробиологических нарушений представлены в таблице 58:

Таблица 58 - Встречаемость пациентов с различными степенями дисбиоза микрофлоры ротоглотки до и после лечения с пробиотиком и без него.

Степень дисбиоза ротоглотки	До	Без Пробиотика	Пробиотик
Бронхит			
Норма	0,0%	0,0%	0,0%
1	39,3%	46,2%	45,5%
2	14,3%	7,7%	9,1%
3	46,4%	46,2%	45,5%
Пневмония			
Норма	0,0%	0,0%	0,0%
1	52,6%	22,2%*	37,5%**
2	0,0%	11,1%*	25,0%* **
3	47,4%	66,7%	37,5%**

Примечание: * - достоверное отличие от значения группы «До лечения» ($p < 0,05$)

** - достоверное отличие значений в группах ОБ (ОП) и ОБ+БМ (ОП+БМ) ($p < 0,05$)

В таблице 58 показано, что в группе ОБ и ОБ+БМ не обнаружено достоверного изменения встречаемости микробиоценозов с различными степенями метаболических нарушений. В группе ОП обнаружено снижение встречаемости микробиоценозов с 1-й степенью микробиологических нарушений и увеличение — со 2-й. В группе ОП+БМ

увеличивается встречаемость микробиоценозов с 1-й и 2-й степенями метаболических нарушений и снижение встречаемости — с 3-й. Таким образом, в группе ОП+БМ происходит снижение средней степени метаболических нарушений за счет снижения встречаемости микробиоценозов с более высокими степенями метаболических нарушений.

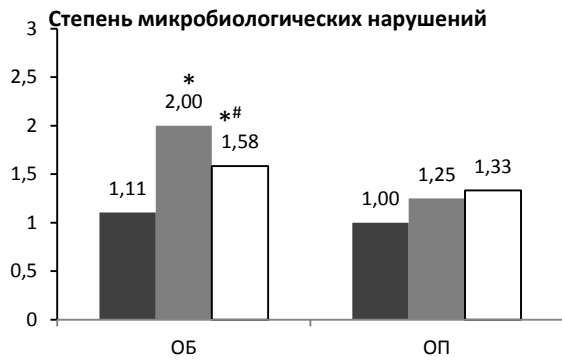
В таблицах 55 - 58 показано, что влияние синбиотика Бифидум Мульти при проведении антимикробной и противовирусной терапии острого бронхита менее выражено, чем для терапии острой пневмонии. В группе ОП+БМ снижается встречаемость пациентов с 3-й степенью метаболических нарушений и увеличивается со 2-й и 1-й.

На рисунке 52 представлены средняя степень микробиологических нарушений микробиоценозов ротоглотки и кишечника (рисунок 52а, 52б), встречаемость пациентов с низким значением доли фагочувствительной микрофлоры в микробиоценозе (рисунок 52в, 52г), с нормальными значениями метаболической активности микрофлоры (рисунок 52д).

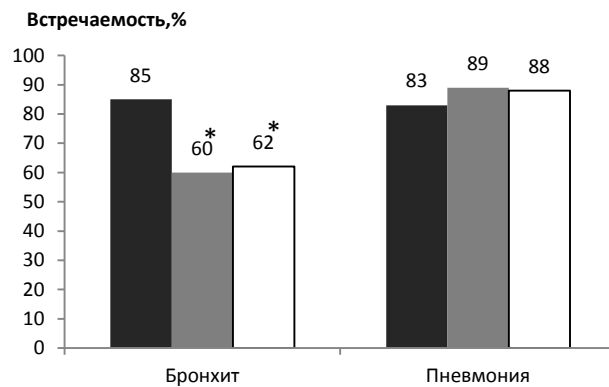
Антибиотикотерапия острого бронхита влияет на состав микрофлоры ротоглотки (рисунки 52а, 52в), а так же появление фагочувствительной микрофлоры в этом биотопе, что не отмечается при антибиотикотерапии пневмонии (рисунки 52а, 52в). В составе микробиоценоза кишечника не происходит изменений при антибиотикотерапии острого бронхита и пневмонии, кроме снижения фагочувствительной микрофлоры и снижении концентрации масляной кислоты в кале (рисунки 52г, 52д). Применение «Бифидум-Мульти» в схеме антибактериальной терапии снижает среднюю степень микробиологических нарушений ротоглотки по сравнению с антибиотикотерапией при бронхите (рисунки 52а), и снижает ее для микробиоценоза кишечника по сравнению с позицией до лечения и после антибиотикотерапии (рисунки 52б, 52д).

На рисунке 53 представлены встречаемость пациентов со средним значением степени микробиологических нарушений для микробиоценозов ротоглотки и кишечника. Влияние синбиотика «Бифидум-Мульти» при лечении пациентов с острым бронхитом и острой пневмонией изучалось у тех же пациентов, из которых были сформированы группы эпизодически (ЭБД) и частоболеющих детей (ЧБД) вне зависимости от диагноза.

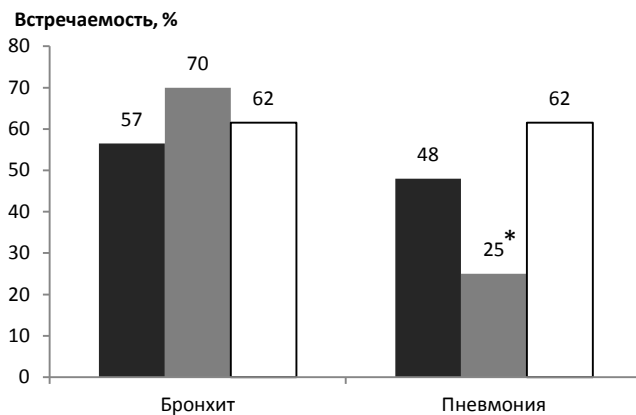
Влияние антибактериальной терапии и действия «Бифидум-Мульти» на эпизодически и частоболеющих детей показано на представленных графиках (рисунок 53). Влияние антибактериальной терапии на группу частоболеющие дети более выражено (Рисунок 53а, 53б, 53д), чем на группу эпизодически болеющие дети (рисунки 53в, 53д). Включение в схему антибактериальной терапии «Бифидум-Мульти» снижает среднюю степень микробиологических нарушений микрофлоры ротоглотки и кишечника (рисунки 53а, 53б). Для группы частоболеющие дети «Бифидум-Мульти» оказывает положительный эффект (рисунки 53а, 53в, 53г, 53д).



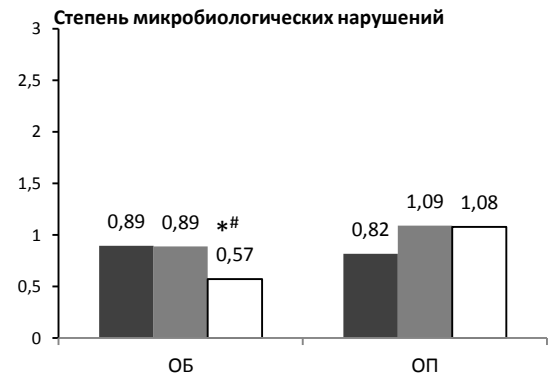
а) Встречаемость пациентов с микробиоценозами ротоглотки без микробиологических нарушений, %



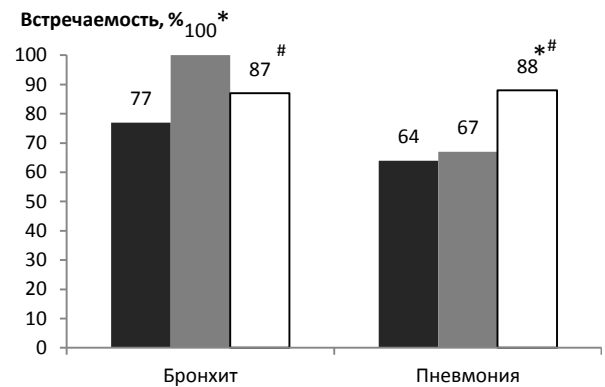
в) Встречаемость микробиоценозов ротоглотки без фагочувствительной м/ф, %



д) Встречаемость микробиоценозов кишечника без метаболических нарушений, %



б) Встречаемость пациентов с микробиоценозами кишечника без микробиологических нарушений, %



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

Примечание:

■ - До лечения

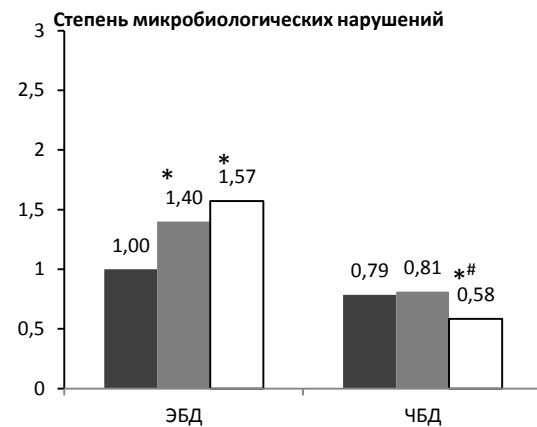
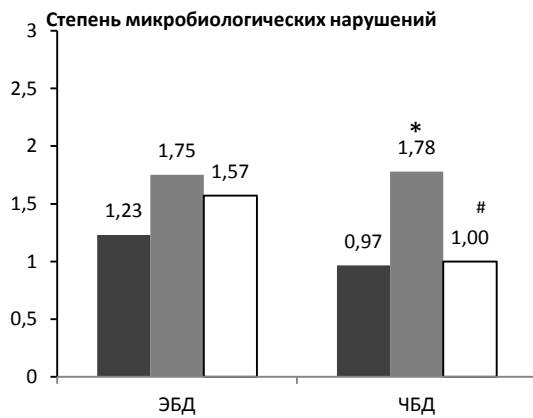
■ - После лечения

□ - Применение «Бифидум-Мульти»

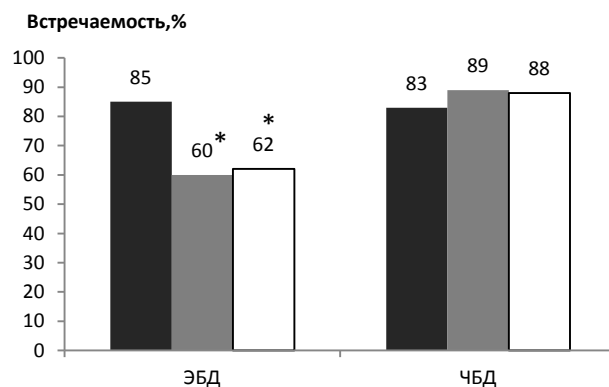
* - достоверное отличие от нормы

- достоверное отличие значений после лечения и применения «Бифидум-Мульти»

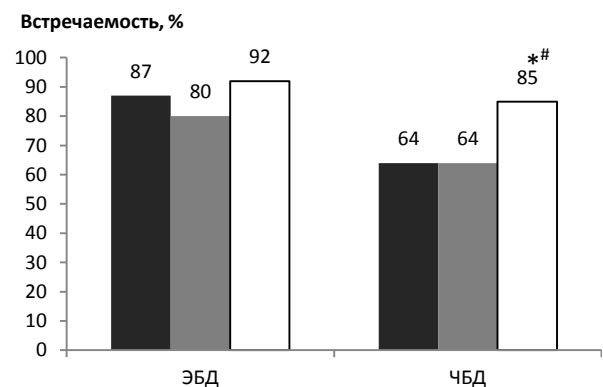
Рисунок 52 - Изменения состояния микробиоценозов у пациентов с острым бронхитом и острой пневмонией



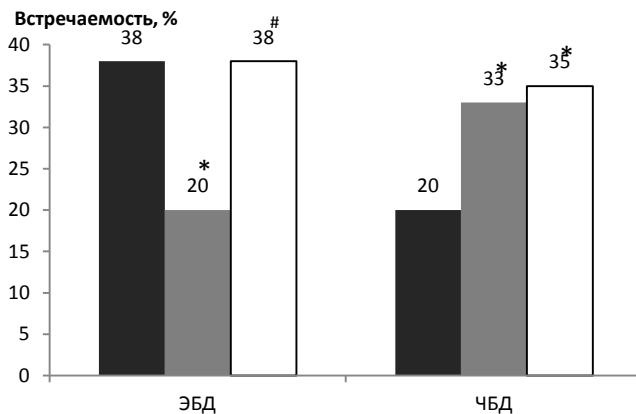
а) Встречаемость пациентов с микробиоценозами ротоглотки без микробиологических нарушений, %



б) Встречаемость пациентов с микробиоценозами кишечника без микробиологических нарушений, %



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



Примечание:

■ - До лечения

■ - После лечения

□ - Применение Бифидум Мульти

* - достоверное отличие от нормы

- достоверное отличие значений после лечения и применения Бифидум Мульти

д) Встречаемость микробиоценозов кишечника без метаболических нарушений, %

Рисунок 53 - Изменения состояния микробиоценозов у эпизодически и частоболеющих детей с острым бронхитом и острой пневмонией

4.2. Изменения микробиоценоза кишечника у детей с последствиями перенесенных гастроудоденитов и влияние синбиотика Нормоспектрум

Для исследования микробиоценозов кишечника после лечения хронического гастроудоденита, у пациентов 46 человек из них 21 (45,8%) женщины и 25 (54,2%) мужчины,

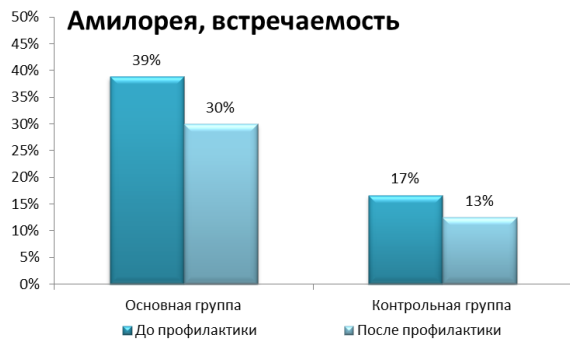
проходивших типовую программу медицинской реабилитации в МКООУ санаторной школе-интернате № 5 г. Нижний Новгород, исследовались результаты бактериологического и копрологического анализов. Отбор пациентов в группу гастродуодениты (ГД) согласно анамнезу и группу сравнения (ГС) проводил врач, к.м.н. Шапкина О.А. В исследовании оценивали влияние синбиотика «Нормоспектрум» (группа ГД) в состав которого, входят штаммы *B. bifidum*, *B. longum* и *B. adolescentis*, входящие в нормальную микрофлору взрослого человека, два штамма ацидофильных лактобацилл, а также виды *L. plantarum* и *L. casei*, пребиотические компоненты – инулин и олигофруктоза, витаминно-минеральный премикс. (ЗАО "АМФИТА", Россия).

Исследовали кал до и после прохождения программы реабилитации копрологическими методами и концентрации летучих жирных кислот. Для определения нарушения ферментативного пищеварения использовали модифицированный метод копрологического анализа, описанный в главе 2.1. Сравнивали встречаемость результатов анализов копрологических синдромов. Использовали данные формализованные по образцу (таблица 4) и программу определения копрологических синдромов, в основе которой, заложены алгоритмы (Рисунок 1-6). Для оценки метаболической активности использовали концентрации летучих жирных кислот в кале и их производные. Эффективность синбиотика Нормоспектрум оценивали по изменению встречаемости микробиоценозов с параметрами ниже нормы, в норме и с выбросами – значениями, превышающими границы, приведенные в таблице 22 метаболического паспорта здорового человека.

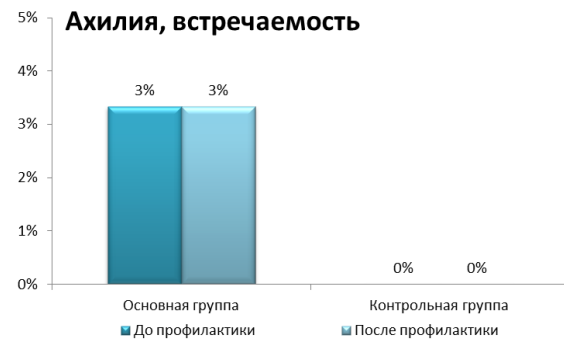
Результаты – встречаемость копрологических синдромов и нарушений ферментативного пищеварения представлена в графиках (рисунок 54).

На графиках (рисунок 54) показано, что в группе ГД изменения не имеют достоверных отличий, до и после профилактики. В группе ГС отмечается достоверное увеличение встречаемости результатов копрологического анализа с синдромами «Амилорея, панкреатическая недостаточность» (рисунок 54 д) и «Замедленный транзит» (рисунок 54 ж), а частота встречаемости — «нарушение протеолиза в желудке» (рисунок 54 з) и «Нормальный копросиндром» (рисунок 54 в) снижается.

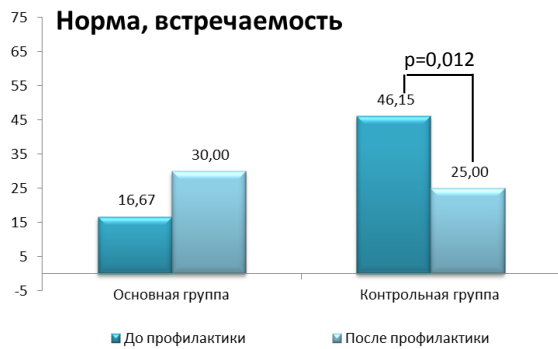
Результаты сравнения концентраций летучих жирных кислот в кале в исследуемых группах по средним (медианным) значениям с интерквартильным размахом представлены в таблице 59 и на графиках (рисунок 55).



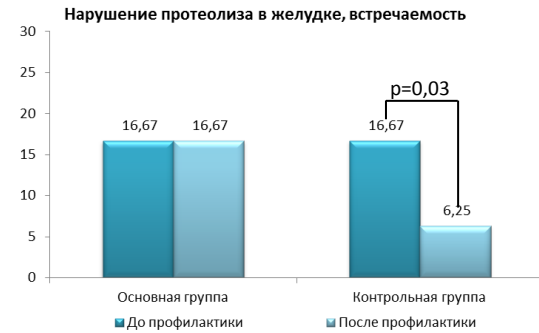
а) частота встречаемости амилореи, %



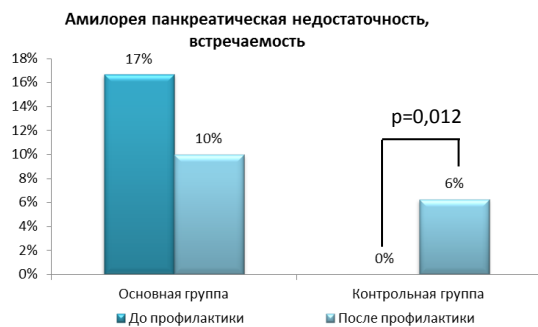
б) частота встречаемости ахилии, %



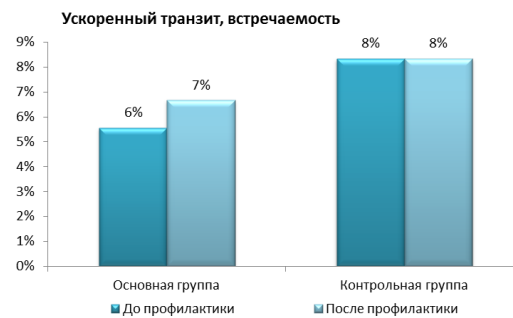
в) частота встречаемости нормального копросиндрома, %



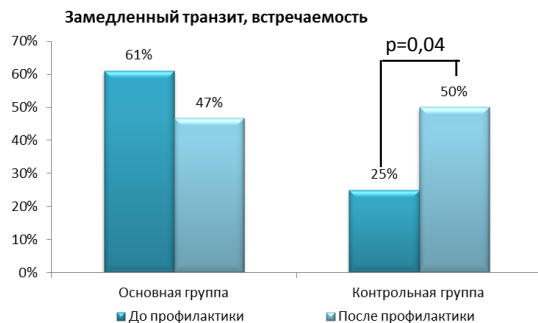
г) частота встречаемости синдрома нарушения протеолиза в желудке, %



д) частота встречаемости панкреатической недостаточности при амилорее, %

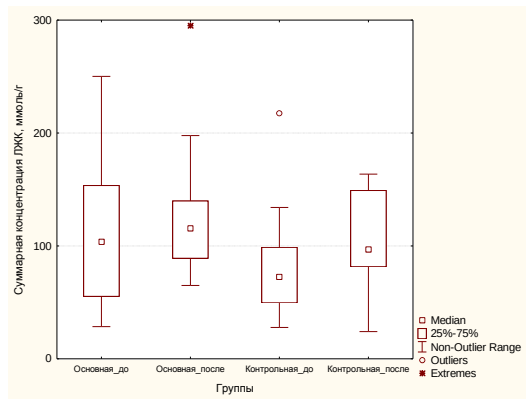


е) частота встречаемости ускоренный транзит, %

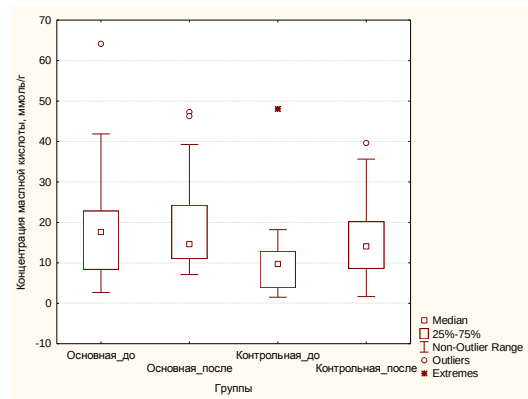


ж) частота встречаемости замедленный транзит, %

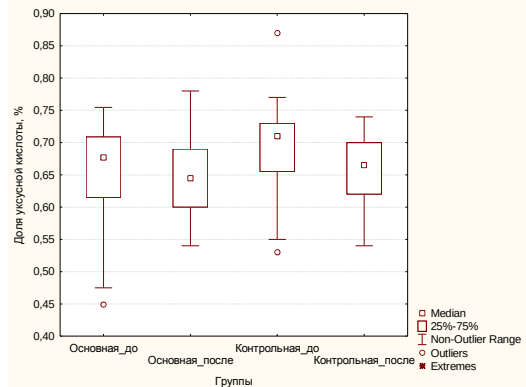
Рисунок 54 - Встречаемость копрологических синдромов в группах пациентов основной и контрольной групп.



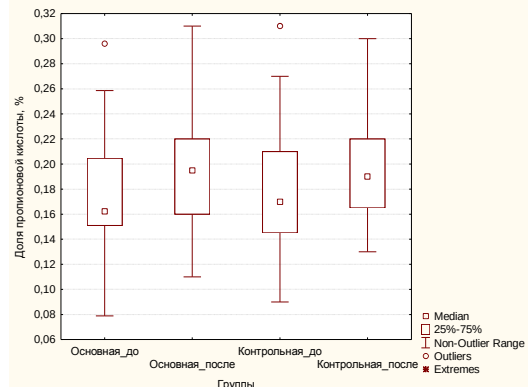
а) Суммарная концентрация



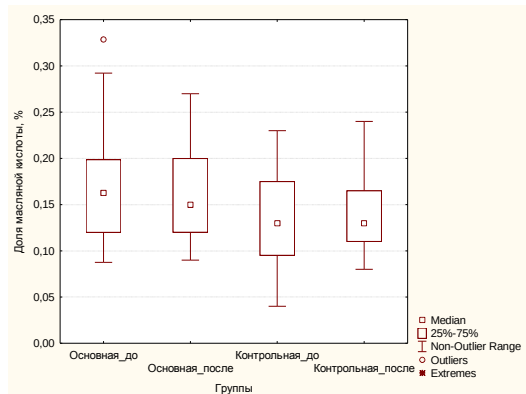
б) Концентрация масляной кислоты



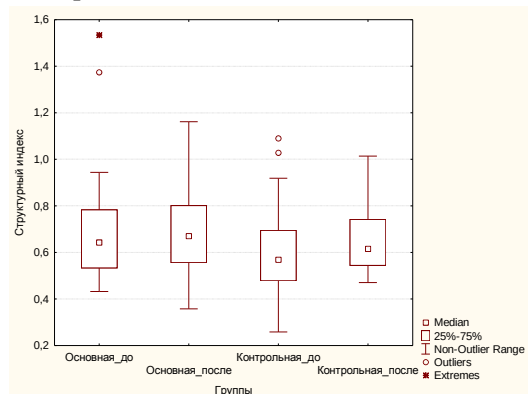
в) Доля уксусной кислоты



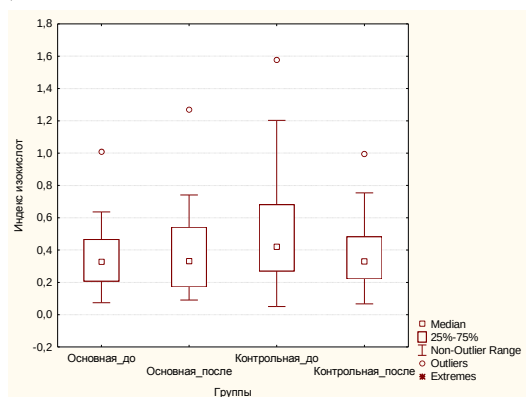
г) Доля пропионовой кислоты



д) Доля масляной кислоты



е) Структурный индекс



ж) Протеолитический индекс

Рисунок 55 - Концентрации ЛЖК в кале пациентов основной и контрольных групп

Таблица 59 - Концентрации ЛЖК в кале пациентов основной и контрольных групп

Параметры метаболической активности	Основная группа			Контрольная группа		
	до	после (ГД)	Досто- верность, р	до	после (ГС)	Досто- верность, р
Уксусная кислота, ммоль/г	70,63	79,98	0,46	50,23	67,43	0,13
Пропионовая кислота, ммоль/г	18,77	22,49	0,26	12,80	21,17*	0,04
Изомасляная кислота, ммоль/г	2,69	5,01	0,24	1,87	3,78	0,32
Масляная кислота, ммоль/г	18,68	19,27	0,85	10,97	15,94	0,21
Изовалериановая кислота, ммоль/г	3,43	4,03	0,42	2,39	3,51	0,27
Валериановая кислота, ммоль/г	2,93	2,72	0,68	2,01	2,34	0,53
Изокапроновая кислота, ммоль/г	0,07	0,01*	0,00	0,08	0,01*	0,00
Капроновая кислота, ммоль/г	0,64	0,07*	0,01	0,43	0,15	0,18
Суммарная концентрация ЛЖК, ммоль/г	117,83	133,59	0,44	80,78	114,35	0,11
Структурный индекс, ед.	0,70	0,70	0,98	0,62	0,66	0,54
Индекс изокилот, ед.	0,34	0,39	0,47	0,52	0,39	0,28
Доля уксусной кислоты, %	66%	65%	0,71	69%	66%	0,16
Доля пропионовой кислоты, %	18%	19%	0,19	18%	20%	0,24
Доля масляной кислоты, %	17%	16%	0,53	13%	14%	0,59

Примечание: * - достоверное отличие от значения группы «До лечения» ($p < 0,05$)

В таблице 59 и графиках (рисунок 55) показано, что в группе ГД снизились концентрации изокапроновой и капроновой кислот. В группе ГС снизилась концентрация пропионовой и изокапроновой кислот. Таким образом, изменения концентраций ЛЖК не указывают на существенные различия метаболической активности в результате прохождения пациентами программы профилактической реабилитации и применением синбиотика Нормоспектрум.

