

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ  
ФЕДЕРАЦИИ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«СЕВЕРО-КАВКАЗСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

*На правах рукописи*

**Добрыня Юлия Михайловна**

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА  
МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ОРГАНИЗМА  
КРЫС И ПРЕБИОТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ПРИ  
ПРИМЕНЕНИИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОЙ СУБСТАНЦИИ  
НА ОСНОВЕ *MEDUSOMYCES GISEVII***

06.02.01 – Диагностика болезней и терапия животных, патология,  
онкология и морфология животных

**ДИССЕРТАЦИЯ**  
на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
доктор ветеринарных наук, профессор  
**Тимченко Людмила Дмитриевна**

Ставрополь – 2019

<b>ОГЛАВЛЕНИЕ</b>		<b>СТР.</b>
ВВЕДЕНИЕ.....		3
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....		
1.1. Проблемы системных функциональных нарушений организма животных, связанные с дисбалансом кишечной микрофлоры		11
1.2. Способы коррекции микробиоценоза кишечника и последствий его нарушения		19
СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.....		
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....		34
3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....		
3.1. Аналитическое и экспериментальное обоснование разработки и применения биологически активной субстанции из <i>Medusomyces gisevii</i>		46
3.2. Оценка пребиотического действия и определение оптимальной эффективной дозы биологически активной субстанции из <i>Medusomyces gisevii</i>		62
3.3. Влияние биологически активной субстанции из <i>Medusomyces gisevii</i> на гематологические и биохимические показатели крови лабораторных животных		69
3.4. Влияние биологически активной субстанции из <i>Medusomyces gisevii</i> на иммунологические показатели крови лабораторных животных		80
3.5. Гистологическая картина кишечника и печени лабораторных животных под влиянием биологически активной субстанции из <i>Medusomyces gisevii</i>		83
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....		94
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ....		109
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....		110
ПРИЛОЖЕНИЯ.....		149

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы.** Дисбиотические нарушения качественного и количественного состава микрофлоры организма и ее функций, вызванные различными причинами, по-прежнему остаются одной из ведущих и наиболее трудно решаемых проблем современной ветеринарной медицины. В настоящее время мировым сообществом признана важная роль кишечной микрофлоры в обеспечении постоянства внутренней среды организма. Нарушение баланса микробной экосистемы кишечника животных влечет за собой снижение антагонистической и метаболической активности микроорганизмов, что отражается на целом ряде морфофункциональных особенностей различных органов и систем, проявляющихся в нарушении переваривания и всасывания пищи, синтеза витаминов, ферментов, аминокислот, снижении общей резистентности и развитии воспалительных процессов. В результате этого возникают вторичные осложнения, среди которых на первый план выступают нарушения иммунитета и метаболизма (Р.Т. Маннапова с соавт., 2001; В.Н. Бабин с соавт., 2002; В.Б. Гриневич с соавт., 2003; С.В. Бельмер с соавт., 2006; Ю.А. Копанев, 2009; И.М. Файзуллин, Р.Т. Маннапова, 2011; Ж.В. Бучахчан с соавт., 2011; Н.В. Данилевская, 2008; Н.В. Данилевская, В.В. Субботин, 2012; Т.В. Бурцева, 2013).

Механизмы развития дисбактериоза и его последствий очень сложны и многогранны, поэтому необходимость изыскания средств, которые могут охватывать как можно большее число звеньев данного патогенеза, для ветеринарии является по-прежнему актуальной.

Современный взгляд на коррекцию патологических процессов, связанных с нарушением микрофлоры, предполагает использование комплексного подхода к оздоровлению кишечной экологии. В последние годы среди многообразия средств борьбы с дисбактериозом приоритет отдается пребиотическим препаратам нового поколения (Н.И. Урсова, 2005; В.М. Бондаренко, 2005; Ю.А. Копанев, 2007; В.В. с соавт. Великанов, 2011; О.В. Бухарин, 2013; Т.А. Бокова, 2016; Т.Я. Вахитов с

соавт., 2013, 2017; А.И. Аминова с соавт., 2017). В абсолютном большинстве представленные препараты сконструированы искусственно, содержат структурные компоненты микроорганизмов и различные комбинации их метаболитов, а также пищевые волокна, полисахариды, органические кислоты, сорбенты. Благодаря такому составу, они не только осуществляют регулирование симбионтных отношений организма и его микрофлоры за счет компенсации метаболитов, создают благоприятные условия для развития собственной микрофлоры, но еще и обладают широким спектром биологической активности, противовоспалительными, иммуномодулирующими и другими свойствами, практически не оказывают побочных действий (Б.А. Шендеров, 1998; Н.М. Грачева, В.М. Бондаренко, 2004; И.Ю. Чичерин с соавт., 2012; Ж.В. Бучахчан с соавт., 2011; И.В. Дармов с соавт., 2011, 2014; В.Е. Улитко, 2014; М.Д. Ардатская, 2015; О.Г. Голушко с соавт., 2015; А.А. Плоскирева, 2016; Е.И. Краснова с соавт., 2017).

В связи с трудоемким технологическим производством, обуславливающим довольно высокую себестоимость таких препаратов, широкое распространение они получили пока лишь в гуманной медицине, в то время как в ветеринарной практике их использование ограничено. Именно поэтому для создания подобных препаратов принципиальное значение имеет подбор экологически чистого, безвредного и недорогого сырья, которое заведомо содержит вещества, обладающие как пребиотическим, так и широким патогенетическим действием в соответствии с развитием возможных осложнений дисбиотического процесса. В этом отношении особое внимание привлекает природный микробный симбионт *Medusomyces gisevii* (чайный гриб), а именно его зооглея, чей богатый, поликомпонентный состав вполне может обеспечить вышеуказанные требования.

В связи с тем, что создание нового препарата на основе сложной микробной субстанции с целью последующего внедрения в ветеринарию, безусловно, требует глубокого всестороннего изучения его влияния на организм, обозначенная тема исследования представляется актуальной.

**Степень разработанности темы.** Сведения об изучении свойств *Medusomyces gisevii* изложены в работах Л.Т. Даниелян (2005), М.Н. Веревкиной (2010), Р.А. Зайнуллина с соавт. (2010), И.Д. Кароматова (2014), В.В. Рогожина, Ю.В. Рогожина (2017). В зарубежной литературе культуре *Medusomyces gisevii* посвящены работы G.S. Murugesan et al., (2009), S. Bhattacharya et al., (2011), A. Aloulou et al., (2012), D. Banerjee et al., (2012), H. Battikh et al., (2012) R. Jayabalan et al. (2007, 2008, 2014). Предположения о потенциале симбионта как о пробиотике высказаны в работе N.O. Kozyrovska et al. (2012).

Большинство сообщений посвящены свойствам культуральной жидкости симбионта, встречаются лишь единичные сообщения о практическом использовании зооглеи. Анализ литературных сведений показал, что до настоящего момента пребиотических препаратов на основе зооглеи *Medusomyces gisevii* разработано не было, вследствие чего потенциал его действия на микробиоценоз кишечника, нарушения которого сопровождаются широким симптомокомплексом в организме животных, до сих пор не раскрыт в полной мере.

**Цель исследования:** изучить пребиотическое действие биологически активной субстанции «БАС-ЧГ», созданной на основе зооглеи *Medusomyces gisevii* (чайный гриб) и оценить ее влияние на морфофункциональные показатели организма белых крыс.

**Задачи исследования:**

1. Предложить теоретическое и экспериментальное обоснование целесообразности применения *Medusomyces gisevii* (чайный гриб) для разработки новой биологической активной субстанции «БАС-ЧГ» с пребиотическими и биостимулирующими свойствами.

2. Изучить пребиотическое действие и выявить оптимальную эффективную дозу полученной субстанции «БАС-ЧГ» на модели антибиотик-ассоциированного дисбактериоза у белых крыс.

3. Определить влияние субстанции «БАС-ЧГ» на гематологические, биохимические и иммунологические показатели организма у лабораторных животных.

4. Выявить динамику гистологического строения печени и кишечника лабораторных животных под влиянием разработанной субстанции «БАС-ЧГ».

**Научная новизна работы.** Впервые теоретически и экспериментально обоснована целесообразность использования зооглеи микробного симбионта *Medusomyces gisevii* в качестве перспективного сырья для создания ветеринарного препарата с комплексным пребиотическим и биостимулирующим действием.

Разработан эффективный препарат для ветеринарной медицины из зооглеи *Medusomyces gisevii* с комплексным механизмом пребиотического действия и влияния на морфофункциональные показатели организма при дисбактериозе за счет качественного сочетания в нем клетчатки, ферментов, органических кислот, аминокислот, макро- и микроэлементов, инактивированных микроорганизмов.

Впервые установлена оптимальная пребиотическая доза препарата «БАС-ЧГ», которая составила 400 мг/кг живой массы.

Доказано системное положительное воздействие разработанной субстанции на организм животных, что заключается в коррекции гематологических и биохимических показателей крови, а также в воздействии на иммунную систему организма.

На основе данных о гистологическом строении печени и кишечника экспериментальных животных под влиянием препарата из *Medusomyces gisevii* подтверждена его эффективность.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Полученные результаты углубляют и расширяют сведения о препаратах, используемых для коррекции дисбиотических нарушений микрофлоры и их последствий у животных, а также их влиянии на морфофункциональные показатели организма животных.

Разработанная на основе *Medusomyces gisevii* субстанция дополняет перечень ветеринарных препаратов – метабиотиков и может применяться в

ветеринарной медицине как эффективное средство выбора для терапии животных с нарушениями микрофлоры желудочно-кишечного тракта и развивающихся на этом фоне патологических процессов, а также для их профилактики.

Результаты исследования могут быть рекомендованы в качестве методических указаний при использовании микробных симбионтов для разработки эффективных ветеринарных пребиотических препаратов нового поколения, оказывающих системное действие на организм (в частности, иммуностропное и метаболизм корригирующее) и населяющую его микрофлору, а также при использовании вторичного сырья на предприятиях, производящих продукты на основе *Medusomyces gisevii*.

Сведения о морфофункциональных особенностях организма животных при применении препарата могут быть использованы в перспективе для разработки новых лечебных схем при различных системных патологиях, ассоциированных с нарушением иммунитета и метаболических процессов, развивающихся как на фоне дисбактериоза, так и независимо от его наличия.

Результаты исследований используются в учебном процессе ФГАОУ ВО «Северо-Кавказский федеральный университет» при проведении занятий по дисциплинам «Микробиология», «Общая биотехнология»; в учебном процессе ФГБОУ ВО «Донской государственной технической университет» при поведении занятий по дисциплинам «Цитология и гистология» и «Кормление животных с основами кормопроизводства»; ФГБОУ ВО «Донской государственной аграрный университет» при проведении занятий по дисциплинам «Внутренние незаразные болезни» и «Диетология»; ФГБОУ ВО «Чеченский государственный университет» при поведении занятий по дисциплинам «Иммунология» и «Микробиология», «Внутренние незаразные болезни» и «Ветеринарная микробиология и микология».

Результаты научных исследований используются в процессе научной и производственной деятельности и подкреплены актами о внедрении следующих организаций: межотраслевая научно-исследовательская лаборатория экспериментальной иммуноморфологии, иммунопатологии и

иммунобиотехнологии Института живых систем ФГАОУ ВО «Северо-Кавказский федеральный университет», лаборатория экспериментальной биологии и биотехнологии Научно-образовательного центра ГОУ ВО «Московский государственный областной университет», ООО «Крестьянское (фермерское) хозяйство «НИКОЛИНА НИВА», ИП Зинченко И.В. «Ветеринарный центр «На Пирогова», ООО «Русквас».

Результаты исследований по действию разработанной субстанции на организм экспериментальных животных использованы при выполнении базовой части государственного задания №2014/216 по теме «Разработка технологий комплексных ветеринарных биопрепаратов на основе экологически чистого регионального сырья животного, растительного и микробного происхождения» в 2014–2016 годах и положены в основу патента №2630457 РФ «Способ получения биологически активной субстанции с пребиотическим эффектом на основе *Medusomyces gisevii*».

**Методология и методы исследования.** Результаты исследований получены с использованием бактериологических, биотехнологических, гематологических, морфометрических, гистологических, статистических методов исследования.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Свойства зооглеи *Medusomyces gisevii* (чайный гриб) в совокупности с предложенными приемами переработки обуславливают широкий перечень характеристик, обеспечивающий ее полипатогенетический эффект при дисбактериозе и его последствиях у животных.

2. Биологически активная субстанция на основе зооглеи *Medusomyces gisevii* (чайный гриб) обладает пребиотическим эффектом по отношению к кишечной микрофлоре животных.

3. Динамика изученных морфофункциональных показателей организма при использовании разработанной биологически активной субстанции на основе зооглеи *Medusomyces gisevii* свидетельствует о её противовоспалительном, регенераторном, метаболизмкорректирующем, иммуностропном эффекте.



**Степень достоверности.** Исследования выполнены в лабораторных условиях на откалиброванном сертифицированном оборудовании с использованием стандартизированных реактивов и общепринятых методик. Полученные результаты обработаны с помощью программы Primer of Biostatistics (Version 4.03).

**Апробация результатов.** Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на ежегодной научно-практической конференции «Университетская наука – региону» (Ставрополь, 2014-2018 гг.); Международной научно-практической конференции, посвященной 100-летию со дня рождения профессора О.П. Стуловой «Актуальные вопросы морфологии и биотехнологии в животноводстве» (Кинель, РИЦ СГСХА, 2015 г.); на VI Международной научно-практической конференции «Современные достижения биотехнологии. Новаии пищевой и перерабатывающей промышленности» (Ставрополь, 2016 г.); на Международной научно-практической интернет-конференции «Инновационные подходы в ветеринарной и зоотехнической науке и практике» (Ставрополь, 2016 г.); на 19-й международной научно-методической конференции по патологической анатомии животных «Актуальные вопросы патологии, морфологии, и терапии животных» (Ставрополь, 2017 г.).

**Личный вклад соискателя.** Постановка цели и задач, сбор и анализ литературы, планирование, организация и проведение исследований, а также статистическая обработка результатов выполнялись лично автором. Доля участия соискателя при выполнении работы составляет 85%.

**Публикации.** По материалам диссертации опубликованы 16 научных работ, в том числе 8 работ в периодических изданиях из перечня ведущих рецензируемых научных журналов, утвержденных ВАК Министерства науки и высшего образования Российской Федерации и рекомендованных для публикации основных научных результатов диссертации на соискание ученой степени, 1 работа в издании, включенном в библиографическую и реферативную базу данных «Scopus» (Медицинский вестник Северного Кавказа), 1 работа в издании,

включенном в библиографическую и реферативную базу данных «Web of science» (Indian Journal of Animal Sciences), получен 1 патент на изобретение.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация изложена на 149 страницах компьютерного набора, иллюстрирована 33 рисунками, в том числе 30 фотографиями, 9 таблицами. Работа состоит из введения, глав обзора литературы, собственных исследований, а также заключения, списка сокращений и условных обозначений и приложений. Список использованной литературы содержит 356 источников, в том числе 102 – зарубежных авторов.

## 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Проблемы системных функциональных нарушений организма животных, связанные с дисбалансом кишечной микрофлоры

В последнее время специалисты различных областей ветеринарии и медицины все чаще обращают внимание на проблемы, связанные с нарушением микроэкологии кишечника.

Благодаря многочисленным исследованиям, к настоящему моменту достоверно установлено, что организм теплокровных находится в тесной взаимосвязи с населяющей его микробиотой, образует с ней единую высокоорганизованную, саморегулирующуюся систему, которая является координатором равновесия компонентов внутренней среды на генетическом, клеточном, метаболическом и регуляторном уровнях [16, 25, 67, 122, 135, 136, 174, 177, 206,].

Наиболее колонизирован микрофлорой кишечный тракт, а именно толстый кишечник. По данным ряда авторов, в нем обитает около четырехсот видов микроорганизмов, а количество микробных клеток в 1 г кишечного содержимого достигает  $10^{14}$  [55, 348].

Основная часть микрофлоры кишечника птиц и млекопитающих представлена строгими анаэробными микроорганизмами, не образующими спор, такими как лактобациллы, бифидобактерии, энтерококки и бактериоиды, а также факультативными анаэробами – эшерихиями, клостридиями, дрожжеподобными грибами и др. [33, 49, 55, 142, 169, 175, 176, 178, 279].

Стоит обратить внимание, что наибольшую долю микроорганизмов у моногастричных животных всех возрастов и у жвачных до становления рубцового пищеварения составляют именно представители родов *Bifidobacterium* и *Lactobacillus*. Данные микробиологических исследований показывают отсутствие существенных различий в общем количестве бактерий, определяемых в толстом кишечнике человека, птиц и млекопитающих животных, хотя содержание представителей отдельных родов и видов может значительно различаться [120].

Взаимоотношения между организмом-хозяином и населяющей его микрофлорой имеют характер устойчивого симбиоза [235]. При отсутствии существенных стрессовых воздействий в течение всей жизни количественный и видовой баланс микроорганизмов в организме хозяина колеблется незначительно и в норме находится с ним в состоянии динамического равновесия, получившего определение «эубиоз» [15, 29, 20, 21, 71, 141, 235].

В научной литературе неоднократно встречается сравнение микрофлоры с саморегулирующимся «экстракорпоральным органом», реализующим обширный ряд незаменимых функций, благодаря которым обеспечивается поддержание гомеостаза организма [154, 270, 334, 336].

Основные функции нормальной микрофлоры разнообразны. Их можно подразделить на четыре большие группы: трофическая (пищеварительная), синтетическая, детоксикационная, иммунная. О.Н. Минушкин с соавторами (1999) подразделяет эффекты деятельности микрофлоры на локальные и системные [6, 7, 25, 26, 49, 65, 66, 107, 143, 189, 256, 319].

Трофическая функция микрофлоры реализуется за счет участия ее в процессах расщепления и усвоения пищи микробного, растительного или животного происхождения. Стоит отметить, что некоторые вещества могут метаболизироваться только кишечной микрофлорой в связи с отсутствием у организма способности к выработке соответствующих ферментов [125]. Именно микрофлора кишечника принимает наиболее активное участие в углеводном обмене за счет процессов ферментации лактозы, фруктозы, глюкозы и более высокомолекулярных углеводов (целлюлозы, пектинов, крахмала и прочих). Без участия микрофлоры не возможен полноценный белковый метаболизм: протеазы и пептидазы, вырабатываемые бактериями, осуществляют гидролиз белков сначала до пептидов, а затем до аминокислот и пептидных остатков. Ферменты нормофлоры участвуют в обмене углерод- и азотсодержащих соединений: благодаря участию бактериальных уреаз в кишечнике происходит до 50% процессов общего метаболизма мочевины. Нормальная микрофлора кишечника задействована в расщеплении липидов и синтезе жирных и желчных кислот [28,

21, 113, 222, 256, 268, 277, 294, 326], принимая, таким образом, активное участие в метаболизме билирубина и холестерина [18].

Большое значение придается мощной синтетической способности нормофлоры. Микроорганизмы кишечника синтезируют вещества, необходимые для метаболических реакций. Это относится, прежде всего, к основным витаминам группы В, С, К, никотиновой, фолиевой, пантотеновой кислоте, биотину, нафтохинонам, некоторым незаменимым аминокислотам, нейротрансмиттерам, гормоноподобным субстанциям [122, 151, 320]. Продуцируемые микробами летучие жирные кислоты принимают участие в усвоении витамина D, регуляции абсорбции ионов натрия, калия, хлора и воды, а также кальция, магния, железа, цинка, контролируют содержание бикарбоната натрия и уровень рН, то есть поддерживают электролитный и кислотно-щелочной балансы в организме [22, 125, 151, 166, 231, 254, 295, 348].

Нормальная микрофлора кишечника осуществляет защиту макроорганизма за счет обеспечения его колонизационной резистентности в результате конкурентной борьбы за экологические ниши и питательные субстраты с патогенными и условно-патогенными микробами. Кроме того, она вырабатывает специализированные вещества (перекись водорода, органические кислоты, бактериоцины, лизоцим), сдерживающие рост патогенов [20, 134, 281, 293, 324], и является первым барьером для всех чужеродных объектов, проникающих в желудочно-кишечный тракт.

Особо следует подчеркнуть иммуностимулирующую функцию нормальной кишечной микрофлоры, изучению которой, как одной из важнейших, посвящено множество работ [109, 157].

А.И. Хавкин (2003, 2006) называет кишечник самым большим иммунным органом в организме и констатирует, что эффективность работы его иммунокомпетентных клеток находится в прямой взаимосвязи с активностью нормальной микрофлоры [66, 227, 228]. Эффект, оказываемый микрофлорой, проявляется в усилении фагоцитарной активности макрофагов, моноцитов и гранулоцитов; стимуляции и пролиферации плазматических клеток; увеличении

уровня специфического IgA; индукции синтеза цитокинов; стимуляции клеточных иммунных механизмов защиты. Индигенная микрофлора участвует в выработке активаторов и стимуляторов фагоцитарной (переваривающей и поглотительной) активности клеток моноклеарно-фагоцитарной системы. Доказано свойство структурных компонентов клеточной стенки грамположительных анаэробов участвовать в стимуляции иммунегенеза и активации системы моноклеарных фагоцитов. Мурамилдипептид, содержащийся в оболочках бифидо- и лактобактерий, активирует лимфопролиферативный ответ на T и B клеточные митогены, стимулируя образование цитотоксических T-лимфоцитов и продукцию иммуноглобулинов. Он многократно усиливает цитотоксические свойства натуральных киллеров, макрофагов, стимулирует синтез интерлейкинов и интерферонов, тем самым оказывая иммуномодулирующее действие [31, 32, 33, 52, 53, 65, 66, 109, 137, 157, 176, 311, 347].

Микроорганизмы нормофлоры стимулируют лимфоидный аппарат кишечника, осуществляют снижение проницаемости кишечного барьера и секреции медиаторов воспаления. Путем контакта с микроорганизмами через слизистую оболочку кишечника, постоянного проникновения небольшого количества бактерий, их антигенов и продуктов метаболизма в кровотоки поддерживается необходимая напряженность специфической и неспецифической иммунной системы [109, 120, 121, 135, 136, 227, 228, 311].

Безусловным доказательством значения микрофлоры для корректного функционирования организма являются исследования, проведенные на безмикробных животных – гнотобионтах. Показано, что такие особи страдают от многочисленных нарушений, таких как сокращение и истончение слизистой оболочки кишечника, снижение перистальтики, основного обмена веществ, объема крови и ударного объема сердца, изменение функций желез. Иммунитет у них не просто подавлен, а происходит инволюция иммунокомпетентных органов [9, 10, 66, 216, 244, 286, 298, 327].

Учитывая многообразные и разносторонние функции нормальной микрофлоры, закономерным является вывод о том, что любой дисбаланс в

системе «хозяин-микробиота» способен привести к нарушениям в организме не только на локальном, но и на системном уровне. Данное состояние обозначается термином «дисбактериоз», под которым понимают клинико-лабораторный синдром, связанный с изменением качественного и/или количественного состава микробиоты кишечника, ее биохимических и ферментативных свойств с последующим развитием метаболических и иммунологических нарушений и возможным развитием желудочно-кишечных расстройств, а также с возможностью нормальной микробиоты транслоцироваться в несвойственные ей биотопы [32, 96, 174, 284].

Причины и факторы, обуславливающие возникновение нарушений микробиоты кишечника у животных, весьма разнообразны. Основными внешними факторами в ветеринарии и животноводстве являются: несоблюдение правил ветеринарно-санитарной гигиены, использование антигельминтных и химиотерапевтических препаратов, недоброкачественных кормов, несбалансированный рацион, голодания, стрессы, перемещение животных в новую геохимическую провинцию, радиация, пребывание в экстремальных условиях, прерывания контакта с материнским организмом, изоляция от внешней среды, обсемененность корма, бактериальные инфекции, гельминтозы. К внутренним факторам относятся: возраст (новорожденный, старческий), болезни органов пищеварения, оперативные вмешательства, тяжело протекающие заболевания эндокринной, нервной систем, болезни обмена веществ, онкологические и аллергические болезни, связанные с патологией желудочно-кишечного тракта [223]. По мнению Н.В. Гончара (2009) и А.Н. Панина с соавторами (2012) и ряда других авторов главенствующей причиной возникновения дисбактериозов в современном мире является повсеместное бесконтрольное применение антибактериальных препаратов [60, 71, 72, 175].