Для сравнения метаболической активности микробиоценозов кишечника используем встречаемость концентраций ЛЖК, находящихся в рамках референсных значений. Частота встречаемости метаболизма микробиоценозов пациентов с показателями ниже нормы, в норме и выше показателей метаболизма здорового человека представлены на графиках (рисунок 56):

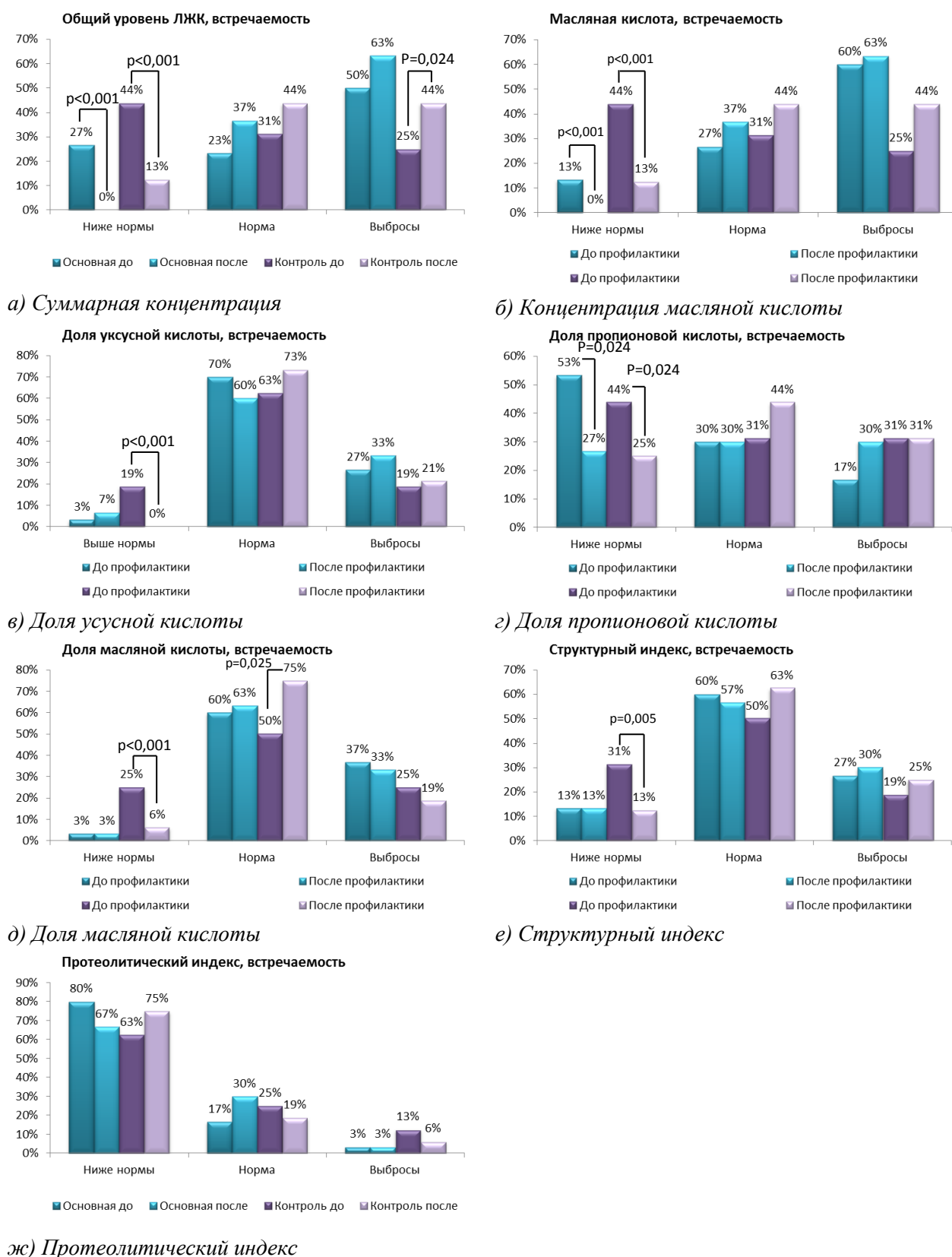


Рисунок 56 - Встречаемость пациентов с концентрациями ЛЖК в кале ниже и выше нормы для основной и контрольной групп до и после реабилитации.

На графиках (рисунок 56) показано, что изменения в группе ГД снизилась частота встречаемости показателей ниже референсных значений для суммарной концентрации ЛЖК (рисунок 56а), концентрация масляной кислоты (рисунок 56б) и доля пропионовой кислоты

(рисунок 56г). В группе ГС произошли аналогичные изменения и увеличилась частота встречаемости показателя выше нормы для общего уровня ЛЖК (рисунок 56а) и концентрации масляной кислоты (рисунок 56б), а так же снизилась частота встречаемости ниже нормы для показателя доля масляной кислоты (рисунок 56д). Таким образом, в результате программы реабилитации после гастродуоденита микробиоценоз кишечника пациентов с низкой концентрацией масляной кислоты изменяется в сторону увеличения продукции масляной кислоты (рисунок 56б). Это снижает риск развития дисбиозов, связанных со снижением колонизационной резистентности индигенной микрофлоры и прочих рисков, включая риск развития онкологических заболеваний. При включении в программу реабилитации синбиотика Нормоспектрум, как следует из данных группы ГД, встречаемость микробиоценозов с низкими значениями масляной кислоты, снижается до 0% (рисунок 56б).

На рисунке 57 представлены данные о частоте встречаемости микробиоценозов с нормальным копрологическим синдромом, без метаболических нарушений и среднее значение микробиологических нарушений в исследуемых группах.

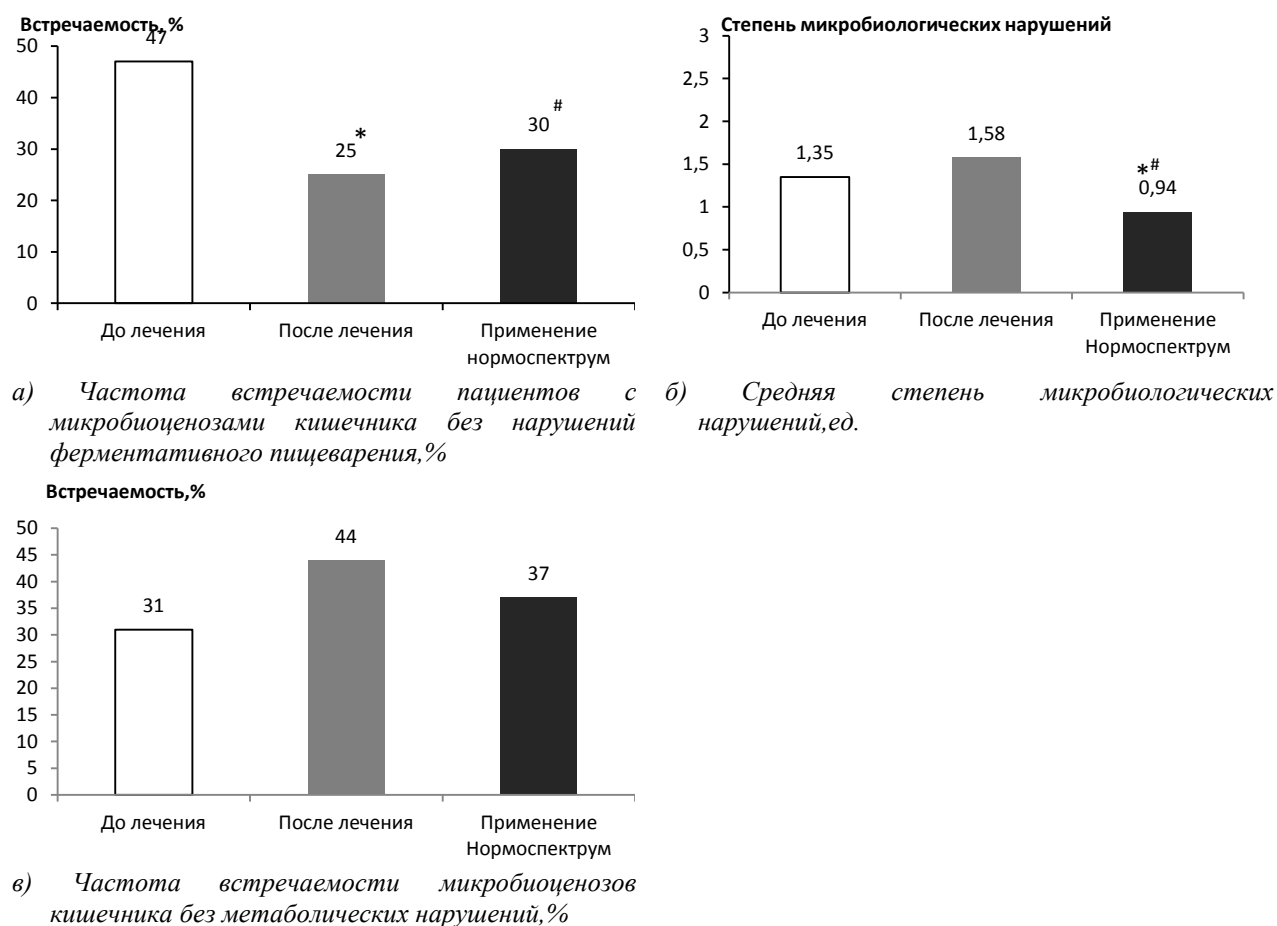
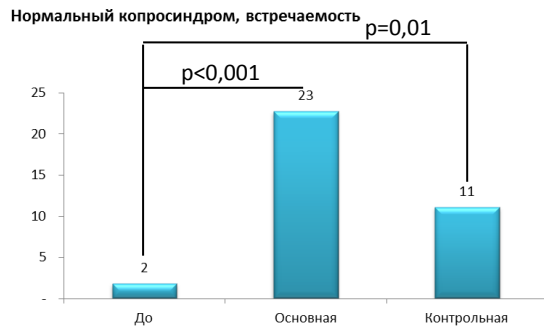


Рисунок 57 - Изменения состояния микробиоценозов у пациентов с хроническими хеликобактерассоциированными заболеваниями органов пищеварения.

4.3. Изменение микробиоценозов кишечника и ротоглотки у детей с онкологическим анамнезом и влияние синбиотика Бифидум Мульти.

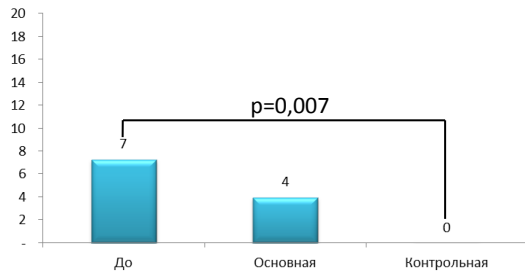
Для исследования микробиоценозов кишечника и ротоглотки после лечения гемобластозов и солидных опухолей, у пациентов 127 человек из них 43 (33,6%) женщины и 84 (66,4%) мужчины, проходившие типовую программу медицинской реабилитации в санатории «Русское поле» Чеховский район, Московской области, исследовались результаты бактериологического, копрологического анализов и определение концентраций ЛЖК в кале и слюне. Отбор пациентов в группы с онкологическим анамнезом (ОА) и группу сравнения (ГС) проводил врач, к.м.н. Коновалова М.В. В исследовании оценивали влияние синбиотика «Нормоспектр» (группа ОА+БМ).

Исследование микрофлоры ротоглотки и кишечника у детей на разных сроках после окончания лечения гемобластозов и солидных опухолей проводилось на пациентах санатория «Русское поле» Чеховского района, Московской области. Часть пациентов – основная группа (120 детей) принимала пробиотик «Бифидум-Мульти», а контрольная группа проходила мероприятия реабилитации без пробиотика. Исследовали кал до и после посещения санатория копрологическими, микробиологическими методами и определяли концентрации летучих жирных кислот в кале и слюне. Для определения нарушения ферментативного пищеварения использовали модифицированный метод копрологического анализа, описанный в главе 3. Сравнивали встречаемость пациентов с копрологическими синдромами и нарушениями ферментативного пищеварения различных типов. Использовали данные формализованные по образцу (таблица 4) и программу, основанную на алгоритме распознавания копрологических синдромов и других типов нарушения ферментативного пищеварения. Для оценки метаболической активности использовали концентрации летучих жирных кислот в кале, слюне и их производные. Эффективность пробиотика оценивали по изменению встречаемости пациентов с параметрами ниже нормы, в норме и с выбросами – значениями, превышающими границы, приведенные в таблице 22 метаболического паспорта здорового человека. Степени микробиологических нарушений определяли с использованием нейросети MLP 93-14-4 и сравнивали встречаемость количества пациентов с различными степенями нарушения. Степень нарушения метаболизма определяли по классификационным уравнениям дискриминантного анализа построенного для ЛЖК слюны (Глава 2). Результаты – встречаемость копрологических синдромов и нарушений ферментативного пищеварения представлена в графиках (рисунок 58).



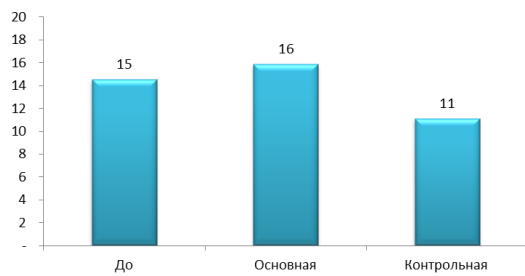
а) Нормальный копросиндром

Гнилостная диспепсия, встречаемость, %



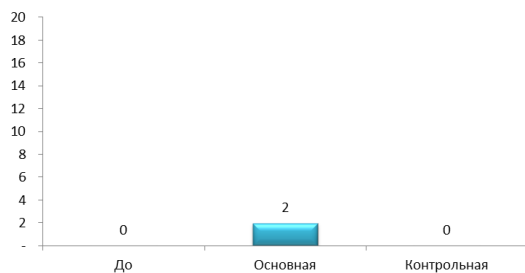
в) гнилостная диспепсия

Дискинезия ЖВП, встречаемость, %



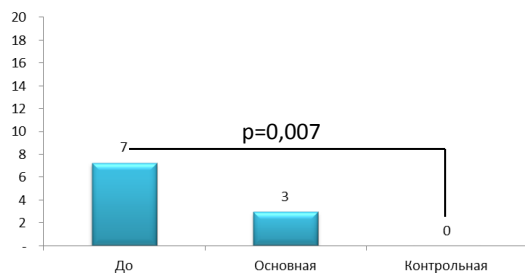
д) Дискинезия

Амилорея панкреатическая недостаточность, встречаемость, %



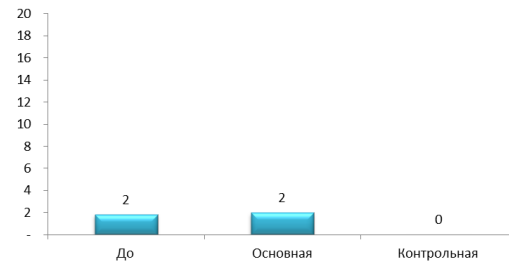
ж) Амилорея панкреатическая недостаточность

Ускоренный транзит, встречаемость, %



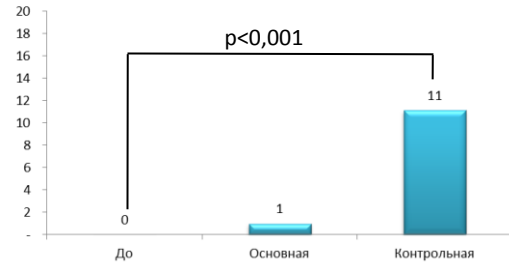
и) Ускоренный транзит

Ахолия, встречаемость, %



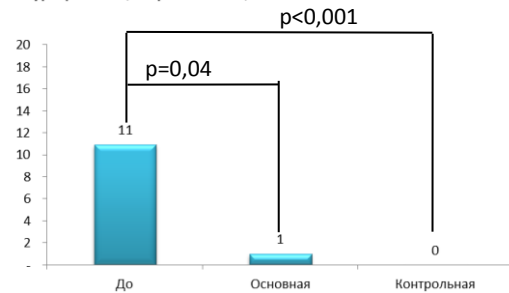
б) Ахолия

Нарушение протеолиза в желудке, встречаемость, %



г) нарушение протеолиза

Обтурация ЖВП, встречаемость, %



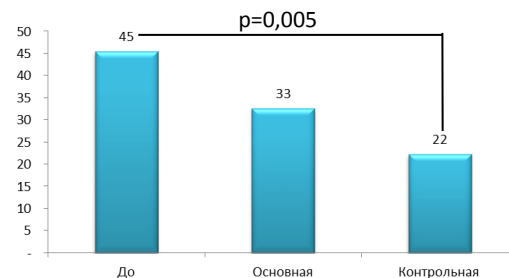
е) Обтурация ЖВП

Стеария панкреатическая недостаточность, встречаемость, %



з) Стеария панкреатическая недостаточность

Замедленный транзит, встречаемость, %



к) Замедленный транзит

Рисунок 58 - Встречаемость копорологических синдромов в группах пациентов основной и контрольной групп.

На графиках (рисунок 58) показано, что в группе ОА достоверно увеличивается частота встречаемости результатов копрологического анализа с нормальным копрологическим синдромом (рисунок 58а), нарушением протеолиза в желудке (рисунок 58г), стеареей с панкреатической недостаточностью (рисунок 58з), замедленный транзит (рисунок 58к). В группе ОА снижается частота встречаемости результатов анализов с синдромом обтурация ЖВС (рисунок 58е). Частота встречаемости результатов анализов в группе ОА+БМ с нормальным копрологическим синдромом (рисунок 58а) увеличивается в 2 раза, по сравнению с группой ОА. В группе ОА+БМ снижается встречаемость результатов анализов с обтурацией ЖВС (рисунок 58е). Таким образом, увеличение частоты встречаемости результатов анализов с нормальным копрологическим синдромом в основной и контрольных группах указывает на положительный эффект мероприятий по реабилитации и профилактике, который усиливается с включением синбиотика Бифидум Мульти в программу.

Результаты бактериологического анализа микрофлоры кишечника представлены в таблице 60.

В таблице 60 показано, что в группе ОА снижена встречаемость *Enterococcus spp.*, *E.Coli Hem+*, *Proteus spp.* в микробиоценозах кишечника и увеличена встречаемость *Staphylococcus spp. aur.* в микробиоценозе кишечника. В группе ОА+БМ увеличена встречаемость *Citrobacter* в микробиоценозе кишечника. Таким образом, изменения состава микробиоценоза кишечника не затронули индигенную микрофлору, что характеризует изменения в микробиоценозе кишечника, как незначительные.

Таблица 60 - Встречаемость и концентрация микроорганизмов кишечной микрофлоры до и после посещения санатория.

Микроорганизмы	До		Основная (ОА+БМ)		Контрольная (ОА)	
	Частота встречаемости	Интенсивность обсемененности	Частота встречаемости	Интенсивность обсемененности	Частота встречаемости	Интенсивность обсемененности
<i>Bifidobacterium spp.</i>	100%	8,00	100%	8,55	100%	8,22
<i>Lactobacillus spp.</i>	100%	5,44	100%	6,14	100%	5,89
<i>Escherichia coli</i>	98%	7,83	100%	7,89	100%	8,10
<i>Enterococcus spp.</i>	61%	6,40	59%	6,47	44%* **	6,50
<i>Candida spp.</i>	11%	4,43	22%	4,23	11%	4,00
<i>Klebsiella spp.</i>	8%	6,00	5%	7,33	11%	6,00
<i>Enterobacter spp.</i>	5%	6,33	9%	7,00	11%	7,00
<i>Escherichia coli hem-</i>	5%	6,00	5%	6,00	0%* **	-
<i>Staphylococcus aur.</i>	3%	5,00	0%	-	11%* **	5,00
<i>Proteus spp.</i>	2%	7,00	7%	6,50	0%* **	-
<i>Escherichia coli lac+</i>	2%	6,00	2%	6,50	0%	-
<i>Citrobacter spp.</i>	0%	-	9%*	6,40	0%**	-
<i>Escherichia coli lac-</i>	0%	-	3%	6,50	0%	-

Примечание: * - достоверное отличие от значения группы «До лечения» ($p < 0,05$)

** - достоверное отличие значений в группах ОА и ОА+БМ ($p < 0,05$)

Для оценки изменений состава микробиоценоза кишечника используем сравнения встречаемости микробиоценозов различных степеней микробиологических нарушений, рассчитанных с помощью искусственной нейронной сети MLP 93-39-4. Результаты сравнения представлены в таблице 61.

Таблица 61 - Встречаемость степеней микробиологических нарушений в исследуемых группах.

Степени микробиологических нарушений	До	Основная (ОА)		Контрольная (ОА+БМ)	
Норма	42,19	65,52*	p=0,025	55,56	p=0,176
1	51,56	32,76*	p=0,041	44,44	p=0,468
2	6,25	1,72	p=0,109	0,00*	p=0,012

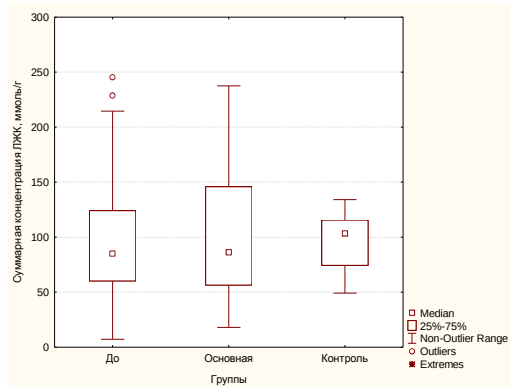
В таблице 61 показано, что в группе ОА увеличивается встречаемость микробиоценозов с показателем норма и снижается с показателем 1-я степень микробиологических нарушений. В группе ОА+БМ достоверно снижается встречаемость микробиоценозов с 2-й степенью микробиологических нарушений. Таким образом, профилактическая программа увеличивает встречаемость микробиоценозов без микробиологических нарушений, а включение синбиотика Бифидум Мульти снижает встречаемость дисбиотических изменений 2-й степени микробиологических нарушений.

Средние (медианные) концентрации ЛЖК в кале по группам представлены на графиках (рисунок 59)

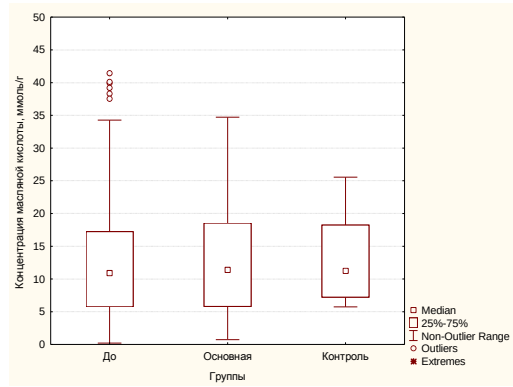
На графиках (рисунок 59а,б,в,г,д,е,ж) показано, отсутствие достоверных изменений концентраций ЛЖК и их производных в группах до лечения и ОА и ОА+БМ.

Для сравнения метаболической активности микробиоценозов кишечника используем частоты встречаемости концентраций ЛЖК, находящихся в рамках референсных значений. Частота встречаемости пациентов с показателями ниже нормы, в норме и выше показателей метаболизма здорового человека представлены в таблице 62 и на графиках (рисунок 60).

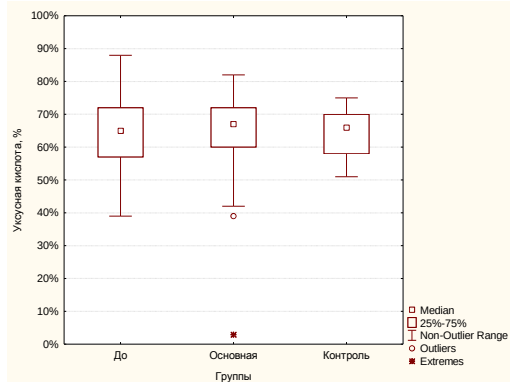
В таблице 62 и на графиках (рисунок 60) показано, что в группе ОА снижена частота встречаемости с показателями ниже референсных значений для суммарного уровня ЛЖК (рисунок 60а), масляной кислоты (рисунок 60б), структурного индекса (рисунок 60е) и индекса изокислот (рисунок 60ж). Изменения в группе ОА+БМ не имеют достоверных отличий от групп ОА и до лечения. Таким образом, проведение профилактических мероприятий положительно влияют на метаболическую активность микрофлоры кишечника.



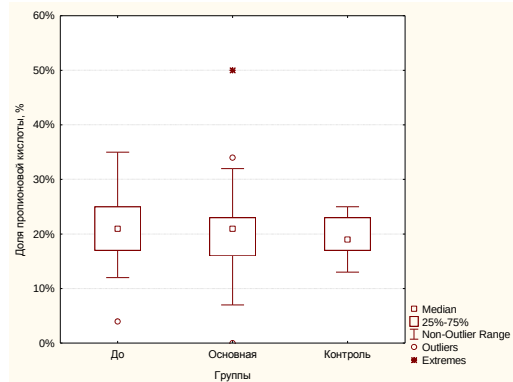
а) Суммарная концентрация ЛЖК



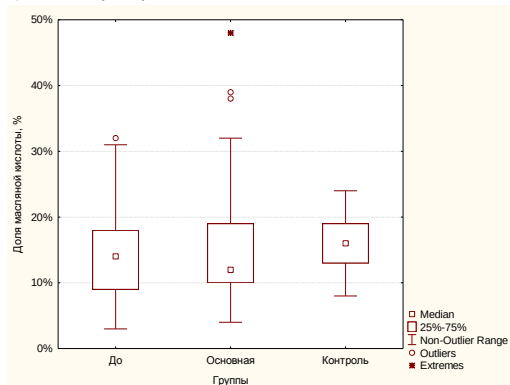
б) Концентрация масляной кислоты



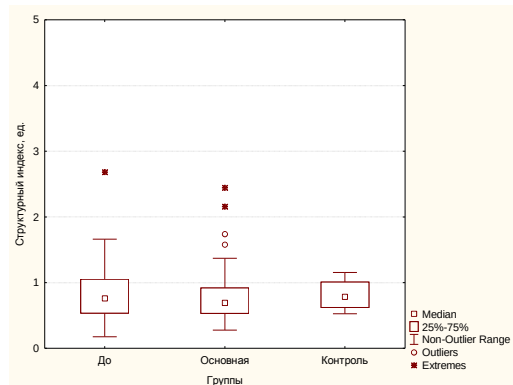
в) Доля уксусной кислоты



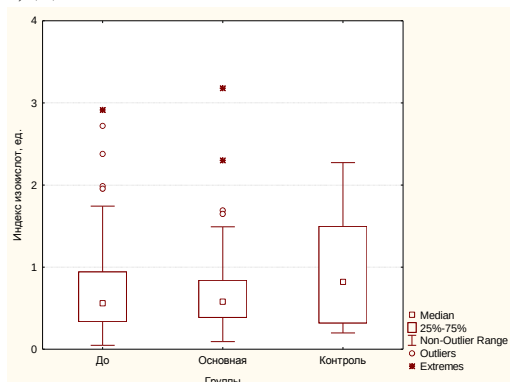
г) Доля пропионовой кислоты



д) Доля масляной кислоты



е) Структурный индекс



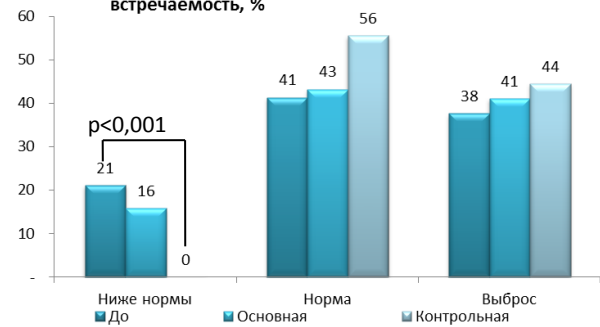
ж) Индекс изоокислот

Рисунок 59 - Концентрации ЛЖК в кале в исследуемых группах.