При дисбактериозе нарушается нормальное соотношение аэробной и анаэробной кишечной микробиоты, что в первую очередь выражается в снижении доминирующих представителей эубиоты (лакто- и бифидобактерий) на 1-2 и более порядка, на фоне возрастания количества кишечной палочки с измененными

ферментативными свойствами, условно-патогенных микроорганизмов (стафилококков, грибов рода *Candida*, энтеробактерий), проникновения в кишечник посторонних патогенных агентов. Ряд исследователей выделяет так называемый скрытый дисбактериоз, выражающийся не в изменении количества и соотношения различных групп нормальной микрофлоры, а в снижении их функциональной активности, что в конечном итоге приводит к клинически выраженным нарушениям микробного статуса организма [153, 341].

Как отмечает Е.А. Сабельникова (2011), дисбактериоз всегда является следствием того или иного воздействия, однако возникнув, в большинстве случаев он сам выступает катализатором процесса формирования многих заболеваний и способен многократно усугубить развитие основного патологического процесса [14, 30, 32, 66, 102, 195, 227, 228].

Дестабилизация равновесия микробных ассоциаций мешает выполнению их основных физиологических функций, в результате чего образуется дополнительная брешь в защитной системе организма, снижается проницаемость кишечного барьера, возникает угроза снижения колонизационной резистентности по отношению к внешним патогенам. На фоне ослабления представителей непатогенной микрофлоры создаются условия для роста количества собственных условно-патогенных микроорганизмов, который не сопровождается ростом числа антител. В связи с тем, что иммунная система не дает своевременного ответа, развивается затяжной эндогенный инфекционный процесс [128, 234].

Нарушения микрофлоры кишечника напрямую ведут к угнетению функций кроветворения, снижению факторов естественной резистентности – лизоцимной, бактерицидной и фагоцитарной активности, циркулирующих иммунных комплексов [176].

Микроэкологические взаимосвязи кишечника очень тонки и разносторонни, поэтому не только повышение, но и понижение численности условно-патогенных микроорганизмов способно негативно отразиться на функциях микрофлоры. В первую очередь это касается снижения количества кишечной палочки с нормальными ферментативными свойствами, которое ведет к снижению числа



плазматических клеток, продуцирующих секреторный IgA, активный в отношении эшерихий и других энтеробактерий, имеющих с ними антигенное родство. Недостаток IgA и его секреторного компонента ведёт к уменьшению вирус- и токсиннейтрализующей активности, способности подавлять адгезию патогенов на энтероцитах. Ослабление местного иммунитета слизистой оболочки в таких случаях может оказаться решающим фактором в развитии инфекционного процесса как бактериальной, так и вирусной этиологии. Возникает замкнутый круг, в котором сопутствующие нарушения иммунитета препятствуют самостоятельному восстановлению микробного баланса [30, 174, 175, 188, 189, 217, 238, 299, 300, 311].

Ю.А. Копанев (2009) обращает внимание, что, учитывая значительное взаимодействие между биоценозом кишечника и системой местного иммунитета кишечника, целесообразно считать дисбактериоз не только микробиологической, но и иммунологической проблемой, что, по мнению автора, должно отражаться в лечебной тактике [120].

По сообщениям А.Н. Маянского (2000), А.И. Парфенова с соавторами (2001), В.В. Новосада, И.В. Кумова (2009), О.В. Квана с соавторами (2006) [114, 137, 145, 161, 169, 178, 179] при дисбактериозах кишечника резко нарушаются процессы синтеза ферментов, незаменимых соединений и усвоения всех пищевых ингредиентов (жиров, белков, углеводов, витаминов, микроэлементов), что приводит к ограничению поступления в организм пластического и энергетического материала, нарушению всех видов метаболизма [214, 236]. Снижение синтеза летучих жирных кислот является ударом по питательным потребностям эпителиоцитов и пусковым механизмом к развитию воспалительных заболеваний слизистой оболочки кишечника, хронического и язвенного колита, синдрома раздраженного кишечника [53, 228, 229].

Помимо этого, страдает и перистальтика кишечника. Так, S. Mazmanian, J. Round, D. Casper (2008), выяснили, что увеличение представителей лактобифидофлоры усиливают пропульсивную моторику кишечника, в то время как высокая активность эшерихий наоборот ее угнетают [310].

Большинство исследователей особо заостряют внимание на тесной взаимосвязи работы микрофлоры желудочно-кишечного тракта с нормальным функционированием печени. П.В. Селиверстов с соавторами (2010) приравнивает микрофлору пищеварительного тракта ко второму основному после печени детоксицирующему органу, участвующему в поддержании гомеостаза. При снижении синтетической, трофической и детоксикационной функций микрофлоры именно печень принимает на себя первый «удар». Карнейро де Мура (2001) и ряд других авторов описывают теорию взаимосвязи дисбаланса микрофлоры толстой кишки с нарушением липидного метаболизма и возникновением дислипидемий. При затяжном течении дисбактериоза и усиленном размножении патогенных анаэробов повышается токсическая нагрузка на ферментные системы печени, появляются прямые предпосылки для возникновения ее метаболических и структурных нарушений [112, 197, 210, 253, 322].

Таким образом, рассмотренные литературные сведения подтверждают наличие у кишечной микрофлоры целого ряда функций, которые реализуются на локальном и системном уровне и обеспечивают поддержание успешного функционирования макроорганизма. Дисбаланс, возникший в микрoэкологической системе под влиянием каких-либо внешних или внутренних факторов, является катализатором изменения физиологического статуса организма, в котором манифестируются нарушения иммунитета и всех видов метаболизма, сопряженного с негативным влиянием на печень. Угнетение физиологической активности основных представителей эубиоза негативно сказывается на сопротивляемости животных возбудителям инфекций, способствует развитию и усугублению воспалительного процесса в кишечнике, что в конечном итоге приводит к снижению жизнеспособности животных и получению сельскохозяйственной продукции низкого качества.

## **1.2. Способы коррекции микробиоценоза кишечника и последствий его нарушения**

В свете многочисленных данных, подтверждающих исключительную роль нормальной микрофлоры кишечника в обеспечении успешного функционирования организма, не вызывает сомнения, что изыскание путей поддержания ее баланса, а также быстрая коррекция и своевременная профилактика ее нарушений является одним из важнейших и перспективных направлений в ветеринарной биотехнологии.

Согласно современным методическим рекомендациям, мероприятия по лечению и предупреждению дисбактериозов предполагают комплексный подход, в цели которого входит: борьба с излишней бактериальной обсемененностью системы при наличии таковой; удаление токсичных продуктов обмена веществ бактерий зачастую путем энтеросорбции; нормализация моторики кишечника; восстановление баланса нормальной кишечной микрофлоры и ее функциональной активности; стимуляция иммунной реактивности организма [7 - 10, 140, 141, 223].

Однако следует отметить, что подобный комплексный подход, прежде всего, относится к лечению дисбактериозов у человека, в то время как применение традиционно оправданных схем в ветеринарии бывает серьезно затруднено.

В большинстве случаев для решения задач профилактики и коррекции нарушений микроэкологии кишечника предлагается использование пробиотиков, пребиотиков, синбиотиков и различных их комбинаций [91, 102, 133].

За последнее время в ветеринарной практике наиболее широкое внедрение получили пробиотики – бактериальные препараты, содержащие в своем составе один или несколько штаммов живых микроорганизмов, введение которых оказывает положительное влияние на физиологические функции, биохимические и иммунные реакции организма через оптимизацию его микроэкологического статуса [8 - 10, 73, 74].

Еще с начала XX века в качестве традиционных компонентов пробиотиков

используются доминирующие представители физиологического нормоценоза теплокровных – штаммы микробов, принадлежащие к родам *Bifidobacterium* и *Lactobacillus*. Их поступление в организм за счет высоких адгезивных свойств [136] теоретически призвано обеспечить заселение пустующих экологических ниш кишечного тракта штаммами полезных бактерий-пробионтов, которые за счет конкурентной борьбы и вырабатываемых ими метаболитов должны вытеснять патогенную микрофлору из состава кишечного микробиоценоза [25, 26, 132]. С относительно недавнего времени в составы препаратов начали вводить представителей условно-патогенной микрофлоры (виды *Enterococcus*, *Escherichia*, *Propionibacterium*, *Streptococcus*) и даже вовсе нетипичной для нормоценоза (*Bacillus*, *Saccharomyces*, *Aspergillus*, *Risopus*, *Cordiceps*) [40, 160, 201, 254, 261, 308, 333, 337, 338].

Пробиотики считаются довольно безвредными препаратами [201]. В настоящее время они пользуются популярностью и используются для всех без исключения видов животных в ветеринарных клиниках и различных отраслях животноводческого хозяйства, в составе кормов или полноценной терапии [48, 104, 129, 135, 136, 170, 204, 224, 352]. Популярные препараты отечественного и зарубежного производства («Бифидум-СХЖ», «Зоонорм», «Лактоамиловорин», «Ветом 1.1», «Биоспорин», «Колибактерин», «FortiFlora» и другие), успешно применяют с целью профилактики диарейных заболеваний, повышения иммунитета, сохранности, роста и развития молодняка животных и птиц [13, 49, 89, 145, 158, 162, 164, 202, 272].

По сообщениям большого числа авторов, к наиболее ярким положительным сторонам применения пробиотиков относится высокий терапевтический результат при лечении желудочно-кишечных расстройств, восстановление естественного баланса микрофлоры, нормализация обмена веществ и как следствие заметный ростостимулирующий эффект. Явная антагонистическая активность штаммов-пробиотиков по отношению к ряду условно-патогенных и патогенных микробов даже позволяет сравнивать их действие в организме с результатом применения антибиотиков, и в некоторых случаях рекомендовать их как замену данным

препаратам. Кроме того, особо отмечается прямое иммуностимулирующее влияние вносимых в организм бактерий и, как следствие, повышение его общей устойчивости [5, 33, 68, 106, 210, 230, 296].

Однако, наряду с большим количеством данных о положительном влиянии пробиотиков, в научной практике до сих пор не угасают споры об их эффективности и целесообразности применения.

Ф.С. Хазиахметов и А.А. Башаров (2012 г) отмечают, что пробиотики далеко не во всех случаях сильного расстройства желудочно-кишечного тракта молодняка животных проявляют лечебный эффект. По мнению Л.К. Пархоменко, Е.В. Репетева (2006) в большинстве своем препараты пробиотики имеют довольно узкий спектр дисбиотической активности. Эксперименты А. Bezkorovainy (2001), И.В. Дармова с соавторами (2011, 2012) в лабораторных условиях и на живых моделях показали, что при прохождении по желудочно-кишечному тракту численность пробиотических микроорганизмов снижается до сотен микробных клеток, поэтому чтобы обеспечить их эффективность необходимо прибегать к разработке дополнительных средств защиты. Кроме того, применение высоких доз пробиотиков иногда провоцируют усиление диареи, симптомов раздражения кишечника, а также иммунных нарушений [35, 73, 74, 90, 180, 220, 229, 238, 239, 262, 309].

Ряд исследователей предполагает, что, скорее всего, описываемые в литературе положительные эффекты применения пробиотиков оказываются преимущественно транзиторно и опосредованно за счет продукции ими метаболитов [149, 220, 221, 238, 239].

Применение пробиотиков сопряжено с рядом технологических недостатков, к которым относятся неудобства, связанные с малым сроком хранения жидких форм препарата, ведь в данном случае необходимо сохранять высокую концентрацию именно живых бактерий. Сухие пробиотики, как правило, показывают гораздо меньшую активность, по сравнению с жидкими, что связано с длительным сроком восстановления активности микроорганизмов в среде пищеварительного тракта и их быстрой элиминацией [11, 73, 74, 133, 239].

По мнению И.А. Ерюхина с соавторами (1997), Данилевской Н.В. (2008) производители пробиотиков, учитывая перечисленные несовершенства, зачастую руководствуются коммерчески выгодными качествами штаммов, их низкой стоимостью и легкостью культивирования, способностью выдерживать высокие температуры при гранулировании, длительными сроками хранения получаемой продукции, вместо того, чтобы сосредоточиться на их истинных физиологических и терапевтических свойствах [71, 92].

Предпосылкой тому, чтобы опровергнуть безоговорочную безопасность пробиотиков, служит постулат, согласно которому кишечный микробиоценоз каждого организма является сложной экосистемой, строго индивидуальной и неповторимой. Изменения в этой ассоциации при неконтролируемом внесении отдельных микроорганизмов могут иметь непредсказуемые последствия и остаются недостаточно изученными. Именно поэтому к назначению пробиотиков в качестве лекарственного средства или дополнения к корму следует подходить с особой осторожностью [66, 71, 72].

Так, Н.В. Данилевская (2008 г) в своей статье отмечает сложность восстановления пищеварения и микробиоценоза у мелких домашних животных. Она приводит описание клинического случая, в котором длительное скормливание коту сухого корма, обогащенного пробиотиком, вместо положительного эффекта спровоцировало дисбактериоз с повышенным содержанием в фекалиях микроорганизмов *Enterococcus faecium* и *Escherichia coli*, что обусловило длительную антибиотикотерапию, сопровождавшуюся резким ухудшением состояния здоровья животного. Этот случай, по мнению автора, наглядно дает понять, что длительно вводимый в больших дозах микроорганизм может существенно изменить соотношение различных представителей нормофлоры не только кишечника, но и других открытых полостей. Например, обилие энтерококков в фекалиях и моче в описанном выше прецеденте связывается именно с тем, что этим микроорганизмом был обогащен готовый корм, который животное получало постоянно [71].

Эксперименты Л.Ю. Ниловой, А.Г. Бойцова, Е.А. Оришак (2008 г) показали,

что коммерческие пробиотические препараты лакто- и бифидобактерий и собственные микроорганизмы хозяина могут проявлять антагонизм в отношении друг друга. Данный факт дает основания предположить, что введение в организм высоких концентраций пробиотических лактобактерий способно спровоцировать или усугубить дисбаланс в микробиологической системе хозяина [159], а также спровоцировать чрезмерную ответную иммунную реакцию [180, 220-222].

Не стоит также забывать, что бактерии-пробионты могут обладать генами патогенности или устойчивости к антибиотикам [11, 30]. М.А. Шевяков (2006) сообщает об опасности введения в ослабленный организм атипичной или потенциально патогенной флоры, что может приводить к непредсказуемым инфекционным осложнениям [243]. Э.В. Карнаух, А.Н. Базалева (2013) обращают внимание, что при неграмотном применении даже самый лучший пробиотик может спровоцировать серьезные осложнения (аллергические реакции, цитокиновый дисбаланс, желче- и мочекаменную болезнь, ожирение и др.) [110, 285].

Таким образом, применение пробиотиков требует разработки индивидуальных схем, тщательного расчета терапевтической дозы и строгого соблюдения санитарно-гигиенических требований [220, 222].

Закономерно полагать, что с целью коррекции дисбиотических нарушений микрофлоры наиболее физиологичным является не попытка внедрения в организм чужеродных пробиотических штаммов, а стимуляция собственных резидентных микроорганизмов [153, 243]. С этой позиции предпочтительным является использование альтернативных средств регуляции микробиоценоза, коими являются пребиотики – пищевые ингредиенты, способные улучшать здоровье хозяина за счет избирательной стимуляции роста или активности одного, или нескольких видов бактерий собственной микрофлоры кишечного тракта [64-66, 279, 340].

Концепция пребиотиков начала развиваться в полную силу относительно недавно, лишь в конце XX века, и пришла в ветеринарию из гуманитарной медицины, а точнее из отрасли так называемого «функционального питания» [87,

244, 328-330]. Согласно общепринятым критериям, пребиотиками считают вещества различного происхождения, которые обладают устойчивостью к действию желудочного сока, не расщепляются ферментами желудочно-кишечного тракта и не всасываются в нем, но одновременно ферментируются бактериями традиционно нормальной микрофлоры, избирательно стимулируют ее размножение и функциональную активность в благоприятную для макроорганизма сторону [59, 64, 65, 279, 340].

К пребиотикам относят большое число соединений, так или иначе стимулирующих микрофлору организма-хозяина: растворимые и нерастворимые пищевые волокна (моносахариды, дисахариды, олигосахариды, полисахариды), пептиды, ферменты, аминокислоты, антиоксиданты (витамины, каротиноиды, соли и др.), органические кислоты, ненасыщенные жирные кислоты, всевозможные экстракты и др. [6-8, 187, 193, 226, 279, 346].

Пребиотики способны оказывать широкий спектр действий на организм, который реализуется преимущественно через запуск сложного многоступенчатого каскада реакций [100]. Механизм основного «пребиотического» эффекта главным образом опосредован через воздействие на нормальную микрофлору кишечника, преимущественно сахаролитическую (лакто-, бифидобактерии, бактероиды и ряд других представителей), для которой данные вещества создают благоприятную среду обитания или являются пищевым сырьем. Один из предполагаемых механизмов пребиотического действия заключается в том, что проходя транзитом через верхние отделы желудочно-кишечного тракта, попадая в кишечник, под воздействием микробных ферментов пребиотики могут подвергаться гидролизу с образованием летучих жирных кислот (масляной, уксусной, пропионовой и других). Полученные таким образом жирные кислоты являются главным энергетическим субстратом для клеток кишечного эпителия. Они вовлекаются в цикл Кребса и обеспечивают рост и регенерацию слизистой оболочки. В то же время жирные кислоты оказывают осмотическое действие, что приводит к увеличению объема фекальных масс [7, 23, 100, 211, 303].

Как отмечает большинство авторов, использование пребиотических



препаратов способствует формированию наиболее гармоничного и физиологичного качественного и количественного состава микроорганизмов в кишечном тракте животных, начиная с первых дней жизни. Именно формирование индивидуального микробиоценоза с наиболее полным разнообразием симбионтов конкретного участка обеспечивает максимальный уровень колонизационной резистентности организма и способствует большей сопротивляемости заболеваниям в будущем [34, 51, 64, 65, 94, 249].

Наряду со стимуляцией собственной микрофлоры хозяина, наблюдаются и своего рода «побочные» положительные эффекты, которые зависят от свойств самого пребиотика и имеют некоторые отличия [100].

Так, например, пищевые волокна обладают огромным спектром физиологических эффектов, имеющих большое значение для нормальной жизнедеятельности организма. Они имеют свойство удерживать воду, регулируя подобным образом осмотическое давление в просвете кишечного тракта, состав электролитов в кишечном содержимом, увеличивают массу и объем фекалий. Растворимые пищевые волокна, формируя гелеобразованные структуры, препятствуют рефлюксам, способствуют опорожнению желудка и увеличивают скорость пассажа кишечного содержимого. Перечисленные эффекты в целом направлены на стимуляцию моторики желудочно-кишечного тракта [11, 135, 136, 176, 205, 221, 228].

Пищевые волокна проявляют детоксицирующее действие, которое объясняется их высокими адсорбционными свойствами. Они способны нормализовывать уровень триглицеридов и глюкозы в сыворотке крови за счет снижения всасывания липидов и углеводов в кишечнике. Адсорбция волокнами желчных кислот приводит к их уменьшенному всасыванию, что обеспечивает их регуляцию в организме и гипохолестеринемический эффект [19, 51, 151, 167].

Большую значимость в поддержании естественной популяции микрофлоры имеют нерастворимые пищевые волокна [206]. Не подвергаясь ферментации и не растворяясь в кишечном соке, они достигают толстой кишки, где создают обширную дополнительную поверхность, на которой фиксируются различные

бактерии кишечника. Это приводит к резкому увеличению количества микроорганизмов на единицу объема кишки и возрастанию метаболической активности кишечного содержимого, в том числе и продукции ими бактериальных ферментов и продуктов с иммуномодулирующими свойствами [24]. При этом в первую очередь фиксации подвергаются бифидо- и лактобактерии [205, 206].

Некоторые авторы, впрочем, полагают, что избыточное потребление пищевых волокон способно пагубно отразиться на балансе витаминов, минеральных и других соединений в организме [205, 206].

Наиболее известным в мире пребиотиком является лактулоза – синтетический дисахарид, химический изомер лактозы. Сильный бифидогенный эффект этого соединения позволил с успехом использовать его в ветеринарии в составе препаратов «Ветелакт», «Дюфалак», «Лактусан» и прочих для оптимизации микробиоценоза и процессов пищеварения у животных. В препарате «Экофилтрум» лактулоза находится в сочетании с сорбентом лигнином [24, 39, 103, 105, 124, 157, 199].

Исследования О.Н. Бобрик (2005), Г.Ф. Бовкун (2003, 2004, 2005) и других показывают, что введение препаратов лактулозы способствует раннему становлению микробиоценоза у животных, их сохранности в крупных промышленных хозяйствах [11]. Помимо основного эффекта, лактулоза способствует увеличению численности популяции лактобактерий и других сахаролитических микроорганизмов, попутно обеспечивает антитоксическое действие, стимуляцию перистальтики кишечника, улучшение всасывания фосфатов, солей кальция. [66]. Лактулоза обладает опосредованным антиинфекционным действием по отношению к иерсиниям, шигеллам, сальмонеллам и ротавирусам, которое она реализует за счет стимуляции роста нормальной микрофлоры кишечника [325].

Одним из особенных свойств лактулозы является заметный послабляющий эффект, реализуемый за счет многократного усиления осмотического давления в кишечнике, что одновременно может рассматриваться и как преимущество, и как

недостаток этого соединения.

Фруктоолигосахариды, в частности инулин, получили не меньшее признание в мировой практике. Инулин является полимером фруктозы, который в чистом виде получают из сырья растительного происхождения (цикория, топинамбура, всевозможных фруктов). Установлено, что введение в рацион фруктоолигосахаридов и инулина способствует улучшению всасывания организмом магния и кальция, регулирует секрецию желудочно-кишечных пептидов, принимающих участие в метаболизме жиров, снижает уровень триглицеридов и модулирует секрецию инсулина. Данные эффекты играют принципиально важную роль в противовоспалительной и антиканцерогенной активности.

Многочисленные клинические исследования и эксперименты на животных подтверждают иммуномодулирующее действие фруктоолигосахаридов. Так, установлено, что постоянное введение их в рацион оказывает влияние на активность лимфоцитов, фагоцитов, сигнальных молекул иммунной системы, в том числе интерферона и фактора некроза опухоли. Олигофруктоза и инулин оказывают влияние на работу селезенки и лимфоузлов, в частности на увеличение количества Т-лимфоцитов, молекул главного комплекса гистосовместимости II класса на поверхности антиген-презентирующих клеток, уровня интерлейкинов 2 и 4 в крови.

Некоторые исследователи предполагают, что данный эффект является опосредованным через положительное влияние вещества на состав и функциональную активность представителей кишечного эубиоза и осуществляется двумя путями: 1) оптимизация состава и иммуномодулирующей функции кишечной микрофлоры (прежде всего толстой кишки); 2) регуляция продукции микрофлорой летучих жирных кислот, являющихся прямыми участниками иммунного ответа [19, 216, 237, 258, 266, 275, 297, 299, 304, 323, 328, 330, 335, 345, 354, 355]

В ряду пребиотиков особенное место занимают так называемые подкислители – препараты, изготавливаемые на основе органических кислот. Их

применение осуществляет прямую регуляцию кислотности в желудке и кишечнике, понижение уровня рН до оптимального и наиболее благоприятного для развития собственной полезной микрофлоры. Одновременно со снижением кислотности в желудочно-кишечном тракте снижается и количество кишечной палочки с низкой ферментативной активностью, сальмонелл, шигелл и других патогенных и условно-патогенных микроорганизмов.

В основном подкислители добавляют в корма и питьевую воду животным и птице. Наиболее часто для этих целей используют уксусную, муравьиную, пропионовую, молочную, лимонную, яблочную, виноградную, сорбиновую, фумаровую и другие кислоты [92, 209]. Добавление в рацион животным органических кислот способствует усиленной выработке панкреатического сока поджелудочной железой, что благоприятно отражается на переваривании и усвоении всех питательных веществ корма. В результате улучшенной конверсии белков, жиров и углеводов организмом снижается количество доступного субстрата для патогенных бактерий [91, 165, 246].

Короткоцепочечные жирные кислоты являются основным продуктом микробной ферментации пищевого субстрата и одним из ключевых источников энергии для разных органов и тканей, начиная от непосредственно кишечника заканчивая головным мозгом. Они принимают участие в обмене веществ, синтезе витаминов, гормонов, нейромедиаторов и других биологически активных соединений, регуляции водного, солевого, кислородного баланса, обладают антиканцерогенным и прямым бактерицидным и противовоспалительным действием [6, 7, 56, 153, 186, 313, 350].

В связи с тем, что дисбиотические нарушения в желудочно-кишечном тракте сопровождаются изменением ферментного статуса организма, возрастанием напряженности углеводного и других видов метаболизма, важными регуляторами пищеварительного процесса, одновременно оказывающими опосредованное пребиотическое действие, являются кормовые ферменты [108, 130, 214]. Их применение не способно оказать влияние на видовой состав кишечной популяции, однако может подействовать на функциональную

активность ее представителей путем реализации максимального потенциала их пищевой базы. Например, введение дополнительных энзимных компонентов в рацион птицы помогает разрушать полисахариды оболочки зерна, что делает более доступным для дальнейшего использования пищеварительной системой организма высвободившегося белка и крахмала. Способность разрушать некрахмалистые полисахариды снижает плотность содержимого кишечника и способствует его ускоренному движению по пищеварительному тракту. Улучшенное усвоение пищевых ресурсов в определенной степени ослабляет конкуренцию микроорганизмов за необходимый субстрат. Таким образом, косвенно осуществляется дополнительная регуляция благоприятного уровня микрофлоры и сдерживание активности условно-патогенных представителей [115, 245].

Помимо прямого пищеварительного действия, ферменты обладают еще и дополнительными свойствами. В. Голубев (2016) отмечает, что у жвачных животных применение ферментов, в частности амилаз, целлюлаз, глюкеназ в составе комплексного препарата «Румистарт» оказывает влияние на моторику рубца, препятствует атонии преджелудков и развитию ацидоза вызванного большими объемами кислого корма [58]. Стоит отметить, что недостаток ферментов в организме животного зачастую дополнительно восполняется именно введением бактериальных препаратов, в которых ферменты являются продуктами метаболизма микроорганизмов [2, 203].

С давних пор известна и противовоспалительная активность ферментов, которая может быть особенно важной в условиях затяжного дисбактериоза, отягощенного эндогенным воспалительным процессом в кишечнике. Так, на отечественном рынке с недавнего времени представлен препарат широкого спектра действия «Вобэнзим», сочетающий в своем составе композицию ферментов растительного и животного происхождения (трипсин, липазу, амилазу, папаин и др.), которые в совокупности проявляют иммуномодулирующие, противовоспалительные, анальгезирующие и прочие свойства [119]. За рубежом в качестве противовоспалительных средств применяют препараты чистой

бактериальной альфа-амилазы «Biogaran», «Buclamase» или «Maxilase» [93, 152, 265, 269, 286, 319, 312].

Еще более молодой концепцией, только набирающей обороты в мировой практике, является использование для профилактики желудочно-кишечных расстройств, ассоциированных с нарушениями микрофлоры, препаратов синбиотиков, сочетающих в себе одновременно комбинацию про- и пребиотика, а также метабиотиков – принципиально новых препаратов на основе продуктов метаболизма или структурных компонентов пробиотических микроорганизмов. Выделение последних в самостоятельный класс мировыми сообществами произошло лишь в 2008 году, и в настоящее время метабиотики широкое распространение получили исключительно в гуманной медицине [6, 246, 339].

Механизм действия метабиотиков является пребиотическим. Он призван оптимизировать всевозможные специфические функции организма хозяина посредством взаимодействия с его индигенной микрофлорой, создавая так называемый «управляемый микробиоценоз» [6].

Многие авторы отмечают, что главным достоинством метабиотиков является высокий профиль безопасности вследствие отсутствия в составе живых микроорганизмов. При этом одновременно сохраняется выраженное положительное влияние и иммуностимулирующее действие на организм, присущее пробиотикам [4, 6, 28, 186].

В линейке таких препаратов одним из первых является «Закофальк», в состав которого входит пребиотик инулин и бутират – соль масляной кислоты. Масляная кислота – одна из трех короткоцепочечных жирных кислот, основных продуктов бактериального метаболизма, которая является главным поставщиком энергии для клеток кишечника, стимулирует рост и обновление клеток слизистой оболочки и принимает участие в формировании слизистого слоя, а также регулирует сигнальные и метаболические реакции в желудочно-кишечном тракте. Применение бутирата обладает общим противовоспалительным эффектом за счет снижения уровня провоспалительных цитокинов [9, 10, 150, 153].

В состав популярного метабиотика «Хилак форте» входит стерильный

раствор метаболитов таких представителей нормальной микрофлоры, как *Lactobacillus acidophilus* и *helveticus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus faecalis*. Так как перечисленные микроорганизмы имеют разный тип обмена веществ (сахаролитический и протеолитический), продуцируют широкий перечень биоактивных соединений и жирных кислот, влияние данного препарата на организм осуществляется комплексно за счет одновременного воздействия на широкий перечень представителей кишечного эубиоза [121, 186].

Метабиотический препарат «Актофлор» сочетает в себе низкомолекулярные синтетические метаболиты бактерий, среди которых органические кислоты и аминокислоты: янтарная кислота, молочная кислота, муравьиная кислота, гидроксид натрия, ацетат натрия, глутаминовая кислота, валин, лизин, метионин, аланин, глицин, лейцин, аспаргиновая кислота. Препарат обладает высокой пребиотической и иммуностимулирующей активностью [41, 60, 215].

Особенное внимание в ряду метабиотиков привлекают искусственно созданные комбинированные препараты, в которых одновременно сочетаются разнонаправленные преимущества пребиотика. Одним из таких является «Бактистатин», в который согласно спецификации производителя, входит стерилизованная высушенная культуральная жидкость бактерии *Bacillus subtilis* (пробиотическая составляющая), минерал цеолит (энтеросорбент), гидролизат соевой муки (пребиотическая составляющая). Активные метаболиты *B. subtilis* представляют собой уникальный набор естественных биологически активных компонентов: бактериоцины, лизоцим, ферменты, полипептиды, аминокислоты и др. Их совокупность обеспечивает коррекцию дисбиотических изменений нормофлоры за счет прямого подавления условно-патогенных микроорганизмов и стимуляции функциональной активности собственных бактерий кишечника; параллельно оказываются иммуномодулирующие эффекты. Цеолит выполняет две функции: селективную сорбцию нежелательных продуктов обмена (токсинов) бактерий и является носителем действующих веществ. Гидролизат соевой муки обладает прямым пребиотическим действием и осуществляет стимуляцию роста

бифидобактерий, и помимо этого, является для организма дополнительным источником витаминов, микроэлементов и таких аминокислот, как глицин, глютаминовая кислота, аспарагиновая кислота, лейцин, лизин, аргинин, серин, тирозин, пролин и др. [1, 173].

Еще одним комплексным препаратом с наиболее широким спектром пребиотического действия является «Эубикор». В его составе сочетаются водорастворимые и водонерастворимые пищевые волокна, а также продукты метаболизма и сами инактивированные клетки дрожжей штамма *Saccharomyces cerevisiae (vini)*. По сообщениям исследователей полисахаридная оболочка дрожжевых клеток содержит глюканы, маннаны и гликогеноподобные единицы, которые являются стимуляторами неспецифического, а по некоторым данным и специфического иммунного ответа, так как обладают сильными антигенными свойствами. Маннаны клеточной стенки дрожжей взаимодействуют с рецепторами на поверхности условно-патогенных и патогенных бактерий, а также с их токсинами, выводя их из организма и тем самым усиливают его колонизационную резистентность [64].

Помимо этого, внутреннее содержимое дрожжевой клетки богато биологически активными соединениями, ферментами, витаминами, аминокислотами, микро- и макроэлементами. Их поступление в организм оказывает не только стимулирующее влияние на микрофлору кишечника, но и благоприятно отражается на других системах [98, 188, 194, 314, 328, 330]. Похожим механизмом действия обладает дрожжевой метабиотик «Агримос» [69, 208].

Подводя итог вышесказанному, можно сделать вывод, что в вопросах коррекции микрофлоры желудочно-кишечного тракта следует уделять внимание выбору правильной стратегии и применять по возможности наиболее комплексный разносторонний подход, учитывая не только особенности микроэкологии кишечника, но и особенности течения патологического процесса в каждом конкретном организме. При современной разнообразии средств профилактики и лечения дисбактериоза и его последствий, вопрос о выборе



наиболее подходящего и физиологичного препарата, особенно в условиях работы с животными, до сих пор остается открытым. Несмотря на то, что пробиотические препараты все еще широко используются в ветеринарии, наиболее предпочтительным в решении вопроса желудочно-кишечных расстройств и нарушения микрофлоры все же является применение пребиотиков и метабиотиков, способствующих сохранению естественной популяции микроорганизмов. Благодаря многим преимуществам современные исследователи отводят главную роль в эволюции путей коррекции микробных дисбалансов именно метабиотикам, а также производным от них комбинированным препаратам, оказывающим многоцелевое действие в отношении широкого перечня манифестирующих проявлений дисбактериоза, в частности они действуют не только на микрофлору, но и оказывают детоксикационный, противовоспалительный, иммуномодулирующий и прочие эффекты. Создание таких препаратов требует четкого понимания механизмов их конструирования.

Известно, что, несмотря на происхождение, в основу наиболее эффективных из них входят метаболиты микроорганизмов, пищевые волокна, ферменты, органические кислоты, аминокислоты. Анализ литературных сведений показал, что практически нет ветеринарных препаратов, обладающих комплексным патогенетическим действием на организм за счет сочетания вышеперечисленных биологически активных компонентов. В связи с вышеизложенным изыскание сырьевых резервов, разработка технологии подобных препаратов, а также оценка их действия на основные механизмы патологических процессов и манифестирующую симптоматику при дисбактериозе является актуальным направлением в ветеринарии.

## СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Диссертационная работа выполнялась в период с 2014 по 2019 г. на кафедре прикладной биотехнологии, на базе лаборатории экспериментальной иммуноморфологии, иммунопатологии и иммунобиотехнологии Института живых систем, на базе научно-исследовательской лаборатории «Нанобиотехнология и биофизика» Института живых систем ФГАОУ ВО «Северо-Кавказский федеральный университет», на базе ОУ Белорусского государственного технологического университета (Минск, Беларусь), в условиях ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт».

Объектом исследования являлись белые крысы-самцы линии Вистар. Материалом для исследования послужили фекалии, кровь и внутренние органы белых крыс, которым применяли новую биологически активную субстанцию «БАС-ЧГ» на основе *Medusomyces gisevii* (чайный гриб).

Исследование по теме диссертационной работы проведено при финансовой поддержке Минобрнауки России, в рамках выполнения базовой части государственного задания (2014/216) 2014-2016 гг. В работе использовались сведения о деятельности, любезно предоставленные предприятием ООО «Русквас» (Россия, Лыткарино).

*Вся экспериментальная работа осуществлялась в три основных этапа.*

*Первый этап* исследования включал в себя теоретическое и экспериментальное обоснование целесообразности разработки нового препарата на основе природного микробного симбионта *Medusomyces gisevii*, получение его экспериментальных серий и качественную характеристику препарата.

*На втором этапе* проводили подтверждение пребиотической эффективности и отработку оптимальной пребиотической дозы полученного препарата «БАС-ЧГ» на модели антибиотик-ассоциированного дисбактериоза у лабораторных животных.

На третьем этапе осуществляли морфофункциональное обоснование эффективности применения полученного препарата на лабораторных животных с использованием гематологических, биохимических, иммунологических, гистологических методов исследования биологических субстратов организма.

**Для первого этапа исследования** на основе теоретических предпосылок к созданию эффективных пребиотических препаратов в качестве сырья был выбран природный микробный симбионт *Medusomyces gisevii* (чайный гриб), из которого готовилась экспериментальная серия биологически активной субстанции с тестовым названием «БАС-ЧГ». В работе использовалась микробная ассоциация *Medusomyces gisevii alfa* ВКПМ Sa-10. Ассоциация *Medusomyces gisevii alfa* ВКПМ Sa-10 используется на предприятии ООО «Русквас» (Московская область, г. Лыткарино) при производстве живых напитков чайного гриба, является запатентованной, содержит три вида микроорганизмов: бактерии *Gluconacetobacter xylinus*, дрожжи *Brettanomyces anomalus*, дрожжи *Zygosaccaromyces rouxii* [183].

Культивирование симбионта осуществлялось в лабораторных условиях на универсальной жидкой питательной среде, приготовленной по следующему рецепту: в кипящую водопроводную воду объемом 1 л добавляли 100 г сахара до полного его растворения, затем в этот раствор на 20 минут помещали марлевый мешочек, содержащий 10 г крупнолистового черного чая марки «Краснодарский» (Россия), после чего охлаждали его естественным путем до комнатной температуры (+24°C...+26°C). В стеклянную емкость с полученной средой вносили культуру *Medusomyces gisevii alfa* ВКПМ Sa-10 в размере 1% от общего объема питательной среды (10 мл). Емкость накрывали четырехслойной марлевой салфеткой, обеспечивающей доступ кислорода, необходимого для нормальной жизнедеятельности бактерий симбионта. Культивирование производили в стационарном состоянии при температуре +25°C...+27°C. [44-46, 76, 83, 183].

В процессе работы с симбионтом использовались следующие приборы и оборудование: лабораторный миксер Sterilmixer 12 (РБИ, Италия), сублимационная сушилка ЛС-500 (Проинтех, Россия), морозильная камера

Tefcold SE-45 Series (Дания), автоклав СПВА-75-1НН (Транс-сигнал, Россия), анализатор влагосодержания лабораторный MB 25 Ohaus (Швейцария), портативный pH-метр FG2-Kit Mettler Toledo (Швейцария), лабораторные весы электронные ВЛТ-150 (Россия), электронный штангенциркуль ШЦЦ-II 0-250 0,01 (Россия). Оценка морфологических характеристик зооглеи чайного гриба и визуализация осуществлялись при помощи научного компьютеризированного комплекса для микроскопических исследований включающего прямой микроскоп Axio Imager 2 (A2) (Carl Zeiss Microscopy, Германия), макроскоп Axio Zoom V16 (Carl Zeiss Microscopy, Германия) и программное обеспечение Zen 2012 Pro (Carl Zeiss Microscopy, Германия).

Микробиологическое исследование зооглеи проводили общепринятым чашечным методом [163]. Для этого ее извлекали из культуральной жидкости, гомогенизировали в течение 5 минут на лабораторном миксере, затем 1 г гомогената помещали в пробирку, заливали 9 мл стерильного физиологического раствора, тщательно перемешивали и отстаивали 5 минут до отделения осадка. Готовили десятикратные разведения. С целью подсчета общего количества жизнеспособных клеток дрожжей и уксуснокислых бактерий производили посев на среды Сабуро (ФБУН ГНЦ ПМБ Оболенск, Россия) и Ацетобактер агар (HiMedia, Индия) соответственно, инкубировали в термостате при температуре +30°C в течение 48 часов. Подсчет колоний производили при помощи счетчика колоний микроорганизмов Scan 100 (Interscience, Франция). Полученные результаты указывали для всех микроорганизмов при необходимости сравнительного анализа в lg КОЕ/г.

Наличие органических кислот и остаточных сахаров в готовой субстанции исследовали методами тонкослойной хроматографии [241] и газовой хроматографии с масс-спектрометрией при помощи газового хроматографа Agilent 6850, оснащенного масс-детектором Agilent 5975B. (Waters, США). Состав свободных аминокислот в субстанции определяли на автоматическом анализаторе аминокислот ARACUS (ABACUS, Германия). Анализ микро- и макроэлементов проводили методом атомно-абсорбционной спектrophотометрии на приборе ААС

марки Perkin Elmer 2280 (США) [252]. Амилолитическую активность определяли методом Каравея [116]. Сырую клетчатку определяли по методу Кюршнера и Ганека [47].

Подтверждение пребиотической активности, отработку пребиотических доз разработанной субстанции, а также дальнейшие морфофункциональные исследования ее влияния на организм проводили на лабораторных моделях, в качестве которых использованы белые крысы линии Вистар в общем количестве 240 особей-самцов. Животные разделялись на экспериментальные группы в соответствии с поставленными задачами. Выбор данного вида лабораторных животных обусловлен удобством контроля эндогенных (в том числе генетических) и экзогенных (условия кормления, содержания и др.) факторов, способных оказывать существенное влияние на ход эксперимента.

Средняя масса экспериментальных животных составляла 280-300 г, возраст 6-8 месяцев. Все они были клинически здоровыми, во время эксперимента содержались в виварии в стандартных условиях. Температура воздуха в помещении составляла +20...22°C, влажность воздуха 40-45%. В комнатах, где содержались крысы, с лекарственными препаратами и химикатами не работали. Животные находились в условиях 12-14-часового светового режима при свободном доступе к воде и корму. Получали стандартный рацион вивария при стандартном режиме кормления по ГОСТ Р 50258-92 [62].

Эксперименты на животных были проведены в соответствии с требованиями Директивы ЕС 86/609/ЕЕС и российского законодательства, регулирующего эксперименты на животных [75].

***Второй этап экспериментальной работы*** осуществляли согласно схеме, представленной на рисунке 1. Оценку пребиотической эффективности субстанции производили на модели антибиотик-ассоциированного дисбактериоза, воспроизведенного в соответствии с методикой И.В. Дармова с соавторами (2013) в нашей модификации [183]. Для этого животным индивидуально вводили гентамицина сульфат (НПО «Микроген», Россия) перорально в дозе 15 мг/кг

живой массы дважды в сутки в течение 7-ми дней. Предварительно были получены фоновые бактериологические показатели.

В процессе оценки пребиотической эффективности «БАС-ЧГ» уделялось внимание выявлению оптимальной пребиотической дозы субстанции, в связи с чем было сформировано 4 группы животных по 30 крыс в каждой.

Животные группы «Без БАС-ЧГ» на протяжении всего периода эксперимента содержались исключительно на стандартном корме. Данная группа формировалась с целью сопоставления естественной динамики уровня микрофлоры во время дисбактериоза с результатами введения в рацион «БАС-ЧГ».



Рисунок 1 – Схема эксперимента по определению оптимальной пребиотической дозы «БАС-ЧГ»

Животным групп №1, 2 и 3 препарат «БАС-ЧГ» начинали применять на следующий день после завершения приема антибиотика в течение 21 суток в дозах, представленных на рисунке 1. Выбранные дозы биологически активной субстанции обусловлены рекомендациями по приему пребиотических препаратов схожего состава, указанными в литературе [1, 117]. Оценивали, какая

минимальная доза «БАС-ЧГ» оказала наилучший пребиотический эффект по отношению к основным эубиотическим представителям кишечного микробиоценоза.

Бактериологические исследования осуществляли общепринятыми методами [15, 139] с использованием прямого микроскопа исследовательского уровня Axio Imager 2 (A2) (Carl Zeiss Microscopy, Германия), материалом послужили фекалии крыс, полученные после естественной дефекации индивидуально от каждого животного в стерильную, герметически закрывающуюся посуду стерильным шпателем. Пробу для исследования брали из средней или последней порции фекалий. Количество собранного материала от каждого животного соответствовало 1-2 граммам. Время от момента взятия материала до его обработки в лаборатории не превышало 2 часа.

Отбирали навеску фекалий и после взвешивания гомогенизировали её в таком объеме физиологического раствора (0,85 % раствор хлорида натрия, pH 7,0), чтобы получить исходное разведение материала в 10 раз (1 г навески – 9 мл физиологического раствора хлорида натрия). Содержимое тщательно перемешивали стеклянной палочкой и оставляли при комнатной температуре на 10–15 минут, готовили десятикратные разведения. В расставленные в штативе пробирки вносили по 4,5 мл стерильного нейтрального физиологического раствора. Из первого разведения стерильной пипеткой объемом 1 мл с неповрежденным концом переносили 0,5 мл материала во вторую пробирку. При этом кончик пипетки прислоняли к внутренней стенке пробирки, не касаясь содержащейся в ней жидкости. После этого пипетку сбрасывали, брали другую такую же пипетку и перемешивали жидкость во второй пробирке путем пипетирования не менее 5 раз. После перемешивания этой же пипеткой переносили 0,5 мл в следующую пробирку, соблюдая те же правила, пока не закончили подготовку всех разведений. Из приготовленных разведений делали дозированные посева на селективные питательные среды для культивирования различных групп микроорганизмов.

Учет количества бифидобактерий проводили путем посева 1 мл суспензии из разведений  $10^7$ - $10^9$  на полужидкую среду Блаурока (ФБУН «ГНЦ ПМБ» Роспотребнадзора, Россия), которую регенерировали нагреванием перед посевом. Инкубацию пробирок проводили в термостате с анаэробной системой культивации INFORS MT Multitron (Швейцария) при температуре  $+37^\circ\text{C}$  в течение 24-48 ч, после чего регистрировали рост характерных колоний в среде в виде комет и гвоздик. Приготавливали мазки и окрашивали их по методу Грама. Определяли наибольшее разведение кала, из которого они выросли.

Лактобактерии учитывали путем посева 0,1 мл суспензии из разведений  $10^5$ - $10^9$  на MRS-агар (ФБУН «ГНЦ ПМБ» Роспотребнадзора России, Россия). Инкубацию чашек проводили в термостате с анаэробной системой культивации INFORS MT Multitron (Швейцария) при температуре  $+37^\circ\text{C}$  в течение 24-48 ч, после чего регистрировали рост гладких белых выпуклых колоний размером 2,5-3,5 мм. Под микроскопом определяли небольшие грамположительные неспоровые палочки, образующие цепочки, иногда кокко-бациллы.

Определение грамотрицательных кишечных палочек проводили путем посева 0,1 мл суспензии из разведений  $10^3$ ,  $10^5$ ,  $10^7$  на среды Эндо (НПО «Питательные среды», Россия), Левина (ГНЦ ПМБ Оболенск, Россия), Плоскирева (Микроген ФГУП НПО «Питательные среды», Россия), кровяной агар (Агат-Мед, Москва). После термостатирования при температуре  $+37^\circ\text{C}$  в течение 24 ч производили подсчет колоний, из которых ярко-красные с металлическим блеском – с нормальной ферментативной функцией (лактозоположительные), бледно-розовые или бесцветные – со сниженной ферментативной функцией (лактозоотрицательные). Сходные по морфологическим признакам колонии пересевали на короткий ряд Клиглера (ФБУН ГНЦ ПМБ Оболенск, Россия), цитратный агар Симмонса (Микроген НПО ФГУП НПО «Питательные среды», Россия)) для идентификации. Бесцветные колонии со среды Левина, бесцветные или слегка розоватые колонии со среды Плоскирева также пересевали на короткий ряд Клиглера. На кровяном агаре учитывали наличие зон гемолиза



вокруг колоний. Под микроскопом эшерихии имеют вид коротких неспорообразующих грамотрицательных палочек.

Стафилококки определяли высевом 0,1 мл суспензии из разведений  $10^1$ - $10^5$  на желточно-солевой агар Чистовича (ФБУН ГНЦ ПМБ Оболенск, Россия). Колонии патогенных стафилококков после термостатирования при  $+37^\circ\text{C}$  в течение 24 ч образуют вокруг себя зоны помутнения в результате положительной реакции на лецитиназу, в отсутствие таковой проводили реакцию плазмокоагуляции. Для этого в капле стерильной водопроводной воды петлей растворяли культуру микроорганизма, затем к ней добавляли каплю стерильной плазмы крови кролика, фиксировали формирование хлопьевидных сгустков.

Определение энтерококков проводили путем посева 0,1 мл суспензии из разведений  $10^5$ - $10^7$  на селективную среду Сланетца-Бартли (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd, Индия). После инкубации при температуре  $+37^\circ\text{C}$  в течение 48 ч подсчитывали количество колоний, микроскопировали окрашенные по Граму мазки.

Наличие анаэробных спорообразующих бактерий учитывали засевом 1 мл суспензии из разведений  $10^3$ ,  $10^5$ ,  $10^7$  на среду Вильсона-Блера (ХимМедСервис, Ярославль, Россия). Избавлялись от неспоровых микроорганизмов помещением пробирки на водяную баню при температуре  $+80^\circ\text{C}$  на 20 мин. При обнаружении черных колоний в центре столбика среды говорили об обнаружении клостридий.