Общий уровень ЛЖК в кале, встречаемость, %



Концентрация масляной кислоты в кале, встречаемость, %



а) Суммарная концентрация

Доля уксусной кислоты, встречаемость, %



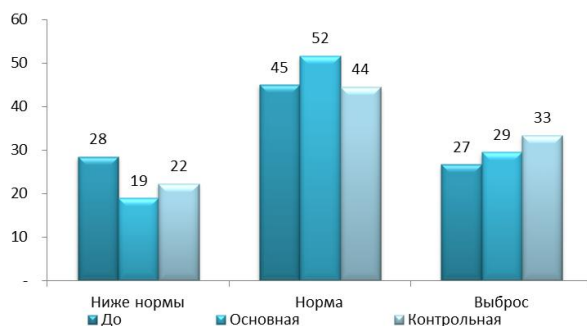
б) Концентрация масляной кислоты

Доля пропионовой кислоты, встречаемость, %



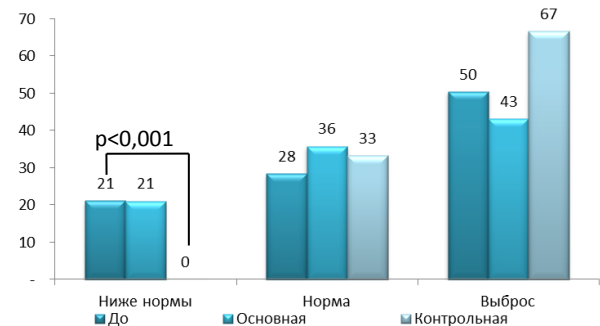
в) Доля уксусной кислоты

Доля масляной кислоты, встречаемость, %



г) Доля пропионовой кислоты

Структурный индекс, встречаемость, %



д) Доля масляной кислоты

Индекс изокилот, встречаемость, %



е) Структурный индекс

ж) Индекс изокилот

Рисунок 60 - Встречаемость пациентов с показателями в норме, ниже нормы и отличающимися от метаболического паспорта здорового человека.

Таблица 62 - Встречаемость пациентов с показателями в норме, ниже нормы и отличающимися от метаболического паспорта здорового человека.

Параметр	До	Основная ОА+БМ		Контрольная ОА	
Суммарный уровень ЛЖК					
Ниже нормы	24,77	26,32	p=0,829	11,11*	p=0,023
Норма	36,70	32,63	p=0,625	33,33	p=0,688
Выброс	38,53	41,05	p=0,778	55,56	p=0,079
Масляная кислота					
Ниже нормы	21,10	15,79	p=0,382	0,00*	p<0,001
Норма	41,28	43,16	p=0,838	55,56	p=0,147
Выброс	37,61	41,05	p=0,698	44,44	p=0,451
Доля уксусной кислоты					
Выше нормы	14,68	15,79	p=0,841	11,11	p=0,482
Норма	44,04	49,47	p=0,574	44,44	p=0,965
Выброс	41,28	34,74	p=0,453	44,44	p=0,733
Доля пропионовой кислоты					
Ниже нормы	17,43	27,37	p=0,138	22,22	p=0,447
Норма	33,94	28,42	p=0,484	44,44	p=0,236
Выброс	48,62	44,21	p=0,647	33,33	p=0,091
Доля масляной кислоты					
Ниже нормы	28,44	18,95	p=0,168	22,22	p=0,382
Норма	44,95	51,58	p=0,5	44,44	p=0,957
Выброс	26,61	29,47	p=0,702	33,33	p=0,385
Структурный индекс					
Ниже нормы	21,10	21,05	p=0,994	0,00*	p<0,001
Норма	28,44	35,79	p=0,359	33,33	p=0,534
Выброс	50,46	43,16	p=0,451	66,67	p=0,134
Индекс изокислот					
Выше нормы	17,43	15,79	p=0,776	44,44*	p<0,001
Норма	60,55	65,26	p=0,674	44,44	p=0,116
Выброс	22,02	18,95	p=0,631	11,11	p=0,058

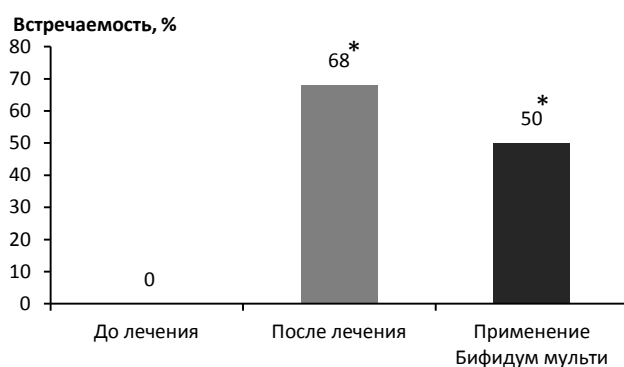
Для оценки изменения степени метаболических нарушений в ротоглотке сравним степени дисбиоза, определенные классификационными уравнениями дискриминантной функции по концентрациям ЛЖК в слюне. Результат представлен в таблице 63:

Таблица 63 - Встречаемость различных степеней нарушений метаболизма в исследуемых группах.

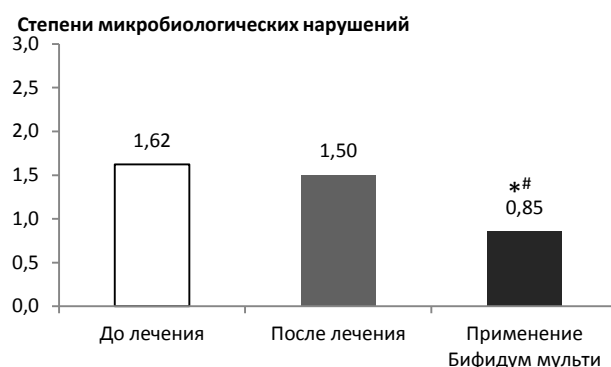
	До	Основная (ОА+БМ)		Контрольная (ОА)	
Норма	-	68,29*	p<0,001	50,00*	p<0,001
1 степень	60,00	4,88 *	p<0,001	16,67*	p<0,001
2 степень	15,56	0,00*	p<0,001	0,00*	p<0,001
3 степень	24,44	26,83	p=0,739	33,33	p=0,242

В таблице 63 показано, что в группах ОА и ОА+БМ отмечено снижение встречаемости микробиоценозов в 1-й и 2-й степенях метаболических нарушений и увеличение встречаемости микробиоценозов без метаболических нарушений.

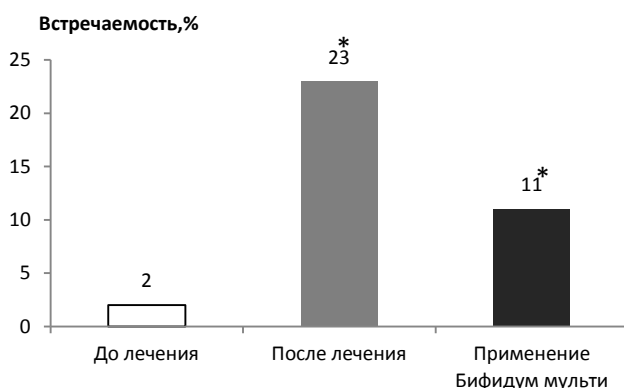
На гистограммах, представленных на рисунке 61, можно наблюдать увеличение встречаемости пациентов с нормальным копросиндромом (рисунок 61а), с нормальными значениями концентраций ЛЖК в слюне (рисунок 61б). Влияние включения «Бифидум Мульти» в схему профилактики обозначается как снижение средней степени микробиологических нарушений микробиоценоза кишечника (рисунок 61б) и снижение встречаемости пациентов с концентрациями ЛЖК в кишечника в рамках референсных значений (рисунок 61г). Таким образом, обнаружено положительное действие синбиотика «Бифидум-Мульти» для микробиоценоза кишечника.



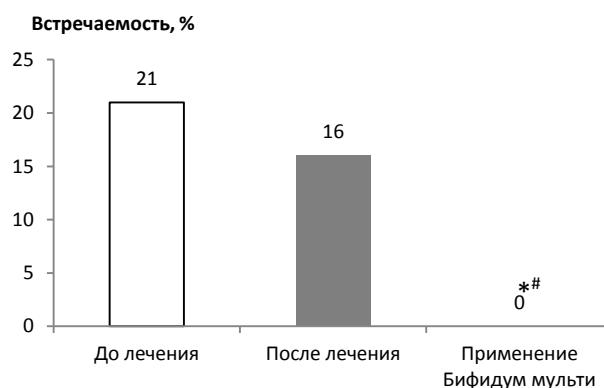
а) Встречаемость пациентов с микробиоценозами кишечника без нарушений ферментативного пищеварения, %



б) Встречаемость пациентов с микробиоценозами кишечника без микробиологических нарушений, %



в) Встречаемость микробиоценозов ротоглотки без метаболических нарушений, %



г) Встречаемость микробиоценозов кишечника без метаболических нарушений, %

Примечание: * - достоверное отличие от нормы # - достоверное отличие значений после лечения и применения «Бифидум-Мульти»

Рисунок 61 - Изменения состояния микробиоценозов пациентов группы «онкологический анамнез»

На графиках (рисунок 57) отмечается достоверное снижение количества пациентов с нормальным копрологическим синдромом (рисунок 57а). Отмечается положительный эффект включения в схему медицинской реабилитации «Нормоспектрум», так как в группе

«Нормоспектр» достоверно снизилась средняя степень микробиологических нарушений микрофлоры кишечника (рисунок 57б), и не отмечается снижение встречаемости пациентов с нормальным копрологическим синдромом (рисунок 57а)

4.4. Особенности микробиоценоза ротоглотки при остром бронхите и острой пневмонии, позволяющие расширить возможности диагностичности инфекционного процесса.

Использование микробиологического анализа микрофлоры ротоглотки с дальнейшим построением нейросети дает возможность определить инфекционный процесс, с высокой степенью вероятности даже когда диагностика прямым методом затруднена.

Для определения наличия инфекционного процесса составим нейросеть, где проведем разделение между группой норма, острый бронхит и острая пневмония.

Данные микробиологического исследования микрофлоры ротоглотки 44 пациента с метками групп для обработки нейросетью логарифмы концентраций микроорганизмов, выявленных в анализах, округлили до целого числа, а концентрации не выявленных микроорганизмов заменили 0. Таким образом, была подготовлена исходная таблица для начала нейросетевого анализа.

В разделе Data mining выбрали пункт Automatet Neural Networks и выбрали задачу классификации. Программе задали объем обучающей выборки 80%, а тестовой 20%. Для работы были выбраны 2 типа нейросетей – многослойный персептрон (MLP) с минимальным количеством скрытых слоев 8 и максимальным — 25 и сети радиальных базисных функций (RBF) с минимальным количеством скрытых слоев 10 и максимальным 14. Для обучения было задано 20 разных сетей с отбор 5-ти сетей с наименьшей ошибкой и наибольшим процентом совпадений при обучении и тестировании.

После второй итераций по подбору сети была достигнута 100,00% корректное разделение групп нейросетью архитектуры MLP 37-16-2. Данные корректной классификации результатов бактериологического анализа микрофлоры ротоглотки искусственной нейронной сетью архитектуры MLP 37-16-2, представлены в таблице 64:

Таблица 64 - Характеристика корректной классификации результатов бактериологического анализа искусственной нейронной сетью архитектуры MLP 37-16-2

Группа	Всего	Корректно	Не корректно	Корректно (%)	Не корректно (%)
Бронхит	15	15	0	100	0
Пневмония	14	14	0	100	0

Из таблицы 64 видно, что нейросеть MLP 37-16-2 с высокой степенью достоверности классифицировала результаты бактериологического анализа пациентов с диагнозами острый бронхит и острая пневмония.

Для оценки микробиоценоза ротоглотки у пациентов с острым бронхитом и острой пневмонией по изменениям концентраций ЛЖК в слюне используем метод дискриминантного анализа концентраций летучих жирных кислот в слюне. Известно, что не все микроорганизмы могут быть выделены и идентифицированы современными бактериологическими методами культивирования микроорганизмов, в то же время концентрации летучих жирных кислот в слюне зависят от метаболизма аэробной и анаэробной части.

Были проведены анализы концентрации ЛЖК в слюне у пациентов с острым бронхитом и острой пневмонией. Данные всех 2-х групп обработали программой дискриминантного анализа из пакета Statistica 8.

В исследовании по результатам дискриминантного анализа выявлено, что различия между группами пациентов с острым бронхитом (ОБ) и острой пневмонией (ОП) установлены.

При проверке правильности классификации решающими правилами (линейными классифицирующими функциями дискриминантного анализа групп пациентов с ОБ и ОП) были некорректно классифицированы один результат в группе ОБ и один результат в группе ОП.

Таблица 65 - Результаты классификации дискриминантным анализом групп пациентов с ОБ и ОП.

Группа	Процент	Острый бронхит (ОБ)	Острая пневмония (ОП)
Острый бронхит (ОБ)	94,11765	16	1
Острая пневмония (ОП)	96,29630	1	26
Итого:	95,45454	17	27

Среднее значение точности корректной классификации (общая вероятность классификации пациентов) составила 95,45% (таблица 65). При этом доли правильно классифицированных пациентов в обеих группах были примерно одинаковыми 94,12% для ОБ и 96,30% для пациентов ОП.

Результат оценки информативности выявленных признаков у пациентов в каждой группе указывает информативность выбранных переменных (F-критерий). Наибольшее значение F-критерия указывает на переменную, изменения которой, вносят максимальный вклад в классификационные уравнения. Значение этой переменной оказывает максимальное влияние на решение о принадлежности результатов анализов пациента к одной из исследуемых групп. Результат оценки чувствительности решающих правил представлен в таблице 66.

Из таблицы 66 следует, что все представленные в ней переменные являются информативными параметрами с уровнями значимости от 0,00171 до 0,0000001. Вместе с тем,

наиболее информативным признаком является (C5) концентрация валериановой кислоты (F=24,39).

Таблица 66 - Оценка чувствительности решающих правил.

Пере- менные	Показатели	F-включения	p
C2	Уксусная кислота, ммоль/г	21,74574	0,0000001
C5	Валериановая кислота, ммоль/г	24,39441	0,0000001
IC6	Изокапроновая кислота, ммоль/г	10,45118	0,000171

Основной целью дискриминации является нахождение такой линейной комбинации переменных, которая бы оптимально разделила рассматриваемые группы. Подбор коэффициентов переменных и констант линейных уравнений (линейных дискриминантных функций) проводили при помощи алгоритмов, реализованных в программе дискриминантного анализа. Коэффициенты линейных дискриминантных функций для исследуемых групп ОБ и ОП представлены в таблице 67.

Таблица 67 - Коэффициенты линейных классификационных функций. Classification Functions.

Переменные	Показатели	Острый бронхит (ОБ)	Острая пневмония (ОП)
C2	Уксусная кислота, ммоль/г	0,50752	0,113286
C5	Валериановая кислота, ммоль/г	-1,15227	1,909195
IC6	Изокапроновая кислота, ммоль/г	-3,88032	0,119217
	Постоянная	-6,13238	-0,80473

С использованием полученных коэффициентов линейные классификационные формулы будут выглядеть следующим образом:

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

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

где: C2 – концентрация уксусной кислоты в слюне, ммоль/г; C5 – концентрация валериановой кислоты в слюне, ммоль/г; IC6 – концентрация изокапроновой кислоты в слюне, ммоль/г.

Отнесение объекта к одной из исследуемых групп выполняется по максимальному значению линейных классификационных функций - $\max F_i$ ($i=1, k$) [2], после их расчета по набору переменных для каждой группы, где k – количество групп. В нашем случае $k=2$.

Основной целью дискриминации является нахождение такой линейной комбинации переменных (дискриминантные переменные), которая бы оптимально разделила рассматриваемые группы. С геометрической точки зрения дискриминантные функции определяют гиперповерхности в n -мерном пространстве. В частном случае при $n=2$ она

является прямой, а при $n=3$ — плоскостью. Требуется построить в пространстве границу более простой формы так, чтобы как можно больше точек одного класса лежало по одну сторону границы, а как можно больше точек другого класса — по другую сторону. Два класса (две группы) можно представить себе как два кластера точек, которые каким-либо образом разделены. Среднее значение для каждого кластера обозначается точкой в n -мерном дискриминантном пространстве и характеризует величину различий групп относительно друг друга. Из геометрической интерпретации задачи дискриминантного анализа следует правило классификации объектов: объект приписывается к тому классу, к центроиду которого он ближе всего. Расстояние между центроидами оценивается длиной вектора, или квадратом расстояний между центроидами, который рассчитывается путем геометрического сложения проекций в n -мерном пространстве. Расстояние между центроидами называется по имени ученого — Махалонобиса, который предложил этот метод оценки.

В таблице 68 приведены квадраты расстояний Махалонобиса между центроидами групп.

Таблица 68 - Квадрат расстояний Махалонобиса между группами ОБ и ОП.

Группа	Квадрат расстояний Махалонобиса	
	Острый бронхит (ОБ)	Острая пневмония (ОП)
Острый бронхит (ОБ)	0	5,20759
Острая пневмония (ОП)	5,20759	0

Таким образом, нами получен результат, свидетельствующий о различиях между 1 и 2 группами (расстояние Махалонобиса – 5,20759).

Данные о факторной нагрузке канонической линейной дискриминантной функции используются для оценки коэффициентов «весомости» переменных при решении задачи дифференциальной диагностики ОБ и ОП. Канонические функции — это ортогональные оси, в максимальной степени различающие центроиды классов. Началом координат для канонических функций является «главный центроид» — точка, координаты которой есть средние значения всех дискриминантных переменных. Первая каноническая ось ориентирована в направлении, в котором центроиды классов различаются в максимальной степени. Если классов больше двух, то вторая ось ориентирована перпендикулярно первой в направлении максимального различия классов и т. д. Максимальное число таких функций равно числу классов за вычетом единицы. Так, для различения двух центроидов (классов) достаточно одной оси, для различения трех классов — двух канонических функций, и т. д. Канонические функции и дискриминантные переменные связывают стандартизированные канонические коэффициенты, которые позволяют оценить относительный вклад переменных в каждую каноническую функцию. В отличие от них, структурные коэффициенты канонических функций — это корреляции канонических функций и дискриминантных переменных. Как и факторные нагрузки в факторном анализе,

структурные коэффициенты отражают связь дискриминантных переменных с каноническими функциями. Структурные коэффициенты канонических функций показывают вклад каждой дискриминантной переменной в различительную способность соответствующей функции. Для решения диагностической задачи по каноническим уравнениям нами определялись канонические линейные дискриминантные функции (КЛДФ), обобщающие данные обо всех признаках, включенных в модель, по всем пациентам, находящимся в матрице наблюдений. Вклад КЛДФ в межгрупповую дисперсию признаков (Eigenvalue) оценивается по χ^2 -критерию Пирсона. Этот вклад признается значимым при уровне значимости $p < 0,05$ [2].

Таблица 69 - Коэффициенты канонических линейных дискриминантных функций

Переменные	Показатели	Корень 1
C2	Уксусная кислота, ммоль/г	-1,1685
C5	Валериановая кислота, ммоль/г	0,33796
IC6	Изокапроновая кислота, ммоль/г	0,60958
	Eigenval	0,92551
	Cum. Prop	1

В таблице 69 представлены коэффициенты КЛДФ; ее собственный вклад и кумулятивный вклад (cum. prop.). Так, корень 1 обобщил дисперсию всех признаков на 100%. Также приведены формулы для расчета К. По формуле можно рассчитать координаты обследованных пациентов:

$$K = -1,1685 \times C2 + 0,33796 \times C5 + 0,60958 \times IC6$$

где: C2 – концентрация уксусной кислоты в слюне, ммоль/г; C5 – концентрация валериановой кислоты в слюне, ммоль/г; IC6 – концентрация изокапроновой кислоты в слюне, ммоль/г.

Таблица 70 - Факторная нагрузка канонической линейной дискриминантной функции.

Переменные	Показатели	Корень 1
C2	Уксусная кислота, ммоль/г	-0,8115
C5	Валериановая кислота, ммоль/г	-0,03626
IC6	Изокапроновая кислота, ммоль/г	0,105016

По таблице факторной структуры канонической линейной дискриминантной функции (таблица 70) судят о корреляционной связи наблюдавшихся переменных, включенных в модели с каноническими ЛДФ. С канонической ЛДФ более тесно связана уксусная, кислота ммоль/г (таблица 70).

Таким образом, в результате проведенного исследования установлено следующее.

Изменение функциональной активности микробиоценоза ротоглотки подтверждается

изменением концентраций уксусной, валерианой, и изокапроновой кислот в слюне в зависимости от диагноза, что подтверждается низким значением лямбды Уилкса и низкими корреляционными связями для концентраций этих кислот.

Полученные в исследовании линейные классификационные уравнения дискриминантной функции при изучении микробиоценоза ротоглотки позволяют проводить с высокой чувствительностью дифференциальную диагностику острого бронхита и острой пневмонии.

Информативными дифференциально-диагностическими признаками при проведении дифференциальной диагностики острого бронхита и острой пневмонии являются: концентрации уксусной, валериановой и изокапроновой кислот определяемые в слюне пациентов. Наиболее информативным признаком из них является концентрация валериановой кислоты в слюне ($F=24,39$).

Предложено для проведения дифференциальной диагностики острого бронхита и острой пневмонии проводить дифференциальную диагностику острого бронхита и острой пневмонии по формулам линейных классификационных функций:

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

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

Канонические линейные дифференциальные функции, необходимые для определения дисперсии признаков острого бронхита и острой пневмонии рассчитывается по уравнению $K = -1,1685 \times C2 + 0,33796 \times C5 + 0,60958 \times IC6$.

Установлена, что точность диагностики по решающим правилам (табл. 65) в среднем имеет достоверность 95,45%, для острого бронхита – 94,12%, для острой пневмонии – 96,30%.

Глава 5. Создание пробиотических препаратов с заданными свойствами для персонализированной коррекции дисбиозов.

Одним из вариантов дифференцированного применения пробиотиков при дисбактериозах кишечника является учет уровня отдельных ЛЖК в многовидовых композициях на основе консорциумов штаммов лактобацилл, их активной и титруемой кислотности в соответствии с дефицитом соответствующих ЛЖК в содержимом кишечника пациентов. Из литературы известно, что концентрации ЛЖК в кале и содержимом кишечника отличаются не только по концентрации, но и в соотношениях относительно друг друга. Поэтому сопоставление дефицита отдельных ЛЖК кала и избытка отдельных ЛЖК консорциума штаммов не корректно. Известно, что дефицит ЛЖК в кишечнике образуется при различных токсических воздействиях, особенно при антибиотикотерапии. Таким образом, возможность применения консорциума штаммов лактобацилл можно исследовать на модели антибиотико-ассоциированного дисбиоза у мышей. Первым этапом данного исследования является изучение синергетических составов по отношению штаммов лактобацилл к отдельным ЛЖК.

5.1 Разработка многовидовой композиции на основе консорциума штаммов лактобацилл с учетом показателей ЛЖК

Для выбора многовидовых композиций на основе промышленно применимых видов лактобацилл, предназначенных для персонализированной коррекции дисбактериозов, на основе исследования влияния на уровень ЛЖК в пригодной для промышленного культивирования питательной среде композиций штаммов *L. acidophilus* NK-1, *L. acidophilus* K3III24, *L. acidophilus* 100auu, *Lactobacillus plantarum* 8P-A3, *Lactobacillus casei* B-85.

В качестве известной среды, широко используемой при приготовлении жидких БАД на основе лактобацилл, была использована гидролизатно-молочная среда (ГМС) [48].

Определение содержания ацидофильных лактобацилл проводили по методу, изложенному в ГОСТ 10444.11-89 [25].

Санитарно микробиологические исследования образцов биомассы лактобацилл проводили с учетом ГОСТ 10444.12-88, ГОСТ 30347-97, ГОСТ Р 52814-2007, ГОСТ Р 52816-2007 и МУК 2.3.2.721-98 [26, 27, 29, 30, 80].

Определение активной кислотности образцов биомассы лактобацилл проводили по ГОСТ 30648.5-99 с использованием рН-метра Piccolo plus (Hanna Instruments, Германия) [28].

Определение ЛЖК проводили по модифицированному нами методу в несколько этапов: пробоподготовка, хроматографирование, обработка результатов.

Для определения ЛЖК использовали отделенный от осадка подкисленный центрифугат образца питательной среды или биомассы лактобацилл, который получали в следующей

последовательности: 1) в одноразовой пластиковой пробирку вносили 2 мл образца; 2) для осаждения белка к образцу приливали 57% водный раствор хлорной кислоты до появления признаков коагуляции белка; 3) для осаждения белков полученную смесь центрифугировали при 6000 об/мин; 4) к отделенному от осадка центрифугату приливали 1 мл 1N соляной кислоты и 0,5 мл стандартного вещества. Полученный инфильтрат должен был быть прозрачным, иметь кислую реакцию.

Исследование влияния многоштаммовых моновидовых композиций на основе консорциумов штаммов лактобацилл на уровень ЛЖК в ГМС в течение промышленно применимого времени культивирования.

Инокулаты вносились в количестве 5% от общего объема среды.

Образцы биомассы отбирались через пять часов после начала культивирования.

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

При исследовании всех полученных образцов продукции отмечено достаточно высокое содержание лактобацилл в среде культивирования – $8 \lg$ КОЕ/мл (таблица 71).

Наиболее низкие показатели активной кислотности и статистически достоверно высокие показатели титруемой кислотности выявлены при культивировании всех трех штаммов *L. acidophilus*.

Таблица 71 - Влияние консорциумов лактобацилл на показатели композиций (содержание бактерий, активную и титруемую кислотность)

Разновидности многовидовых композиций	КОЕ	Ph	Титруемая кислотность
<i>L. acidophilus</i> 100aи : <i>L. casei</i> = 1 : 1	10^9	$3,86 \pm 0,3$	164 ± 20
<i>L. acidophilus</i> 100aи : <i>L. casei</i> = 2 : 1	10^9	$3,64 \pm 0,2$	172 ± 18
<i>L. acidophilus</i> 100aи : <i>L. casei</i> = 3 : 1	10^9	$3,92 \pm 0,25$	168 ± 22
<i>L. acidophilus</i> 100aи : <i>L. casei</i> = 1 : 2	10^9	$3,71 \pm 0,2$	166 ± 24
<i>L. acidophilus</i> 100aи : <i>L. casei</i> = 1 : 3	10^9	$3,78 \pm 0,3$	174 ± 21
<i>L. acidophilus</i> NK-1 : <i>L. casei</i> = 1 : 1	10^9	$3,82 \pm 0,2$	184 ± 20
<i>L. acidophilus</i> NK-1 : <i>L. casei</i> = 2 : 1	10^9	$3,79 \pm 0,25$	168 ± 24
<i>L. acidophilus</i> NK-1 : <i>L. casei</i> = 3 : 1	10^9	$3,85 \pm 0,21$	186 ± 16
<i>L. acidophilus</i> NK-1 : <i>L. casei</i> = 1 : 2	10^9	$3,84 \pm 0,2$	192 ± 18
<i>L. acidophilus</i> NK-1 : <i>L. casei</i> = 1 : 3	10^9	$3,69 \pm 0,19$	182 ± 24
<i>L. acidophilus</i> K3III24 : <i>L. casei</i> = 1 : 1	10^9	$3,91 \pm 0,24$	168 ± 22
<i>L. acidophilus</i> K3III24 : <i>L. casei</i> = 2 : 1	10^9	$7,73 \pm 0,3$	158 ± 16

Таблица 71 - Влияние консорциумов лактобацилл на показатели композиций (содержание бактерий, активную и титруемую кислотность) (продолжение)

Разновидности многовидовых композиций	КОЕ	Ph	Титруемая кислотность
<i>L. acidophilus K3III24 : L. casei = 3 : 1</i>	10 ⁹	3,67±23	164±14
<i>L. acidophilus K3III24 : L. casei = 1 : 2</i>	10 ⁹	3,59±0,2	158±26
<i>L. acidophilus K3III24 : L. casei = 1 : 3</i>	10 ⁹	3,72±0,21	184±22
<i>L. acidophilus 100auu : L. plantarum = 1 : 1</i>	10 ⁹	3,95±0,27	188±20
<i>L. acidophilus 100auu : L. plantarum = 2 : 1</i>	10 ⁹	3,83±0,2	192±18
<i>L. acidophilus 100auu : L. plantarum = 3 : 1</i>	10 ⁹	3,59±0,24	196±24
<i>L. acidophilus 100auu : L. plantarum = 1 : 2</i>	10 ⁹	3,78±0,3	186±22
<i>L. acidophilus 100auu : L. plantarum = 1 : 3</i>	10 ⁹	3,84±0,21	184±20
<i>L. acidophilus NK-1 : L. plantarum = 1 : 1</i>	10 ⁹	3,91±0,23	174±24
<i>L. acidophilus NK-1 : L. plantarum = 2 : 1</i>	10 ⁹	3,56±0,2	178±22
<i>L. acidophilus NK-1 : L. plantarum = 3 : 1</i>	10 ⁹	3,58±0,21	186±28
<i>L. acidophilus NK-1 : L. plantarum = 1 : 2</i>	10 ⁹	3,69±0,2	172±22
<i>L. acidophilus NK-1 : L. plantarum = 1 : 3</i>	10 ⁹	3,62±0,3	170±24
<i>L. acidophilus K3III24 : L. plantarum = 1 : 1</i>	10 ⁹	3,84±0,18	174±20
<i>L. acidophilus K3III24 : L. plantarum = 2 : 1</i>	10 ⁹	3,73±0,3	182±22
<i>L. acidophilus K3III24 : L. plantarum = 3 : 1</i>	10 ⁹	3,77±0,26	180±24
<i>L. acidophilus K3III24 : L. plantarum = 1 : 2</i>	10 ⁹	3,68±0,2	172±22
<i>L. acidophilus K3III24 : L. plantarum = 1 : 3</i>	10 ⁹	3,79±0,3	184±28
<i>L. casei : L. plantarum = 1 : 1</i>	10 ⁹	3,82±0,23	168±18
<i>L. casei : L. plantarum = 2 : 1</i>	10 ⁹	3,91±0,24	164±16
<i>L. casei : L. plantarum = 3 : 1</i>	10 ⁹	3,85±0,3	166±20
<i>L. casei : L. plantarum = 1 : 2</i>	10 ⁹	3,79±0,2	160±26
<i>L. casei : L. plantarum = 1 : 3</i>	10 ⁹	3,83±0,22	158±20

Достоверные отличия указаны **полужирным курсивом**. * – ***P* < 0,05**

Согласно приведенным данным в таблице 71 наиболее низкая титруемая кислотность определялась в следующих консорциумах:

1. *L. acidophilus K3III24 : L. casei = 2 : 1*
2. *L. acidophilus K3III24 : L. casei = 1 : 2*
3. *L. casei : L. plantarum = 1 : 2*
4. *L. casei : L. plantarum = 1 : 3*

Наиболее высокая титруемая кислотность определялась в следующих консорциумах:

1. *L. acidophilus NK-1 : L. casei = 3 : 1*
2. *L. acidophilus NK-1 : L. casei = 1 : 2*
3. *L. acidophilus 100auu : L. plantarum = 2 : 1*
4. *L. acidophilus 100auu : L. plantarum = 3 : 1*

Таблица 72 - Влияние консорциумов лактобацилл на уровень короткоцепочечных монокарбоновых жирных кислот в среде культивирования.