Подсчет общего числа дрожжеподобных грибов рода *Candida* проводили путем посева 0,1 мл суспензии из разведений  $10^1$ ,  $10^3$ ,  $10^5$  на среду Сабуро (ФБУН ГНЦ ПМБ Оболенск, Россия) с хлорамфениколом. Чашки инкубировали при температуре  $+37^\circ\text{C}$  в течение 48 ч, после чего фиксировали количество гладких выпуклых белых колоний. Мазки подкрашивали метиленовым синим, под микроскопом отмечали наличие крупных круглых клеток.

Подсчет колоний проводили при помощи счетчика колоний микроорганизмов Scan 100 (Interscience, Франция). Полученные результаты пересчитывали и выражали для всех микроорганизмов в lg КОЕ/г.

*Третий этап экспериментальной работы* осуществляли согласно общей схеме, представленной на рисунке 2. Минимальная дозировка препарата, оказавшая наиболее комплексный пребиотический эффект, считалась оптимальной и была выбрана для дальнейших морфофункциональных исследований. Для этого были сформированы дополнительные 2 группы животных, которые разбивались на подгруппы по 30 крыс в каждой: группа IA и группа IА использовалась для гематологического, биохимического и гистологического исследования; группа IB и группа IБ для иммунологического исследования.

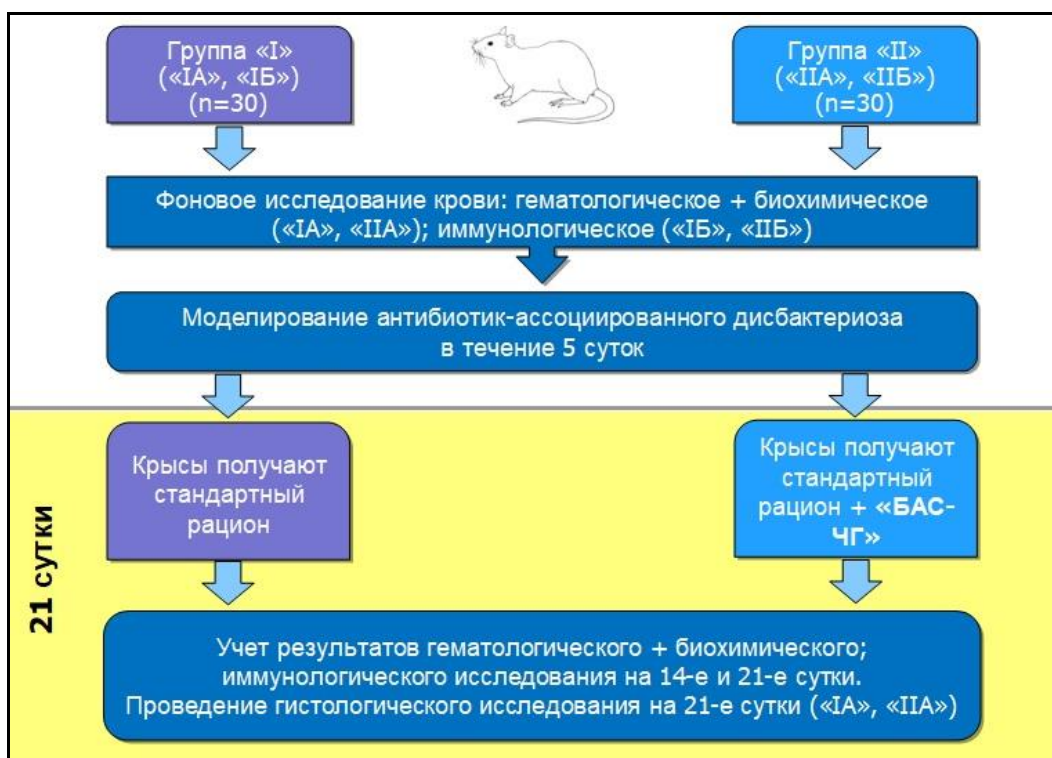


Рисунок 2 – Схема постановки эксперимента по изучению влияния «БАС-ЧГ» на морфофункциональные показатели организма подопытных животных

У всех животных был осуществлен забор крови для фонового исследования (полученные результаты считались контрольными). Затем животным был смоделирован антибиотико-ассоциированный дисбактериоз по указанной выше методике, после чего осуществлен повторный забор крови для гематологического, биохимического, иммунологического исследования. В течение 21 суток после окончания приема антибиотика животные группы IA и IB получали только

стандартный рацион, в то время как животным группы ПА и ПБ в дополнение к нему скармливали «БАС-ЧГ» индивидуально в минимально эффективной дозе. У всех животных кровь для исследований отбирали на 14 сутки, а также по окончании курса «БАС-ЧГ» – на 21 сутки. Усыпление животных группы IA и ПА для последующего гистологического исследования производили на 21 сутки.

Внешнее физиологическое состояние и поведение животных оценивали каждый день.

Кровь брали у животных натошак из хвостовой вены, в одну из пробирок заранее добавляли 0,5 мл стабилизатора Трилон-Б. Эту кровь использовали для общего анализа крови, который проводили на автоматическом калибруемом гематологическом анализаторе MicroCC-20Plus (HTI, США). Из другой пробирки получали сыворотку для биохимического исследования с помощью центрифуги MicroCL 17R (Thermo, США).

При проведении общего анализа крови учитывали показатели красной крови (количество эритроцитов, гемоглобина, среднее содержание гемоглобина в эритроцитах, уровень гематокрита, скорость оседания эритроцитов) и белой крови. Для дифференциального подсчета лейкоцитов проводили микроскопию мазков крови, окрашенных по Романовскому – Гимзе с использованием прямого микроскопа исследовательского уровня Axio Imager 2 (A2) (Carl Zeiss Microscopy, Германия) [119, 198].

Биохимический анализ крови проводили на полуавтоматическом биохимическом анализаторе BioChem SA (HTI, США) с использованием наборов реагентов «Вектор бест» (Новосибирск, Россия) в соответствии с инструкциями производителя. Определяли уровень общего белка, альбуминов, глобулинов, альбумин-глобулиновый коэффициент, уровень С-реактивного белка, аспаратаминотрансферазы, аланинаминотрансферазы, содержание общего билирубина, лактатдегидрогеназы, щелочной фосфатазы, глюкозы, общего холестерина, мочевины, триглицеридов, кальция, фосфора, железа, магния.

Гистологическое исследование органов-мишеней, в качестве которых были выбраны участки тонкого кишечника (подвздошная кишка), толстого кишечника

(слепая и ободочная кишка) и печени, проводили в соответствии с методическими рекомендациями С.М. Сулейманова с соавторами (2000). После вскрытия животных отбирали кусочки органов размером не более 1,5 см и фиксировали их в 10% нейтральном забуференном растворе формалина на протяжении 48 часов. После фиксации материал промывали под проточной водопроводной водой в течение 24 часов, далее осуществлялась проводка по стандартной методике для последующей заливки в парафин. С помощью санного микротомы МС-2 («АТМ-практика», Россия) приготавливались срезы толщиной 5-7 мкм, которые наклеивались на предметные стекла, окрашивались гематоксилином и эозином, заключались в канадский бальзам и высушивались на воздухе. Для обнаружения жиров в тканях использовали окраску по Судану III, при этом срезы готовились при помощи замораживающего микротомы «МЗП-01 Технотом» с охладителем микротомы «ОМТ-0228» (Россия) при температуре минус 10-12°C.

Приготовленные гистологические препараты просматривались под микроскопом на различных увеличениях, производилась общая структурная оценка тканей и микрофотографирование. Выбор методов и приемов микрофотографирования осуществлялся по рекомендациям, изложенным в учебном пособии Л.Д. Тимченко, В.Н. Вакулина (2014).

При проведении иммунологического исследования учитывали лизоцимную активность сыворотки крови, которую определяли в соответствии с методикой В.Я. Саруханова с соавторами (2012), бактерицидную активность сыворотки крови, которую исследовали по методике Д.А. Петрачева (1981), комплементарную активность сыворотки крови изучали по методу, изложенному в «Методических рекомендациях по оценке и коррекции неспецифической резистентности животных» [242].

Определяли функциональную активность фагоцитов по методу А.М. Горчакова с соавторами (2003). Подсчитывали общее число клеток, участвующих в фагоцитозе (фагоцитарный индекс), определяли среднее число микроорганизмов, поглощенных одним фагоцитом (фагоцитарное число). Процент завершенности фагоцитоза оценивался как отношение числа

переваренных микробов к общему числу поглощенных микробов, выраженное в процентах. В качестве объектов фагоцитоза выступали пекарские дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*.

Кислородозависимый метаболизм нейтрофилов определяли по методу Д.Н. Маянского (1996) путем оценки способности этих клеток поглощать нитросиний тетразолий (NBT, США), вычисляли значение спонтанного и стимулированного НСТ-теста.

Содержание IgG, IgM, IgA определяли на приборе Immunochem-2100 (НТИ, США) с помощью наборов реактивов Elisa Kit (Cloud-Clone CORP., США).

Статистическую обработку полученных результатов исследования проводили на компьютере с использованием программы Primer of Biostatistics (Version 4.03). Вычисляли среднее арифметическое значение ( $M$ ), ошибку среднего арифметического ( $m$ ), представляли результаты в виде  $M \pm m$ . Различия между группами оценивали с помощью общепринятых методов математической статистики [126].

### 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В данном разделе изложены результаты научных исследований, опубликованные в научных статьях Ю.М. Добрыня (2016, 2017, 2018), Ю.М. Добрыня, Н.И. Бондарева, Л.С. Катунина (2014), Ю.М. Добрыня, С.С. Аванесян, Н.И. Бондарева, Л.Д. Тимченко, И.В. Ржепаковский, Е.И. Симечева (2015), Ю.М. Добрыня, Н.И. Бондарева, С.И. Писков (2016), С.С. Митина, С.И. Писков, Л.Д. Тимченко, Н.И. Бондарева, И.В. Ржепаковский, Ю.М. Добрыня, В.А. Андреюк (2016), Н.И. Бондарева, Л.Д. Тимченко, Е.В. Алиева, Ю.М. Добрыня, Н.И. Гандрабура, С.И. Писков, Л.И. Калмыкова (2017), Н.И. Бондарева, Л.Д. Тимченко, Ю.М. Добрыня, Е.В. Алиева, И.В. Ржепаковский, Е.С. Лихачева, М.Н. Сизоненко, С.И. Писков, М.А. Козлова, Д.А. Арешидзе (2017), Ю.М. Добрыня, Л.Д. Тимченко, И.В. Ржепаковский, Н.И. Бондарева, С.И. Писков (2016, 2017), Ю.М. Добрыня, Л.Д. Тимченко, Н.И. Бондарева, С.И. Писков (2016, 2018), которые содержат уточненные, расширенные и новые сведения.

#### **3.1. Аналитическое и экспериментальное обоснование разработки и применения биологически активной субстанции из *Medusomyces gisevii***

Анализ многочисленных научных сведений, представленных в обзоре литературы, свидетельствует о необходимости разработки высокоэффективного препарата для нужд ветеринарной медицины, который бы обладал комплексом механизмов прямого и косвенного действия на микрофлору, свойственным наиболее эффективным современным пребиотическим субстанциям, к числу которых относят метаболиты и фрагменты микроорганизмов, пищевые волокна, органические кислоты, аминокислоты, ферменты. Литературный поиск показал, что именно эти вещества могут оказывать непосредственное влияние на организм, корректируя его иммунитет, оказывая противовоспалительное действие и регулируя метаболические процессы, что крайне важно при дисбактериозе, практически всегда сопровождающемся иммуно-метаболическими расстройствами. Не вызывает сомнения, что на современном этапе эффективный

пребиотик с прямым воздействием на симптомокомплекс, сопровождающий нарушения микробиоценоза, можно рассматривать как средство выбора в лечении дисбиозов и их последствий.

Качество таких препаратов, несомненно, зависит от сырья. Абсолютное большинство описанных многоцелевых пребиотиков собираются синтетическим путем, что зачастую представляется экономически нецелесообразным.

По нашему мнению, для ветеринарных целей имеет смысл поиск такого доступного сырья, которое бы заведомо обладало высоким потенциалом успешного пребиотика, отвечающего вышеописанным требованиям. Считаем, что в этом смысле предпочтительно использование природных компонентов, отличающихся многопрофильным составом, за счет содержания большого количества перечисленных биологически активных веществ с искомым действием. Кроме того, не последним фактором, обуславливающим предпочтение того или иного сырья, является его стоимость.

С учетом вышеизложенного, при изыскании такого сырья мы обратили внимание на природный микробный симбионт *Medusomyces gysevii*, который с начала XX века известен в нашей стране под названием «чайный гриб» или «комбуча». Данный объект представляет собой сложный симбиотический организм, главными участниками которого являются два основных компонента – дрожжи и уксуснокислые бактерии [3, 44, 45, 54, 219, 288]. Точный микробный состав симбионта может варьироваться в зависимости от многих условий: типа питательной среды, региона происхождения культуры, условий и времени культивирования. Как правило, он насчитывает от двух до 35-ти и более видов микроорганизмов в одном сообществе [95, 250, 251]. Внешний вид чайного гриба характеризуется двумя составляющими – это культуральная/ферментативная жидкость и зооглея/тело гриба, плавающая на поверхности жидкости.

Культуральная жидкость *Medusomyces gysevii* по своей сути является продуктом двух комбинированных брожений (спиртового и уксуснокислого) и представляет собой метаболизированную питательную среду, которая состоит из продуктов жизнедеятельности микроорганизмов симбионта и отдельных

бактерий, перемещающихся в пространстве за счет диффузии [70, 191, 192]. Химический состав культуральной жидкости очень богат. Он включает органические кислоты (яблочная, молочная, уксусная, глюкуроновая, глюконовая, лимонная, щавелевая, пировиноградная, фосфорная, койевая), сахара (моносахариды, дисахариды), витамины (С, В1, РР, D), ферменты (липаза, амилаза, сахараза, протеаза, каталаза), липиды (фосфатиды, стерины, жирные кислоты), пигменты, пуриновые основания, альдегиды, белки, сапонины, нуклеиновые кислоты, аминокислоты, азотистые основания, этанол [146, 190, 191, 260, 289-292]. Наличие того или иного вещества в метаболитном составе культуральной жидкости во многом зависит от конкретных микробных составляющих симбионта, а также условий культивирования и состава питательной среды.

Многими исследованиями, в том числе и нашими, было отмечено наличие бактериостатического и бактерицидного действия культуральной жидкости чайного гриба в отношении ряда патогенных микроорганизмов, таких как *Helicobacter pylori*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Bacillus cereus*, *Shigella sonnei*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, плесневых грибов и возбудителей грибковых заболеваний человека [70, 76, 259, 271, 342–344, 356]. Согласно сведениям Л.Т. Даниелян (2005) антимикробное действие обеспечивается за счет наличия среди метаболитов симбионта активного термостабильного вещества – бактерицидина [70].

Большого внимания заслуживают исследования, показавшие, что убитые данным веществом паратифозные и бруцеллезные вакцины в иммуногенном отношении оказались лучше живых. Данный факт может объясняться взаимодействием антигена со свободными радикалами культуральной жидкости и образованием недоступных тканевым ферментам частиц, вследствие чего замедляется их гидролиз и вывод из тканей. Исследования вакцин, обработанных неразведенным бактерицидином, на кроликах показали их иммуногенность и усиление иммунного ответа у животных [70].



Патентный и литературный поиск показал, что культуральная жидкость *Medusomyces gisevii* наиболее активно используется в пищевом и фармацевтическом производствах [181, 182, 225, 232, 233]. Ее применяют в технологиях созревания теста для изготовления хлебобулочных изделий, при получении уксусной кислоты в производственных масштабах для нужд пищевой промышленности. На основе культуральной жидкости готовят лекарственные средства и тонизирующие напитки, которые набирают все большую популярность в нашей стране и за рубежом как продукты здорового питания [96, 191, 192, 278].

В литературе имеются некоторые сведения о том, какое влияние оказывает ферментативная жидкость *Medusomyces gusevii* на микробиоценоз кишечника и пищеварение у животных. Проведенные В.В. Хачатрянном (2012) исследования свидетельствуют, что ее выпаивание кроликам вызывало существенное снижение у них количества кишечной палочки. У тонкорунно-грубошерстных овцематок в последней стадии беременности и новорожденных ягнят применение культуральной жидкости в течение 30-ти дней вызвало снижение уровня кишечной палочки, дрожжей и грамположительных бактерий, и одновременное увеличение количества молочнокислых бактерий в кишечнике. В опытах М.Н. Веревкиной с соавторами (2010) выпаивание культуральной жидкости чайного гриба пороссятам снижало количество желудочно-кишечных расстройств, диспепсий, повышало аппетит и подвижность животных [44].

Как свидетельствует Л.Т. Даниелян (2005) дача культурального настоя чайного гриба овцематкам и ягнятам не влияет на видовой состав кишечной микрофлоры, однако модифицирует количественное соотношение микроорганизмов кишечника в сторону увеличения молочнокислых бактерий в общем пуле [70, 306]. В испытаниях *in vitro* Н.И. Бондаревой с соавторами (2016) доказано стимулирующее действие культуральной жидкости чайного гриба на лактобактерии [264].

Таким образом, на основании вышесказанного можно сделать вывод о том, что метаболиты чайного гриба обладают в целом положительным потенциалом действия как в отношении кишечной микрофлоры, так и макроорганизма в целом.

Однако, по нашему мнению, целенаправленное применение в ветеринарии непосредственно культуральной жидкости не представляется экономически оправданным, так как в основе ее получения лежит использование пищевого сырья. Затраты на производство сахаросодержащих питательных сред довольно высоки, несмотря на предлагаемые варианты заменителей, эффективность которых достаточно спорна [146]. В связи с этим, объектом нашего особого внимания явился другой продукт метаболизма симбионта – зооглея/тело чайного гриба.

По информации представителей одного из успешных пищевых предприятий России ООО «Русквас», выпускающего в ассортименте живые бутилированные напитки «Чайный гриб «Комбуча» с разными вкусами [172], в цикле приготовления напитка неминуемо образуется зооглея чайного гриба, которую приходится постоянно изымать из технологического процесса. В связи с этим накапливаются тонны ценного вторичного сырья, которое может быть направлено на переработку, что, несомненно, представляет большой интерес для нужд ветеринарии.

Зооглея/тело *Medusomyces gusevii* является основополагающим структурным образованием симбионта. Она представляет собой практически бесцветную плотную многослойную биопленку, образованную переплетенными нитями химического вещества – бактериальной целлюлозы, продуцируемой уксуснокислыми бактериями чайного гриба. Кристаллическая структура полисахарида, образующего зооглею, имеет обширную внутреннюю поверхность, характеризуется высокой плотностью и наличием большого количества ячеек. Биогенные молекулы бактериальной целлюлозы находятся в гидратированном состоянии, так как примерно 80–90% ее видимого объема составляет культуральная жидкость [276, 305, 315].

Применение зооглеи чайного гриба в качестве пищевого волокна имеет большую перспективу. Исследования ультраструктуры бактериальной целлюлозы, проведенные Л.А. Алешиной с соавторами (2016), зафиксировали включение в пространство целлюлозной сетки микроорганизмов симбионта и

характерных для них аминокислот. Ввиду своего состава и строения, целлюлоза чайного гриба в естественных условиях является эффективным бионосителем и местом иммобилизации продуктов бактериального метаболизма, в том числе ферментов, органических кислот, сигнальных молекул и прочих веществ [3, 54, 191, 192]. Учитывая данный факт, мы считаем, что все обнаруженные в культуральной жидкости вещества содержатся в зооглее в многократно увеличенных концентрациях.

В желудочно-кишечном тракте бактериальная целлюлоза ферментируется на 70%, и при прохождении по кишечнику она функционирует по типу «молекулярного сита», обладает влагоудерживающими и адсорбционными свойствами, способна выводить холестерин и желчные кислоты, удерживает воду, нормализует кишечный транзит, влажность и массу фекалий, увеличивает массу микрофлоры толстой кишки [148]. Н.Н. Скорлупкиной (2016) в экспериментах *in vitro* был доказан пребиотический эффект бактериальной целлюлозы в отношении лактобактерий и пробиотической кишечной палочки. В отечественной и зарубежной литературе встречаются единичные упоминания о попытках использования зооглеи чайного гриба *in vivo* путем ее скармливания животным, что, к сожалению, не получило широкого распространения [200].

Таким образом, уже на этапе аналитического обзора отчетливо прослеживаются принципиальные преимущества зооглеи чайного гриба в качестве сырья для разработки ветеринарного препарата с искомыми свойствами.

Наличие в ее структуре пищевых волокон бактериальной целлюлозы и высокая концентрация биологически активных веществ потенциально могут обеспечить пребиотический эффект.

Присутствующие в зооглее в большом количестве уксуснокислые бактерии и дрожжи, по нашему мнению, могут являться активаторами неспецифической и иммунобиологической реактивности организма, о чем встречаются прямые упоминания в литературе. Так, сообщается, что клеточные стенки дрожжей являются сильнейшим иммуномодулятором, а уксуснокислые бактерии *Gluconacetobacter xylinus* вырабатывают гетерополисахарид ацетоксан, который

усиливает сопротивляемость организма к бактериальным и вирусным инфекциям [69, 88, 98, 188, 194, 208, 314, 328, 330, 332].

Единичные случаи использования бактериальной целлюлозы в пищевых и кормовых целях подтверждают, что она не токсична, не вызывает аллергии, обладает высокой поглотительной способностью и стимулирует пищеварение, оказывая положительное влияние на процессы метаболизма [147, 274, 280, 307, 321, 332, 351, 353]. Диетические свойства бактериальной целлюлозы намного выше, чем чистой растительной целлюлозы [185, 240, 316]. Безусловным преимуществом зооглеи следует считать то, что она фактически является неиспользованным отходом пищевой промышленности, что способно значительно снизить себестоимость изготавливаемых из нее препаратов.

Учитывая высокую метаболическую активность микробной составляющей чайного гриба, использование зооглеи диктует необходимость поиска технологического подхода, который бы обеспечивал ее стабилизацию, возможность длительного хранения, транспортировки субстанции на дальние расстояния, устранение сложностей стандартизации микробного компонента и одновременно сохранение ряда патогенетически значимых метаболитов, таких как фермент амилаза, обладающий противовоспалительным действием, органические кислоты, аминокислоты, микроэлементы.

В связи с вышеизложенным нами предпринята попытка разработать новую биологически активную субстанцию, основным сырьевым объектом для которой явилась зооглея, образующаяся при культивировании консорциума *Medusomyces gisevii alfa* ВКПМ Sa-10.

Разработка технологии приготовления «БАС-ЧГ» складывалась из двух стадий: подготовительной и основной (рисунок 3).

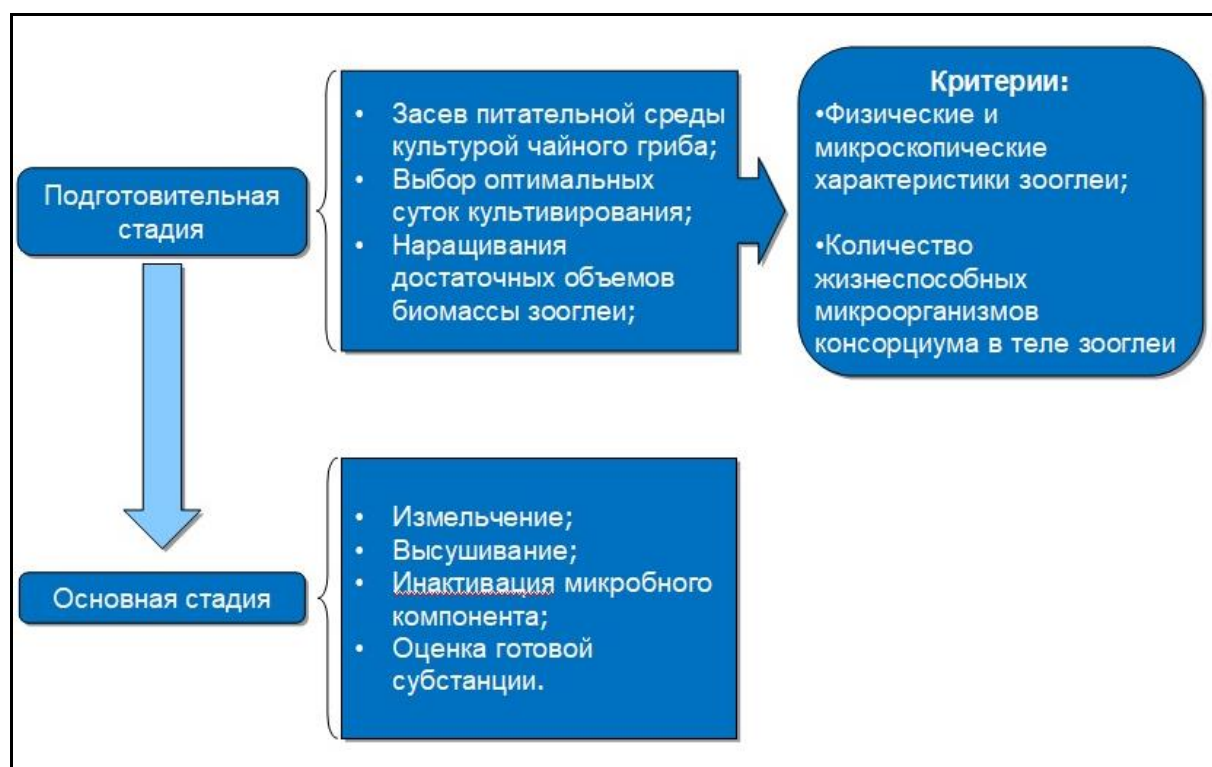


Рисунок 3 – Процесс разработки «БАС-ЧГ»

*Подготовительная стадия* заключалась в первичной работе с сырьем: засева питательной среды культурой чайного гриба и выборе оптимальных сроков культивирования для наращивания достаточных объемов биомассы зооглеи.

Работа на данном этапе производилась в десятикратных повторениях. В 5 емкостей объемом 1 л со стандартной питательной средой одновременно засевали культуру чайного гриба по методике, представленной в разделе «Материалы и методы». Основными критериями при выборе оптимальных сроков культивирования зооглеи являлись ее физические и микроскопические характеристики: масса и толщина зооглеи, сформированность матрицы, оцениваемая визуально по плотности (частоте) целлюлозных волокон в поле зрения микроскопа, а также общее количество жизнеспособных микроорганизмов консорциума, находящихся непосредственно в теле зооглеи. Учет результатов проводили на 3, 7, 14, 21 и 28 сутки культивирования. Зооглею на каждые сутки использовали для всех видов исследований только из одной емкости во избежание дополнительной микробной контаминации.

Результаты исследования зооглеи консорциума *Medusomyces gisevii alfa* ВКПМ Sa-10 свидетельствуют, что на 3 сутки культивирования видимая ее часть только начинает формироваться. Она представляет собой еле заметные хлопьевидные участки помутнения на поверхности среды размером не более 5 мм (рисунок 4а). В данном состоянии не представляется возможным ее измерить или взвесить.



Рисунок 4 – Зооглея *Medusomyces gisevii* на 3 сутки культивирования

На 7 сутки культивирования зооглея имеет вид прозрачной сплошной гелевой пленки, занимающей всю площадь поверхности сосуда. Легко рвется и тонет при попытке ее снять. Масса влажной зооглеи на 1 л питательной среды составляла  $15,8 \pm 2,9$  г, толщина  $0,9 \pm 0,1$  мм. Целлюлозные нити занимают все поле зрения микроскопа, расположены рыхло и преимущественно линейно, даже при малом увеличении заметны крупные просветы между одиночными нитями (рисунок 5б).

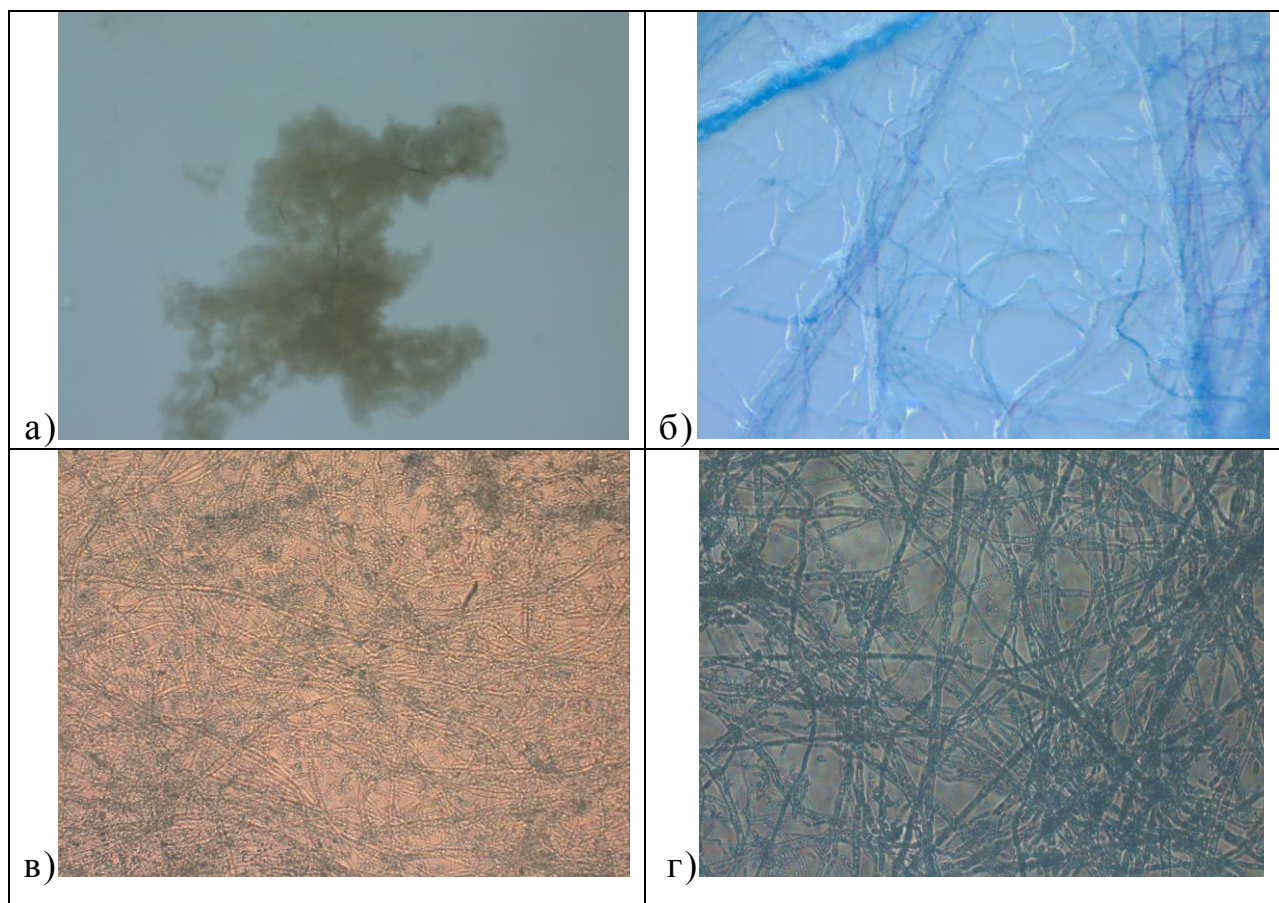


Рисунок 5 –Зооглея *Medusomyces gisevii* на разные сутки культивирования: а) 3 сутки (без окраски,  $\times 40$ ); б) 7 сутки, (окраска метиленовым синим,  $\times 260$ ); в) 14 сутки, (окраска метиленовым синим,  $\times 200$ ); г) 21 сутки, (окраска метиленовым синим,  $\times 400$ )

На 14 сутки культивирования зооглея представляет собой сплошное гладкое полупрозрачное образование четкой формы на поверхности сосуда. Физическая структура зооглеи плотная, однородная. Масса влажной зооглеи на 1 л питательной среды составляла  $85,8 \pm 8,9$  г, толщина  $6,1 \pm 0,2$  мм. Волокна бактериальной целлюлозы присутствуют в большом количестве, занимают все поле зрения микроскопа, переплетены между собой, расположены часто, без просветов, встречаются как толстые, так и тонкие нити. Под микроскопом четко визуализируется многослойный сетчатый каркас, внутри которого в большом количестве локализованы клетки микроорганизмов, расположенные хаотично (рисунок 5в).

К 21 суткам культивирования зооглея чайного гриба приобретает плотную хрящеподобную структуру, для измельчения которой необходимы

дополнительные инструменты. Масса влажной зооглеи на 1 л питательной среды составляла  $145,5 \pm 7,7$  г, толщина  $9,2 \pm 1,1$  мм. Волокна бактериальной целлюлозы занимают все поле зрения микроскопа, переплетены между собой, расположены часто, без просветов, встречаются преимущественно толстые хорошо окрашенные целлюлозные волокна, образующие объемный каркас (рисунок 5г).

На 28 сутки физическая и микроскопическая структура зооглеи аналогична 21 суткам исследования. Заметно снижается тенденция накопления биомассы. Масса влажной зооглеи на 1 л питательной среды составляла  $151,8 \pm 5,2$  г, толщина  $9,8 \pm 0,4$  мм. Волокна бактериальной целлюлозы занимают все поле зрения микроскопа, переплетены между собой, расположены часто, без просветов, встречаются преимущественно толстые хорошо окрашенные целлюлозные волокна, образующие объемный каркас.

Руководствуясь литературными данными, свидетельствующими о пропорциональном накоплении количества биологически активных веществ в культуральной жидкости чайного гриба по мере увеличения сроков его культивирования [56, 191, 192], мы задались целью провести исследование, позволяющее обозначить необходимые сроки культивирования биомассы зооглеи, без снижения ее качества. В качестве критерия нами была выбрана оценка динамики численности живых микроорганизмов сообщества, находящихся непосредственно в теле чайного гриба, как основных продуцентов и утилизаторов образующихся в системе биологически активных веществ.

Микробиологическое исследование проводили, начиная с 7 суток, так как на 3 сутки культивирования состояние зооглеи считали неудовлетворительным.

Результаты исследования показывают, что на протяжении всего периода культивирования в зооглее обнаруживаются как дрожжи, так и уксуснокислые бактерии, причем дрожжи находятся в преобладающем количестве (таблица 1). Прослеживается четкая динамика увеличения количества микроорганизмов в теле зооглеи по мере увеличения сроков ее культивирования и достижение максимума на 21 сутки. Однако к 28 суткам культивирования происходит резкое снижение количества дрожжей на 2,2 порядка, и уксуснокислых бактерий на 1,4 порядка.



Таблица 1. Динамика изменения количества жизнеспособных микроорганизмов в зооглее чайного гриба на разные сутки культивирования, ( $M \pm m$ )

Группа микроорганизмов, lg КОЕ/г	Сутки культивирования			
	7	14	21	28
Дрожжи	4,25±0,34	5,59±0,21*	7,45±0,19*	5,21±0,16*
Уксуснокислые бактерии	3,21±0,12	4,81±0,17*	6,25±0,14*	4,85±0,14*

Примечание: Эксперимент проводился в десяти повторях

\*( $P < 0,05$ ) – статистически достоверный результат в сравнении с предыдущим показателем данной группы

Выявленная динамика, по нашему мнению, свидетельствует об истощении питательной среды и излишнем накоплении в ней побочных продуктов обмена веществ микроорганизмов, что останавливает активный метаболизм клеток, приводит к их гибели и вымыванию из матрикса зооглеи.

Таким образом, мы считаем наиболее целесообразным использование зооглеи на 21 сутки культивирования, так как на данные сутки накоплена существенная ее биомасса, сформирована многослойная волокнистая матрица зооглеи, позволяющая адсорбировать как можно больше биологически активных веществ. В теле зооглеи обнаруживается наибольшее количество жизнеспособных клеток микроорганизмов консорциума, что свидетельствует о достаточно высокой их метаболической активности. На 28 сутки культивирования прирост биомассы зооглеи продолжается, однако его скорость становится существенно ниже, чем в предыдущие сроки. Кроме того, в теле зооглеи регистрируется гибель микроорганизмов и их вымывание из матрикса.

На основном этапе разработки «БАС-ЧГ» культивирование биомассы зооглеи чайного гриба осуществляли по указанной выше методике в 20 емкостях объемом 1 литр в течение 21 суток, в результате чего собрали 3450 г влажной зооглеи, которую подвергли дальнейшей переработке. Все манипуляции, проведенные на данном этапе были направлены на стабилизацию субстанции путем инактивации микробной составляющей, сохранение структуры целлюлозного волокна, сохранение ферментного компонента, органических

кислот, аминокислот, макро- и микроэлементов, обеспечение легкости хранения, транспортировки и применения готового продукта.

Первым этапом переработки зооглеи являлось ее измельчение механическим способом на фрагменты размером 2-3 см. Целесообразность данной манипуляции обусловлена высокой влажностью зооглеи. В связи с тем, что она содержит в себе до 90% жидкой составляющей, сушка цельного объема зооглеи по сравнению с фрагментированным при одинаковых параметрах высушивания характеризуется более высоким процентом влажности и очень высокой прочностью, что обуславливает значительные трудности в ее последующем измельчении. Доведение его до желаемых параметров требует больших мощностей и увеличения времени сушки.

Следующим после измельчения этапом переработки зооглеи является ее высушивание. В процессе эксперимента нами отдано предпочтение лиофильному высушиванию, так как анализ тенденций развития биотехнологии показал, что среди различных методов высушивания, данный метод обладает рядом значительных преимуществ и перспектив. Так, сублимационное обезвоживание отличается относительной быстротой, предполагает мягкие режимы термообработки в вакууме и позволяет получить конечную влажность на уровне нескольких процентов, сохранив при этом структуру исходного материала и его специфические свойства [50].

Кроме того, по нашему мнению, выбор лиофильного способа высушивания на этапе предшествующем инактивации бактериального компонента позволяет обеспечить иммобилизацию на матрице зооглеи и стабилизацию некоторых биологически активных веществ, подготовку их к дальнейшей термической обработке с наименьшими потерями. Так, к примеру, обезвоживание и иммобилизация ферментов препятствует спонтанной или индуцированной денатурации нагреванием [12]. Таким образом, вышеприведенные сведения обуславливают приоритетность нашего выбора в технологическом цикле приготовления «БАС-ЧГ» в пользу лиофильного высушивания.

Фрагменты зооглеи помещали в низкотемпературную холодильную камеру

при температуре минус 40°C на 72 часа, а затем сушили при режиме среднего рабочего давления в камере высушивания 6,5-7,0 Па, температуре конденсатора минус 9...50,0°C. Общая длительность цикла сушки составляла 29 часов. Высушенная таким образом субстанция имела процент влажности 10% (рисунок 6). После высушивания ее измельчали на лабораторной мельнице и плотно укупоривали в стеклянной таре.



Рисунок 6 – Фрагменты работы при получении «БАС-ЧГ»  
(процесс сублимационной сушки)

В качестве метода инактивации микробной составляющей нами было выбрано автоклавирование, которое проводилось в течение 10 минут при температуре 105°C, давлении 1,1 атм. Данный метод является одним из наиболее эффективных и доступных для производств. Кроме того, краткий режим обработки горячим паром под давлением обуславливает сохранность структуры сухой зооглеи в отличие от способов сухожаровой или СВЧ-стерилизации, при которых целлюлоза начинает пригорать.

Необходимо отметить, что в предложенном нами технологическом цикле процесс высушивания предшествует обработке в автоклаве, так как промежуточными исследованиями подтверждено, что автоклавирование сырой зооглеи приводит к склеиванию субстанции, невозможности ее разделения, связыванию воды, как следствие высокому проценту влажности при

высушивании и снижению качества итогового продукта.

В процессе оценки качества итоговой субстанции выявлено, что «БАС-ЧГ» внешне представляет собой порошкообразную массу бежевого цвета со слабым кисловатым запахом.



Рисунок 7 – Внешний вид готовой субстанции «БАС-ЧГ»

Исследования были направлены на определение сырой клетчатки, аминокислот, органических кислот, макро- и микроэлементов в готовом продукте. Дополнительно проведено исследование наличия фермента амилазы, которая имеет высокое значение в регуляции воспалительной реакции, которая, как мы указывали выше, является одним из наиболее частых проявлений, сопровождающих нарушения микрофлоры кишечника. Амилаза, по нашему мнению, может сохраниться в субстанции благодаря выбранным режимам обработки.

Проведенными исследованиями подтверждено, что созданная субстанция имеет в своем составе широкий перечень аминокислот и макро- микроэлементов (таблица 2), а также органические кислоты: глюконовую, глюкуроновую, янтарную, энантовую, капроновую, адипиновую. Амилолитическая активность

субстанции составила  $121,5 \pm 4,1$  мкг/мин×мл. Относительное процентное содержание сахарозы в «БАС-ЧГ» составляет  $25,94 \pm 0,2\%$ . Содержание сырой клетчатки составляет  $62,2 \pm 0,8\%$ .

Таблица 2 – Содержание аминокислот и макро- микроэлементов в «БАС-ЧГ» (M±m)

Аминокислотный состав						
Ед.изм.	Изолейцин	Тирозин	Фенилаланин	Гистидин	Лизин	Лейцин
мкг/мл	$28,25 \pm 0,4$	$4,9 \pm 0,7$	$4,8 \pm 0,6$	$65,54 \pm 1,1$	$2,2 \pm 0,4$	$3,9 \pm 0,5$
Содержание макро- и микроэлементов						
Ед. изм.	Ca	K	Na	Zn	Fe	Mn
мкг/мл	$10,25 \pm 0,2$	$32,82 \pm 1,2$	$32,24 \pm 1,4$	$0,9 \pm 0,07$	$0,3 \pm 0,01$	$0,4 \pm 0,03$

Примечание: Эксперимент проводился в десяти повторях

Возвращаясь к обзору доступной литературы, мы не исключаем сохранение в итоговой субстанции других термостабильных соединений, присущих сырой зооглее чайного гриба.

Таким образом, комплекс проведенных исследований показал, что разработанная субстанция имеет богатый поликомпонентный состав, включающий органические кислоты, минеральные вещества, аминокислоты, углеводы, что обуславливает перспективы ее использования в качестве пребиотика с широким спектром патогенетического действия при дисбактериозе, сопряженным с воздействием на иммунный статус и метаболизм. Наличие у субстанции амилолитической активности потенциально способно обеспечить ее противовоспалительную активность, что является важным в процессе развития последствий дисбактериоза. Сама методика переработки сырья предполагает обязательное присутствие в инактивированном виде микроорганизмов собственных нативной субстанции, что является потенциальным фактором, обуславливающим стимуляцию иммунобиологической реактивности организма.

### 3.2. Оценка пребиотического действия и определение оптимальной эффективной дозы биологически активной субстанции из *Medusomyces gisevii*

Вышеизложенные сведения о богатом составе «БАС-ЧГ» позволили приступить к подтверждению гипотезы о пребиотических свойствах разработанной субстанции на лабораторных животных.

Результаты фонового бактериологического исследования содержимого желудочно-кишечного тракта, а также спектр микрофлоры кишечника, выявленный после моделирования дисбактериоза, представлены в таблице 3.

В ходе фонового исследования качественного и количественного состава фекальной микрофлоры установлено, что у животных всех 4 экспериментальных групп преобладали представители, характерные для традиционно нормальной микрофлоры кишечника теплокровных, а именно бифидобактерии и лактобактерии, кишечная палочка с выраженными ферментативными свойствами. Помимо этого, выявлены энтерококки, непатогенные представители рода *Staphylococcus* и дрожжеподобных грибов рода *Candida*. Кишечная палочка со сниженной ферментативной активностью, золотистый стафилококк не обнаружены. Полученные результаты приняты нами в качестве исходных для определения последующей динамики.

В результате применения гентамицина сульфата наблюдалось значительное угнетение представителей традиционно нормальной микрофлоры кишечника у 100% животных всех групп в равной степени, что в первую очередь выжалось в достоверном снижении количества бифидобактерий в 2,5 раза, лактобактерий в 2,3 раза, кишечной палочки с выраженными ферментативными свойствами в 3 раза. Существенно снизился процент выделения и количество энтерококков. У 100% животных после применения антибиотика отмечено появление кишечной палочки со сниженными ферментативными свойствами, а также повышение количества грибов рода *Candida* в 2,6 раза. Во всех группах появились особи, у которых выделяли золотистый стафилококк.

Таблица 3 – Микрофлора кишечника экспериментальных животных в процессе моделирования дисбактериоза до применения «БАС-ЧГ» ( $M \pm m$ )

Группа Микроорганизм	Группа без «БАС-ЧГ» (n=30)		Группа 1 (n=30)		Группа 2 (n=30)		Группа 3 (n=30)	
	lg КОЕ/г	Выделено гол. (%)	lg КОЕ/г	Выделено гол. (%)	lg КОЕ/г	Выделено гол. (%)	lg КОЕ/г	Выделено гол. (%)
До применения гентамицина								
<i>Bifidobacterium</i> <i>spp.</i>	8,3±0,38	30 (100)	8,22±0,31	30 (100)	8,31±0,24	30 (100)	8,28±0,33	30 (100)
<i>Lactobacillus</i> <i>spp.</i>	7,4±0,32	30 (100)	7,51±0,35	30 (100)	7,22±0,31	30 (100)	7,31±0,35	30 (100)
<i>E. coli lac.(+)</i>	6,8±0,41	30 (100)	6,87±0,2	30 (100)	6,72±0,34	30 (100)	6,75±0,38	30 (100)
<i>E. coli lac.(-)</i>	н/о	0 (0)	н/о	0 (0)	н/о	0 (0)	н/о	0 (0)
<i>Enterococcus</i> <i>spp.</i>	5,2±0,32	30 (100)	5,41±0,27	30 (100)	5,34±0,38	30 (100)	5,44±0,41	30 (100)
<i>Staphylococcus</i> <i>spp.</i> -коагулазо(-)	3,21±0,37	30 (100)	3,28±0,36	30 (100)	3,23±0,41	30 (100)	3,22±0,28	30 (100)
<i>Staphylococcus</i> - <i>aureus</i>	н/о	0 (0)	0 (0)	0 (0)	н/о	0 (0)	н/о	0 (0)
<i>Candida spp.</i>	1,57±0,22	30 (100)	1,52±0,25	30 (100)	1,48±0,18	30 (100)	1,49±0,21	30 (100)
После применения гентамицина								
<i>Bifidobacterium</i> <i>spp.</i>	3,25±0,11*	30 (100)	3,11±0,12*	30 (100)	3,25±0,17*	30 (100)	3,31±0,12*	30 (100)
<i>Lactobacillus</i> <i>spp.</i>	3,11±0,12*	30 (100)	3,04±0,14*	30 (100)	3,11±0,12*	30 (100)	3,18±0,13*	30 (100)
<i>E. coli lac.(+)</i>	2,34±0,25*	30 (100)	2,27±0,31*	30 (100)	2,36±0,24*	30 (100)	2,23±0,22*	30 (100)
<i>E. coli lac.(-)</i>	2,51±0,22*	30 (100)	2,14±0,12*	30 (100)	2,22±0,17*	30 (100)	2,6±0,18*	30 (100)
<i>Enterococcus</i> <i>spp.</i>	1,25±0,34*	5 (16)	1,34±0,32*	6 (20)	1,42±0,35*	8 (26)	1,34±0,34*	5 (16)
<i>Staphylococcus</i> <i>spp.</i> -коагулазо(-)	2,26±0,34	30 (100)	2,27±0,38	30 (100)	2,34±0,38	30 (100)	2,31±0,35	30 (100)
<i>Staphylococcus</i> - <i>aureus</i>	1,82±0,38*	12 (40)	1,73±0,31*	8 (26,6)	1,94±0,58*	8 (26,6)	1,8±0,45*	9 (30)
<i>Candida spp.</i>	4,18±0,21*	30 (100)	4,16±0,16*	30 (100)	4,15±0,14*	30 (100)	4,11±0,12*	30 (100)
Патогенных микроорганизмов рода <i>Klebsiella</i> , <i>Proteus</i> , <i>Clostridium</i> до и после применения гентамицина не обнаружено								

Примечание: \*( $P < 0,05$ ) – статистически достоверный результат в сравнении с предыдущим показателем данной группы

Полученные результаты свидетельствуют о развитии дисбактериоза и подтверждают успешность выбранной модели экспериментального

дисбактериоза.