Разновидности многовидовых композиций	Уксусная	Пропионовая	Изомасляная	Масляная	Изо валерия- новая	Валерия-новая	Изо капроновая
<i>L. acidophilus 100au</i> : <i>L. casei</i> = 1 : 1	8,74±0,54	5,87±0,47	0,043±0,002	0,145±0,007	0,072±0,005	0,047±0,008	0,134±0,003
<i>L. acidophilus 100au</i> : <i>L. casei</i> = 2 : 1	9,65±0,62	5,52±0,54	0,046±0,007	0,143±0,005	0,085±0,008	0,043±0,005	0,141±0,007
<i>L. acidophilus 100au</i> : <i>L. casei</i> = 3 : 1	7,48±0,59	5,82±0,52	0,054±0,006	0,136±0,009	0,063±0,004	0,046±0,009	0,133±0,005
<i>L. acidophilus 100au</i> : <i>L. casei</i> = 1 : 2	6,84±0,82	6,01±0,45	0,061±0,005	0,144±0,012	0,058±0,006	0,045±0,005	0,127±0,004
<i>L. acidophilus 100au</i> : <i>L. casei</i> = 1 : 3	7,06±0,74	5,14±0,47	0,058±0,008	0,148±0,005	0,069±0,009	0,073±0,006	0,156±0,003
<i>L. acidophilus NK-1</i> : <i>L.</i> <i>casei</i> = 1 : 1	7,54±0,52	4,92±0,49	0,052±0,006	0,143±0,007	0,073±0,003	0,091±0,003	0,177±0,004
<i>L. acidophilus NK-1</i> : <i>L.</i> <i>casei</i> = 2 : 1	7,98±0,63	4,63±0,46	0,055±0,007	0,132±0,006	0,071±0,007	0,101±0,007	0,189±0,002
<i>L. acidophilus NK-1</i> : <i>L.</i> <i>casei</i> = 3 : 1	7,11±0,71	5,42±0,54	0,054±0,005	0,147±0,003	0,066±0,005	0,063±0,010	0,155±0,006
<i>L. acidophilus NK-1</i> : <i>L.</i> <i>casei</i> = 1 : 2	6,57±0,56	5,89±0,43	0,051±0,002	0,142±0,009	0,057±0,009	0,050±0,004	0,131±0,004
<i>L. acidophilus NK-1</i> : <i>L.</i> <i>casei</i> = 1 : 3	8,01±0,74	5,19±0,63	0,064±0,008	0,154±0,010	0,098±0,006*	0,133±0,005	0,177±0,006
<i>L. acidophilus K3III24</i> : <i>L. casei</i> = 1 : 1	8,92±0,83	4,95±0,56	0,067±0,004	0,168±0,004	0,105±0,004*	0,179±0,004*	0,198±0,004*
<i>L. acidophilus K3III24</i> : <i>L. casei</i> = 2 : 1	9,54±0,57	4,46±0,61	0,061±0,009	0,174±0,012*	0,111±0,007*	0,211±0,006*	0,201±0,003*
<i>L. acidophilus K3III24</i> : <i>L. casei</i> = 3 : 1	7,15±0,79	5,73±0,52	0,059±0,003	0,155±0,006	0,082±0,005	0,075±0,003	0,155±0,006
<i>L. acidophilus K3III24</i> : <i>L. casei</i> = 1 : 2	6,65±0,65	6,11±0,47	0,057±0,006	0,143±0,003	0,075±0,009	0,057±0,004	0,137±0,002
<i>L. acidophilus K3III24</i> : <i>L. casei</i> = 1 : 3	11,42±0,76	6,94±0,54	0,052±0,005	0,161±0,005	0,079±0,004	0,078±0,009	0,163±0,005
<i>L. acidophilus 100au</i> : <i>L. plantarum</i> = 1 : 1	10,92±0,68	6,01±0,41	0,055±0,004	0,157±0,002	0,072±0,005	0,054±0,006	0,152±0,007
<i>L. acidophilus 100au</i> : <i>L. plantarum</i> = 2 : 1	10,37±0,53	5,68±0,49	0,051±0,003	0,149±0,007	0,084±0,003	0,049±0,005	0,143±0,009
<i>L. acidophilus 100au</i> : <i>L. plantarum</i> = 3 : 1	11,95±0,64*	7,52±0,52*	0,056±0,005	0,173±0,009*	0,073±0,006	0,097±0,005	0,173±0,005
<i>L. acidophilus 100au</i> : <i>L. plantarum</i> = 1 : 2	12,65±0,71*	8,01±0,44*	0,063±0,004	0,177±0,007*	0,068±0,008	0,118±0,007	0,184±0,009
<i>L. acidophilus 100au</i> : <i>L. plantarum</i> = 1 : 3	9,97±0,56	6,11±0,31	0,057±0,007	0,157±0,005	0,061±0,003	0,113±0,008	0,181±0,004
<i>L. acidophilus NK-1</i> : <i>L.</i> <i>plantarum</i> = 1 : 1	9,13±0,59	5,64±0,57	0,055±0,006	0,147±0,011	0,064±0,009	0,117±0,004	0,187±0,003
<i>L. acidophilus NK-1</i> : <i>L.</i> <i>plantarum</i> = 2 : 1	8,42±0,78	4,82±0,47	0,053±0,008	0,144±0,004	0,074±0,005	0,110±0,005	0,185±0,007
<i>L. acidophilus NK-1</i> : <i>L.</i> <i>plantarum</i> = 3 : 1	10,65±0,59	7,03±0,62	0,056±0,006	0,163±0,009	0,067±0,008	0,113±0,009	0,189±0,006
<i>L. acidophilus NK-1</i> : <i>L.</i> <i>plantarum</i> = 1 : 2	11,86±0,69*	7,98±0,48*	0,064±0,003	0,172±0,009*	0,065±0,004	0,122±0,007	0,197±0,004*
<i>L. acidophilus NK-1</i> : <i>L.</i> <i>plantarum</i> = 1 : 3	11,84±0,67*	6,17±0,49	0,067±0,005	0,176±0,012*	0,087±0,006	0,169±0,005*	0,202±0,002*
<i>L. acidophilus K3III24</i> : <i>L. plantarum</i> = 1 : 1	11,22±0,45	5,34±0,45	0,061±0,009	0,174±0,008*	0,108±0,005*	0,194±0,006*	0,211±0,003*
<i>L. acidophilus K3III24</i> : <i>L. plantarum</i> = 2 : 1	10,43±0,72	4,57±0,46	0,063±0,007	0,178±0,007*	0,112±0,007*	0,211±0,007*	0,213±0,004*
<i>L. acidophilus K3III24</i> : <i>L. plantarum</i> = 3 : 1	12,32±0,72*	7,01±0,54	0,068±0,003	0,175±0,009*	0,079±0,009	0,141±0,008	0,175±0,006

Таблица 72- Влияние консорциумов лактобацилл на уровень короткоцепочечных монокарбоновых жирных кислот в среде культивирования.

Разновидности многовидовых композиций	Уксусная	Пропионовая	Изомасляная	Масляная	Изо валерия-новая	Валерия-новая	Изо капроновая
<i>L. acidophilus K3III24 : L. plantarum = 1 : 2</i>	12,76±0,68*	8,12±0,52*	0,066±0,006	0,171±0,010*	0,065±0,003	0,133±0,008	0,173±0,003
<i>L. acidophilus K3III24 : L. plantarum = 1 : 3</i>	9,31±0,85	7,39±0,47	0,056±0,003	0,153±0,004	0,059±0,009	0,074±0,004	0,153±0,007
<i>L. casei : L. plantarum = 1 : 1</i>	8,11±0,69	6,92±0,54	0,059±0,008	0,168±0,005	0,057±0,004	0,050±0,007	0,142±0,004
<i>L. casei : L. plantarum = 2 : 1</i>	7,02±0,64	6,44±0,48	0,051±0,002	0,175±0,009*	0,055±0,007	0,043±0,003	0,133±0,005
<i>L. casei : L. plantarum = 3 : 1</i>	10,56±0,55	7,83±0,46*	0,065±0,005	0,147±0,006	0,068±0,008	0,097±0,004	0,136±0,009
<i>L. casei : L. plantarum = 1 : 2</i>	11,72±0,73*	8,31±0,49*	0,063±0,004	0,149±0,004	0,062±0,005	0,115±0,007	0,178±0,003
<i>L. casei : L. plantarum = 1 : 3</i>	8,74±0,67	5,87±0,46	0,048±0,007	0,144±0,007	0,070±0,003	0,043±0,003	0,134±0,004

Достоверные отличия указаны **полужирным курсивом** – $P < 0,05$

* – достоверное повышение ЛЖК после культивирования ($P < 0,05$)

Выявлена максимальная способность повышать уровень уксусной кислоты в среде культивирования ($p < 0,05$) при совместном культивировании в соотношениях:

- *L. acidophilus 100aui* и *L. plantarum = 3 : 1*;
- *L. acidophilus 100aui : L. plantarum = 1 : 2*;
- *L. acidophilus NK-1 : L. plantarum = 1 : 2*;
- *L. acidophilus NK-1 : L. plantarum = 1 : 3*;
- *L. acidophilus K3III24 : L. plantarum = 3 : 1*;
- *L. acidophilus K3III24 : L. plantarum = 1 : 2*;
- *L. casei : L. plantarum = 1 : 2*

Уровень пропионовой кислоты статистически достоверно ($p < 0,05$) повышался при культивировании следующих многовидовых консорциумов лактобацилл:

- *L. acidophilus 100aui : L. plantarum = 3 : 1*;
- *L. acidophilus 100aui : L. plantarum = 1 : 2*;
- *L. acidophilus NK-1 : L. plantarum = 1 : 2*;
- *L. acidophilus K3III24 : L. plantarum = 1 : 2*;
- *L. casei : L. plantarum = 3 : 1*;
- *L. casei : L. plantarum = 1 : 2*.

Концентрация масляной кислоты статистически достоверно ($p < 0,05$) повышалась при культивировании следующих многовидовых консорциумов лактобацилл:

- *L. acidophilus K3III24 : L. casei = 2 : 1*;
- *L. acidophilus 100aui : L. plantarum = 3 : 1*;
- *L. acidophilus 100aui : L. plantarum = 1 : 2*;

- *L. acidophilus* NK-1 : *L. plantarum* = 1 : 2;
- *L. acidophilus* NK-1 : *L. plantarum* = 1 : 3;
- *L. acidophilus* K3Ш24 : *L. plantarum* = 1 : 1;
- *L. acidophilus* K3Ш24 : *L. plantarum* = 2 : 1;
- *L. acidophilus* K3Ш24 : *L. plantarum* = 3 : 1;
- *L. acidophilus* K3Ш24 : *L. plantarum* = 1 : 2;
- *L. casei* : *L. plantarum* = 2 : 1.

При совместном культивировании многовидовых консорциумов лактобацилл отмечалось статистически достоверное ($p < 0,05$) повышение уровня изовалериановой кислоты:

- *L. acidophilus* NK-1 : *L. casei* = 1 : 3;
- *L. acidophilus* K3Ш24 : *L. casei* = 1 : 1;
- *L. acidophilus* K3Ш24 : *L. casei* = 2 : 1;
- *L. acidophilus* K3Ш24 : *L. plantarum* = 1 : 1;
- *L. acidophilus* K3Ш24 : *L. plantarum* = 2 : 1.

Повышение уровня валериановой кислоты статистически достоверно ($p < 0,05$) повышалось при культивировании следующих многовидовых консорциумов лактобацилл:

- *L. acidophilus* K3Ш24 : *L. casei* = 1 : 1;
- *L. acidophilus* K3Ш24 : *L. casei* = 2 : 1;
- *L. acidophilus* NK-1 : *L. plantarum* = 1 : 3;
- *L. acidophilus* K3Ш24 : *L. plantarum* = 1 : 1;
- *L. acidophilus* K3Ш24 : *L. plantarum* = 2 : 1.

Уровень изокапроновой кислоты статистически достоверно ($p < 0,05$) повышался при культивировании многовидовых консорциумов лактобацилл:

- *L. acidophilus* K3Ш24 : *L. casei* = 1 : 1;
- *L. acidophilus* K3Ш24 : *L. casei* = 2 : 1;
- *L. acidophilus* NK-1 : *L. plantarum* = 1 : 2;
- *L. acidophilus* NK-1 : *L. plantarum* = 1 : 3;
- *L. acidophilus* K3Ш24 : *L. plantarum* = 1 : 1;
- *L. acidophilus* K3Ш24 : *L. plantarum* = 2 : 1.

5.2. Модель антибиотико-ассоциированного дисбиоза у мышей

Описание групп.

Для исследования отбирали клинически здоровых белых мышей разного пола, с хорошей упитанностью, активных, подвижных, хорошо обволощенных, с нормальной окраской слизистых оболочек и оформленным стулом, прошедших карантин.

Здоровые животные были разделены на 9 групп по 11 мышей в каждой группе в соответствии с получаемыми препаратами. Препараты в течение 6 -12 дней вводили перорально с помощью зонда по 0,5 мл, предварительно у животных отнимали корм и выдерживали в течение 2 часов. В период проведения эксперимента оценивали следующие клинические показатели:

1. состояние шерсти;
2. активность животного;
3. окраска слизистых оболочек;
4. масса тела;
5. характер стула.

После окончания исследований животных вскрывали, отделяли кишечник.

Исследовали содержимое тонкого и толстого кишечника.

Группа 1. Использовано 11 животных разного пола, средний вес которых составил 25 г. Животным перорально вводили 0,5 мл раствора **амоксциллина**.

Для приготовления раствора таблетку амоксициллина 1000 мг суспендировали в 25 мл физиологического раствора. Далее объем суспензии доводили до 50 мл. Концентрация амоксициллина в готовой смеси составляла 20 мг/мл. Суспензию с антибиотиком использовали в течение суток, далее готовили новую. Животным вводили смесь по 0,5 мл перорально 1 раз в сутки в течение 6 дней. На 7 день вскрывали, отделяли содержимое тонкого и толстого кишечника для анализа. Следует отметить, что у всех животных, такие клинические показатели, как состояние шерсти, активность животного, окраска слизистых, характер стула в течение всего времени проведения опыта оставались без изменений.

Группа 2. Использовано 11 животных разного пола, средний вес которых составил 25,9 г. Животным перорально вводили 0,5 мл раствора **кларитромицина**.

Для приготовления раствора таблетку **кларитромицина** 500 мг измельчали в ступке и суспендировали в 10 мл 1 % крахмала, приготовленного на основе физиологического раствора. Далее к 5 мл суспензии добавляли 7,5 мл раствора крахмала. Концентрация **кларитромицина** при этом составляла 20 мг/мл. Суспензию с антибиотиком использовали в течение суток, далее готовили новую. Смесь вводили животным по 0,5 мл перорально 1 раз в сутки в течение 6 дней, на 7 день вскрывали, отделяли содержимое тонкого и толстого кишечника для анализа.

Следует отметить, что у всех животных, такие клинические показатели, как состояние шерсти, активность животного, окраска слизистых, характер стула в течение всего времени проведения опыта оставались без изменений.

Группа 3. Использовано 11 животных разного пола, средний вес которых, составил 25 г. Животным перорально вводили 0,5 мл раствора **азитромицина**.

Для приготовления раствора во флакон, содержащий порошок **азитромицина** в количестве 16,74 г, где на долю **азитромицина** приходится 800 мг, добавляли раствор 1 % крахмала в количестве 8 мл, приготовленного на основе физиологического раствора, тщательно перемешивали. К 1 мл полученной таким образом суспензии прибавляли 4 мл 1 % раствора крахмала. Конечная концентрация **азитромицина** при этом составляла 8 мг/мл. Раствор антибиотика использовали в течение суток, далее готовили новый. Смесь вводили животным по 0,5 мл перорально с помощью зонда 1 раз в сутки в течение 6 дней, на 7 день вскрывали, отделяли содержимое тонкого и толстого кишечника для анализа.

Следует отметить, что у всех животных, такие клинические показатели, как состояние шерсти, активность животного, окраска слизистых, характер стула в течение всего времени проведения опыта оставались без изменений.

Группа 4. Использовано 11 животных разного пола, средний вес которых составил 26,6 г. Животным перорально вводили 0,5 мл раствора **левофлоксацина**.

Для приготовления раствора таблетку **левофлоксацина** 500 мг измельчали в ступке и суспендировали в 8 мл 1 % крахмала, приготовленного на основе физиологического раствора. Далее к 3 мл суспензии добавляли 12 мл раствора крахмала. Конечная концентрация **левофлоксацина** при этом составляла 8 мг/мл. Раствор антибиотика использовали в течение суток, далее готовили новый. Смесь вводили животным по 0,5 мл перорально 1 раз в сутки в течение 6 дней, на 7 день вскрывали, отделяли содержимое тонкого и толстого кишечника для анализа.

Следует отметить, что у всех животных, такие клинические показатели, как состояние шерсти, активность животного, окраска слизистых, характер стула в течение всего времени проведения опыта оставались без изменений.

Группа 5. Использовано 11 животных разного пола, средний вес которых составил 25,4 г. Животным перорально вводили 0,5 мл раствора **цефиксима**.

Для приготовления раствора во флакон, содержащий порошок **супракс** в количестве 30 г, где на долю **цефиксима** приходится 1200 мг, добавляли 40 мл физиологического раствора, тщательно перемешивали - раствор использовали в течение 7 дней. К 1 мл полученной таким образом суспензии прибавляли 4 мл 1% крахмала. Конечная концентрация **цефиксима** при этом составляла 4 мг/мл. Конечный раствор суспензии использовали в течение суток, далее готовили новый. Смесь вводили животным по 0,5 мл перорально с помощью зонда 1 раз в сутки в течение 6 дней, на 7 день вскрывали, отделяли содержимое тонкого и толстого кишечника для анализа.

Следует отметить, что у всех животных, такие клинические показатели, как состояние шерсти, активность животного, окраска слизистых, характер стула в течение всего времени

проведения опыта оставались без изменений.

Группа 6. Использовано 11 животных разного пола, средний вес которых составил 26,3 г. Животным перорально вводили 0,5 мл раствора 1 % крахмала, приготовленного на основе физиологического раствора, в течение 3 дней. Далее на 4 день - раствор **фосфомицина**, и еще 2 дня - раствор 1 % крахмала. На 7 день проводили вскрытие.

Для приготовления суспензии порошок **фосфомицина** (пакетик по 3000 мг) разводили в 15 мл физиологического раствора, перемешивали и доводили объем до 30 мл. Концентрация фосфомицина в суспензии для введения составляла 8 мг/мл.

Следует отметить, что у всех животных, такие клинические показатели, как состояние шерсти, активность животного, окраска слизистых, характер стула в течение всего времени проведения опыта оставались без изменений.

Группа 7. Использовано 11 животных разного пола, средний вес которых составил 25,15 г. Животным перорально вводили 0,5 мл раствора 1 % крахмала, приготовленного на основе физиологического раствора, и раствор **метотрексата** в течение 12 дней, чередуя введение этих препаратов через день. На 13 день проводили вскрытие.

Для приготовления раствора использовали раствор **метотрексата** для внутривенного введения 5 мг/мл, который разводили в 25 раз 1 % раствором крахмала, приготовленным на основе физиологического раствора (0,5мл + 12,0мл). Концентрация **метотрексата** в растворе для перорального введения составляла 0,2 мг/мл.

Следует отметить, что:

- на 5 день эксперимента пало одно животное, при вскрытии визуальных изменений внутренних органов обнаружено не было, лимфоузлы - без изменений;
- на 9 день эксперимента пало одно животное, при вскрытии визуальных изменений внутренних органов обнаружено не было, лимфоузлы - без изменений;
- на 11 день эксперимента пало одно животное, при вскрытии визуальных изменений внутренних органов обнаружено не было, лимфоузлы - без изменений;

Клинические показатели остальных животных, такие, как состояние шерсти, активность животного, окраска слизистых, характер стула в течение всего времени проведения опыта оставались без изменений.

Группа 8. Использовано 11 животных (самцов), средний вес которых составил 26,5 г. Животным перорально вводили 0,5 мл раствор **преднизолона** в течение 10 дней. На 11 день проводили вскрытие.

Для приготовления раствора использовали раствор **преднизолона** для инъекций 25 мг/мл, который разводили в 62 раза 1 % раствором крахмала, приготовленным на основе физиологического раствора (0,5мл + 30,5мл). Концентрация **преднизолона** в растворе для

перорального введения составляла 0,4 мг/мл.

Следует отметить, что у всех животных, такие клинические показатели, как состояние шерсти, активность животного, окраска слизистых, характер стула в течение всего времени проведения опыта оставались без изменений.

Группа 9 (контрольная). Использовано 11 животных разного пола, средний вес которых составил 26,3 г. Животным перорально вводили 0,5 мл раствора 1 % крахмала, приготовленного на основе физиологического раствора в течение 6 дней. На 7 день проводили вскрытие.

Следует отметить, что у всех животных, такие клинические показатели, как состояние шерсти, активность животного, окраска слизистых, характер стула в течение всего времени проведения опыта оставались без изменений. Схема введения препарата и обозначения на рисунках представлены в таблице 73

Таблица 73 - Обозначения групп на рисунках и в таблицах.

№	Наименование антибиотика и пробиотика	Кодовое обозначение на графиках и в таблицах
1	Перорально вводили 0,5 мл раствора амоксциллина	АМЦ
2	Перорально вводили 0,5 мл раствора кларитромицина	КЛТ
3	Перорально вводили 0,5 мл раствора азитромицина	АЗТ
4	Перорально вводили 0,5 мл раствора левофлоксацина	ЛВФ
5	Перорально вводили 0,5 мл раствора цефиксима	ЦФК
6	Перорально вводили 0,5 мл раствор фосфомицина	ФСМ
7	Перорально вводили 0,5 мл раствора метотрексата	МТР
8	Перорально вводили 0,5 мл раствор преднизолона	ПНЗ
9	Перорально вводили 0,5 мл раствора 1 % крахмала	Норма

Получены концентрации ЛЖК в содержимом кишечника мышей.

В таблице 74 показано, что некоторые исследуемые препараты достоверно снижают концентрации ЛЖК. Достоверного снижения концентраций не наблюдается в группах АЗТ, МТР, ПНЗ, что соответствует применению азитромицина, метотрексата и преднизолона. Влияние перепаратов в большей степени отмечено у концентрации пропионовой и масляной кислот, чем на концентрации уксусной кислоты. Следовательно, происходит угнетение анаэробной микрофлоры в большей степени, чем аэробной. Учитывая особую роль масляной кислоты в обеспечении энергией коллоноцитов эпителия, можно отметить существенное, более чем 5-кратное, снижение концентрации масляной кислоты во всех исследуемых группах за исключением АЗТ, МТР и ПНЗ.

Таблица 74 - Концентрации уксусной, пропионовой и масляной кислот в содержимом кишечника мышей у разных экспериментальных групп

Группы	Концентрации ЛЖК, ммоль/г		
	уксусной	пропионовой	масляной
АМЦ	13,41 ± 2,56 (p=0,379)	<i>0,86 ± 0,6 (p=0,002)*</i>	<i>0,15 ± 0,06 (p<0,05)*</i>
КЛТ	<i>9,34 ± 3,37 (p=0,024)*</i>	<i>0,5 ± 0,29 (p<0,05)*</i>	<i>2,07 ± 1,86 (p<0,05)*</i>
АЗТ	18,83 ± 6,86 (p=0,397)	<i>1,32 ± 0,49 (p=0,009)*</i>	7,25 ± 2,81 (p=0,878)
ЛВФ	<i>6,72 ± 2,79 (p=0,001)*</i>	<i>0,54 ± 0,43 (p<0,05)*</i>	<i>0,1 ± 0,07 (p<0,05)*</i>
ЦФК	<i>5,72 ± 1,5 (p<0,05)*</i>	<i>0,24 ± 0,07 (p<0,05)*</i>	<i>0,09 ± 0,08 (p<0,05)*</i>
ФСМ	16,79 ± 3,18 (p=0,578)	<i>4,6 ± 1,22 (p=0,019)*</i>	<i>0,35 ± 0,23 (p<0,05)*</i>
МТР	11,02 ± 2,77 (p=0,081)	2,09 ± 0,65 (p=0,271)	4,33 ± 2,39 (p=0,062)
ПНЗ	11,88 ± 2,38 (p=0,12)	<i>1,65 ± 0,48 (p=0,038)*</i>	5,95 ± 2,37 (p=0,459)
Норма	15,42 ± 3,55	2,7 ± 0,79	7,01 ± 1,37

Примечание: Достоверные отличия указаны **полужирным курсивом** – **P<0,05**

* - $p<0,05$ - достоверное отличие от группы Норма

Концентрации изокилот, а также валериановой и капроновой кислоты представлены в таблице 75

Таблица 75 - Концентрации изокилот, валериановой и капроновой кислоты в содержимом кишечника мышей у разных экспериментальных групп

Группы	Концентрации ЛЖК, ммоль/г				
	изомасляной	изо валериановой	изо капроновой	валериановой	капроновой
АМЦ	<i>0,16 ± 0,05 (p<0,05)*</i>	<i>0,15 ± 0,06 (p=0,015)*</i>	<i>0,13 ± 0,04 (p=0,008)*</i>	<i>0,02 ± 0,01 (p=0,007)*</i>	<i>0,01 ± 0 (p=0,027)*</i>
КЛТ	<i>0,1 ± 0,05 (p<0,05)*</i>	<i>0,13 ± 0,09 (p=0,016)*</i>	0,05 ± 0,01 (p=0,138)	0,09 ± 0,08 (p=0,116)	<i>0,01 ± 0 (p=0,001)*</i>
АЗТ	0,48 ± 0,14 (p=0,496)	0,51 ± 0,21 (p=0,135)	0,11 ± 0,06 (p=0,16)	0,09 ± 0,04 (p=0,084)	0,01 ± 0 (p=0,233)
ЛВФ	<i>0,13 ± 0,1 (p<0,05)*</i>	0,14 ± 0,13 (p=0,053)	0,06 ± 0,01 (p=0,439)	<i>0,01 ± 0 (p=0,006)*</i>	<i>0,01 ± 0 (p<0,05)*</i>
ЦФК	<i>0,06 ± 0,02 (p<0,05)*</i>	<i>0,08 ± 0,04 (p=0,001)*</i>	0,05 ± 0,01 (p=0,302)	<i>0,02 ± 0,01 (p=0,009)*</i>	<i>0,01 ± 0 (p<0,05)*</i>
ФСМ	0,33 ± 0,2 (p=0,102)	0,26 ± 0,09 (p=0,423)	0,08 ± 0,02 (p=0,152)	<i>0,01 ± 0 (p=0,006)*</i>	<i>0,01 ± 0 (p=0,013)*</i>
МТР	<i>0,3 ± 0,11 (p=0,032)*</i>	0,22 ± 0,06 (p=0,156)	<i>0,01 ± 0 (p<0,05)*</i>	0,23 ± 0,17 (p=0,914)	<i>0,01 ± 0 (p=0,027)*</i>
ПНЗ	0,46 ± 0,31 (p=0,617)	0,19 ± 0,13 (p=0,148)	0,06 ± 0,03 (p=0,666)	0,19 ± 0,17 (p=0,86)	0,02 ± 0,01 (p=0,775)
Норма	0,56 ± 0,17	0,32 ± 0,11	0,07 ± 0,02	0,21 ± 0,13	0,02 ± 0

Примечание: Достоверные отличия указаны **полужирным курсивом** - $p<0,05$

* - достоверное отличие от группы Норма

В таблице 75 показано, что влияние препаратов на концентрации изокилот, валериановую и капроновую кислот менее выражено, чем на концентрацию уксусной, пропионовой и масляной. Отмечается тенденция к снижению их концентрации, при приеме каждого антимикробного химиопрепарата, кроме фосфомицина на концентрацию изокапроновой кислоты. В группе АМЦ достоверно увеличивается концентрация изокапроновой кислоты в содержимом кишечника мышей.

В таблице 76 представлены расчетные показатели метаболической активности микрофлоры кишечника лабораторных мышей, исследуемых групп.

Таблица 76 - Расчетные величины и индексы ЛЖК микрофлоры содержимого кишечника мышей различных экспериментальных групп

Группы	Расчетные величины и индексы ЛЖК		
	Суммарная концентрация, ммоль/г	Структурный индекс	Индекс изокислот
АМЦ	$14,89 \pm 3,06$ ($p=0,001$)*	$0,1 \pm 0,03$ ($p<0,05$)*	$3,22 \pm 1,44$ ($p<0,05$)*
КЛТ	$12,29 \pm 5,5$ ($p=0,001$)*	$0,25 \pm 0,11$ ($p<0,05$)*	$0,87 \pm 0,52$ ($p=0,013$)*
АЗТ	$28,59 \pm 8,9$ ($p=0,664$)	$0,61 \pm 0,25$ ($p=0,355$)	$0,18 \pm 0,08$ ($p=0,337$)
ЛВФ	$7,7 \pm 3,27$ ($p<0,05$)*	$0,17 \pm 0,11$ ($p<0,05$)*	$2,96 \pm 1,1$ ($p<0,05$)*
ЦФК	$6,28 \pm 1,58$ ($p<0,05$)*	$0,11 \pm 0,02$ ($p<0,05$)*	$2,49 \pm 1,1$ ($p<0,05$)*
ФСМ	$22,43 \pm 3,73$ ($p=0,24$)	$0,35 \pm 0,1$ ($p<0,05$)*	$3,05 \pm 1,46$ ($p=0,001$)*
МТР	$18,21 \pm 5,14$ ($p=0,042$)*	$0,64 \pm 0,2$ ($p=0,369$)	$0,18 \pm 0,08$ ($p=0,368$)
ПНЗ	$20,41 \pm 4,82$ ($p=0,113$)	$0,7 \pm 0,14$ ($p=0,602$)	$0,12 \pm 0,04$ ($p=0,471$)
Норма	$26,3 \pm 5,02$	$0,75 \pm 0,14$	$0,14 \pm 0,04$

Примечание: Достоверные отличия указаны **полужирным курсивом** - $p<0,05$

* - достоверное отличие от группы Норма

В таблице 76 показано, что в определенных группах достоверно снижается суммарная концентрация ЛЖК. В группах АЗТ, ФСМ, ПНЗ, достоверного снижения расчетных величин не наблюдается.

Снижение структурного индекса указывает на снижение активности анаэробной микрофлоры во всех, исследуемых группах, кроме АЗТ, МТР, ПНЗ.

Увеличение индекса изокислот (индекс протеолитической активности) наблюдается во всех, исследуемых группах, кроме АЗТ, МТР, ПНЗ. Увеличение индекса изокислот соответствует увеличению протеолитической активности микрофлоры.

Соотношение уксусной, пропионовой и масляной кислот представлено в таблице 77.

В таблице 77 показано, что во всех, исследуемых группах, кроме ЦФК, и ФСМ имеется дисбаланс доли уксусной, пропионовой и масляной кислот.

Таким образом, определены антимикробные химиопрепараты, и соответствующих концентраций ЛЖК в содержимом кишечника, которые достоверно снижаются при применении этих химиопрепаратов на макроорганизм.

Таблица 77 - Соотношение уксусной, пропионовой и масляной кислот в содержимом кишечника мышей у разных экспериментальных групп.

Группы	Расчетные величины и индексы ЛЖК		
	Уксусная, %	Пропионовая, %	Масляная, %
АМЦ	94 ± 2 ($p<0,05$)*	5 ± 2 ($p=0,005$)	1 ± 0 ($p<0,05$)*
КЛТ	84 ± 7 ($p<0,05$)*	5 ± 2 ($p<0,05$)*	11 ± 7 ($p<0,05$)*

Таблица 77 - Соотношение уксусной, пропионовой и масляной кислот в содержимом кишечника мышей у разных экспериментальных групп. (Продолжение)

Группы	Расчетные величины и индексы ЛЖК		
	Уксусная, %	Пропионовая, %	Масляная, %
АЗТ	68 ± 7 (p=0,132)	5 ± 1 (p=0,001)*	27 ± 7 (p=0,759)
ЛВФ	91 ± 5 (p<0,05)*	8 ± 5 (p=0,293)	1 ± 1 (p<0,05)*
ЦФК	94 ± 1 (p<0,05)*	4 ± 1 (p<0,05)*	2 ± 1 (p<0,05)*
ФСМ	77 ± 5 (p<0,05)*	21 ± 5 (p=0,001)*	2 ± 1 (p<0,05)*
МТР	65 ± 6 (p=0,255)	13 ± 3 (p=0,243)	22 ± 8 (p=0,129)
ПНЗ	62 ± 4 (p=0,637)	9 ± 3 (p=0,528)	28 ± 7 (p=0,929)
Норма	61 ± 5	10 ± 2	29 ± 4

Достоверные отличия указаны **полужирным курсивом** - p<0,05

* - достоверное отличие от группы Норма

5.3. Подбор оптимального соотношения штаммов консорциума лактобацилл в пробиотическом препарате для различных антибиотиков в модели антибиотико-ассоциированного дисбиоза у мышей

С целью персонализации лечения и индивидуального подбора препаратов и схем для лечения разработан и опробирован метод «Оптимизации состава пробиотических препаратов по его метаболическому профилю» в зависимости от применяемого антимикробного препарата.

Соотношения лактобацилл для которых концентрации отдельных ЛЖК достоверно повышены по сравнению со своими компонентами были определены в главе 6.1. В таблице 78 представлены консорциумы и летучие жирные кислоты концентрации которых достоверно повышены.

Таблица 78 - Сводная таблица консорциумов штаммов лактобацилл и отдельных ЛЖК, концентрация которых достоверно повышена по сравнению со своими компонентами.

№ п/п	Состав консорциума	Всего ЛЖК	C2	C3	iC4	C4	iC5	C5	iC6
1	<i>L. acidophilus</i> NK-1 <i>L. plantarum</i> 1:3	5	+			+	+	+	+
2	<i>L. acidophilus</i> K3III24 <i>L. casei</i> 2:1	4				+	+	+	+
3	<i>L. acidophilus</i> NK-1 <i>L. plantarum</i> 1:2	4	+	+		+			+
4	<i>L. acidophilus</i> 100au <i>L. plantarum</i> 1:2	3	+	+		+			
5	<i>L. acidophilus</i> 100au <i>L. plantarum</i> 3:1	3	+	+		+			
6	<i>L. casei</i> <i>L. plantarum</i> 1:2	3	+	+		+			
7	<i>L. acidophilus</i> K3III24 <i>L. casei</i> 1:1	3					+	+	+
8	<i>L. acidophilus</i> K3III25 <i>L. plantarum</i> 3:1	3	+	+		+			
9	<i>L. acidophilus</i> K3III26 <i>L. plantarum</i> 1:1	2				+	+		
10	<i>L. acidophilus</i> K3III27 <i>L. plantarum</i> 1:2	2	+			+			
11	<i>L. acidophilus</i> K3III28 <i>L. plantarum</i> 2:1	2				+	+		
12	<i>L. acidophilus</i> NK-1 <i>L. plantarum</i> 1:1	2						+	+

Таблица 78 - Сводная таблица консорциумов штаммов лактобацилл и отдельных ЛЖК, концентрация которых достоверно повышена по сравнению со своими компонентами. (продолжение)

№ п/п	Состав консорциума	Всего ЛЖК	C2	C3	iC4	C4	iC5	C5	iC6
13	<i>L. acidophilus</i> NK-2 <i>L. plantarum</i> 2:1	2						+	+
14	<i>L. casei</i> <i>L. plantarum</i> 3:1	1		+					
	Всего		7	6	0	10	5	5	6

В таблице 78 показано, что для 14 композиций характерно повышение концентрации ЛЖК. Отмечается, что эффект синергетического увеличения концентрации изомасляной кислоты не обнаружен ни в одной композиции. Синергетический эффект увеличения концентрации масляной кислоты отмечается у 10 композиций из 14.

Данные о действии антимикробных химиопрепаратов на метаболическую активность микрофлоры в модели антибиотико-ассоциированного дисбиоза мышей представлены в главе 3.2. В таблице 79 представлены антимикробные химиопрепараты, для которых снижены, концентрации ЛЖК в содержимом кишечника в модели антибиотико-ассоциированного дисбиоза мышей.

Таблица 79 - Сводная таблица действия антибиотиков на отдельные ЛЖК в антибиотико-ассоциированной модели у мышей.

	Антимикробный препарат	сумма	C2	C3	iC4	C4	iC5	C5	iC6
1	амоксациллин	6		-	-	-	-	-	-
2	цеффиксим	6	-	-	-	-	-	-	
3	левофлоксацин	5	-	-	-	-		-	
4	кларитромицин	5	-	-	-	-	-		
5	фосфомицин	3		-		-		-	
6	азитромицин	2		-		-			
7	метотрексат	2			-				-
8	преднизолон	1		-					
	Всего		3	7	5	6	3	4	2

В таблице 79 показано, что концентрация пропионовой кислоты снижается 7-ю антимикробными химиопрепаратами из 8-ми. Максимальное количество ЛЖК снижается в группах амоксициллин и цефалексим. Минимальное количество ЛЖК снижается в группе преднизолон, который является синтетическим глюкокортикостероидом. В группе метотрексат, снижается концентрация изомасляной и изокапроновой кислот. Метотрексат это противоопухолевое средство из группы антиметаболитов-антагонистов фолиевой кислоты.

С целью персонализации микроэкологической коррекции сопоставим наборы летучих жирных кислот, концентрации которых увеличиваются в двухвидовых композициях и снижаются в кишечнике после применения антимикробных, противоопухолевых и гормональных препаратов.

Оптимальный консорциум подбирали при наибольшем числе совпадений дефицитных концентраций ЛЖК в модели антибиотико-ассоциированного дисбиоза и профицитных ЛЖК в двухвидовых консорциумах штаммов лактобацилл. Число совпадающих ЛЖК для двухвидовых консорциумов в зависимости от применяемого антимикробного средства представлены в таблице 80.

Таблица 80 - Эффективность применения консорциумов штаммов лактобацилл при применении антибиотиков по соответствию концентраций ЛЖК

№ п/п	Состав консорциума	амоксциллин	цефик-сим	левофлоксацин	кларитромицин	фосфомидин	азитромицин	метотрексат	преднизолон
1	<i>L. acidophilus</i> NK-1 <i>L. plantarum</i> 1:3	4	4	3	3	2	1	1	0
2	<i>L. acidophilus</i> K3III24 <i>L. casei</i> 2:1	4	3	2	2	2	1	1	0
3	<i>L. acidophilus</i> NK-1 <i>L. plantarum</i> 1:2	3	3	3	3	2	2	1	1
4	<i>L. acidophilus</i> 100aui <i>L. plantarum</i> 1:2	2	3	3	3	2	2	0	1
5	<i>L. acidophilus</i> 100aui <i>L. plantarum</i> 3:1	2	3	3	3	2	2	0	1
6	<i>L. casei</i> <i>L. plantarum</i> 1:2	2	3	3	3	2	2	0	1
7	<i>L. acidophilus</i> K3III24 <i>L. casei</i> 1:1	3	2	1	1	1	0	1	0
8	<i>L. acidophilus</i> K3III25 <i>L. plantarum</i> 3:1	2	3	3	3	2	2	0	1
9	<i>L. acidophilus</i> K3III26 <i>L. plantarum</i> 1:1	2	2	1	2	1	1	0	0
10	<i>L. acidophilus</i> K3III27 <i>L. plantarum</i> 1:2	1	2	2	2	1	1	0	0
11	<i>L. acidophilus</i> K3III28 <i>L. plantarum</i> 2:1	2	2	1	2	1	1	0	0
12	<i>L. acidophilus</i> NK-1 <i>L. plantarum</i> 1:1	2	1	1	0	1	0	1	0
13	<i>L. acidophilus</i> NK-2 <i>L. plantarum</i> 2:1	2	1	1	0	1	0	1	0
14	<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

Максимальные значения выделены **полужирным курсивом**

В таблице 80 показано, 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 цефексима и амоксициллина возможна только на 67%.

Увеличение количества компонентов консорциума и применение данной методики позволит в дальнейшем составлять необходимые композиции для комплексной антибиотикотерапии..

Заключение

Диагностические и прогностические критерии состояния микробиоценозов различных биотопов ЖКТ и их референсных значений.

Исследование микробиоценозов двух биотопов ЖКТ – ротоглотки и кишечника показало существенные различия в подходах к оценке их состояния, диагностических возможностей, и приемлимого набора средств биоинформатики. Эти различия обусловлены различной доступностью микроорганизмов их метаболитов и задачами, которые эволюционно сложились для каждого из исследуемых биотопов.

Микробиоценоз ротоглотки находится в первом звене пищеварительного процесса и поэтому сталкивается с большим количеством чужеродных микроорганизмов и вирусов поступающих с пищей, что требует от него высокой степени устойчивости к агрессивной вирулентной микрофлоре. Поступающая пища не задерживается в ротовой полости, поэтому количество субстрата так же существенно меньше, чем у микрофлоры кишечника, а состав субстрата более разнообразный, менее деструктурирован и имеет широкий разброс по температурному режиму и консистенции. Эти факторы формируют высокоизменчивое микробное сообщество с более агрессивными видами микроорганизмов, обладающие активным метаболизмом как летучих жирных кислот, так и других химически активных групп, например, бактериоцинов. Микрофлора ротоглотки может быть более полно характеризована микробиологическими методами, так как условия культивирования и ее естественной среды обитания близки по температурному и газовому составу, а так же в связи с устойчивостью к агрессивной внешней среде. Таким образом, с позиции биоинформативной пригодности микрофлора ротоглотки и ее метаболиты (ЛЖК) являются более доступными для распознавания инфекционных процессов и степени микробиологических нарушений. Низкие корреляционные связи концентраций ЛЖК в слюне, делают возможным широкое применение регрессионных методов, что имеет преимущество перед качественными системами распознавания образов, так как дает возможность не только классификации, но и количественной оценки глубины изменений и расчета эффективности лечения и протекционной активности биопрепаратов.

Микробиоценоз кишечника неоднороден и находится на многих звеньях пищеварительной цепочки, причем как в горизонтальной, так и в вертикальной плоскости. Микробиоценоз кишечника сильно зависит от поступающего субстрата, что делает его исследование вне зависимости от копрологии малоинформативным. Большое влияние на исходные данные биоинформационного анализа — вид микроорганизма, его концентрации и концентрации летучих жирных кислот оказывает наложение большого количества процессов, в которые вовлечены микроорганизмы, разветвленная стадийность этих процессов и отсутствие

определенности в степени их завершения. Частично эту проблему решает сепарация по копрологическим признакам, особенно по скорости транзита кала, но тем не менее информативность данных микробиологического и биохимического анализа кала существенно ниже, чем у микробиоценоза ротоглотки. Существенным препятствием служит так же низкий процент определяемых видов микроорганизмов из 3500 видов определяется 5-10, что составляет менее 1%, причем за счет различия в условиях обитания микроорганизма и условиях его культивирования выборка культивированных микроорганизмов может интерпритировать состояние микробиоценоза очень условно и не пропорционально. Концентрации ЛЖК определяемые в кале имеют существенный разброс по корреляционным показателям, что сильно ограничивает возможность их применения в регрессионных методах многомерной статистики. Значения концентраций ЛЖК имеют большой разброс и не имеют нормального распределения, так как зависят от скорости транзита кала, индивидуальных особенностей человека, а так же количества и типа переваренного субстрата. Некоторые ЛЖК имеют равновесные концентрации так как всасываются в кишечнике, а другие ЛЖК не всасываются, но продолжают изменять концентрации и пропорции друг относительно друга в кале до момента начала анализа. Из вышеописанного можно сделать вывод о невысокой эффективности применения традиционных средств биоинформационного анализа имеющихся данных. Исследователю необходим более детальный подход при изучении микробиоценоза кишечника по микробиологическому составу и ЛЖК в кале, что становится возможным при комплексном подходе.

Исследование ферментативного пищеварения копрологическим методом разделяет нарушения пищеварения по скомпроментированности желудочного переваривания, панкреатического переваривания, нарушения всасывания, ускоренного и замедленного транзита кала, воспалительных реакций кишечника. Более глубинные нарушения – копрологические синдромы, менее глубинные нарушения могут носить временный, случайный характер, а могут быть сигналом для развивающегося заболевания. Кроме указания локализации нарушения ферментативного пищеварения по копрологическому синдрому можно определить тип субстрат, который в избытке поступает в толстый кишечник: жиры — стеарея; белки — креаторея; углеводы — амилорея. Благодаря формализации исходных данных по макроскопии, микроскопии кала и основных химических реакций (таблица 4) удалось построить алгоритмы определения копрологических синдромов (рисунки 1-6) автоматизировать в программу определение нарушений ферментативного пищеварения, копрологических синдромов и тип избыточного субстрата, поступающего в толстый кишечник.

Известно, что микроорганизмы чувствительны к субстрату, на котором они растут, поэтому проведено исследование встречаемости микроорганизмов, встречаемости их

ассоциатов в зависимости от копрологических синдромов и нарушений, а так же от типа избыточного субстрата на большой (3175 чел.) выборке пациентов КДЦ им. Г.Н. Габричевского. Рейтинг встречаемости микроорганизмов для различных групп по копрологическим нарушениям практически не менялся *Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.* и *Escherichia coli* встречаются постоянно, поэтому обратим внимание на микрофлору, которая встречается у менее 90% пациентов: *Enterococcus spp.*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Escherichia coli hem+*, *Escherichia coli lac-*, *Proteus spp.*, *Citrobacter spp.*, *Pseudomonas spp.* (таблица 9). Исследование встречаемости ассоциаций микроорганизмов проводилось без учета *Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.* и *Escherichia coli*, так как они участвуют практически во всех ассоциациях. Более 50% ассоциаций во всех группах представлены сочетанием *Enterococcus spp.*- *Klebsiella spp.* и *Enterococcus spp.*- *Enterobacter spp.*, а так же отдельно *Enterococcus spp.*, *Klebsiella spp.* и *Enterobacter spp.*. Остальные ассоциации микроорганизмов не превышают 5% встречаемости за исключением *Proteus spp.* в группе воспалительные реакции, *Enterococcus spp.* – *Escherichia coli lac-* для амилореи - гипоцидного состояния и стеареи, панкреатической недостаточности пищеварения. Так же 5% порог встречаемости превысили ассоциации *Enterococcus spp.* – *Escherichia coli hem+*, *Escherichia coli lac-* для колита (таблица 12).

Разделение пациентов по избытку жиров, белков и углеводов в кале дало следующие результаты рейтинга встречаемости микроорганизмов и их ассоциатов: *Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.* и *Escherichia coli* более 90% во всех группах, 60% - 75% *Enterococcus spp.*, далее 35 – 40% *Klebsiella spp.*, 20 – 30% *Enterobacter spp.*, 10-20% *Escherichia coli hem+*, остальные микроорганизмы встречаются не более чем у 10% пациентов, причем различия между группами по встречаемости микроорганизмов не достоверны. Встречаемость ассоциаций без учета *Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.* и *Escherichia coli* палочки распределились следующим образом: в более 40% для всех исследуемых групп, включая норму определялись ассоциации *Enterococcus spp.*- *Klebsiella spp.* и *Enterococcus spp.*- *Enterobacter spp.*. В остальные 75% попадают *Enterococcus spp.* и ассоциации *Enterococcus spp.* с *Escherichia coli lac-*, *Escherichia coli hem+*, *Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.*, и *Escherichia coli hem+*. Среди редко встречающихся ассоциаций есть ассоциации которые не встречаются в других исследуемых группах. Для нормы следующие сочетания: *Escherichia coli lac-* с *Enterobacter spp.* и *Staphylococcus spp.*, *Enterobacter spp.* и *Staphylococcus spp.*, *Klebsiella spp.* и *Enterobacter spp.*, *Proteus spp.* и *Staphylococcus spp.*, *Escherichia coli lac-* и *Staphylococcus spp.*, *Escherichia coli hem+* и *Enterobacter spp.*, *Escherichia coli hem+* и *Klebsiella spp.*. Для амилореи выделены сочетания 3-4 микроорганизмов: *Klebsiella spp.* - *Enterobacter spp.*, - *Enterococcus spp.* - *Staphylococcus spp.*, *Klebsiella spp.* - *Citrobacter spp.* - *Enterococcus spp.* - *Staphylococcus spp.*,

Enterobacter spp., - *Pseudomonas spp.* - *Enterococcus spp.*, *Klebsiella spp.* - *Enterobacter spp.* - *Staphylococcus spp.* Для стеареи определены сочетания: *Proteus spp.* - *Enterococcus spp.* - *Staphylococcus spp.*, *Escherichia coli lac-* - *Pseudomonas spp.* - *Enterococcus spp.*, *Escherichia coli hem+* - *Enterococcus spp.* - *Staphylococcus spp.*, *Escherichia coli hem+* - *Enterobacter spp.* - *Staphylococcus spp.*, *Escherichia coli hem+* - *Citrobacter spp.* - *Enterococcus spp.*, *Enterobacter spp.* - *Pseudomonas spp.*, *Escherichia coli hem+* - *Pseudomonas spp.* (таблица 12).

Из полученных данных не удастся выделить типичных ассоциаций для различных типов нарушений ферментативного пищеварения в статистически значимых количествах, что объясняется неадекватностью реального состояния микробиоценоза и выделяемой микробиологическим посевом микрофлоры, изменчивость которой, не отражается в том наборе микроорганизмов, который представляется в ответе. Так же, причиной может быть устойчивость состава микробиоценоза кишечника к изменениям типа предлагаемого микрофлоре субстрата, в связи с более влиятельными факторами, связанными с местом обитания – микробно-тканевым комплексом кишечника хозяина. Таким образом, отсутствие связи между копрологическим синдромом и составом микробиоценоза кишечника дает нам возможность применять эти параметры как независимые друг от друга.

Известные методы оценки микробного сообщества по микробиологическому посеву копрофильтратов сходятся к определению степени микробиологических нарушений по степени дефицита *Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.* с появлением ассоциаций условно-патогенных микроорганизмов без однозначного указания на состав ассоциаций микроорганизмов, отличающих одну степень микробиологических нарушений от другой. Определение степени микробиологических нарушений происходит исходя из опыта эксперта. Для того, чтобы учесть все явные и скрытые зависимости соотношений микроорганизмов применяются нейросетевые программы.

На имеющемся объеме данных модулем автоматического подбора искусственных нейронных сетей реализованном в пакете программ Statistica были проведены подбор программ с целью разделения групп по степени дисбиоза, с обучающей выборкой классифицирующей микробиоценозы пациентов по степени микробиологических нарушений. Искусственная нейронная сеть была обучена и показала эффективность 99,9% (рисунок 7).

Исследована так же фагорезистентность микрофлоры в норме при амилорее, стеарее и креаторее. Показано, что фагорезистентность по всем исследуемым фагам в группе нормальной копрологии выше, чем в группах амилорея, стеарея и креаторея. Таким образом, резистентность к бактериофагам может быть маркером нормальной микрофлоры, не испытывающей «субстратных перегрузок» (таблица 14).

Исследования зависимости количества микрофлоры чувствительной к бактериофагам и

соотношений летучих жирных кислот микробиоценоза показывает информативность критерия избытка фагочувствительной микрофлоры микробиоценозов. Исследование зависимости встречаемости микробиоценозов с чувствительными к бактериофагам микроорганизмами и концентрациями *Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.*, а так же концентрации масляной кислоты и общего уровня ЛЖК показало наличие минимального экстремума на отметке 10% фагочувствительной микрофлоры от всей выделенной просветной микрофлоры (рисунок 12). Таким образом, критерий избытка фагочувствительной микрофлоры ЖКТ человека установлен на отметке более 10% от всей выделенной просветной микрофлоры кишечника.

Так как встречаемость просветной микрофлоры кала чувствительной к бактериофагам является вероятностной величиной, по отношению к встречаемости чувствительной к бактериофагам микрофлоры в содержимом кишечника наличие данного критерия оценивает нейросеть MLP 63-15-4, обученная на 3175 пациентах КДЦ при МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского выполнявших комплексный анализ микрофлоры кишечника (рисунок 17а) .

Исследование концентраций ЛЖК в зависимости от копрологических синдромов показало достоверное снижение концентрации масляной кислоты в норме относительно групп амилорея, стеарея и креаторея. Достоверно снижен общий уровень, доля масляной и пропионовой кислоты, структурный индекс (рисунок 19 - 22). Подобная разнонаправленность копрологических показателей и концентраций ЛЖК может свидетельствовать о наложении нескольких процессов, дающих по совокупности подобный результат. Увеличение метаболической активности микробиоценоза при избытке субстратов может быть связано, как с ускорением транзита, снижением всасываемости ЛЖК, так и с более активной переработкой более насыщенного содержимого кишечника. В любом случае все показатели находятся в рамках референсных значений, разработанных для концентраций ЛЖК (таблица 26).

Исследование зависимости концентрации масляной кислоты в норме, при амилореи и стеареи от концентрации *Escherichia coli* - *Enterococcus spp.* и *Escherichia coli* - *Klebsiella spp.* показало различное поведение функций. При нормальной копрологии снижение масляной кислоты наблюдается или при дефиците кишечной палочки и высоких концентрациях энтерококка или при дефиците *Enterococcus spp.* и высоких концентрациях кишечной палочки. При амилореи снижение концентрации масляной кислоты наблюдается при одновременном снижении *Enterococcus spp.* и *Escherichia coli*, а при стеареи при низких концентрациях *Escherichia coli* и любых концентрациях *Enterococcus spp.* (рисунок 23).