Наблюдение за внешним видом, активностью, аппетитом и характером фекалий экспериментальных животных выявило, что после применения гентамицина у подавляющего большинства животных всех экспериментальных групп отмечены характерные признаки расстройства пищеварительного тракта: беспокойство или вялость, снижение количества потребляемого корма, метеоризм, фекалии имели маслянистую или жидкую консистенцию иногда с примесью слизи, зеленовато-коричневого цвета.

Результаты испытания «БАС-ЧГ» показали, что у животных групп 2 и 3, принимавших субстанцию в дозах 400 мг/кг и 500 мг/кг соответственно, положительная динамика кишечной микрофлоры проявилась уже на 7 сутки курса, что выражалось в достоверном увеличении количества лактобактерий в 1,4 раза по сравнению с состоянием на момент окончания введения антибиотика (таблицы 3 и 4) и в 1,3 раза по сравнению с данными, полученными в группе без «БАС-ЧГ» (таблица 4).

В группах 2 и 3 наблюдалось достоверное уменьшение количества кишечной палочки со сниженными ферментативными свойствами в 1,4 раза по сравнению с данными в группе без «БАС-ЧГ».

Процент выделения *Staphylococcus aureus* повысился на 7-е сутки в группе без применения «БАС-ЧГ», в то время как в группах 1, 2 и 3 он остался таким же, как на момент окончания применения гентамицина (таблицы 3 и 4).

Во всех группах, которым применяли экспериментальную субстанцию, количество грибов рода *Candida* осталось на уровне момента окончания приема антибиотика, в то время как в группе без «БАС-ЧГ» их количество увеличилось в 1,2 раза, что свидетельствуют о продолжении развития дисбактериоза.



Таблица 4 – Влияние «БАС-ЧГ» на показатели микрофлоры кишечника крыс с экспериментальным антибиотик-ассоциированным дисбактериозом, 7 сутки приема (M±m)

Группа	Группа без «БАС-ЧГ» (n=30)		Применение «БАС-ЧГ»					
			Группа 1 (n=30)		Группа 2 (n=30)		Группа 3 (n=30)	
Микроорганизм	lg КОЕ/г	Выделено гол.(%)	lg КОЕ/г	Выделено гол.(%)	lg КОЕ/г	Выделено гол.(%)	lg КОЕ/г	Выделено гол.(%)
<i>Bifidobacterium spp.</i>	3,32±0,4	30 (100)	3,78±0,52	30 (100)	3,98±0,35	30 (100)	4,06±0,38	30 (100)
<i>Lactobacillus spp.</i>	3,39±0,32	30 (100)	3,59±0,25	30 (100)	4,5±0,23* ▲	30 (100)	4,61±0,28*▲	30 (100)
<i>E. coli -lac.(+)</i>	2,54±0,2	30 (100)	2,62±0,21	30 (100)	2,97±0,28	30 (100)	2,93±0,21	30 (100)
<i>E. coli -lac.(-)</i>	3,22±0,4	30 (100)	2,52±0,57	30 (100)	2,21±0,25* *	30 (100)	2,18±0,12*	30 (100)
<i>Enterococcus spp.</i>	1,22±0,24	5 (16)	1,24±0,12	6 (20)	1,32±0,15	8 (26)	1,33±0,18	5 (16)
<i>Staphylococcus spp. -коагулазо(-)</i>	2,16±0,14	30 (100)	2,17±0,18	30 (100)	2,14±0,18	30 (100)	2,11±0,11	30 (100)
<i>Staphylococcus - aureus</i>	2,22±0,23	17 (56,6)	1,71±0,37	8 (26,6)	1,82±0,48	8 (26,6)	1,72±0,35	9 (30)
<i>Candida spp.</i>	5,21±0,25* *	30 (100)	4,46±0,26	30 (100)	4,35±0,34	30 (100)	4,41±0,32	30 (100)
Патогенных микроорганизмов рода <i>Klebsiella</i> , <i>Proteus</i> , <i>Clostridium</i> не обнаружено								

Примечание: Группа без «БАС-ЧГ» – станд.корм; группа 1 – станд.корм + 300 мг/кг «БАС-ЧГ»; группа 2 – станд.корм + 400 мг/кг «БАС-ЧГ»; группа 3 – станд.корм + 500 мг/кг «БАС-ЧГ»; \*(P<0,05) – статистически достоверный результат в сравнении показателей между группами; ▲(P<0,05) – статистически достоверный результат в сравнении показателей только внутри групп с «БАС-ЧГ».

На 14 сутки курса применения экспериментальной субстанции у всех животных с «БАС-ЧГ» отмечено значительное повышение количества основных представителей эубиотической микрофлоры (таблица 5).

Количество бифидобактерий у животных группы 1 в 1,1 раза (или на 14%) выше, чем в группе, где не применяли «БАС-ЧГ», в группе 2 и группе 3 в 1,2 и 1,3 раза соответственно выше по сравнению с группой, где не применяли «БАС-ЧГ». Количество лактобактерий у животных группы 1 превышало таковое в группе без «БАС-ЧГ» в 1,1 раза (или на 16,6%), в группе 2 и группе 3 в 1,3 и в 1,4 раза соответственно. Количество лактобактерий в группах 2 и 3 на данные сутки исследования достоверно выше, чем в группе 1.

Количество кишечной палочки с выраженными ферментативными свойствами в группах 2 и 3 возросло в 1,4 раза по сравнению с данными в группе без «БАС-ЧГ». Кишечная палочка со сниженной ферментативной активностью в группе без «БАС-ЧГ» присутствовала у 100% животных, в то время как в группе 1 процент выделения этого микроорганизма снизился на 76,7%, а в группах 2 и 3 на 14 сутки он не обнаруживался.

Таблица 5 – Влияние «БАС-ЧГ» на показатели микрофлоры кишечника крыс с экспериментальным антибиотик-ассоциированным дисбактериозом, 14 сутки приема ( $M \pm m$ )

Группа	Группа без «БАС-ЧГ» (n=30)		Применение «БАС-ЧГ»					
			Группа 1 (n=30)		Группа 2 (n=30)		Группа 3 (n=30)	
Микроорганизм	lg КОЕ/г	Выделено гол.(%)	lg КОЕ/г	Выделено гол.(%)	lg КОЕ/г	Выделено гол.(%)	lg КОЕ/г	Выделено гол.(%)
<i>Bifidobacterium spp.</i>	5,11±0,11	30 (100)	5,86±0,35*	30 (100)	6,54±0,28*	30 (100)	6,72±0,38*	30 (100)
<i>Lactobacillus spp.</i>	5,32±0,35	30 (100)	6,18±0,22*	30 (100)	7,29±0,24* ▲	30 (100)	7,57±0,38* ▲	30 (100)
<i>E. coli -lac.(+)</i>	3,12±0,24	30 (100)	3,92±0,51	30 (100)	4,38±0,35*	30 (100)	4,43±0,22*	30 (100)
<i>E. coli -lac.(-)</i>	2,2±0,54	30 (100)	1,84±0,64	7 (23,3)	н/о	0 (0)	н/о	0 (0)
<i>Enterococcus spp.</i>	2,71±0,51	30 (100)	2,15±0,28	30 (100)	2,45±0,35	30 (100)	2,45±0,42	30 (100)
<i>Staphylococcus spp. -коагулазо(-)</i>	2,45±0,27	30 (100)	2,16±0,11	30 (100)	2,15±0,17	30 (100)	2,17±0,14	30 (100)
<i>Staphylococcus aureus</i>	2,3±0,35	12 (40)	1,82±0,62	8 (26,6)	н/о	0 (0)	н/о	0 (0)
<i>Candida spp.</i>	4,2±0,27	30 (100)	3,42±0,32*	30 (100)	3,21±0,14*	30 (100)	2,88±0,41*	30 (100)
Патогенных микроорганизмов рода <i>Klebsiella</i> , <i>Proteus</i> , <i>Clostridium</i> не обнаружено								

Примечание: Группа без «БАС-ЧГ» – станд.корм; группа 1 – станд.корм + 300 мг/кг «БАС-ЧГ»; группа 2 – станд.корм + 400 мг/кг «БАС-ЧГ»; группа 3 – станд.корм + 500 мг/кг «БАС-ЧГ»; \* (P<0,05) – статистически достоверный результат в сравнении показателей между группами; ▲ (P<0,05) – статистически достоверный результат в сравнении показателей внутри групп с «БАС-ЧГ».

В группе 1 частота выделения *Staphylococcus aureus* была на 13,4% ниже таковой в группе без «БАС-ЧГ», в то время как в группах 2 и 3 данный микроорганизм не обнаруживался. Во всех группах животных, которым

применяли «БАС-ЧГ» наблюдается снижение количества грибов рода *Candida* в 1,2; 1,3 и 1,4 раза соответственно по сравнению с группой без «БАС-ЧГ».

К 21 суткам испытания качественный и количественный состав микрофлоры желудочно-кишечного тракта животных группы без «БАС-ЧГ» не восстановился полностью до первоначальных значений, а имел лишь тенденцию к восстановлению. Так, уровень бифидо-, лактобактерий, кишечной палочки с выраженными ферментативными свойствами остался соответственно в 1,4; 1,2; 1,6; раз ниже по сравнению с аналогичными показателями до начала применения гентамицина (таблица 6). У 100% животных отмечалось наличие кишечной палочки с низкой ферментативной активностью, а также сохранялся повышенный уровень грибов рода *Candida* в 2,1 раз по сравнению с фоновым значением. У 12 крыс по-прежнему выделяли золотистый стафилококк.

Одновременно динамика микрофлоры в группах животных, принимавших «БАС-ЧГ», по большинству исследуемых микроорганизмов приближалась к исходным значениям.

Уровень бифидобактерий у животных группы 1 оказался в 1,2 раза выше, чем в группе без «БАС-ЧГ», а в группах 2 и 3 в 1,3 раза выше, чем в группе без «БАС-ЧГ» (таблица 6). Полученные значения приближаются к таковым до воздействия антибиотика.

Количество лактобактерий в группах 1, 2 и 3 оказалось в 1,3 раз; 1,4 раз и 1,5 раз соответственно выше, чем в группе без «БАС-ЧГ». Стоит отметить, что количество лактобактерий в группах 2 и 3 на  $0,99 \lg$  КОЕ/г и  $1,15 \lg$  КОЕ/г соответственно превысило фоновые показатели в данных группах, что свидетельствует о выраженном лактостимулирующем эффекте выбранных доз субстанции.

У животных всех трех групп, получавших «БАС-ЧГ», в отличие от группы без «БАС-ЧГ» на 21 сутки не выявлено наличие золотистого стафилококка. В группах 2 и 3 не удалось выделить кишечную палочку с низкой ферментативной активностью, в группе 1 данный микроорганизм выделяли только у 3-х животных, в то время как в группе без «БАС-ЧГ» она регистрировалась у всех животных.

На 21 сутки исследования в группах 1, 2 и 3 уровень грибов рода *Candida* был в 1,4 раза; 2,3 раза и 2,4 раза ниже такового в группе без «БАС-ЧГ», причем данный микроорганизм в группах 2 и 3 отмечался в незначительных количествах и оказался достоверно ниже по сравнению со значением в группе 1.

Таблица 6 – Влияние «БАС-ЧГ» на показатели микрофлоры кишечника крыс с экспериментальным антибиотик-ассоциированным дисбактериозом, 21 сутки приема ( $M \pm m$ )

Группа	Группа без «БАС-ЧГ» (n=30)		Применение «БАС-ЧГ»					
			Группа 1 (n=30)		Группа 2 (n=30)		Группа 3 (n=30)	
Микроорганизм	lg КОЕ/г	Выделено гол. (%)	lg КОЕ/г	Выделено гол. (%)	lg КОЕ/г	Выделено гол. (%)	lg КОЕ/г	Выделено гол. (%)
<i>Bifidobacterium spp.</i>	5,85±0,41	30 (100)	7,12±0,12*	30 (100)	7,81±0,42*	30 (100)	7,94±0,58*	30 (100)
<i>Lactobacillus spp.</i>	5,92±0,33	30 (100)	7,41±0,12*	30 (100)	8,21±0,18* ▲	30 (100)	8,46±0,41* ▲	30 (100)
<i>E. coli -lac.(+)</i>	4,27±0,34	30 (100)	5,59±0,27*	30 (100)	6,75±0,41*	30 (100)	6,54±0,58*	30 (100)
<i>E. coli -lac.(-)</i>	2,45±0,42	30 (100)	1,57±0,27	3 (6,6)	н/о	0 (0)	н/о	0 (0)
<i>Enterococcus spp.</i>	4,71±0,42	30 (100)	5,41±0,38	30 (100)	5,75±0,42	30 (100)	5,61±0,57	30 (100)
<i>Staphylococcus spp. -коагулазо(-)</i>	3,69±0,41	30 (100)	2,56±0,47	30 (100)	2,78±0,51	30 (100)	2,27±0,24	30 (100)
<i>Staphylococcus aureus</i>	2,8±0,62	12 (40)	н/о	0 (0)	н/о	0 (0)	н/о	0 (0)
<i>Candida spp.</i>	3,75±0,42	30 (100)	2,55±0,26*	30 (100)	1,61±0,36* ▲	30 (100)	1,53±0,31* ▲	30 (100)
Патогенных микроорганизмов рода <i>Klebsiella</i> , <i>Proteus</i> , <i>Clostridium</i> не обнаружено								

Примечание: Группа без «БАС-ЧГ» – станд.корм; группа 1 – станд.корм + 300 мг/кг «БАС-ЧГ»; группа 2 – станд.корм + 400 мг/кг «БАС-ЧГ»; группа 3 – станд.корм + 500 мг/кг «БАС-ЧГ»; \* ( $P < 0,05$ ) – статистически достоверный результат в сравнении показателей между группами; ▲ ( $P < 0,05$ ) – статистически достоверный результат в сравнении показателей внутри групп с «БАС-ЧГ».

Отмечая физическое состояние животных можно констатировать, что уже в первую неделю испытания биологически активной субстанции у большинства животных, которым скармливали «БАС-ЧГ» во всех трех дозах стали менее выраженными или исчезли признаки расстройства желудочно-кишечного тракта,

улучшился аппетит и качество фекалий. К концу эксперимента у всех животных, принимавших биологически активную субстанцию, полностью исчезли явления метеоризма, и стабилизировалась пищеварительная функция, в то время как у отдельных животных группы без «БАС-ЧГ» вялость, нарушение аппетита и диарея сохранялись до конца эксперимента.

Таким образом, полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что разработанная субстанция «БАС-ЧГ» оказывает пребиотическое действие по отношению к основным представителям микрофлоры желудочно-кишечного тракта во всех исследуемых дозах, что выражается в повышении у животных количества лакто- и бифидобактерий, кишечной палочки с выраженными ферментативными свойствами и снижении количества представителей условно-патогенной микрофлоры (кишечной палочки со сниженными ферментативными свойствами, золотистого стафилококка, грибов рода *Candida*) по сравнению с животными группы без «БАС-ЧГ», содержащимися только на стандартном рационе. Наилучшие результаты, начиная с 7-х суток, были получены в группе 2 у животных, получавших субстанцию в дозе 400 мг/кг, и в группе 3, получавших субстанцию в дозе 500 мг/кг. Следует отметить выраженный лактостимулирующий эффект субстанции, который особенно ярко проявляется уже с 7-х суток ее применения в дозах 400 мг/кг и 500 мг/кг. Учитывая отсутствие достоверных различий между группами, показавшими наилучшую динамику восстановления микрофлоры на всем протяжении эксперимента, в качестве оптимальной пребиотической мы определили дозу «БАС-ЧГ» равную 400 мг/кг.

### **3.3. Влияние биологически активной субстанции из *Medusomyces gisevii* на гематологические и биохимические показатели крови лабораторных животных**

Влияние разработанной субстанции «БАС-ЧГ» на гематологические показатели экспериментальных животных представлены в таблице 7. Установлено, что до начала эксперимента все исследуемые показатели у 100%

животных обеих экспериментальных групп находились в пределах средней физиологической нормы, описанной для данного вида животных в отечественной и зарубежной литературе [127, 132, 144, 302].

В результате применения антибиотика произошло изменение гематологических показателей у животных группы «IA» и группы «IIA», что выражалось в снижении уровня гемоглобина в 1,2 раза, эритроцитов в 1,5 раза, лейкоцитов в 1,4 раза, повышении уровня гематокрита в 1,1 раза и СОЭ в 1,8 раза. Несмотря на изменения, все исследуемые показатели находились в пределах физиологической нормы для данного вида животных, однако достигали границ ее пределов. Изменения претерпела и лейкоцитарная формула. В группе «IA» и группе «IIA» процентное содержание лимфоцитов снизилось на 12,41% и 11,68% соответственно (упало ниже нормативных значений). Произошло снижение уровня моноцитов. Содержание эозинофилов повысилось на 3,87% и 3,5%, а содержание палочкоядерных нейтрофилов на 1,42% и 1,2%, сегментоядерных нейтрофилов на 8,93% и 9,35% и превысило показатели нормы. Динамика остальных показателей гематологического исследования не достоверна. Динамика гематологических показателей свидетельствует о признаках нарушения иммунной резистентности, что отражалось в снижении общего числа лейкоцитов и отдельных их форм, а также развитии воспалительной реакции, сопровождающейся повышением уровня нейтрофилов и эозинофилов, что может свидетельствовать о ее аллергическом характере. Снижение уровня эритроцитов, по нашему мнению, свидетельствует о нарушении эритропоэза, возможно вследствие снижения усвоения железа организмом, и снижения синтеза микрофлорой витаминов группы В.

Результаты применения разработанной биологически активной субстанции показали, что «БАС-ЧГ» оказывает положительное влияние на динамику гематологических показателей животных, начиная уже с 14 дня ее применения. Так, у животных группы «IIA» уровень эритроцитов, гемоглобина, гематокрита, лейкоцитов, параметры лейкоцитарной формулы достоверно отличались от данных, полученных в этой группе после применения антибиотика, а также данных группы «IA» на аналогичные сутки исследования.

Таблица 7 – Влияние «БАС-ЧГ» на гематологические показатели крыс с экспериментальным антибиотик-ассоциированным дисбактериозом, (M±m)

Показатель, (нормативное значение)	Группа «IA»				Группа «IIA»			
	до антибиотика	после антибиотика	14 сутки, стандартный рацион	21 сутки, стандартный рацион	до антибиотика	после антибиотика	14 сутки приема «БАС- ЧГ»	21 сутки приема «БАС- ЧГ»
Эритроциты, 10 <sup>12</sup> /л (5,5-10)	8,64±0,15	5,68±0,42*	6,21±0,15	7,21±0,21*	8,23±0,14	5,21±0,11*	<u>7,14±0,18</u> ▲	8,65±0,41▲
Гемоглобин, г/л (110-180)	156,06±2,23	121,27±3,42*	128,22±1,1	142,5±2,2*	154,33±2,35	123,42±2,83*	<u>137,35±2,25</u> ▲	159,2±2,12▲
Гематокрит, % (34-48)	40,20±1,17	46,55±1,26*	45,11±0,12	44,2±1,22*	41,08±1,61	46,81±1,72*	<u>41,2±1,1</u> ▲	40,22±1,11▲
МСН, пг (12-23)	15,62±1,12	12,2±1,87	12,8±1,1	13,2±1,18	15,31±1,22	11,86±1,92	13,12±1,1	16,78±2,45
СОЭ, мм/ч (0,7-2,1)	1,1±0,12	2,06±0,18*	1,84±0,41	1,74±0,45	1,1±0,16	2,01±0,17*	<u>1,2±0,17</u>	1,2±0,21
Тромбоциты, 10 <sup>9</sup> /л (430-840)	525±13,12	536±12,15	533±11,85	528±12,85	528±12,18	537±13,14	532±12,25	525±13,26
Лейкоциты, 10 <sup>9</sup> /л (5-14)	7,26±0,22	5,12±0,22*	5,5±0,11	6,11±0,12*	7,44±0,23	5,34±0,29*	<u>6,75±0,45</u> ▲	8,21±0,27*▲
Лейкограмма, %								
Лимфоциты (62-75)	67,53±1,15	55,12±1,85*	<u>62,5±1,5</u>	63,55±1,45*	68,33±1,60	56,65±1,96*	<u>67,25±1,35</u> ▲	72,8±1,45*▲
Базофилы (0-1,5)	0,73±0,34	1,5±0,2	1,6±0,3	0,92±0,87	0,68±0,31	1,5±0,2	1,4±0,5	0,72±0,45

Продолжение таблицы 7.

Показатель, (нормативное значение)	Группа «IA»				Группа «IIA»			
	до антибиотика	после антибиотика	14 сутки, стандартный рацион	21 сутки, стандартный рацион	до антибиотика	после антибиотика	14 сутки приема «БАС- ЧГ»	21 сутки приема «БАС- ЧГ»
Эозинофилы (0-6)	0,8±0,5	4,91±0,6*	4,56±0,5	4,31±0,3*	1,20±0,1	4,62±0,3*	<u>2,4±0,25</u> ▲	1,5±0,25▲
Нейтрофилы палочкоядерные (1,1-3,2)	2,7±0,3	4,5±0,3*	4,0±0,6	3,7±0,3*	2,5±0,2	4,2±0,3*	3,51±0,3	2,8±0,4
Нейтрофилы сегментоядерные (20-29)	22,27±1,80	31,2±1,25*	32,2±1,25	28,22±1,1*	23,07±2,17	32,42±1,56*	<u>27,12±1,51</u> ▲	22,25±2,21▲
Моноциты (0-5)	2,5±0,2	1,2±0,3*	1,25±0,25	1,75±0,3	2,4±0,2	1,2±0,2*	1,75±0,4	2,6±0,2▲

Примечание: «Группа IA» – станд.корм; «Группа IIA» – станд.корм + 400 мг/кг «БАС-ЧГ»; \*(P<0,05) – в сравнении с данными до применения антибиотика; подчеркивание (P<0,05) – в сравнении с данными по окончанию применения антибиотика; ▲(P<0,05) – в сравнении с группой «IA».



Уровень эритроцитов у животных группы «IIА», получавших «БАС-ЧГ», на 37% и 14%, гемоглобина на 11% и 7%, лейкоцитов на 26% и 22% соответственно выше по сравнению с данными на момент окончания приема препарата и данными, полученными в группе «IIА», которой скармливание субстанции не производили. Уровень гематокрита в группе «IIА» на 11% и 8% ниже соответственно по сравнению с данными на момент окончания приема антибиотика и данными в группе «IA». Показатель СОЭ снизился в 1,6 раза по сравнению с данными, полученными в этой группе на момент окончания приема антибиотика, однако он не показал достоверной разницы между данными группы «IIА» и группы «IA».

При рассмотрении лейкоцитарной формулы можно отметить, что на 14-е сутки исследования в группе «IIА» количество лимфоцитов на 10,6% и 7,6% выше, а количество эозинофилов на 2,22% и 2,16%, сегментоядерных нейтрофилов на 7,3% и 5,08% ниже соответственно по сравнению с данными на момент окончания введения антибиотика и данными, полученными в группе «IA» на аналогичные сутки исследования.

Дальнейшее гематологическое исследование показало, что у животных группы «IA», которым не производили скармливание исследуемой субстанции, ряд гематологических показателей не достиг первоначальных значений к финальным 21 суткам исследования. Так, количество эритроцитов, гемоглобина, лейкоцитов оставалось ниже, а уровень гематокрита в группе «IA» выше исходных данных.

Показатели лейкоцитарной формулы в группе «IA» также не восстановились до фоновых значений: количество лимфоцитов оставалось ниже, а количество эозинофилов, палочкоядерных нейтрофилов, сегментоядерных нейтрофилов выше, чем до начала применения антибиотика. Причем содержание лимфоцитов находилось в нижних пределах физиологической нормы.

Одновременно, результаты применения субстанции «БАС-ЧГ» показали, что у животных группы «IIА» все исследуемые показатели крови вернулись к фоновым значениям, при этом уровень эритроцитов, гемоглобина, лейкоцитов

достоверно выше этих показателей в группе «IA». Содержание лейкоцитов оказалось на  $0,77 \cdot 10^9/\text{л}$  выше, чем до начала эксперимента.

При подсчете лейкоцитарной формулы выявлено, что процент лимфоцитов и моноцитов выше, а процент эозинофилов и сегментоядерных нейтрофилов у животных группы «IIA», принимавших «БАС-ЧГ», был соответственно ниже таковых по сравнению с группой «IA». При этом процент лимфоцитов в группе «IIA» на 5,55% выше, чем до начала эксперимента.

Таким образом, полученная динамика изменений гематологических показателей, по нашему мнению, свидетельствует о положительном влиянии «БАС-ЧГ» на организм, что выражается в снижении уровня воспалительной реакции в организме у животных группы «IIA». Повышение лейкоцитов и лимфоцитов в пределах нормативных значений может быть следствием умеренной иммуностимуляции.

Результаты влияния «БАС-ЧГ» на биохимические показатели крови экспериментальных животных представлены в таблице 8. Установлено, что до начала эксперимента все изучаемые параметры у животных обеих групп находились в пределах физиологической нормы [127, 132, 144, 302].

Вследствие применения антибиотика у животных группы «IA» и группы «IIA» выявлены изменения некоторых биохимических показателей крови, что выражалось в уменьшении уровня общего белка на 15,3% и 14,9%, альбумина на 23,2% и 21,02%, глобулинов на 8% и 9,4%, кальция на 24% и 29%, фосфора на 19,35% и 18,7%, магния на 24,3% и 25,1%, железа на 24,2% и 23% соответственно по сравнению с фоновыми показателями.

Таблица 8 – Влияние «БАС-ЧГ» на биохимические показатели крови крыс с экспериментальным антибиотик-ассоциированным дисбактериозом, (M±m)

Показатель (нормативное значение)	Группа «IA»				Группа «IIA»			
	До антибиотика	После антибиотика	14 сутки, стандартный рацион	21 сутки, стандартный рацион	До антибиотика	После антибиотика	14 сутки приема «БАС- ЧГ»	21 сутки приема «БАС- ЧГ»
Общий белок, г/л (60-85)	75,7±1,22	64,1±1,15*	65,2±0,85	69,8±1,12*	74,5±1,12	63,4±1,11*	<u>68,8±1,1</u> ▲	75,6±0,91▲
Альбумины, г/л (28-40)	36,1±1,13	27,7±1,14*	29,2±1,1	33,2±0,8*	35,2±1,18	27,8±1,12*	<u>31,1±1,12</u>	36,1±1,35
Глобулины, г/л (33-50)	39,6±1,31	36,4±0,9*	35,6±0,9	34,6±0,8*	39,1±1,13	35,6±0,8*	<u>38,2±0,8</u> ▲	42,5±1,11*▲
А/Г (0,7-1,5)	0,91±0,11	0,74±0,09	0,81±0,05	0,95±0,08	0,89±0,12	0,78±0,11	0,81±0,07	0,84±0,08
СРБ, мг/л (0-5)	0,58±0,11	1,56±0,13*	1,37±0,21	1,14±0,21*	0,56±0,13	1,61±0,21*	<u>0,62±0,21</u> ▲	0,48±0,16▲
Мочевина, ммоль/л (7,2-10,7)	8,6±0,52	10,1±0,22*	9,7±0,87	8,9±1,12	8,7±0,41	10,1±0,18*	<u>9,5±0,21</u>	8,2±1,11
АлАТ, ед/л (45-79)	61,2±1,1	81,2±1,1*	<u>76,2±1,2</u>	71,1±1,2*	63,1±1,2	82,1±1,2*	<u>69,2±1,1</u> ▲	62,8±1,4▲
АсАТ, ед/л (45-84)	67,4±1,9	85,9±1,11*	<u>80,2±1,1</u>	75,5±1,2*	68,6±2,1	86,5±1,11*	<u>71,5±1,7</u> ▲	67,6±1,8▲
ЛДГ, ед/л (350-563)	357,7±14	421,7±12*	411,2±9	381,8±11	362,9±12	432,2±11*	<u>380,2±9</u> ▲	371,1±9
ЩФ, Ед/л,	330,2±10	375,4±7*	<u>358,2±6</u>	345,2±7	328,4±14	379,2±6*	<u>355,2±7</u>	336,4±5
Билирубин общ, мкмоль/л, (3,24-10,9)	4,4±0,61	6,1±0,21*	5,7±0,21	5,2±0,28	4,8±0,42	6,7±0,32*	<u>5,1±0,29</u>	4,6±0,29

Продолжение таблицы 8.

Показатель (нормативное значение)	Группа «IA»				Группа «IIA»			
	До антибиотика	После антибиотика	14 сутки, стандартный рацион	21 сутки, стандартный рацион	До антибиотика	После антибиотика	14 сутки приема «БАС- ЧГ»	21 сутки приема «БАС- ЧГ»
Холестерин общ, ммоль/л (1,3-2,1)	1,6±0,07	1,9±0,13*	1,9±0,12	2,0±0,13*	1,6±0,11	2,0±0,13*	<u>1,6±0,14</u>	1,5±0,08▲
Триглицериды, ммоль/л (1,06-1,54)	1,11±0,07	1,52±0,18*	1,49±0,17	1,51±0,14	1,12±0,07	1,53±0,16*	1,25±0,15	1,17±0,13
Глюкоза, ммоль/л (5-6,9)	5,92±0,6	5,11±0,3	5,15±0,3	5,32±0,3	5,6±0,4	5,0±0,2	<u>6,3±0,3</u> ▲	6,51±0,3▲
Ca <sup>2+</sup> , ммоль/л	2,5±0,11	1,9±0,13*	2,0±0,12	2,1±0,13*	2,4±0,13	1,7±0,16*	<u>2,2±0,12</u>	2,5±0,13▲
P <sup>3+</sup> , ммоль/л	3,1±0,12	2,5±0,13*	2,6±0,13	2,7±0,14*	3,2±0,14	2,6±0,16*	2,8±0,18	3,3±0,17▲
Mg <sup>2+</sup> , ммоль/л	2,38±0,12	1,8±0,15*	1,9±0,12	2,0±0,11*	2,39±0,03	1,76±0,18*	2,21±0,15	2,38±0,14▲
Fe <sup>3+</sup> , мкмоль/л	41,2±3,12	31,2±2,63*	32,2±1,6	33,6±2,11*	42,1±2,81	32,4±2,86*	<u>39,2±1,81</u> ▲	43,8±2,14▲

Примечание: «Группа IA» – станд.корм; «Группа IIA» – станд.корм + 400 мг/кг «БАС-ЧГ»; \*(P<0,05) – в сравнении с данными до применения антибиотика; подчеркивание (P<0,05) – в сравнении с данными по окончанию применения антибиотика; ▲(P<0,05) – в сравнении с группой «IA».

Также после применения антибиотика в группах «IA» и «IIA» наблюдалось повышение уровня С-реактивного белка (СРБ) в 2,6 раз и в 2,8 раз, ферментов: АлАт на 32,6% и 30,1%, АсАт на 27,4% и 26%, ЛДГ на 17,8% и 19%, ЩФ на 16,7% и 15,4% соответственно. При этом уровень АлАт и АсАт у животных обеих групп превышал нормативные значения для данного вида животных [126, 132, 144, 302].

Кроме этого, отмечается повышение уровня холестерина на 18,7% и 25%, а триглицеридов на 36,9% и 36,6% в группе «IA» и группе «IIA». Уровень мочевины повысился соответственно на 17,4% и 16%, билирубина на 38% и 39,5% по сравнению с данными до применения антибиотика. Остальные исследуемые показатели достоверно не изменились.

В целом описанная динамика показателей свидетельствует о некоторых метаболических изменениях в организме подопытных животных, которые можно связать с применением антибиотика, а также изменением количественного уровня функциональной (пищеварительной и синтетической) активности собственной микрофлоры желудочно-кишечного тракта.

Так, полученные данные свидетельствуют о снижении интенсивности белкового и минерального обмена в организме подопытных животных, изменениях в механизме деконъюгации желчных кислот возможно вследствие снижения количества представителей лактофлоры. Повышение нейтральных липидов может наблюдаться при недостаточном усвоении протеина и липотропных веществ (холина, метионина, селена и др.). Повышение СРБ у животных более чем в 2 раза, учитывая, что данный параметр находится в пределах физиологической нормы, хотя и не указывает на наличие острого воспаления, все же подтверждает наличие повреждения в организме и тенденцию к развитию вялотекущего воспалительного процесса. Повышение уровня ферментов может являться следствием высокой нагрузки на печень, вызванной вероятным эффектом антибиотика и повышенной выработкой токсинов условно-патогенными представителями микробиоценоза.

Применение «БАС-ЧГ» животным с экспериментальным антибиотик

ассоциированным дисбактериозом оказало эффект на динамику биохимических показателей крови животных уже на 14 сутки, что выражалось в достоверном увеличении количества общего белка на 5,5% в группе «IIA» по сравнению с результатами группы «IA», и на 8,5% по сравнению с данными в этой группе на момент окончания применения антибиотика. Количество альбуминов в группе «IIA» возросло на 11,8% по сравнению с данными после применения антибиотика, количество глобулинов на 7,3% по сравнению с данными после применения антибиотика, и на 7,3 по сравнению с группой «IA». Уровень глюкозы в группе «IIA» повысился на 26% по сравнению с моментом окончания применения антибиотика, и на 22% по сравнению с группой «IA». Уровень железа в группе «II» повысился на 20% по сравнению с данными после применения антибиотика, и на 21,7% по сравнению с группой «IA».

Кроме того, на 14 сутки применения «БАС-ЧГ» в группе «IIA» уровень АлАт, АсАт, мочевины, ЩФ, билирубина снизился соответственно на 15,6%, 17,3%, 5,9%, 6,3%, 23%, по сравнению с данными на момент окончания приема антибиотика. При этом уровень АлАт и АсАт были на 9,1% и 10,7% ниже таковых в группе «IA». Уровень ЛДГ в группе «IIA» снизился на 12% по сравнению с моментом окончания применения антибиотика и на 7,5% по сравнению с данными группы «IA». Уровень холестерина в группе «IIA» снизился на 20% по сравнению с данными на момент окончания применения антибиотика.

Уровень СРБ в группе «IIA» оказался в 2,59 раза ниже по сравнению с моментом окончания приема антибиотика и в 2,2 раза ниже, чем в группе «IA», что может в некоторой степени свидетельствовать о противовоспалительных свойствах разработанной субстанции «БАС-ЧГ».

На 21 сутки исследования отмечено, что у животных группы «IA», содержащихся после отмены антибиотика только на стандартном рационе, уровень общего белка, альбуминов, глобулинов, количество кальция, фосфора, магния, железа хотя и имели тенденцию к повышению по сравнению с данными, полученными сразу после применения антибиотика, однако все ещё оставалось достоверно ниже фоновых показателей.

Уровень ферментов в группе «IA» снизился до фоновых значений, что говорит о закономерном ослаблении токсической нагрузки на печень вследствие прекращения воздействия антибиотика. В то же время, уровень АлАт и АсАт оставался достоверно выше по сравнению с данными до начала применения антибиотика. Уровень холестерина оставался на 25% выше по сравнению с исходными данными и даже повысился по сравнению с 14 днем исследования, приблизившись к верхней границе нормативных данных для данного вида животных. Уровень СРБ оставался в 1,96 раза выше по сравнению с фоновым значением данного показателя.

Одновременно в группе «IIA», животные которой принимали «БАС-ЧГ», на 21 сутки все исследуемые биохимические показатели восстановились до уровня фоновых значений. Количество общего белка, кальция, фосфора, магния, железа в сыворотке крови был достоверно выше, а уровень СРБ, и холестерина были достоверно ниже таковых в группе «IA». Отмечено также, что в группе с «БАС-ЧГ» уровень глобулинов повысился на 3,2 г/л, что может свидетельствовать об усилении иммунорезистентности животных. Динамика уровня глюкозы в данной группе может свидетельствовать об улучшении углеводного обмена из-за активизации пищеварительной функции сахаролитической микрофлоры желудочно-кишечного тракта.

Таким образом, за 21 день приема экспериментальной субстанции у животных группы «IIA» наблюдалась выраженная тенденция к нормализации некоторых показателей белкового, углеводного и минерального обмена по сравнению с животными группы «IA», а сопоставляя результаты данных таблиц 7 и 8, можно предположить, что повышение уровня эритроцитов и гемоглобина у животных с «БАС-ЧГ» произошло вследствие улучшения обмена железа в организме.

### **3.4. Влияние биологически активной субстанции из *Medusomyces gisevii* на иммунологические показатели крови лабораторных животных**

Влияние разработанной субстанции «БАС-ЧГ» на иммунные показатели экспериментальных животных представлено в таблице 9. Результаты исследований до воздействия антибиотика в группе «ІБ» и группе «ІІБ» достоверно не отличались друг от друга и были приняты в качестве контрольных для определения последующей динамики.

Вследствие применения антибиотика у животных группы «ІБ» и группы «ІІБ» выявлены изменения некоторых иммунологических параметров крови, что выражалось в снижении уровня БАСК соответственно на 14,1% и 11,9%, ЛАСК на 16% и 14,1%, КАСК на 15,8% и 20,6%, фагоцитарного индекса на 17,8% и 19,6%, фагоцитарного числа на 1,4 и 1,5 единицы, индуцированного НСТ-теста на 13,5% и 15,5% по сравнению с данными до применения антибиотика. Кроме этого выявлено снижение уровня IgA на 16% и 20% в группах соответственно.

Исследование показало, что разработанная биологически активная субстанция оказала воздействие на иммунологические показатели у лабораторных животных уже на 14 сутки применения, что выражалось в достоверном увеличении в группе «ІІБ» БАСК, ЛАСК, КАСК, количества IgA, IgM соответственно на 9,7%, 13,5%, 21,5%, 18,1%, 4,9% по сравнению с данными, полученными в этой группе после применения антибиотика. Уровень БАСК, ЛАСК, количества IgA, IgM в группе «ІІБ» оказался достоверно выше таковых по сравнению с данными группы «ІБ» на аналогичные сутки исследования.

На 21 сутки в группе «ІБ», животным которой не производили скармливание испытуемой субстанции, не произошло полного восстановления всех исследуемых параметров иммунитета до фоновых значений. Так, уровень БАСК, ЛАСК и фагоцитарный индекс, количество IgG, IgM оставался ниже, чем до применения антибиотика.



Таблица 9 – Влияние «БАС-ЧГ» на иммунологические показатели крови крыс с экспериментальным антибиотик-ассоциированным дисбактериозом, (M±m)

Показатель	Группа «ІБ»				Группа «ІІБ»			
	До антибиотика	После антибиотика	14 сутки, стандартный рацион	21 сутки, стандартный рацион	До антибиотика	После антибиотика	14 сутки приема «БАС-ЧГ»	21 сутки приема «БАС-ЧГ»
БАСК, %	55,24±2,21	47,45±2,22*	47,5±2,22	50,12±1,18*	54,98±2,45	48,42±1,21*	<u>53,15±1,2</u> ▲	56,31±3,12▲
ЛАСК, %	47,25±1,76	39,65±1,15*	41,1±1,15	42,22±1,15*	47,92±1,82	41,15±2,2*	<u>46,55±1,2</u> ▲	48,8±2,22▲
КАСК, у.е.	51,76±3,34	43,55±2,25*	44,55±2,25	46,45±3,1	52,22±2,87	41,42±3,1*	<u>50,21±2,12</u>	54,25±2,2▲
ФИ, %	56,30±2,6	46,25±1,8*	47,11±1,8	48,22±2,7*	56,41±2,6	45,35±1,2*	51,1±2,3	61,52±2,3▲
ФЧ, ед	3,5±0,3	2,1±0,4*	2,4±0,4	2,6±0,5	3,8±0,2	2,3±0,4*	3,2±0,3	3,7±0,3
ПЗФ, %	32,2±0,6	23,5±0,5*	26,7±0,3	30,2±0,3	33,4±0,5	26,5±0,5*	28,2±0,4	33,6±0,4
Нст-тест сп, %	23,3±2,2	25,3±2,8	26,3±2,2	26,2±2,5	24,1±2,6	23,2±2,5	25,2±2,2	27,8±2,8
Нст-тест инд, %	46,4±2,6	40,1±1,6*	41,1±1,1	43,2±2,3	47,8±2,80	40,4±3,22*	45,6±2,2	48,4±2,4
IgA, г/л	0,57±0,026	0,49±0,027*	0,47±0,022	0,51±0,031	0,55±0,022	0,44±0,028*	<u>0,52±0,02</u> ▲	0,58±0,014▲
IgM, г/л	1,18±0,019	1,21±0,022	1,20±0,028	1,13±0,014*	1,19±0,028	1,21±0,023	<u>1,27±0,019</u> ▲	1,26±0,034▲
IgG, г/л	1,83±0,028	1,85±0,035	1,80±0,032	1,75±0,022*	1,85±0,032	1,84±0,038	1,88±0,028	2,1±0,035*▲

Примечание: «Группа ІБ» – станд.корм; «Группа ІІБ» – станд.корм + 400 мг/кг «БАС-ЧГ»; \*(P<0,05) – в сравнении с данными до применения антибиотика; подчеркивание (P<0,05) – в сравнении с данными по окончанию применения антибиотика; ▲(P<0,05) – в сравнении с группой «ІБ».

В результате применения субстанции «БАС-ЧГ» в течение 21 суток все исследуемые показатели у животных в группе «ПБ» достигли фоновых значений, полученных до начала действия антибиотика. Уровень IgG на 0,25 г/л превысил показатели в данной группе до начала применения антибиотика. Уровень БАСК, ЛАСК, КАСК, фагоцитарного индекса, количество IgA, IgG, IgM в группе «ПБ» достоверно превышали аналогичные значения группы «ІБ».

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о выраженных иммуномодулирующих свойствах разработанной биологически активной субстанции «БАС-ЧГ».

### **3.5. Гистологическая картина кишечника и печени лабораторных животных под влиянием биологически активной субстанции из *Medusomyces gisevii***

С учетом полученных сведений о функциональных показателях крови, правомерно сделать заключение о том, что одними из главных органов-мишеней и функционально ответственных органов в возникновении и развитии патологических процессов в эксперименте являлись кишечник и печень. Это обусловило дальнейший интерес к более глубокому гистологическому изучению этих органов, что, по нашему мнению, дополняет понимание механизма воздействия испытуемой субстанции на организм животных.

Гистологическую картину, отражающую влияние «БАС-ЧГ» на указанные органы, сравнивали со структурными особенностями этих же органов у крыс с дисбактериозом, не получавших препарата, то есть на 21 сутки после окончания применения антибиотика, что позволило судить о сопутствующих патологических процессах в исследуемых органах, вызванных приемом антибиотика и снижением общего уровня кишечной микрофлоры.

Результаты исследования тонкого кишечника свидетельствуют о том, что у большинства особей группы «ІА» наиболее выраженные нарушения установлены в слизистой оболочке.

На поверхности ворсинок слизистой оболочки подвздошной кишки, иногда

на всем протяжении среза, видны обильные наложения бесструктурной массы слизи, с примесью большого количества десквамированных энтероцитов (рисунок 8).

Состояние ворсинок слизистой оболочки у разных животных отличается, однако признаки альтеративных процессов в них, в разной степени выраженные, отмечены практически у всех крыс (28 животных). На протяжении среза отмечена десквамация эпителия ворсинок, у большинства животных наиболее выраженная в апикальной области, а у некоторых крыс она затрагивает более обширные участки и область крипт (рисунок 9).

В неповрежденном эпителии, отдельные сохранившиеся энтероциты с признаками дистрофии, что выражается в набухании цитоплазмы и размытости границы ядра клеток. Значительное число клеток эпителия ворсинок вакуолизировано и заполнено мутноватым неоднородным содержимым (гиперплазия бокаловидных клеток) (рисунок 10).

При визуализации и дифференциации энтероцитов в одном поле зрения в последовательно расположенных ворсинках, количество бокаловидных клеток достигает  $31,2 \pm 4,01\%$  ( $P < 0,05$ ) на 100 подсчитанных клеток, что является признаком обильного слизиобразования. В эпителиальном слое, выстилающем крипты, отмечено снижение количества клеток (рисунок 11), в том числе клеток Панета, что напрямую связано со снижением секреции некоторых пищеварительных ферментов, антибактериальных субстанций и лизоцима, являющегося одним из ведущих факторов неспецифической резистентности, а также характеризует низкий уровень регенераторной активности эпителия.

В ряде случаев часть ворсинок полностью деструктурирована. Сохранившиеся ворсинки различных размеров, значительное количество укороченных, у некоторых животных ворсинки гипертрофированы по сравнению с остальными (рисунок 12). Часть из них набухшие, границы слоев (эпителий, собственная пластина, мышечная пластина) расплывчаты.

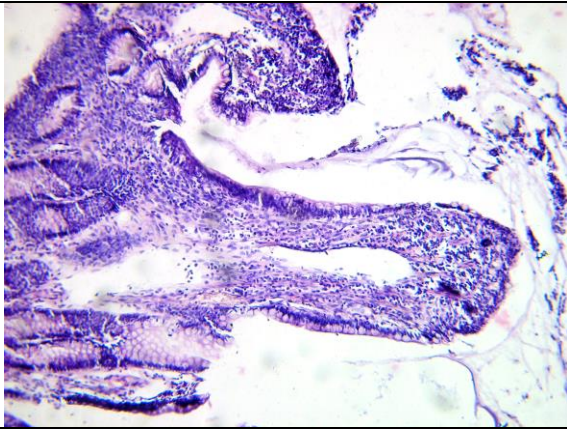


Рисунок 8 – Очаговое слущивание эпителия слизистой оболочки подвздошной кишки. Массивные наложения слизи с примесями клеточных элементов и деструктурированных тканей у крысы группы «IA». Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 100$

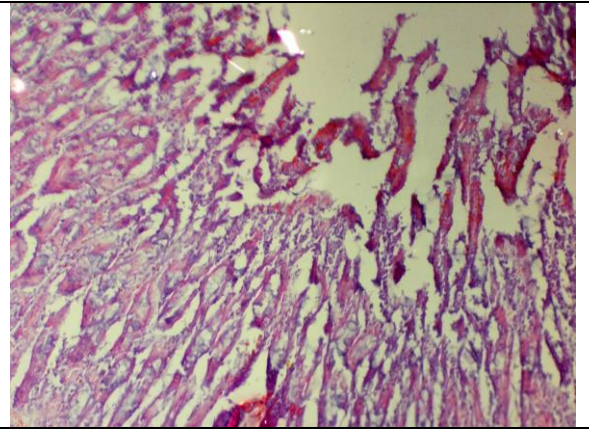


Рисунок 9 – Апикальная деструкция ворсинок подвздошной кишки у крысы группы «IA». Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 100$

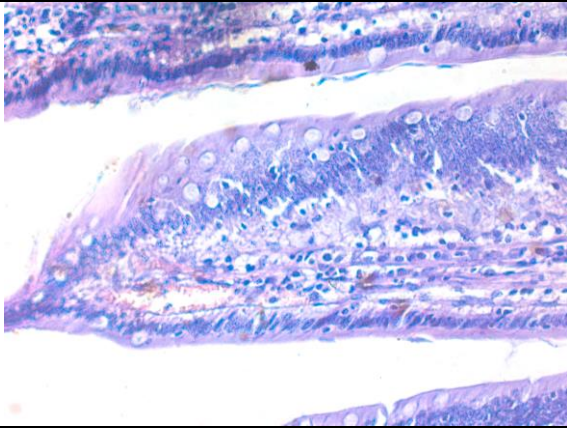


Рисунок 10 – Повышение количества бокаловидных клеток и гиперемия сосудов ворсинки подвздошной кишки у крысы группы «IA». Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 400$

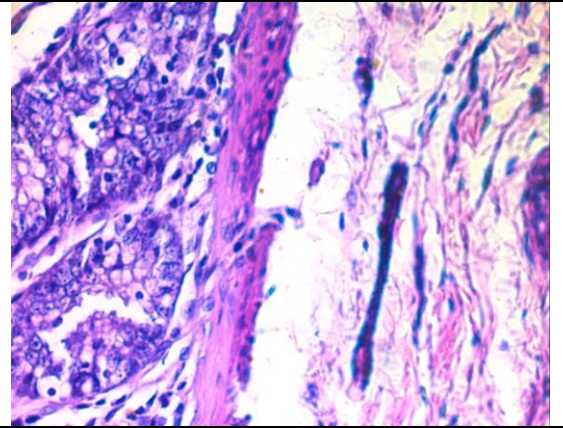


Рисунок 11 – Основания крипт подвздошной кишки у крысы группы «IA» обеднены клеточными элементами. Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 400$