Исследование концентрации масляной кислоты в зависимости от концентраций *Escherichia coli* и *Klebsiella spp.* при нормальной копрологии показало снижение масляной кислоты при увеличении концентрации *Klebsiella spp.* и дефиците *Escherichia coli*. При амилореи снижение масляной кислоты происходит при дефиците и *Klebsiella spp.* и *Escherichia*

coli, а так же при увеличении титра *Escherichia coli* и дефиците *Klebsiella spp.*.

Исследование общего уровня ЛЖК в зависимости от концентрации *Escherichia coli*, *Enterococcus spp.* и *Klebsiella spp.* практически повторило тенденции указанные для масляной кислоты (рисунок 24).

Полученные трехмерные функции имеют несколько экстремумов и могут быть описаны сложными уравнениями, что подтверждает многофакторность процессов и отсутствие корреляционных связей между ЛЖК и концентрациями микроорганизмов высеваемых из кала.

Исходя из позиций многостадийности процессов образования и утилизации ЛЖК в кишечнике и невозможности подбора адекватной математической модели, описывающей процессы пищеварения, свойств микробного сообщества по концентрациям ЛЖК в кале, примем референсные значения для следующих показателей исходя из сравнения микробиоценоза активного пищеварения (МАП) и пациентов, находящегося на параэнтеральном питании – микробиоценоз пассивного пищеварения (МПП). Для концентраций ЛЖК в кале были определены референсные значения некоторых показателей, значения которых достоверно изменяются при переходе микробиоценоза от состояния активного взаимодействия с субстратом к состоянию дефицита субстратного насыщения и невысокой метаболической активности, у пациентов находящихся на частичном параэнтеральном питании (таблица 26). По данным литературы концентрация масляной кислоты является критически важной для колонизационной резистентности нормальной микрофлоры кишечника. Однако, возможна ошибочная интерпретация снижения концентрации масляной кислоты связанной с непропорциональным соотношением концентрации масляной кислоты в содержимом кишечника и в кале, поэтому необходимыми являются данные по общему уровню ЛЖК и процентное соотношения ЛЖК всасываемых в кишечнике – уксусной, пропионовой и масляной. Изменения метаболического равновесия, связанного с изменением структуры микробного сообщества и его частичной деструкции, сопровождается снижением доли масляной и пропионовой кислот при увеличении доли уксусной. Аналогичным показателем характеризующим структурные изменения является структурный индекс, который учитывает не только соотношение метаболитов, всасывающихся в кишечнике, но и всех, определяемых газожидкостной хроматографией. Индекс изокилот характеризует протеолитическую активность микрофлоры, что косвенно указывает на проявление агрессивных видов микрофлоры, перерабатывающих белки. Для всех перечисленных показателей были определены референсные значения, по границе между интерквартильным размахом значений концентраций ЛЖК и их производных у пациентов на частичном параэнтеральном питании и здоровых людей.

Известна роль масляной кислоты в обеспечении колонизационной резистентности

нормальной микрофлоры кишечника, поэтому признаем концентрацию масляной кислоты ключевым параметром метаболической активности микробиоценоза кишечника. Интерквартильный размах микробиоценоза активного пищеварения не пересекаются со значениями микробиоценоза пассивного пищеварения, поэтому можно обозначить референсное значение концентрации масляной кислоты — 4,97 ммоль/г. Снижение концентрации масляной кислоты может происходить пропорционально с общим уровнем ЛЖК или за счет деструкции микробного сообщества с увеличением доли уксусной кислоты в ущерб масляной и пропионовой. Поэтому требуются так же референсные значения долей уксусной, пропионовой и масляной кислот, а так же общего уровня. Путём сравнения интерквартильных размахов МАП и МПП получаем референсные значения доли уксусной кислоты не более 74,78%, пропионовой кислоты не менее 16,49%, масляной кислоты не менее 9,96 %, общего уровня ЛЖК не менее 59,74 ммоль/г. Соотношение суммы ЛЖК всего гомологического ряда к концентрации уксусной кислоты называется структурным индексом, так как по сути является обратной концентрацией доли уксусной кислоты, но с учетом, не только всасываемых ЛЖК, а всего пула, определяемого методикой прямого ввода газожидкостной хроматографией. Референсное значение структурного индекса не менее 0,5 ед. Доказано, что продуцирование изокилот микрофлорой происходит путем гидролиза белков, а метаболитов линейной структуры переработкой полисахаров. Индекс изокилот – это отношение суммы изокилот к их линейным формам. Референсное значение индекса изокилот не более 0,66.

Использование референсных значений позволит избежать неопределенности средних значений при сравнении групп в исследованиях эффективности лечения и применения пробиотиков и других активных препаратов. Сравнение встречаемости значений в норме и ниже нормы переводит сравнение в критерии качественных показателей, а не количественных, что позволяет определить достоверность различий между исследуемыми группами.

Данные референсные значения позволяют разделить пациентов в группе на норму и нарушения метаболической активности. Использование встречаемости отличных от нормы пациентов в расчетах позволяет получать достоверные различия показателей, в то время как сравнение средних (медианных) значений и интерквартильных размахов не могут разделить группы.

Оценка микробиоценозов ротоглотки и кишечника, традиционно сводилась к поиску возможного агента инфекции, а в его отсутствие к потенциально возможному инфекционному агенту. При отсутствии инфекции определяли соотношение микрофлоры, которая типична для данного биотопа и нетипичной микрофлоры. Исходя из этой логики были определены степени микробиологических нарушений, которые присваивались микробиоценозам методом экспертной оценки, путем интерпритации методических рекомендаций и ОСТА. Метод

экспертной оценки интерпритации нормативов на практике оказывается непростой задачей. Встречаются результаты, по которым нельзя однозначно определить степень микробиологических нарушений из-за частичного сходства либо с одной либо с другой степенью. Подобные экспертные задачи решаются системами распознавания образов на основе нейросетей, что позволяет убрать погрешность связанную с субъективностью. Таким образом, на основании 3175 экспертных заключений по оценке микробиоценоза кишечника была создана программа определения степени микробиологических нарушений кишечника на основе нейросети в программе Statistica 8. Аналогично на основании 144 экспертных заключений по оценке микробиоценоза ротоглотки была создана нейросетевая программа определяющая степень микробиологических нарушений микробиоценоза ротоглотки (рисунок 34).

Исследование концентраций ЛЖК в слюне показало пригодность этих данных для реализации регрессионных методов многомерной статистики, поэтому было решено применить дискриминантный анализ для определения степени метаболических нарушений микробиоценоза ротоглотки. Получены классификационные уравнения, дискриминантные функции, координаты центроидов. Основанием для задания степеней метаболитных нарушений послужили степени микробиологических нарушений микробиоценоза ротоглотки, определенные при помощи нейросети (рисунок 35).

Изменения в микробиоценозе ротоглотки более изменчивы и зависят от инфекционного агента, который определяется экспресс методом по концентрациям ЛЖК в слюне и дискриминантным анализом определения вероятности нахождения инфекционного агента, а так же микробиологическим посевом мазка ЗСГ с дальнейшей обработкой полученных данных искусственной нейронной сетью. Определение степени дисбиоза может так же проводится по концентрациям ЛЖК с последующей обработкой дискриминантным анализом, а так же микробиологическим посевом мазка с дальнейшей обработкой данных нейросетью. Использование системы интегральной оценки микробиоценозов для исследования микрофлоры ротоглотки и ее метаболизма имело ряд предпосылок. Прежде всего доступность микроорганизмов и метаболитов, лучшая культивируемость и отсутствие корреляционных связей препятствующих применению регрессионных методов расчета. Поэтому в первую очередь была решена задача замены экспертной оценки степени дисбиоза микрофлоры ротоглотки нейросетью MLP 58-30-4. В результате сравнения функций разделения групп был поставлен под сомнение порядок степеней дисбиоза и глубины реальных изменений микробного сообщества. Группировка полученная нейросетью MLP 58-30-4 была использована для дискриминантного анализа который разделил ЛЖК дискриминантными функциями, на исследуемые группы. Удаление центроидов (средних величин) от центроида норма подтвердило несоответствие степени дисбиоза и реальных микробиологических и

метаболических нарушений. 3-я степень дисбиоза ближе к норме чем 1-я и 2-я. Применимость регрессионных методов дает возможность количественной оценки изменений микробиоценоза ротоглотки (рисунок 34).

Полученные в результате работы алгоритмы и их программные реализации способны качественно изменить диагностику дисбиотических состояний и связанных с ними состояний при лечении основного заболевания. Так называемая оцифровка анализа на дисбиоз позволяет решать более сложные задачи традиционными хорошо освоенными в лабораторной практике методами с применением компьютерной обработки данных.

Система интегральной оценки состояния микробиоценоза биотопов желудочно-кишечного тракта.

Изучение и оценка микробиоценозов организма, расширение возможностей диагностики и прогноза заболеваний требует новых подходов и критериев оценки и их систематизации. Комплексный подход к оценке микробиоценозов, предложенный в исследовании, позволяет интерпретировать реакцию закрытых систем на воздействия различные внешних факторов. К таким факторам относятся инфекции, агрессивное воздействие окружающей среды, применение химиотерапии и химиопрепаратов, влияние про- и пребиотиков.

Для того чтобы оценить величину и вектор изменений системы необходима унификация параметров и их формализация.

Современные требования персонифицированной медицины основываются на интегральной оценке микробиоценозов организма и комплексного подхода к их изучению. В научной работе представлена система изучения микробиоценозов (на примере кишечника и ротоглотки) которая позволяет проводить интегральную оценку микробиоценозов биотопов с использованием биотехнологических методов исследования микрофлоры. Для реализации комплексного подхода к оценке микробиоценозов на основе разработанных критериев в настоящем исследовании предложена система интегральной оценки состояния микробиоценоза биотопов желудочно-кишечного тракта (рисунок 32).

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. В научной работе подтверждены выводы исследователей о том, что под влиянием эндогенных и экзогенных факторов наблюдаются нарушение ферментативного пищеварения и избыточный рост просветной микрофлоры (таблица 12). Кроме того показано, что выявленные нарушения ферментативного пищеварения приводят к увеличению в 2 раза встречаемости микроорганизмов чувствительных к бактериофагам (таблица 14). В связи с увеличением количества микроорганизмов просветной микрофлоры,

последняя получает субстратное преимущество перед индигенной, что приводит к подавлению ее роста. 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) (таблица 26). Известно, что 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 иммунокоррекции. Эти изменения способствуют снижению коллонизационной резистентности. Нормальная собственная микрофлора кишечника человека является важнейшим регулятором иммунологического процесса и индуцирует формирование иммунитета в целом всего организма.

Таким образом, система интегральной оценки микрофлоры кишечника это совокупность копрологического синдрома, степени микробиологических нарушений и изменение концентраций ЛЖК относительно референсных значений. В случае изменений в копрологии и компроментации одного или нескольких органов пищеварения, изменения микробиоценоза могут носить компенсаторный характер, а характеристики метаболической активности указывают на сколько деструктивно такое состояния сказывается на состоянии микробиоценоза по концентрации масляной кислоты и уровню коллонизационной резистентности, соотношению концентраций ЛЖК и структурному индексу, а так же уровню протеолитической активности. В случае нормального копрологического синдрома и иной причины изменения микробиоценоза важно воздействовать на увеличение продукции масляной кислоты, так как от этого зависит коллонизационная резистентность нормальной микрофлоры.

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

Исследование факторов влияния на дисбиотические процессы в кишечнике было решено провести на модели антибиотико-ассоциированного дисбиоза у мышей. В связи с тем, что концентрации ЛЖК в кале отличаются по количеству и соотношению от концентраций ЛЖК в содержимом кишечника, было решено исследовать ЛЖК содержимого кишечника. Содержимое кишечника получают при вскрытии, поэтому для модели были выбраны мыши. Выбранные препараты имели различные механизмы и степень влияния на микробиоценоз. Кроме антибиотиков бактерицидного и бактериостатического действия в опыт были включены противоопухолевое средство – метотрексат и синтетический глюкокортикоид – преднизолон. Значения сравнивали с группой мышей не принимавших антимикробные химиопрепараты. Действие антибактериальных средств приводило к достоверному снижению концентраций

отдельных ЛЖК. Все антибактериальные препараты снижали пропионовую и масляную кислоту и выборочно другие ЛЖК. Метотрексат снижал изомасляную и изокапроновую, а преднизолон только пропионовую кислоты (таблицы 43-46).

Для коррекции дисбиотических нарушений используются многие другие средства, среди которых важную роль отводят пребиотикам. Оценка эффективности защиты пребиотического препарата — лактулозы может быть проведена с помощью дискриминантного анализа. На первом этапе необходимо оценить степень изменений метаболизма микробного сообщества в зависимости от применяемого антимикробного средства. Корреляционные связи ЛЖК в содержимом кишечника и значение лямбды Уилкса, которая является отношением меры внутригрупповой изменчивости к мере общей изменчивости, дают возможность использования 4-х ЛЖК — пропионовой, валериановой, изокапроновой и капроновой кислот.

Исследуемые антимикробные препараты: антибиотики, противоопухолевое средство и глюкокортикостероид имеют разные механизмы действия и действуют на различные сегменты микробного сообщества. Таким образом, мы провоцируем нарушения пищеварения по различным, известным нам механизмам, с ожидаемым эффектом. Наиболее глубокие изменения микробиоценоза ожидаются у препаратов с бактерицидным действием: амоксициллин, левофлоксацин, цефиксим, фосфомицин; менее выраженное изменение у препаратов с бактериостатическим действием - кларитромицин, азитромицин; и наименее выраженное действие у препаратов, не оказывающих на микрофлору прямого действия: метотрексат и преднизолон.

Проведение дискриминантного анализа концентраций ЛЖК содержимого кишечника и анализ расстояния Махаланобиса показало увеличение отличий в метаболической активности для препаратов в ряду преднизолон → метотрексат → азитромицин → фосфомицин → кларитромицин → левофлоксацин → цефалексим → амоксициллин (таблица 41). Полученный ряд сходится с ожидаемым эффектом, что подтверждает обоснованность применения методики расчета и правильность подбора ЛЖК. Мы наблюдаем, что наибольшую степень влияния на метаболические процессы микрофлоры оказывает амоксициллин, а наименьшую - преднизолон, который не относится к классу антибиотиков. Минимально так же влияние метотрексата, который является противоопухолевым средством, и так же не относится к классу антибиотиков. Азитромицин, антибиотик бактериостатическим принципом действия оказывает значительное влияние на функциональную активность, но гораздо меньшую, чем антибиотики бактерицидного принципа действия.

Кроме оценки расстояний Махаланобиса важно оценить достоверность отличий групп (рисунок 39). Препараты метотрексат и преднизолон не имеют достоверных отличий, а действие преднизолона вообще достоверно не отличается от группы контроля. Так же сгруппированы

антибиотики бактерицидного принципа действия: клиндамицин; левофлоксацин и цефалексим. Более "мягкий" антибиотик фосфомицин не группируется с другими антибиотиками бактерицидного принципа действия. Однако в группах амоксициллин (бактерицидный принцип действия) и азитромицин (бактериостатический) не имеют достоверных отличий между собой, находятся на одной прямой относительно центроида норма. Группы с антибиотиками разного принципа действия группируются не зависимо от принципа действия, что дает возможность исследователям задействовать данную модель для раскрытия механизмов влияния антибиотиков на метаболизм микрофлоры.

Исследование протективного действия лактулозы проводили на модели антибиотикоассоциированного дисбиоза с амоксициллином – антибиотиком бактерицидного принципа действия, который показал наивысшую степень метаболических изменений микробного сообщества. Исследовали группы, которые получали 10 мг. ампицилина и различные дозы лактулозы: 0; 0,5 мг.; 5мг.; 20 мг. Эффективность влияния лактулозы на микробиоту мышей ослабленную действием амоксициллина исследовали дискриминантным анализом, который показал расстояния Махалобиса для нарастания концентрации лактулозы: 9,43, 8,93; 11,47; 8,02 (таблица 47). Уровень достоверности отличия групп $p < 0,05$. Значение расстояний Махалобиса для групп 0,5 мг и 20 мг. лактулозы ниже, чем расстояние группы 0 мг. Следовательно применение доз лактулозы 0,5 и 20 мг. эффективно, а 5 мг. неэффективно, так как значение расстояния для 5 мг. — 11,47 больше, чем 9,43 для группы 0 мг. Предложена формула рассчитывающая эффективность в процентах, которая нормирует расстояние в зависимости от исходной удаленности центроидов. Полученные процентные соотношения расстояний Махалобиса пригодны для сравнения эффективности разных концентраций лактулозы и служат исходными данными для принятия решений об оптимальной концентрации лактулозы с данным антибиотиком.

Исследование протективного действия лактулозы в зависимости от концентрации и длительности приема лактулозы проводили на модели антибиотикоассоциированного дисбиоза с азитромицином. Азитромицин отличается пролонгированным действием, так как всасывается в кишечнике, и выводится с желчью в кишечник, где опять всасывается. Благодаря этому циклу его концентрация сохраняется в кишечнике после его отмены. Исследовали группы, которые получали дневную дозу азитромицина 2 мг. с лактулозой 0 мг, 1,2 мг., 6 мг. с продолжительностью опыта 3 и 6 дней, а так же группы которые получали дневную дозу лактулозы 1,2 мг и 6 мг без азитромицина. Эффективность влияния лактулозы на микробиоту мышей ослабленную действием азитромицина исследовали дискриминантным анализом, который показал расстояния Махалобиса для нарастания концентрации лактулозы: 8,55, 9,46; 8,85; — через 3 дня и 5,02, 7,75, 7,28 — через 6 дней (рисунок 42). Расстояния Махалобиса

для групп без азитромицина соответственно распределились по нарастанию концентрации лактулозы: 1,66, 4,05 — через 3 дня и: 3,99, 2,18 — через 6 дней. Таким образом, центроиды групп с лактулозой без азитромицина находятся ближе, чем точки от центроидов азитромицина. Влияние азитромицина больше чем влияние лактулозы. При приеме азитромицина на 3 день приема препарата расстояние больше, чем на 6 день - через 3 дня после того как препарат перестали давать. Такие же тенденции наблюдаются для лактулозы в дозе 6 мг, а в дозе 1,2 мг на 6 день центроид смещается еще дальше от центроида нормы. Прием азитромицина с лактулозой не приводит к снижению расстояния Махалонобиса, что свидетельствует о более глубоком изменении функциональной активности микрофлоры кишечника по сравнению с приемом одного азитромицина. На 6 день, через 3 дня после прекращения приема и азитромицина и лактулозы центроиды групп в которых принимали азитромицин и лактулозу находятся дальше, по сравнению с одним азитромицином. Если допустить, что применение лактулозы положительно влияет на функциональную активность микробиоценоза, то можно учесть в расчетах влияние самой лактулозы на микробиоценоз и определить приведеную эффективность, перенеся точку опоры с центроида контроля на соответствующие центроиды лактулозы. Тогда эффективность лактулозы в дозе 1,2 мг на 3 и 6 день: 35,7% и 69,4%, а в дозе 6 мг. — 30,5%; 82,9%. Максимальный эффект достигается в дозе 6 мг, на 6-й день (таблица 52).

На данных примерах легко убедиться в доступности методов исследования микробиоценозов, через построение моделей на различных животных с большим спектром задач по раскрытию механизмов действия тех или иных воздействий и их сочетаний.

Оценка эффективности применения методов математического моделирования микробиоценоза ротоглотки и использования их для классификации биотопов респираторного тракта.

Микробиоценозы различных биотопов являются чувствительными сенсорами, реагирующими на все изменения обменных процессов, инфекционной инвазии и т.д. изменением состава микроорганизмов и метаболитов. Состояние микробиоценоза при остром бронхите и острой пневмонии имеет характерные соотношения в количествах микроорганизмов и концентраций метаболитов. Для оценки микробиоценозов применили математическое моделирование и оценили возможности корректной классификации состава микробиоценозов искусственной нейронной сетью, а метаболома — дискриминантным анализом концентраций ЛЖК в слюне. Для разработки программы распознавания инфекционного процесса необходимы обучающая выборка данных с известными диагнозами и тестирующая выборка. Для обработки были взяты группы пациентов с диагнозом острый бронхит, острая пневмония.

Округленные до целого логарифмы концентраций микроорганизмов ввели в программу и запустили обучение и подбор сетей. Полученная искусственная нейронная сеть MLP 37-16-2 показала возможность корректной классификации результатов бактериологического анализа микрофлоры ротоглотки 100% (таблица 64). Преимуществом нейросетевых программ является возможность обрабатывать качественные данные и использовать скрытые многосложные закономерности для успешного разделения групп. Тем не менее дискриминантный анализ имеет ряд преимуществ, так как позволяет количественно оценивать результат.

Для математической модели метаболома микробиоценоза ротоглотки дискриминантным анализом по концентрациям ЛЖК в слюне были взяты результаты анализов группы пациентов с диагнозом острый бронхит, острая пневмония. Концентрации летучих жирных кислот были проверены на отсутствие корреляционных связей и соответствие внутри групповой изменчивости к общей изменчивости переменных (лямбда Уилкса), в результате были отобраны 3 ЛЖК – уксусная, валериановая и изокапроновая кислоты. Составлены дискриминантные функции, классификационные уравнения и определены координаты центроидов. Среднее значение точности корректной классификации составила 95,45% (таблица 65).

Использование математического моделирования состояния микробиоценозов или их метаболомов существенно расширяет возможности экспресс-диагностики таких социально важных заболеваний как туберкулез, хламидиоз и прочих. Особенно актуально применение данного метода для скрининговых исследований в закрытых коллективах: детских садах, школах-интернатах, армейских коллективах, учреждениях ФСИН.

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

Задачи конструирования препаратов на основе пробиотиков и антибактериальных препаратов требуют аппарата математического моделирования для получения новых комбинаций. В главе 3 представлена модель комбинации антибиотика и пребиотика лактулоза, где с помощью дискриминантной функции показан нелинейный характер изменения эффективности воздействия на микрофлору кишечника и указаны пороговые дозы и соотношения исследуемых компонентов. Точность и простота использования моделей на основе дискриминантной функции позволяют расширить область исследуемых субстратов и перейти к исследованию новых комбинаций антибиотик – бактериофаг, пребиотик – бактериофаг, пребиотик – пробиотик и т.п. системы с участием компонентов с труднопрогнозируемым эффектом. Комбинирование нейросетевых, регрессионных и одномерных линейных методов статистики может оказаться эффективным инструментом моделирования новых препаратов.

Исследование групп пациентов: с ОРЗ во время лечения основного заболевания; пациентов с хроническими гастродуоденитами в период неполной клинической ремиссии; онкобольных детей на разных сроках после окончания болезни показало эффективность системы интегральной оценки микробиоценозов и влияния средств микроэкологической коррекции. Система интегральной оценки микробиоценозов включает определение копросиндрома, степени микробиологических и метаболических нарушений микробиоценоза кишечника и ротоглотки.

Антибиотикотерапия острого бронхита влияет на состав микрофлоры ротоглотки (рисунок 52а, 52в), а так же появление фагочувствительной микрофлоры в этом биотопе, что не отмечается при антибиотикотерапии пневмонии (рисунок 52а, 52в). В составе микробиоценоза кишечника не происходит изменений при антибиотикотерапии острого бронхита и пневмонии, кроме снижения фагочувствительной микрофлоры и снижении концентрации масляной кислоты в кале (рисунок 52г, 52д). Применение «Бифидум-Мульти» в схеме антибактериальной терапии снижает среднюю степень микробиологических нарушений ротоглотки по сравнению с антибиотикотерапией при бронхите (рисунок 52а), и снижает ее для микробиоценоза кишечника по сравнению с позицией до лечения и после антибиотикотерапии (рисунок 52б, 52д).

Влияние антибактериальной терапии и действия «Бифидум-Мульти» на эпизодически и частоболеющих детей показано на представленных графиках (рисунок 53). Влияние антибактериальной терапии на группу частоболеющие дети более выражено (рисунки 53а, 53б, 53д), чем на группу эпизодически болеющие дети (рисунки 53в, 53д). Включение в схему антибактериальной терапии «Бифидум-Мульти» снижает среднюю степень микробиологических нарушений микрофлоры ротоглотки и кишечника (рисунки 53а, 53б). Для группы частоболеющие дети «Бифидум-Мульти» оказывает положительный эффект (рисунки 53а, 53в, 53г, 53д)

Для пациентов, проходивших программу медицинской реабилитации гастродуоденитов отмечается достоверное снижение количества пациентов с нормальным копрологическим синдромом (рисунок 57а). Отмечается положительный эффект включения в схему медицинской реабилитации «Нормоспектрум», так как в группе «Нормоспектрум» достоверно снизилась средняя степень микробиологических нарушений микрофлоры кишечника (рисунок 57б), и не отмечается снижение встречаемости пациентов с нормальным копрологическим синдромом (рисунок 57а)

По результатам исследования микробиоценозов кишечника и ротоглотки после лечения гемобластозов и солидных опухолей (рисунок 61), можно наблюдать увеличение встречаемости пациентов с нормальным копросиндромом (рисунок 61а), с нормальными значениями

концентраций ЛЖК в слюне (рисунок 61а). Влияние включения «Бифидум Мульти» в схему профилактики обозначается, как снижение средней степени микробиологических нарушений микробиоценоза кишечника (рисунок 61б) и снижение встречаемости пациентов с концентрациями ЛЖК в кишечника в рамках референсных значений (рисунок 61г). Таким образом, обнаружено положительное действие синбиотика «Бифидум-Мульти» для микробиоценоза кишечника.

Из приведенных данных можно сделать вывод об эффективности синбиотика Бифидум-Мульти в профилактике последствий онкозаболеваний и лечении острой пневмонии. Синбиотик Нормоспектрум эффективен в профилактике гастроуденита в период неполной клинической ремиссии.

Разработка алгоритма индивидуального подбора состава консорциума штаммов лактобацилл для средств специальной микрoэкологической коррекции микробиоценоза кишечника.

Задача создания персонифицированного пробиотического препарата для определенного антимикробного химиопрепарата была выполнена путем подбора наиболее подходящих летучих жирных кислот, синергетически увеличивающих свою концентрацию в двухвидовых консорциумах штаммов лактобацилл, к тем летучим жирным кислотам, которые подавляются в кишечнике в результате приема определенного антимикробного химиопрепарата. Достигнута 100% эффективность для компенсации летучих жирных кислот сниженных в результате приема курса азитромицина следующими композициями *L. acidophilus* NK-1 *L. plantarum* 1:2, *L. acidophilus* 100aui *L. plantarum* 1:2, *L. acidophilus* 100aui *L. plantarum* 3:1, *L. casei* *L. plantarum* 1:2, *L. acidophilus* K3III25 *L. plantarum* 3:1. Так же 100% эффективность достигается для компенсации снижения летучих жирных кислот в результате приема курса преднизолона следующими композициями *L. acidophilus* NK-1 *L. plantarum* 1:2, *L. acidophilus* 100aui *L. plantarum* 1:2, *L. acidophilus* 100aui *L. plantarum* 3:1, *L. casei* *L. plantarum* 1:2, *L. acidophilus* K3III25 *L. plantarum* 3:1, *L. casei* *L. plantarum* 3:1. Для 100% компенсации концентраций ЛЖК, снижающихся в результате приема курса антибиотиков амоксициллин, цефиксим и фосфомицин, соответствующих консорциумов лактобацилл из всех возможных комбинаций подобрать не удалось. Имеющиеся композиции достигают эффективности 67% компенсации дефицитных ЛЖК в результате приема амоксициллина, цефиксима и фосфомицина, 60% для левофлоксацина и кларитромицина —, для метотрексата — 50%.

Разумеется данный биотехнологический подход не может учесть всех аспектов взаимоотношений микробиоценоза и пробиотика, но может быть рассмотрен как один из факторов метаболической совместимости для учета применения комплекса пробиотик — антимикробное средство.

Выводы

1. Впервые разработаны алгоритмы, позволяющие выявить ахолию, ахилию, гнилостную и бродильную диспепсию, энтеральный синдром, замедленный транзит, 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 микрoэкологической 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 частоболеющих (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 персонифицированную 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 (амоксциллин, 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 изокислот — 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 микроэко-логической коррекции, разработанными с учетом индивидуальных особенностей химиопрепарата.

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 «Гастродоудениты»

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, капроно-вой и изокислот к уксусной)

ФМЦ - группа мышей, на которой исследуют влияние фосфомицина

ЦФС - группа мышей, на которой исследуют влияние цеффиксима

ЧБД – часто болеющие дети

ЭБД – эпизодически болеющие дети

С2 — концентрация уксусной кислоты, ммоль/г

С3 — концентрация пропионовой кислоты, ммоль/г

іС4 — концентрация изомасляной кислоты, ммоль/г

С4 — концентрация масляной кислоты, ммоль/г

іС5 — концентрация изовалериановой кислоты, ммоль/г

С5 — концентрация валериановой кислоты, ммоль/г

іС6 — концентрация изокапроновой кислоты, ммоль/г

С6 — концентрация капроновой кислоты, ммоль/г

C2% - доля уксусной кислоты в сумме уксусной, пропионовой и масляной кислот, %

C2% - доля пропионовой кислоты в сумме уксусной, пропионовой и масляной кислот, %

C2% - 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%

Список использованной литературы

1. Агапова, О.В. Бактериальные IgA протеазы / О.В. Агапова, В.М. Бондаренко // Журнал микробиологии. - 1998. - № 2, - С.121 - 125
2. Айвазян, С. А. Прикладная статистика: Классификация и снижение размерности: Справочное издание / С.А. Айвазян, В.М. Бухштабер, И.С. Енюков, Л.Д. Мешалкин; под ред. С.А. Айвазяна. Москва: Финансы и статистика, 1989. - 607 с.
3. Алёшкин, В.А. Микробиоценозы и здоровье человека: монография / 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. Гречишникова, О.Г. Жиленкова, В.А. Метельская, Ю.В. Захарова, Т.Н. Гренкова, Э.А. Есаян, 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 общ. ред. В.А.Алёшкина, С.С.Афанасьева, А.В.Караулова. – Москва: Издательство «Династия», 2015. – 548 с.
4. Ардатская, М.Д. Исследование содержания и профиля низкомолекулярных метаболитов сахаролитической толстокишечной микрофлоры в норме и патологии: дис. канд. мед. наук: 14.00.05 / Ардатская Мария Дмитриевна. - М., 1996. - 146 с.
5. Ардатская, М.Д. Клинические аспекты изучения короткоцепочечных жирных кислот при патологии желудочно-кишечного тракта. / М.Д. Ардатская, Э.Э. Арутюнян, Н.И. Прихно, О.Н. Минушкин // Материалы 30-й Межрегиональной конференции "Современные аспекты патогенеза, перспективы диагностики и лечения в гастроэнтерологии". – Смоленск, 2002. - С. 154 - 162.
6. Бабин, В.Н. Биохимические и молекулярные аспекты симбиоза человека и его микрофлоры. / В.Н. Бабин, И.В. Домарадский, А.В. Дубинин, О.А. Кондракова // Российский химический журнал (Журнал Российского химического общества им. Д. И. Менделеева). - 1994. - Т. 38(6). - С. 66 - 78.
7. Баскин, И. И. Многослойные персептроны в исследовании зависимостей «структура-свойство» для органических соединений / И.И. Баскин, В.А. Палюлин, Н.С. Зефилов // Российский химический журнал (Журнал Российского химического общества им. Д. И. Менделеева). - 2006. - Т. 50. - С. 86 - 96.

8. Баскин, И.И. Применение искусственных нейронных сетей в химических и биохимических исследованиях / И.И. Баскин, В.А. Палюлин, Н.С. Зефилов // Вестник Московского университета - Сер. 2. – Химия - 1999.- Т. 40, № 5. – С. 323 - 326.
9. Бельмер, С.В. Функциональные нарушения органов пищеварения у детей: Учебно-методическое пособие / С.В. Бельмер, А.И. Хавкин, Т.В. Гасилина - М., 2006. - 42 с.
10. Бондаренко В. М. «Острова» патогенности бактерий / В.М. Бондаренко // Микробиология. – 2001. – № 4. – С. 67 - 74
11. Бондаренко, В. М. Взаимодействие кишечной микрофлоры с Toll-подобными рецепторами в норме и при патологии: Обзор / В.М. Бондаренко, В.Г. Лиходед // Иммунология - 2009. - Т. 30, № 5. - С. 317 - 320.
12. Бондаренко, В.М. Дисбактериозы кишечника у взрослых / В.М. Бондаренко, Н.М. Грачева, Т.В. Мацулевич. - М: КМК Scientific Press, 2003. – 220 с.
13. Бондаренко, В.М. Дисбактериоз кишечника как клинико-лабораторный синдром: современное состояние проблемы / В.М. Бондаренко, Т.В. Мацулевич - М: Изд. ГЭОТАР-медиа, 2007. – 304 с.
14. Боровиков, В.П. Нейронные сети. Statistica Neural Networks. Методология и технологии современного анализа данных. 2-е изд. перераб. и доп. / В.П. Боровиков - М.: Горячая линия - Телеком, 2008. - 392 с.
15. Боровиков, В. П. STATISTICA: Статистический анализ и обработка данных в среде Windows / В.П. Боровиков, И.П. Боровиков. — М.: Филинь, 1997. — 608 с. — ISBN 589568033-X.
16. Быкова, В.П. Слизистая оболочка носа и околоносовых пазух как иммунный барьер верхних дыхательных путей / В.П. Быкова // Российская ринология. - 1993. - № 1. - С. 40 - 46.
17. Бондаренко, В.М. Дисбактериозы кишечника как клинико-лабораторный синдром: современное состояние проблемы: Руководство для врачей / В.М. Бондаренко, Т.В. Мацулевич - М.: «ГЭОТАР-Медиа», 2007. – 350 с.
18. Вельков, В.В. Многомерная биология XXI века и клиническая лабораторная диагностика / В.В. Вельков // Лабораторная медицина. - № 9. – 2008. - С. 13 - 15.
19. Володин, Н.Н Характеристика микроорганизмов, колонизирующих кишечник человека / Н.Н Володин, В.М. Коршунов, Б.А. Ефимов, Л.И. Кафарская // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2002. - № 5. - С. 98 – 104.
20. Воробьев, А.А. Микробное сообщество пристеночного муцина различных отделов ЖКТ человека / А.А. Воробьев, Ю.В. Несвижский, Е.М Липницкий, М.Н. Алленов, О.Г. Кривошеев, Е.А. Богданова, М.Л. Корнеев // Вестник Российской Академии медицинских

- наук. - 2004. - № 4. - С. 23 – 28.
21. Воробьев, А.А. Популяционно-генетические аспекты микробиологического фенотипа кишечника здорового человека / А.А. Воробьев, Ю.В. Несвижский, Е.В. Буданова, Л.О. Иноземцова // Журнал микробиологии. – 1995. - № 4. – С. 30-35.
 22. Воробьев, А.А. Исследование пристеночной микрофлоры кишки человека / А.А. Воробьев, Ю.В. Несвижский, Е.А. Богданова, Е.М. Липницкий, М.Н. Алленов, М.Л. Корнеев // Журнал микробиологии. – 2003. - № 1. – С. 60 - 63.
 23. Воробьев, А.А. Исследование пристеночной микрофлоры желудочно-кишечного тракта у человека в норме и при патологии / Воробьев А.А., Несвижский Ю.В., Липницкий Е.М. М.Н. Алленов, Е.А. Богданова, М.Л. Корнеев // Вестник Российской Академии медицинских наук. – 2004. - № 2. – С. 43 - 47.
 24. Гальберштам, Н.М. Нейронные сети как метод поиска зависимостей структура — свойство органических соединений / Н.М. Гальберштам, И.И. Баскин, В.А. Палюлин, Н.С. Зефилов // Успехи химии. — 2003. — Т. 72, № 7. — С. 706 - 727.
 25. ГОСТ 10444.11-89 Продукты пищевые. Методы определения молочнокислых микроорганизмов. – М., 1989. – 13 с.
 26. ГОСТ 10444.12-88 Продукты пищевые. Метод определения дрожжей и плесневых грибов. – М., 1988. – 6 с.
 27. ГОСТ 30347-97 Молоко и молочные продукты. Методы определения *Staphylococcus aureus*. – М., 1997. – 8 с.
 28. ГОСТ 30648.5-99 Продукты молочные для детского питания. Метод определения активной кислотности. – М.: ИПК Издательство стандартов, 1999. – 7 с.
 29. ГОСТ Р 52814-2007 Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода *Salmonella*. – М., 2008. – 23 с.
 30. ГОСТ Р 52816-2007 Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий). – М., 2008. – 19 с.
 31. Грачева, Н.М. Применение бактериальных биологических препаратов в практике лечения больных кишечными инфекциями. Диагностика и лечение дисбактериоза кишечника: Методические рекомендации / Н.М. Грачева, Г.И. Гончарова, А.А. Аваков, Л.Б. Королёва – М., 1986. - 28 с.
 32. Гриневич, В.Б. Коррекция дисбиоза кишечника — фактор преодоления инсулинорезистентности / В.Б. Гриневич // Клиническое питание. – 2007. - № 1 - 2. - С. 35
 33. Гриневич, В.Б. Современные представления о значении кишечного микробиоценоза человека и способы коррекции его нарушений / В.Б. Гриневич, М.М. Захарченко // Новые СПб врачебные ведомости. – 2003.- № 2. - С. 13 - 20.

34. Гриневич, В.Б. Принципы коррекции дисбиозов кишечника / В.Б. Гриневич, С.М. Захаренко, Г.А. Осипов // Лечащий Врач. – 2008. - № 6. - С. 6 – 9.
35. Гриневич, В.Б. Коррекция микробно-тканевого комплекса кишечника, как базовая составляющая комплексной терапии метаболического синдрома и кардиоваскулярных заболеваний: Учебно-методическое пособие для врачей / В.Б. Гриневич, Е.И. Сас, В.Е. Кон, Ефимов О.И. - СПб., 2012. - 20 с.
36. Долгушин, И.И. Нейтро-фильные внеклеточные ловушки: метод обнаружения и оценка эффективности улавливания бактерий / И.И. Долгушин, Ю.С. Андреева // Журнал микробиологии. - 2009. - № 2. - С. 70 – 73.
37. Дорофейчук, В.Г. Ключевые тесты для определения кишечного дисбактериоза: Пристендовый листок ВДНХ СССР. / В.Г. Дорофейчук. - М., 1991. – 1с.
38. 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 практической конференции "Пробиотические микроорганизмы - современное состояние вопроса и перспективы использования", посвящ. памяти Г.И. Гончаровой. - М., 2002. - С. 135.
39. Дубинин, А.В. Трофические и регуляторные связи макроорганизма и микрофлоры / А.В. Дубинин, В.Н. Бабин, П.М. Раевский // Клиническая медицина. – 1991. - № 7. - С. 24 - 28.
40. Завгородняя, Е.Ф. Антагонистическая активность кишечной аутофлоры как косвенный метод выявления дисбактериоза кишечника / Е.Ф. Завгородняя, В.В. Зубова, Л.И. Медведева // Врачебное дело. – 1981 - № 6 - С. 113 – 116.
41. 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 научно-практической конференции «Бактериофаги: Теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности». — Ульяновск, 2013. — Т.2. - С. 9-14.
42. Захарова, И.Я. Методы изучения микробных полисахаридов / И.Я. Захарова, Л.В. Косенко - Киев: Наукова Думка, 1982. - 189 с.
43. Зверев, В.В. Микрoэкология и гуморальный иммунитет слизистых открытых полостей человека в норме и при патологических состояниях. Учебное пособие для системы послевузовского профессионального образования врачей / Зверев В.В., Несвижский Ю.В., Ворopaева Е.А., Афанасьев С.С., Алешкин В.А., Караулов А.В., Галимзянов Х.М. – Астрахань – Москва: АГМА- 2011. – 80 с.
44. 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 – № 4 (В) - 2001.- С. 125.
45. Ильенко, Л.И. Новые возможности коррекции микрофлоры кишечника у недоношенных. / 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. 33.
 46. 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.
 47. 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.
 48. Инструкция по приготовлению кисломолочного бифидумбактерина на молочных кухнях системы здравоохранения: Издание официальное. - М., 1988. - С.5 - 9.
 49. Самсыгина, Г.А. Инфекции респираторного тракта у детей раннего возраста / Под ред. профессора Г.А. Самсыгиной. - М.: Миклош, 2006. - С. 111 - 136.
 50. Ключева, Л. А. Микроэкологические нарушения и их коррекция при хроническом рецидивирующем афтозном стоматите (на примере г. Сургута): автореф. дис. канд. мед. наук: 03.00.16 / Ключева Лидия Александровна. – Сургут, 2008. - 124 с.
 51. Кондракова, О.А. Комплексная оценка микроэкологических и функциональных нарушений толстого кишечника для обеспечения этиотропной терапии: Пособие для врачей. / Кондракова О.А., Бабин В.Н., Грубова Е.А., Дубинин А.В., Затевалов А.М. — М.- 2003.- 32 с.
 52. Кондракова, О.А. Новые подходы к диагностике и лечению дисбактериозов. / О.А. Кондракова, В.Н. Бабин, А.В. Дубинин // Сборник трудов по материалам конференции «Лабораторная молекулярная микроэкология». - М., 2000. - С. 215.
 53. Кондракова, О.А. Характеристика спектров микробных метаболитов (ЛЖК) в слюне больных некоторыми системными заболеваниями с проявлениями ксеростомии / Е.А. Воропаева, А.М. Затевалов, В.Н. Бабин, А.Ю. Нурмагомедов, В.В. Хетагуров, И.А. Баранова // Материалы международной научно-практической конференции "Пробиотические микроорганизмы - современное состояние вопроса и перспективы использования", посвящ. памяти Г.И Гончаровой, - М., 2002. - С. 25.
 54. Кондракова, О.А. Микроэкологические 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. 17.

55. 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 // Конгресс «Человек и лекарство». – М., 2002. - С. 14.
56. 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 // Конференция «Гастро 06». - Санкт Петербург, 2006. - С. 33.
57. Кондракова, О.А. Микрoэкологические показатели толстой кишки у детей при ОКИ различной этиологии / Затевалов А.М., Мазанкова Л.Н. // Материалы VI Съезда научного общества гастроэнтерологов России. - М., 2006. - С. 46.
58. 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.
59. Коршунов, В.М. Современные методы оценки качественных и количественных показателей микрофлоры кишечника и влагалища / В.М. Коршунов, Б.А. Ефимов, Л.И. Кафарская // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2002. - № 4. - С. 72 – 78.
60. Крылов, В.П. Принципы комбинированной терапии кишечного дисбактериоза / В.П. Крылов, В.Г. Орлов, Т.В. Малышева // Журнал микробиологии. - 1998. - №4. - С. 64 - 66.
61. Кузиков, А.Н. Особенности казеинолитической активности содежимого толстой кишки при дисбиотических состояниях / А.Н. Кузиков, В.М. Бондаренко, Е.А. Лыкова // Журнал микробиологии. - 1998. - №1. - С. 80 – 83.
62. Кюнкрикова, И.Е. Биокоррекция микрофлоры кишечника в комплексной терапии и профилактике дисбактериоза: дис. канд. мед. наук: 14.00.09 / Кюнкрикова И.Е. - Волгоград - 2000. - 144с.
63. Лахтин, В.М. Лектин-гликоконъюгантные подходы к оценке бактериофагов: перспективы для био-контроля, профилактики и терапии болезней / В.М. Лахтин, А.В. Алёшкин, М.В. Лахтин // Электронный научно-образовательный Вестник «Здоровье и образование в XXI веке». - 2013. - Том 15, № 1.- С. 26 – 28.
64. Лахтин, В.М. Бактериофаги и молочнокислые бактерии. Обзор / В.М. Лахтин, А.В. Алешкин, М.В. Лахтин, С.С. Афанасьев, В.А. Алешкин // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра сибирского отделения Российской Академии медицинских наук. – 2012. - № 5 - 1 (87). - С. 382 - 385.

65. Ленцнер, А.А. Лактофлора и колонизационная резистентность / А.А. Ленцнер, Х.П. Ленцнер, М.Э. Микельсаар // Антибиотики и медицинская биотехнология. - 1987. - №3. - С. 173 - 179.
66. Лиходед, В.Г. Антиэндотоксиновый иммунитет в регуляции численности микрофлоры кишечника. / В.Г. Лиходед, В.М. Бондаренко - М: Медицина. - 2007. – 216 с.
67. 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.
68. 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.
69. 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.
70. Мазанкова, Л.Н. Метаболическая активность кишечной микрофлоры при острых кишечных инфекциях у детей / О.А. Кондракова, А.М. Затевалов, Н.О. Ильина // Российский вестник перинатологии и педиатрии. - 2006. - № 2. - С. 49 – 54.
71. Мазанкова, Л.Н. Диетическая коррекция метаболических нарушений микрофлоры кишечника при вирусных диареях у детей раннего возраста / Л.Н. Мазанкова, О.А. Кондракова, А.М. Затевалов, Н.О. Ильина, Л.В. Бегиашвили // Детские инфекции - 2008. - № 1. - С. 26 - 32.
72. Максимов В.И., Родоман В.Е. Кислотность кишечника как защитный фактор организма хозяина // Журнал микробиологии. - 1998. - №4. - С. 96 - 101.
73. Маянский, А.Н. "Микроэкология человека – непознанная реальность" / А.Н. Маянский // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. - 2001. - Т.3. - № 1. - С. 81 – 84.
74. 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.
75. Мечников, И.И. Молочнокислые микробы и польза, приносимая ими здоровью. / Мечников И.И. - СПб.: Изд. М.П. Петрова. - 1911. – 32 с.
76. Минушкин, О.Н Молекулярные аспекты симбиоза в системе хозяин-микрофлора. / О.Н. Минушкин, В.Н Бабин, И.В. Домарадский, М.Д. Ардатская, А.В. Дубинин // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. - 1998. - № 6 - С. 76 - 82.

77. Минушкин, О.Н. Дисбактериоз кишечника / О.Н. Минушкин, М.Д. Ардатская, В.Н. Бабин // Российский медицинский журнал. - 1999. - № 3. - С. 40 - 45.
78. Митрохин, С.Д. Метаболиты нормальной микрофлоры человека в экспресс-диагностике и контроле лечения дисбиоза толстой кишки: автореф. дис. док. мед наук: 03.02.03 / Митрохин С.Д. – М., 1998. - 37с.
79. Морозова, В.Т. Лабораторная диагностика пищеварительной системы. Российская медицинская академия после дипломного образования / В.Т. Морозова, И.И. Миронова, Р.Л. Марцишевская – М.: Лабора., 2005.- С. 74 - 77.
80. МУК 2.3.2.721-98 Пищевые продукты и пищевые добавки. Определение безопасности и эффективности биологически активных добавок к пище. – М., 1998. – 50 с.
81. Найдено, И. А. Скрининг штаммов молочнокислых бактерий для препаратов пробиотического действия / И.А. Найдено, В.В. Денисенко // Клиническое питание. – 2007. – № 1 – 2. – С. 55.
82. Осипов Г.А. Нормальная микрофлора кишечника и дисбактериоз / Г.А. Осипов, А.И. Парфенов, И.Н. Ручкина // Consilium Provisorum. - 2004. - № 2. - С. 36 - 38.
83. Осипов, Г.А. Хромато-масс-спектрометрический анализ микроорганизмов и их сообществ в клинических пробах при инфекциях и дисбиозах: Химический анализ в медицинской диагностике / Г.А. Осипов – М.: Наука., 2010. – С. 293 – 368.
84. Палеев, Н.Р. Хронический бронхит. Болезни органов дыхания: Руководство по внутренним болезням / Н.Р. Палеев., В.А. Ильченко; Под ред. Н.Р. Палеева. - М.: Медицина., 2000. – 350 с.
85. Паршин Б.Б., Система лимфоидной ткани пищеварительного тракта животных и перорально индуцированная иммунная толерантность / Б.Б. Паршин, Д.В. Толстов Л.В. Ковальчук // Иммунология. – 2001. - №6. - С. 10 – 18.
86. Патент 2236465 Российская Федерация, МПК⁷ C12Q1/02, G01N33/569, Способ определения антииммунноглобулиновой активности. / Бухарин О.В., Чайникова И.Н., Валышев А.В., Валышева И.В., Калинина Т.Н., Попова Е.В., Смолягин А.И.; заявитель и патентообладатель Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН. - №2002125474/13; заявл. 24.09.2002; опубл. 20.09.2004, Бюл. № 11. (2236465).
87. Патент 2145511 Российская Федерация МПК⁷ B01D15/08, G01N30/06, G01N30/48, G01N33/48, Способ разделения смеси жирных кислот, фракций C2 – C7 методом газожидкостной хроматографии. / Алёшкин В.А., Ардатская М.Д., Бабин В.Н., Дубинин А.В., Иконников Н.С., Кондракова О.А., Минушкин О.Н. заявитель и патентообладатель НИФ «Ультрасан» № 99106669/12; заявл. 09.04.1999; опубл. 20.02.2000, Бюл. №. 11 (2220755).

88. Патент 2219944 РФ МПК⁷ А61К38/21, А61Р11/00 Способ лечения вирусно-бактериальных инфекций у детей / Феклисова Л.В., Мескина Е.Р., Щебекова В.М., Покатилова А.И., Галкина Л.А., Целипанова Е.Е., Репина И.Б., Алешкин В.А., Афанасьев С.С. заявитель и патентообладатель Московский областной научно-исследовательский клинический институт №2002107923/14 заявл. 29.03.2002, опубл. 27.12.2003 Бюл. №. 11 (2219944).
89. Пенькова, Н. И. Изучение лактогенных свойств гидролизатов из нетрадиционного сырья природного происхождения в питательных средах и *in vivo* : дис. канд. биол. наук: 03.02.03 / Пенькова Надежда Ивановна.- Ставрополь, 2010.- 160 с.
90. Приказ МЗ РФ № 231 от 9 июня 2003 г. Об утверждении отраслевого стандарта «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника».
91. Приказ Министерства здравоохранения СССР № 535: офиц. текст. – М., 1985. – 87 с.
92. Распоряжение Правительства РФ от 28.12.2012 N 2580-р «Об утверждении Стратегии развития медицинской науки в Российской Федерации на период до 2025 года» - 33 с.
93. Рязанцев, С.В. Роль слизистой оболочки в защите ЛОР-органов от потенциально патогенных для организма антигенных факторов. / С.В. Рязанцев, Н.М. Хмельницкая, Е.В. Тырнова // Вестник оториноларингологии. - 2000. - № 3. - С. 60 - 64.
94. Тамм, А.О. Метаболиты кишечной микрофлоры в диагностике дисбиоза кишечника. / Тамм А.О. // Антибиотики и медицинская биотехнология. - 1987.- Т. 32- № 3- С. 191 – 195.
95. Усвятцов, Б.Я. Характеристика микробного биоценоза слизистой носа у здоровых людей и стафилококковых бактерионосителей / Б.Я. Усвятцов, Л.И. Паршута, О.В. Бухарин // Журнал микробиологии – 2002. - № 6. – С. 65 - 69.
96. Феклисова, Л.В. Клинико-лабораторная эффективность применение отечественного комбинированного пробиотика «Флорин форте» в комплексном лечении детей с инфекционной патологией и при острых кишечных инфекциях: Учебное пособие / Л.В. Феклисова, Е.Е. Целипанова, Е.Р. Мескина, Л.А. Галкина, Н.А. Савицкая, С.П. Кирсанова, Е.В. Русанова, И.В. Троянский, Е.А. Воропаева, Л.В. Пожалостина, С.С. Афанасьев, В.А. Алёшкин. – Москва: ГУ МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского ФУВ, 2011. – 123 с.
97. Хетагуров, В.В. Использование гелеобразного заменителя слюны при ортопедическом лечении больных с ксеростомией / В.В. Хетагуров, И.Ю. Лебеденко, З.С. Есенова, Е.А. Воропаева, О.А. Кондракова, А.М. Затевалов // Панорама ортопедической стоматологии. - 2001. - С. 46.
98. Червинец, Ю.В. Симбиотические взаимоотношения лактобацилл и микроорганизмов желудочно-кишечного тракта: дис. д-ра мед. наук: 03.02.03 / Червинец Юлия Вячеславовна. - М. - 2012. - 263 с.
99. Чернин, В.В. Симбионтное пищеварение человека. Физиология. Клиника, диагностика и

- лечение его нарушений. / А.И. Парфенов, В.М. Бондаренко, О.В. Рыбальченко, В.М. Червинец, Издание 2-е, переработанное и дополненное. – Тверь: ООО «Издательство «Триада», 2013. – С. 125 – 200.
100. Черных, П.Я. Историко-этимологический словарь русского языка. / П.Я. Черных — М.: Русский язык, 1999. — Т. 1. — С. 519—520. — 623 с. — ISBN 5-200-02685-7
 101. Чугунов, А. Ловля бабочек, или чем структурная геномика поможет биологии / А. Чугунов // Наука и жизнь. - 2010. - № 1.- С. 22 - 29.
 102. Шевелева, С.А. Энтеротоксинообразование как диагностический тест при дисбактериозе кишечника Шевелева С.А., Куваева И.Б., Флуер Ф.С. и др. //Вопросы питания. - 2002. - № 4. - С. 23 – 26.
 103. Шендеров, Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание. / Б.А. Шендеров Т1: Микрофлора человека и животных и ее функции. - М.: Грантъ., 1998. - 287 с
 104. Шестаков, С.В. Метагеномика микробиома человека / С.В. Шестаков // Успехи современной биологии - 2010. - № 6. - С.531-543.
 105. Шестаков С.В. Вклад метагеномики в развитие биотехнологии / С. В. Шестаков // Биотехнология. - 2011. - № 6. - С. 8 - 22.
 106. Щербаков, П.Л. Схемы эрадикации штаммов *Helicobacter pylori*, резистентных к метронидазолу у детей / П.Л. Щербаков, А.С. Потапов, Е.С. Дублина, М.Ю. Щербакова, Г.А. Самсыгина, С.И. Эрдес, А.И. Логвинова, Л.В. Кудрявцева // Вопросы современной педиатрии. - 2007. - Т. 6. - № 5. - С. 100 - 104.
 107. Щербенков, И.М. Бактериофаги. Что мы знаем о них? / И.М. Щербенков // Медицинский совет. - 2013. - № 2-3. - С. 56 - 63.
 108. Эпштейн-Литвак, Р.В. Бактериологическая диагностика дисбактериоза кишечника: Методические рекомендации. / Р.В. Эпштейн-Литвак, Ф.Л. Вильшанская. - М., 1977 – 20с.
 109. Ясный, И.Е. Структурная геномика и медицина / И.Е. Ясный, Т.А. Цыбина, Д.В. Шамшури, П.М. Колосов // Молекулярная медицина. — 2009. — № 6. — С. 15 — 20.
 110. Abrahamse, S.L. Potential of short chain fatty acids to modulate the induction of DNA damage and changes in the intracellular calcium concentration by oxidative stress in isolated rat distal colon cells. / S.L. Abrahamse, B.L. Pool-Zobel, and G. Rechkemmer, // Carcinogenesis, - 1999. - 20(4) - p. 629 - 34.
 111. Anderson, N.L. Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words / N.L. Anderson, N.G. Anderson // Electrophoresis. - 1998. - Vol. 19, - № 11.-P. 1853-1861. DOI:10.1002/elps.1150191103. PMID 9740045
 112. Auffray, C. Systems medicine: the future of medical genomics and healthcare / C. Auffray, Zhu chen, L Hood. // Genome Medicine. - 2009. - V.1. - P. 2.1 – 2.11.

113. Backhed, F. Host-bacterial mutualism in the human intestine / F. Backhed, R.E. Ley, J.L. Sonnenburg, D.A. Peterson, J.I. Gordon // *Science*. - 2005. - 307(5717). - P. 1915 - 1920.
114. Backhed, F. Metagenomic analyses of an uncultured viral community from human feces./ M. Breitbart, I. Hewson, B. Felts, J.M. Mahaffy, J. Nulton, P. Salamon, F. Rohwer // *J. Bacteriol.* – 2003. - 185(20): - P. 6220 - 3.
115. Bauer-Marinovic, M. Dietary resistant starch type 3 prevents tumor induction by 1,2-dimethylhydrazine and alters proliferation, apoptosis and dedifferentiation in rat colon. / M Bauer-Marinovic // *Carcinogenesis* - 2006. - 27(9) - P. 1849 - 59.
116. Beavis, R.C. Cinnamic acid derivatives as matrices for ultraviolet laser desorption mass spectrometry of proteins / R.C. Beavis, B.T. Chait, H.M. Fales // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. - 1989. - Vol. 3, № 12. - P. 432 – 435. doi:10.1002/rcm.1290031207. PMID 2520223
117. Bingham, S.A. Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. *Lancet* / S.A. Bingham, - 2003. - 361(9368). - P. 1496 - 501.
118. Breitbart, M. Metagenomic analyses of an uncultured viral community from human feces / M. Breitbart, I. Hewson, B. Felts // *J. Bacteriol.* – 2003. - 185(20). – P. 6220 - 6223.
119. Breitbart M., Method for discovering novel DNA viruses in blood using viral particle selection and shotgun sequencing / M Breitbart, F. Rohwer // *J. Bacteriol.* – 2003. - 185(20). – P. 6220 - 6223.
120. Brüggemann, H. Bacteriophages infecting *Propionibacterium acnes* / H. Brüggemann, R. Lood // Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International Vol. - 2013, - Article ID 705741, 10 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2013/705741>
121. Bishop, C.M. *Neural Networks for Pattern Recognition*: Clarendon Press / C.M. Bishop — 1995 — P. 504
122. Cani, P. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. / P. Cani // *Gut*-2009- 58:1091-1103.;
123. Cani, P. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. / P. Cani, J. Amar // *Diabetes* – 2007 - № 56, P. 1761-1772.
124. Cani, P.D. Oligofructose promotes satiety in rats fed a high-fat diet: involvement of glucagon-like Peptide-1. / P.D. Cani // *Obes Res* - 2005. - № 13(6) - P. 1000 – 7.
125. Cuff, M. The human colonic monocarboxylate transporter Isoform 1: its potential importance to colonic tissue homeostasis. / M. Cuff // *Gastroenterology* - 2005. - № 128(3) - P. 676 – 86.
126. Dabrowska, K. Possible association between phages, Hoc protein, and the immune system / K. Dabrowska, K. Swiła-Jeleń, A. Opolski, A. Górski // *Archives of virology*. – 2006. – Vol. 151,

- № 2. – P. 209 - 215.
127. D'Argenio, G. Butyrate, mesalamine, and factor XIII in experimental colitis in the rat: effects on transglutaminase activity / G. D'Argenio // *Gastroenterology* - 1994. - № 106(2) - P. 399-404
 128. Daviss. Growing pains for metabolomics / Daviss // *The Scientist* - 2005. - Vol. 19 - № 8. - P. 25 - 28.
 129. Delzenne, N.M. Impact of inulin and oligofructose on gastrointestinal peptides. / N.M. Delzenne // *Br J Nutr*, - 2005. - 93 Suppl 1 - p. S157 - 61.
 130. Einerhand, A.W. Role of mucins in inflammatory bowel disease: important lessons from experimental models. / A.W. Einerhand // *Eur J Gastroenterol Hepatol* - 2002. - № 14(7) - P. 757 - 65
 131. Elkon, R. SPIKE: A database, visualization and analysis tool of cellular signaling pathways / R. Elkon, R. Vesterman, N. Amit // *BMC Bioinformatics*. - 2008. - Vol. 9, - № 110, P. 328 - 330
 132. Engholm-Keller, K. Technologies and challenges in large-scale phosphoproteomic / K. Engholm-Keller, M.R. Larsen // *Proteomics*. - 2013. - Vol. 13. - № 6. - P. 910 – 31. DOI:10.1002/pmic.201200484. PMID 9740045
 133. Fredstrom, S.B. Apparent fiber digestibility and fecal short-chain fatty acid concentrations with ingestion of two types of dietary fiber. / S.B. Fredstrom // *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, - 1994. - № 18(1): - P. 14 - 9.
 134. Galdeano, C.M. Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics: Bioactive Foods in Health Promotion / C. M. Galdeano, G. Perdigon // *Clin. Vaccine Immunol.* — 2006. — V. 13. — № 2. — P. 219-226
 135. Genomics, I. Humans, Animals and Plants / I. Genomics; Edited by iConcept Press. Singapur, Publisher: iConcept Press Ltd - 2013. - 336 p. ISBN: 978-1-922227-03-4.
 136. Goodacre, R. Metabolomics of a superorganism. / R. Goodacre // *J Nutr* 2007; - 137 (1 Suppl): P. 259 – 266.
 137. Górski, A. Bacteriophage translocation / A. Górski, E. Wazna, B.W. Dabrowska // *FEMS immunology and medical microbiology*. – 2006. – Vol. 46, - № 3. – P. 313 – 319.
 138. Gostner, A. Effect of isomalt consumption on faecal microflora and colonic metabolism in healthy volunteers. / A. Gostner // *Br J Nutr*, - 2006. - № 95(1): - P. 40 - 50.
 139. Hallert, C. Increasing fecal butyrate in ulcerative colitis patients by diet: Controlled pilot study. / Hallert, C. // *Inflammatory Bowel Diseases*, - 2003. - № 9(2): - P. 116 – 121.
 140. Hamer, H.M. Review article: the role of butyrate on colonic function. / H.M. Hamer // *Aliment Pharmacol Ther*, - 2008. - № 27(2): p. 104 - 19.
 141. Handelsman, J. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. / J. Handelsman, M.R. Rondon, S.F. Brady // *Chemistry & Biology*.- 1998. - Vol. 5. - P. 245 – 249. DOI:10.1016/S1074-5521(98)90108-9

142. Handley, S.A. Pathogenic simian immunodeficiency virus infection is associated with expansion of the enteric virome. / S.A. Handley // *Cell*. – 2012. – P. 151:253 – 266.
143. Healy, M. Microbial DNA typing by automated repetitive-sequence-based PCR / M. Healy, J. Huong, T. Bittner // *J. Clin. Microbiol.* - 2005. - Vol. 43, - № 1. - P. 199 - 207.
144. Hold, G.L. Assessment of microbial diversity in human colonic samples by 16S rRNA sequence analysis / G.L. Hold, S.E. Pryde, V.J. Russel // *FEMS Microbiol. Ecol.* - 2002. - Vol. 39. - P. 33 - 39.
145. Hood, L. Systems Biology and New Technologies Enable Predictive and Preventative Medicine. / L. Hood, J.r. Heath, M.e. Phelps, B. Lin // *Science*. - 2004. - V. 306. - P. 640 – 643.
146. Ivanov, I.I. Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine. / I.I. Ivanov, // *Cell Host Microbe*. – 2008 - 4 - P. 337 – 349.
147. Quackenbush, J. Extracting biology from high-dimensional biological data / J. Quackenbush.// *The Journal of Experimental Biology* - 2010, - P. 1507 – 1517.
148. Jongyoun, Yi. Detection and biovar discrimination of *Ureaplasma urealyticum* by real-time PCR / Yi Jongyoun, Bo Hyun Yoon, Eui-Chong Kim. // *Molecular and Cellular Probes*. - 2005. - Vol. 19. - P. 255 – 260.
149. Jordan, K.W. Metabolomic characterization of human rectal adenocarcinoma with intact tissue magnetic resonance spectroscopy. / K.W. Jordan, J. Nordenstam, G.Y. Lauwers // *Diseases of the Colon&Rectum*. - 2009. - Vol. 52, - № 3. - P. 520 – 525. DOI:10.1007/DCR.0b013e31819c9a2c. PMID 19333056
150. Junjie Qin. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing / Qin Junjie, Li Ruiqiang, Jeroen Raes. // *Nature*. – 2010. - Vol. 464. - P. 59 – 65. (4 March 2010) | doi:10.1038/nature08821; Received 14 August 2009; Accepted 23 December 2009.
151. Karas, M. Matrix-assisted ultraviolet-laser desorption of nonvolatile compounds / M. Karas, D. Bachmann, D. Bahr, F. Hillenkamp // *Int. J. Mass Spectrom. Ion. Proc.* - 1987. - № 78. - P. 53 – 68.
152. Kawamata, K. Propionate absorption associated with bicarbonate secretion in vitro in the mouse cecum. / K. Kawamata, H. Hayashi, and Y. Suzuki // *Pflugers Arch*, - 2007. - 454(2): - P. 253-62.
153. Kitazawa, H. Analysis of bacterial communities of traditional fermented West African cereal foods using culture independent methods / H. Kitazawa, H. Watanabe, T. Shimosato // *Int. J. Food Microbiol.* — 2003. — V. 85. - № 1-2. — P. 11-21.
154. Lan, J.G. Genistein inhibits invasive potential of human hepatocellular carcinoma by altering cell cycle, apoptosis, and angiogenesis. / J.G. Lan, S.M. Cruickshank, J.C. Singh // *World J.Gastroenterol.* — 2005. — V. 11. — №22. — P. 3375-3384.

155. Lewis, S.J. Increasing butyrate concentration in the distal colon by accelerating intestinal transit. / S.J. Lewis and K.W. Heaton // *Gut* - 1997. - № 41(2) - P. 245-51
156. Li, H. SLC5A8, a sodium transporter, is a tumor suppressor gene silenced by methylation in human colon aberrant crypt foci and cancers. / H. Li // *Proc Natl Acad Sci U S A*, - 2003. - 100(14): - P. 8412-7
157. Lood, R. Inducible Siphoviruses in superficial and deep tissue isolates of *Propionibacterium acnes* / R. Lood, M. Mörgelin, A. Holmberg // *BMC Microbiology* – 2008. - 8:139 doi:10.1186/1471-2180-8-139
158. Mackie, R.I. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract / R.I. Mackie, A. Sghir, H.R. Gaskins // *Am. J. Clin. Nutr.* - 1999. - Vol. 69. - P. 1035-1045.
159. Mackowiak, P.A. The normal microbial flora / P.A. Mackowiak // *New Engl. J. Med.* - 1982. - № 307. - P. 83-93.
160. Mahalanobis, P.C. On the generalised distance in statistics. / P.C. Mahalanobis // *Proceedings of the National Institute of Sciences of India* 2. - 1936.-Vol. 1. - P. 49–55
161. Matsuki, T. Use of 16S rRNA gene-targeted group-specific primers for real-time PCR analysis of predominant bacteria in human feces. / T. Matsuki, Watanabe K., J. Fujimoto // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2004. - 70(12). – P. 7220-7228.
162. Matsumoto, N. Butyrate modulates TGF-beta1 generation and function: potential renal benefit for Acacia(sen) SUPERGUM (gum arabic)? / N. Matsumoto // *Kidney Int*, 2006. 69(2): p. 257-65
163. Mazmanian, S.K. An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. / S.K. Mazmanian, C.H. Liu, Tzianabos AO, Kasper DL. // *Cell*. - 2005; - № 122:107 – 118.
164. McIntyre, A. Butyrate production from dietary fibre and protection against large bowel cancer in a rat model. / A. McIntyre, P.R. Gibson, and G.P. Young // *Gut*, - 1993. - 34(3) - p. 386-91
165. Medzhitov, R. Adjuvants and the Initiation of T-Cell Responses / R. Medzhitov // *Nature Rev. Immunol.* — 2001. — V. 1. — № 2. — P. 143-145.
166. Membrez, M. Gut microbiota modulation with norfloxacin and ampicillin enhances glucose tolerance in mice. / M. Membrez // *FASEB J.* – 2008. - № 22. – P. 2416-2426
167. Minot, S. The human gut virome: inter-individual variation and dynamic response to diet. / S. Minot // *Genome Res.* - 2011; - №21. – P. 1616–1625.
168. Mitchell, B.L. Volatile fatty acids in the human intestine: Studies in surgical patients. *Nutrition Research*, / B.L. Mitchell - 1985. - № 5 (10): - P. 1089-1092
169. Morrison, D.J. Butyrate production from oligofructose fermentation by the human faecal flora: what is the contribution of extracellular acetate and lactate? / D.J. Morrison // *Br J Nutr*, - 2006. - № 96(3). - P. 570-7.

170. Neuman, M.G. Immune dysfunction in inflammatory bowel disease. / M.G. Neuman, // Transl Res, - 2007. - № 149(4). - p. 173-86
171. Nicholson, J.K. Global systems biology, personalized medicine and molecular epidemiology / J.K. Nicholson // Mol. Syst. Biol. - 2006. - Vol. 2.- P. 52. DOI:10.1038/msb4100095
172. Nilsson, U. Short-chain fatty acid formation in the hindgut of rats fed oligosaccharides varying in monomeric composition, degree of polymerisation and solubility. / U. Nilsson and M. Nyman // Br J Nutr, - 2005. - № 94(5) - P. 705-13.
173. Nordgaard, I. Colonic Production of Butyrate in Patients with Previous Colonic Cancer during Long-Term Treatment with Dietary Fibre (Plantago ovata Seeds). / I. Nordgaard // Scandinavian Journal of Gastroenterology - 1996. - № 31(10) - P. 1011-1020.
174. Park, Y. Dietary fiber intake and risk of colorectal cancer: a pooled analysis of prospective cohort studies. / Y. Park // JAMA - 2005. - № 294(22) - p. 2849-57.
175. Patterson, D. Artificial Neural Networks. / D. Patterson // Singapore: Prentice Hall. Pietrucha - 1996. - P. 152
176. Qin, J. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. MetaHIT Consortium / J. Qin, R. Li, J. Raes, M. Arumugam // Nature. - 2010. - V. 464(7285). - P. 59-65
177. Qin J., A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. / J. Qin, Y. Li, Z. Cai, S. Li, J. Zhu, F. Zhang // Nature. - 2012 Oct 4; - № 490(7418): - P. 55-60. doi: 10.1038/nature11450. Epub 2012 Sep 26
178. Reyes, A. Viruses in the faecal microbiota of monozygotic twins and their mothers. / A. Reyes // Nature. – 2010. - № 466. – P. 334–338.
179. Rezaie, A. Oxidative stress and pathogenesis of inflammatory bowel disease: an epiphenomenon or the cause? / A. Rezaie, R.D. Parker, and M. Abdollahi // Dig Dis Sci, - 2007. - № 52(9). - P. 2015-21.
180. Roda, A. A new oral formulation for the release of sodium butyrate in the ileo-cecal region and colon. / Roda, A., et al. // World J Gastroenterol, - 2007. - 13(7): - P. 1079-84.
181. Rose, D.J. Influence of Dietary Fiber on Inflammatory Bowel Disease and Colon Cancer: Importance of Fermentation Pattern. / D.J. Rose // Nutrition Reviews, - 2007. - № 65(2). - P. 51-62.
182. Rottier, O. Changes in gut microbiota control intestinal permeability-induced inflammation in obese and diabetic mice through unexpected dependent mechanisms. / O. Rottier, Y. Goiot, A. Neyrinck, L. Geurts et al. // Diabetologia – 2008. - № 51 – P. 34 — 35
183. Rumelhart, D.E. Parallel Distributed Processing: Explorations in the Microstructure of Cognition. / D.E. Rumelhart, J.L. McClelland and the PDP Research Group. // Foundations,

- Cambridge, MA: MIT Press - 1986. - Volume 1 - P. 328 – 333.
184. Scheppach, W. The butyrate story: old wine in new bottles? / W. Scheppach and F. Weiler, // *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, - 2004. - № 7(5): - P. 563-7
 185. Skrzydlewska, E. Lipid peroxidation and antioxidant status in colorectal cancer. / E. Skrzydlewska // *World J Gastroenterol*, - 2005. - № 11(3). - P. 403-406.
 186. Tilg, H. Obesity and the microbiota. / H. Tilg // *Gastroenterology* - 2009 - № 136: - P. 1476-1483.
 187. Toden, S. Dose-dependent reduction of dietary protein-induced colonocyte DNA damage by resistant starch in rats correlates more highly with caecal butyrate than with other short chain fatty acids. / S. Toden // *Cancer Biol Ther*, - 2007. - № 6(2). - P. 253-8
 188. Trygg, J. Chemometrics in metabonomics / J. Trygg, E. Holmes, T. Lundstedt // *J. Proteome Res.* - 2007. - Vol. 6. - № 2.- P. 469-479. DOI:10.1021/pr060594q. PMID 17269704
 189. Tsukumo, D. Translational research into gut microbiota: new horizons in obesity treatment. / D. Tsukumo // *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia* – 2009 - № 53. - P. 139-144
 190. Turnbaugh, P. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. / P. Turnbaugh // *Nature* – 2006. - № 444. – P. 1027-1031.
 191. Tyers, M. From genomics to proteomics / M. Tyers, M. Mann // *Nature*. - 2003. - Vol. 422(6928). - P. 193-197.
 192. Van De Wiele, T. Inulin-type fructans of longer degree of polymerization exert more pronounced in vitro prebiotic effects. / T. Van De Wiele // *Journal of Applied Microbiology*, - 2007. - № 102(2). - p. 452-460.
 193. Velazquez, O.C. Butyrate and the colonocyte. Production, absorption, metabolism, and therapeutic implications. / Velazquez, O.C., H.M. Lederer, and J.L. Rombeau // *Adv Exp Med Biol*, 1997. - № 427. - p. 123-34
 194. Vidal, K. Lipoteichoic acids from *Lactobacillus johnsonii* strain La1 and *Lactobacillus acidophilus* strain La10 antagonize the responsiveness of human intestinal epithelial HT29 cells to lipopolysaccharide and gram-negative bacteria. / K. Vidal, G. Perdigon, A. Donnet-Hughes, D. Granato // *Infect Immun* – 2002. - №70. – P. 2057-2064.
 195. Vinderola, G. Levels of recent thymic emigrant cells decrease in children undergoing partial thymectomy during cardiac surgery. / G. Vinderola, C. Matar // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* — 2005. —V. 12. — №9. — P. 1075-1084
 196. Walsh, S.V. Modulation of tight junction structure and function by cytokines. / Walsh, S.V., A.M. Hopkins, and A. Nusrat // *Adv Drug Deliv Rev*, 2000. - № 41(3) - p. 303-13
 197. Weston, A.D. Systems Biology, Proteomics, and the Future of Health Care: Toward Predictive, Preventative, and Personalized Medicine. / A.D. Weston, L. Hood // *J. Proteome res.* - 2004. - V.

3. - P. 179–196.
198. White, D.W. Immune modulation during latent herpesvirus infection. / D.W. White, R. Suzanne Beard, E.S. Barton // *Immunol Rev.* – 2012. - № 245 - p. 189–208.
199. Wong, C.S. The influence of specific luminal factors on the colonic epithelium: high-dose butyrate and physical changes suppress early carcinogenic events in rats. / C.S. Wong // *Dis Colon Rectum*, - 2005. - № 48(3). - p. 549-59
200. Wu, G.D. Sampling and pyrosequencing methods for characterizing bacterial communities in the human gut using 16S sequence tags / G.D. Wu // *BMC microbiology*. - 2010. - Vol. 10. - P. 206.

Приложения

Приложение 1 - Критерии отбора пациентов по нормальному копрологическому синдрому в комплексном анализе микрофлоры кишечника.

№	Параметр	Значения
1	Консистенция	плотная, мягкая, твердая
2	Форма	цилиндрическая
3	Цвет	коричневый, темно-коричневый, светло-коричневый
4	Запах	нет, без особенностей
5	Слизь	отсутствует, в норме, покрывает каловый столбик
6	Жир	отсутствует
7	Кровь	отсутствует
8	Остатки непереваренной пищи	отсутствуют, в допустимом кол-ве, в большом кол-ве
9	Мышечные волокна непереваренные	отсутствует
10	Мышечные волокна полупереваренные	отсутствует, единичные волокна в поле зрения
11	Мышечные волокна переваренные	отсутствует, единичные волокна в поле зрения
12	Соединительная ткань	отсутствует
13	Растительная клетчатка неперевариваемая	есть
14	Растительная клетчатка перевариваемая	отсутствует
15	Крахмал внеклеточный	отсутствует, единичные зерна в поле зрения
16	Крахмал внутриклеточный	отсутствует
17	Иодофильная флора нормальная	отсутствует
18	Иодофильная флора патогенная	отсутствует
19	Дрожжевые грибы	отсутствует
20	Слизь	отсутствует
21	Лейкоциты	
22	Эритроциты	отсутствует
23	Жир нейтральный	отсутствует, единичные капли
24	Жирные кислоты	отсутствует, в скудном кол-ве
25	Соли жирных кислот	отсутствует, в скудном кол-ве
26	Кристаллы Шарко-Лейдена	отсутствует
27	Кристаллы Оксалаты	отсутствует
28	Кристаллы Фосфаты	отсутствует
29	Эпителий	отсутствует
30	Яйца глист	отсутствует
31	цисты простейших	отсутствует
32	Стеркобилин	положительная реакция
33	Билирубин	отсутствует

Приложение 2 - Критерии отбора пациентов с нормальным пищеварением по микробиологическим показателям в комплексном анализе микрофлоры кишечника.

№	Параметр	Значения, Lg КОЕ/г.		
		До года	с 1 года до 60 лет	Старше 60 лет
1	<i>Bifidobacterium spp.</i>	10 - 11	9 - 10	8 - 9
2	<i>Lactobacillus spp.</i>	6 - 7	7 - 8	6 - 7
3	<i>Escherichia coli</i>	7 - 8	7 - 8	7 - 8
4	<i>Escherichia coli lac+</i>	не более 10% (от общего количества эшерихий)	не более 10% (от общего количества эшерихий)	не более 10% (от общего количества эшерихий)
5	<i>Escherichia coli lac-</i>	не более 5% (от общего количества эшерихий)	не более 5% (от общего количества эшерихий)	не более 5% (от общего количества эшерихий)
6	<i>Escherichia coli hem+</i>	отсутствует	отсутствует	отсутствует
7	<i>Enterococcus spp.</i>	не более 4	не более 4	не более 4
8	<i>Proteus spp.</i>	не более 4	не более 4	не более 4
9	<i>Klebsiella spp.</i>	не более 4	не более 4	не более 4
10	<i>Citrobacter spp.</i>	не более 4	не более 4	не более 4
11	<i>Enterobacter spp.</i>	не более 4	не более 4	не более 4
12	<i>Hafnia spp.</i>	не более 4	не более 4	не более 4
13	<i>Serratia spp.</i>	не более 4	не более 4	не более 4
14	<i>Pseudomonas spp.</i>	не более 4	не более 4	не более 4
15	<i>Candida spp.</i>	не более 4	не более 4	не более 4

Приложение 3 - Степени микробиологических нарушений при дисбактериозе кишечника [90]

Возраст	Характер изменений
1-я степень микробиологических нарушений	
дети младше 1 года жизни	снижение содержания бифидобактерий до 10^9 – 10^8 КОЕ/г, лактобактерий до 10^5 – 10^4 КОЕ/г, типичных эшерихий до 10^6 – 10^5 КОЕ/г, возможно повышение содержания типичных эшерихий до 10^9 – 10^{10} КОЕ/г
дети старше 1 года жизни	снижение содержания бифидобактерий до 10^8 – 10^7 КОЕ/г, лактобактерий до 10^6 – 10^5 КОЕ/г, типичных эшерихий до 10^6 – 10^5 КОЕ/г, возможно повышение содержания типичных эшерихий до 10^9 – 10^{10} КОЕ/г
в возрасте до 60 лет	снижение содержания бифидобактерий до 10^8 – 10^7 КОЕ/г, лактобактерий до 10^6 – 10^5 КОЕ/г, типичных эшерихий до 10^6 – 10^5 КОЕ/г, возможно повышение содержания типичных эшерихий до 10^9 – 10^{10} КОЕ/г
в возрасте старше 60 лет	снижение содержания бифидобактерий до 10^7 – 10^6 КОЕ/г, лактобактерий до 10^5 – 10^4 КОЕ/г, типичных эшерихий до 10^6 – 10^5 КОЕ/г, возможно повышение содержания типичных эшерихий до 10^9 – 10^{10} КОЕ/г

Приложение 3 - Степени микробиологических нарушений при дисбактериозе кишечника (продолжение)

Возраст	Характер изменений
2-я степень микробиологических нарушений	
дети младше 1 года жизни	снижение содержания бифидобактерий до 10^8 и ниже КОЕ/г, лактобактерий до 10^4 и ниже КОЕ/г, повышение содержания гемолитических эшерихий или других условнопатогенных бактерий до концентрации 10^5 – 10^7 КОЕ/г или обнаружение ассоциаций условнопатогенных микроорганизмов в концентрации 10^4 – 10^5 КОЕ/г
дети старше 1 года жизни	снижение содержания бифидобактерий до 10^7 и ниже КОЕ/г, лактобактерий до 10^5 и ниже КОЕ/г, повышение содержания гемолитических эшерихий или других условнопатогенных бактерий до концентрации 10^5 – 10^7 КОЕ/г или обнаружение ассоциаций условнопатогенных микроорганизмов в концентрации 10^4 – 10^5 КОЕ/г
в возрасте до 60 лет	снижение содержания бифидобактерий до 10^7 и ниже КОЕ/г, лактобактерий до 10^5 и ниже КОЕ/г, повышение содержания гемолитических эшерихий или других условнопатогенных бактерий до концентрации 10^5 - 10^7 КОЕ/г или обнаружение ассоциаций условнопатогенных микроорганизмов в концентрации 10^4 - 10^5 КОЕ/г
в возрасте старше 60 лет	снижение содержания бифидобактерий до 10^6 и ниже КОЕ/г, лактобактерий до 10^4 и ниже КОЕ/г; повышение содержания гемолитических эшерихий или других условнопатогенных бактерий до концентрации 10^5 - 10^7 КОЕ/г или обнаружение ассоциаций условнопатогенных микроорганизмов в концентрации 10^4 - 10^5 КОЕ/г
3-я степень микробиологических нарушений	
дети младше 1 года жизни	снижение содержания бифидобактерий до 10^8 и ниже КОЕ/г, лактобактерий до 10^4 и ниже КОЕ/г, обнаружение ассоциаций условнопатогенных микроорганизмов в концентрации 10^6 – 10^7 КОЕ/г и выше
дети старше 1 года жизни	снижение содержания бифидобактерий до 10^7 и ниже КОЕ/г, лактобактерий до 10^5 и ниже КОЕ/г, обнаружение ассоциаций условнопатогенных микроорганизмов в концентрации 10^6 – 10^7 КОЕ/г и выше
в возрасте до 60 лет	снижение содержания бифидобактерий до 10^7 и ниже КОЕ/г, лактобактерий до 10^5 и ниже КОЕ/г, обнаружение ассоциаций условнопатогенных микроорганизмов в концентрации 10^6 – 10^7 КОЕ/г и выше
в возрасте старше 60 лет	снижение содержания бифидобактерий до 10^6 и ниже КОЕ/г, лактобактерий до 10^4 и ниже КОЕ/г, обнаружение ассоциаций условнопатогенных микроорганизмов в концентрации 10^6 – 10^7 КОЕ/г и выше.

Приложение 4 - Степени микробиологических нарушений ротоглотки.

Показатели	Степень нарушения микробиотопа ротоглотки			
	Нормоценоз	Промежу- точный тип	Дисбиоз	Выраженный воспа- лительный процесс
Микрофлора				
Нормофлора, угнетение	- / -	+ / +	++ / ++	+++ / +++
Нормофлора (α, γ-гемолитические стрептококки, непатогенные нейсерии), lg КОЕ/г.	4 - 6	6 - 7	6 - 7	7 – 8
Условно-патогенные аэробы/факультативные анаэробы, lg КОЕ/г.	0 / 0	3 – 4/3 - 4	4 – 5 / 4 – 5	6 – 8 / 6 – 8
Иммуноглобулины, мкг/мл				
IgG	<50	50 - 100	100 - 200	>200
IgM	0	<10	10 – 30	>30
IgA	<20	20 - 50	50 – 100	>100
sIgA	<20	20 - 50	50 – 100	>100
sc	<50	50 - 100	100 - 200	>200