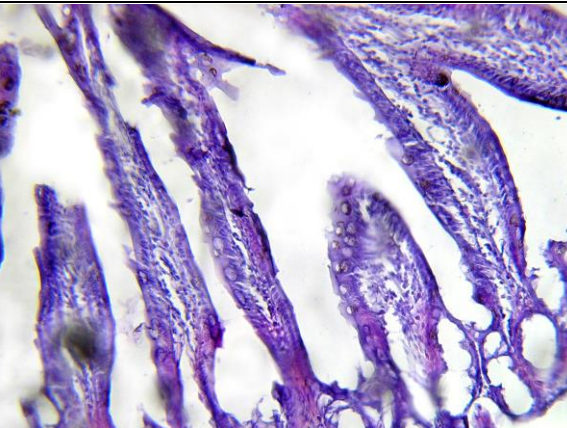


Рисунок 12 – Неоднородность размеров ворсинок, наличие укороченных и гипертрофированных ворсинок подвздошной кишки крысы группы «IA». Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 200$

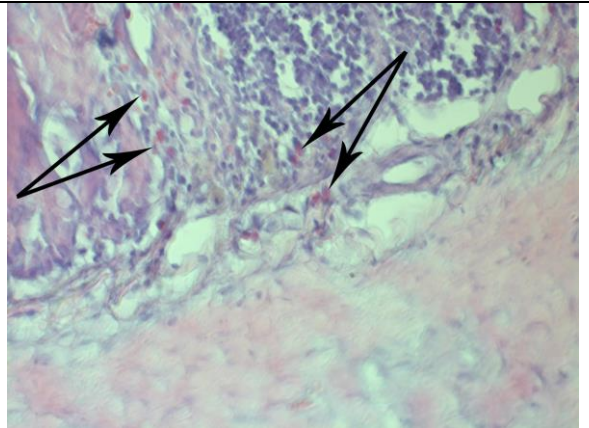
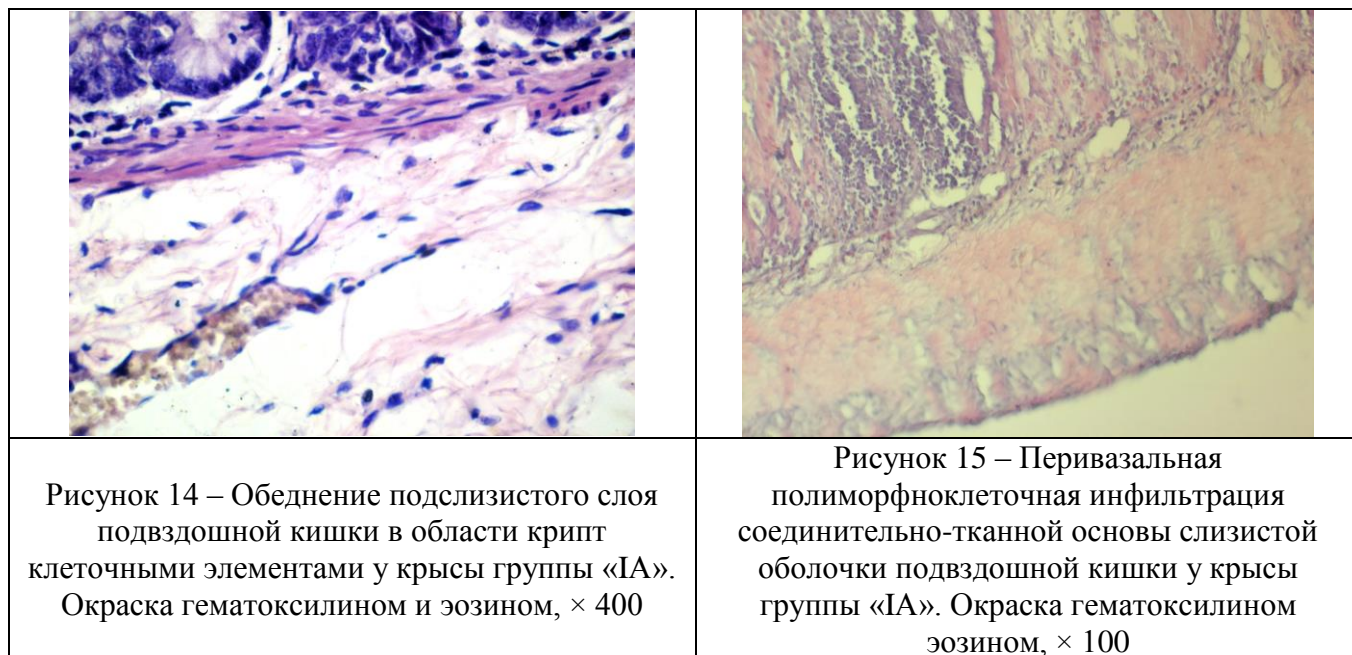


Рисунок 13 – Наличие эозинофилов (отмечено стрелкой) в подвздошной кишке у крысы группы «IA». Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 400$



В собственной пластинке слизистой оболочки подвздошной кишки заметно снижена плотность ретикулярных и лимфоидных элементов, солитарные лимфоидные фолликулы практически не обнаруживаются. Среди клеток соединительной ткани отмечается большое количество эозинофилов, при увеличении в 400 раз до 7-8 клеток (у 8 крыс), что подтверждает роль аллергического компонента в развивающемся патологическом процессе в кишечнике (рисунок 13). Клеточный состав в области, прилегающей ко дну крипт, обеднен (рисунок 14).

Сосуды слизистой оболочки подвздошной кишки у большинства животных умеренно полнокровны. У 8 крыс сосуды апикальной части сохранившихся ворсинок и нижележащих слоев соединительной ткани собственной пластины гиперемированы (рисунок 10). У этих животных ближе к подслизистой основе встречаются перивазальные полиморфноклеточные инфильтраты, представленные лимфоидно-макрофагальными и ретикулярно-лимфоцитарными элементами, а также клетками крови (рисунок 15). Стенки этих сосудов набухшие, пропитаны жидкостью с клеточными элементами крови.

Гистологическая картина в толстом кишечнике схожа с вышеописанными изменениями в тонком отделе кишечника, однако интенсивность этих изменений отличается.

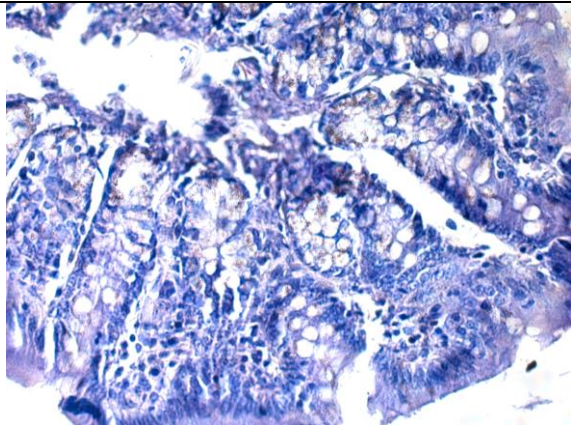
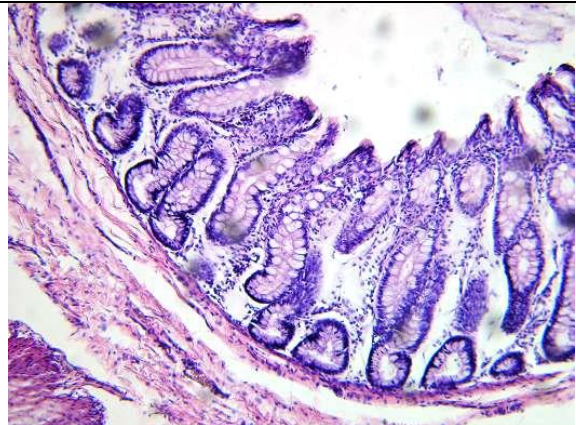
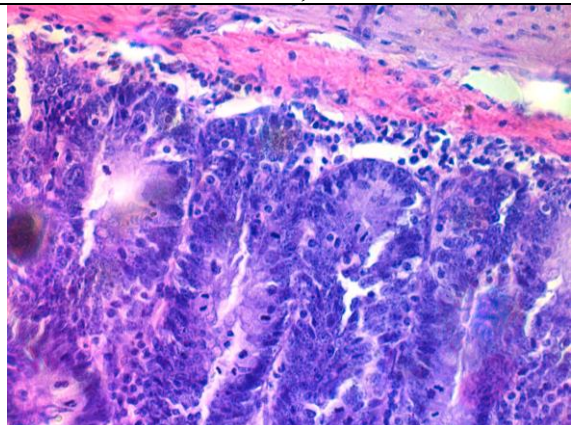
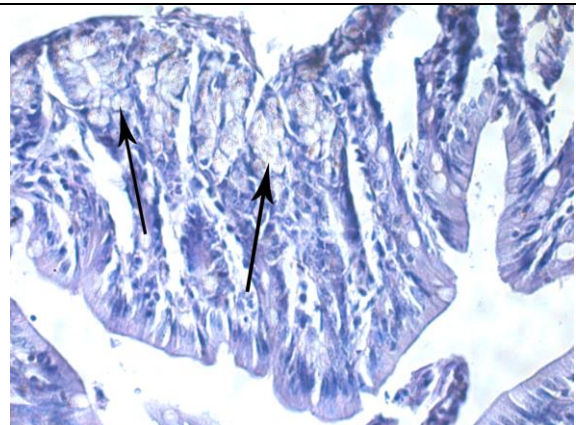
Так, в просвете слепой и ободочной кишки отмечаются более обширные наложения слизи с примесью деструктурированных клеток эпителия. Деструкция и слущивание эпителиального слоя отмечены преимущественно в апикальной области крипт.

Сохранившиеся крипты хорошо развиты, различной высоты. Отдельные крипты укорочены, а их просветы зачастую расширены. У 7 крыс отмечена очаговая деструкция крипт, в виде нарушения железистого строения, сопровождающаяся набуханием окружающих тканей (рисунок 16).

Среди клеток эпителия, выстилающего крипту, преобладают расширенные бокаловидные клетки различной формы и размеров. Большое их количество вакуолизировано. Иногда крупные бокаловидные клетки располагаются бессистемно, бесформенными скоплениями, заполняющими значительную часть просвета крипты (рисунок 16). Число бокаловидных клеток на 100 подсчитанных колоноцитов крипты составило в среднем  $74 \pm 3,01\%$  ( $P < 0,05$ ). Другие клетки, характерные для эпителия толстого кишечника, сосредоточены преимущественно у основания крипт и представлены в основном мелкими клеточными элементами, со слабой дифференцировкой.

Соединительная ткань собственной пластины у большинства животных обеднена клеточными элементами, отмечена гипоплазия лимфоидных фолликулов (рисунок 17).

У 7 животных зарегистрировано диффузно повышение числа клеток в собственной пластине, при этом среди них встречаются как клетки соединительной ткани (в основном фибробласты), так и клеточные элементы, свидетельствующие о воспалительном характере инфильтрации: лимфоциты, нейтрофилы, иногда эозинофилы (рисунок 18).

	
<p>Рисунок 16 – Деструкция либеркюновых крипт. Скопление бокаловидных клеток в просвете крипты слепой кишки у крысы группы «IA». Окраска гематоксилином и эозином, × 400</p>	<p>Рисунок 17 – Обедненный клеточный состав соединительной ткани крипт ободочной кишки у крысы группы «IA». Окраска гематоксилином и эозином, × 200</p>
	
<p>Рисунок 18. – Диффузное повышение числа клеток в собственной пластине ободочной кишки у крысы группы «IA». Окраска гематоксилином и эозином, × 1000</p>	<p>Рисунок 19. – Гиперемия сосудов крипт слепой кишки (ближе к подслизистому слою) у крысы группы «IA» (отмечено стрелками). Окраска гематоксилином и эозином, × 400</p>

Сосуды визуализируются преимущественно ближе в подслизистому слою и у части животных они кровенаполнены и расширены (рисунок 19). Вокруг сосудов признаки полиморфно-клеточной инфильтрации.

Таким образом, экспериментальный дисбактериоз, вызванный у белых крыс приемом антибиотика гентамицина сульфата в дозе 15 мг/кг живой массы дважды в сутки в течение 7-ми дней, по истечении 21 суток после завершения приема антибиотика характеризуется выраженными дистрофическими изменениями основных структурных компонентов слизистой оболочки кишечника, выступающими как самостоятельно, так и у части животных в сочетании с экссудативным и пролиферативным компонентом, свидетельствующим о

развитии катарального воспаления (не исключено аллергического характера). Практически у 100% животных перечисленные патологические процессы сопровождалась морфологическими признаками иммунной недостаточности кишечной стенки и низкой регенераторной активностью клеток эпителия.

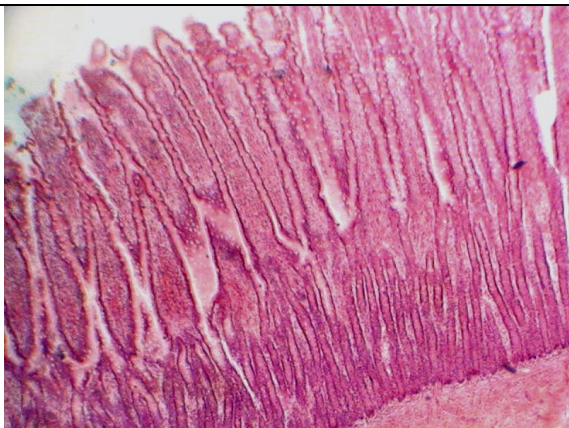
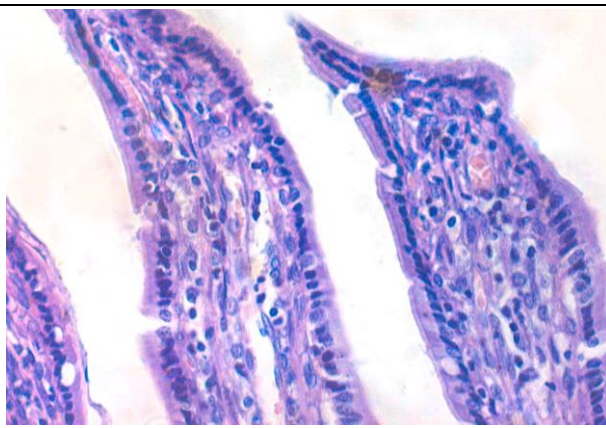
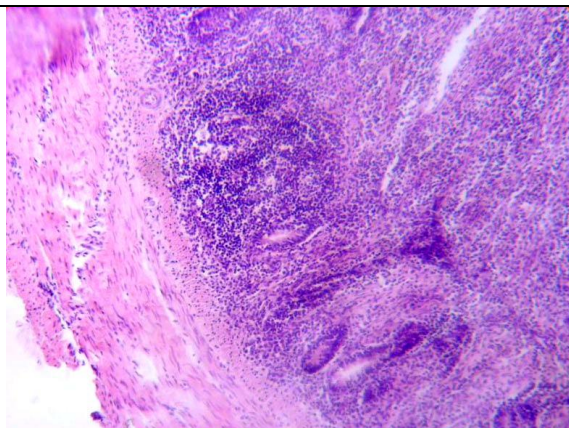

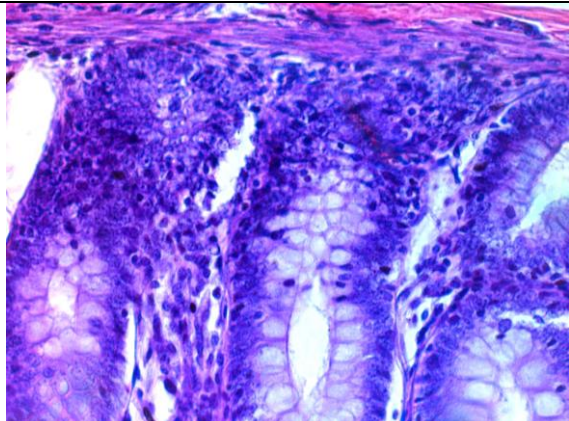
Одновременно гистологическое исследование кишечника животных группы «ПА», получавших «БАС-ЧГ» в течение 21 суток после индукции экспериментального дисбактериоза, показало отсутствие выраженных признаков дистрофических или воспалительных процессов в тонком и толстом кишечнике.

Так, в тонком кишечнике практически у всех животных количество слизи на поверхности ворсинок слизистой оболочки незначительно. На всем протяжении подвздошной кишки ворсинки правильной пальцевидной формы, одинаковой длины (рисунок 20), отмечено отсутствие очагов десквамации эпителия ворсин и крипт (рисунок 21).

Форма энтероцитов и границы их ядер достаточно четкие, умеренно выражена вакуолизация. При визуализации и дифференциации энтероцитов в одном поле зрения в последовательно расположенных ворсинках, количество бокаловидных клеток составляло  $13,4 \pm 2,01\%$  ( $P < 0,05$ ) на 100 подсчитанных клеток. Это в 2,3 раза ниже, чем в группе «IA», что свидетельствует об умеренном слизиобразовании. Пространства крипт не расширены. Количество клеток, в том числе клеток Панета в эпителии крипт увеличено по сравнению с таковым в группе «IA», что свидетельствует о нормализации регенераторной активности эпителия, уровня секреции и неспецифической резистентности.

В собственной пластинке слизистой оболочки подвздошной кишки наблюдается активная пролиферация ретикулярных и лимфоидных элементов, в поле зрения обнаруживаются солитарные лимфоидные фолликулы (рисунок 22). Эозинофилы среди клеток соединительной ткани не идентифицируются. Сосуды слизистой оболочки у большинства животных умеренно полнокровны.



	
<p>Рисунок 20 – Подвздошная кишка крысы группы «IIA». Ворсинки правильной пальцевидной формы, пространства крипт не расширены. Окраска гематоксилином и эозином, × 100</p>	<p>Рисунок 21 – Отсутствие признаков десквамации эпителия ворсинок подвздошной кишки крысы группы «IIA». Умеренное количество бокаловидных клеток. Окраска гематоксилином и эозином, × 400</p>
	
<p>Рисунок 22 – Лимфоидное образование в подвздошной кишке крысы группы «IIA». Окраска гематоксилином и эозином, × 100.</p>	<p>Рисунок 23 – Эпителий ободочной кишки у крысы группы «IIA». Бокаловидные клетки однородной формы и размеров. Окраска гематоксилином и эозином, × 100</p>
	<p>Рисунок 24. Повышение клеточных элементов с более или менее выраженной дифференцировкой в придонной области либеркюновых крипт ободочной кишки крысы группы «IIA». Окраска гематоксилином и эозином, × 1000</p>

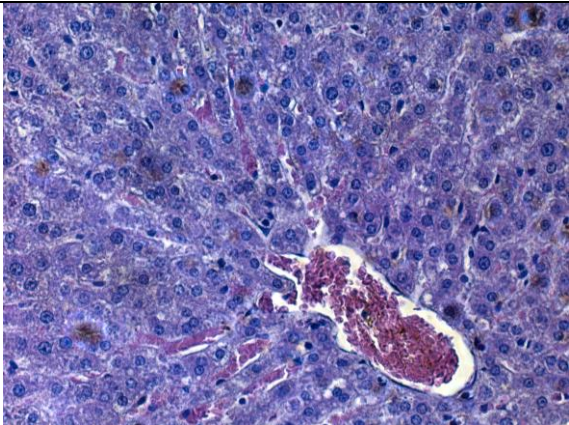
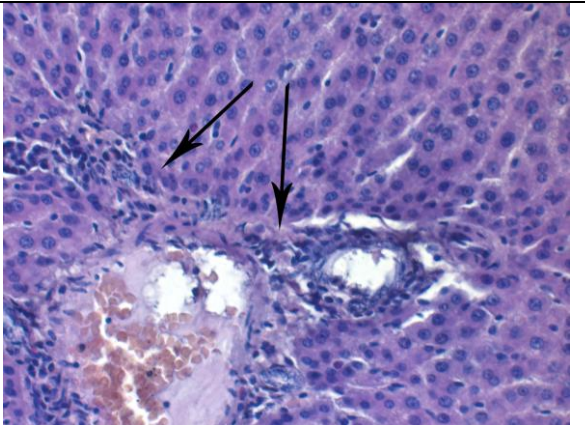
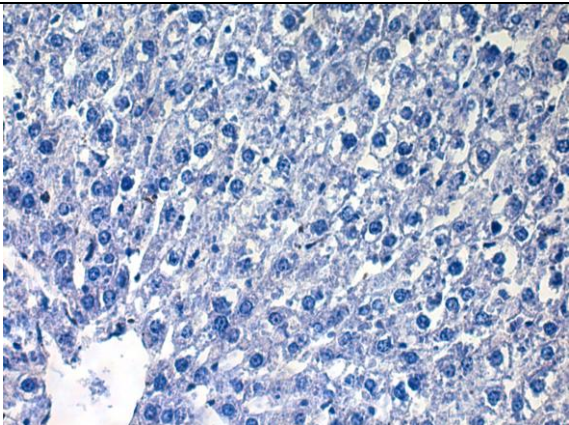
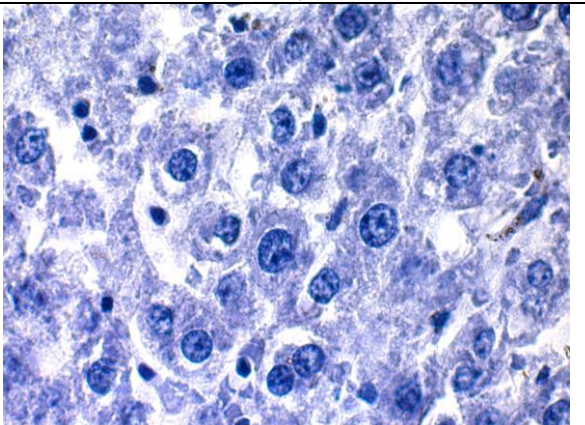
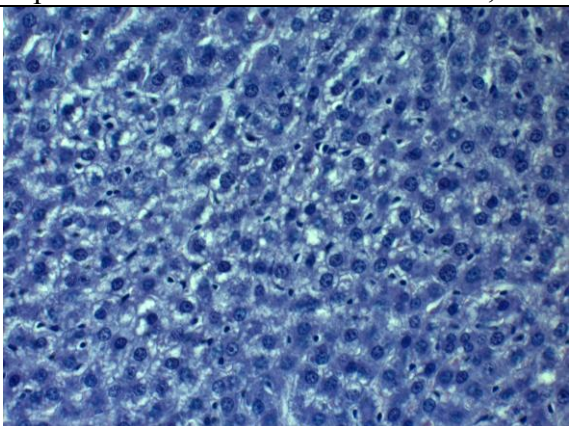
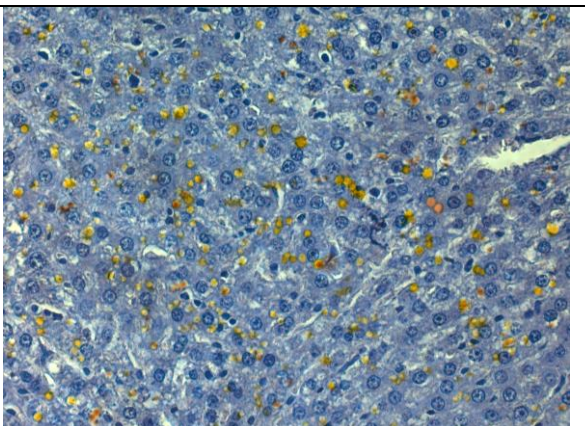
В слепой и ободочной кишке животных группы «II» не отмечено обширных наложений слизи. Эпителий крипт преимущественно без повреждений, крипты хорошо развиты, примерно одинаковой высоты, просветы крипт четко выражены

(рисунок 23). Число бокаловидных клеток на 100 подсчитанных колоноцитов крипты составило в среднем  $57,1 \pm 3,25\%$  ( $P < 0,05$ ), что свидетельствует о тенденции к нормализации соотношения к остальным клеткам эпителия. Несмотря на достаточно высокое их количество, размеры и степень вакуолизации этих клеток однородна, что свидетельствует об их нормальной секреторной активности. В придонной области крипт повышено число клеточных элементов с более или менее выраженной дифференцировкой, что является показателем повышения регенераторной активности клеток, способствующих восстановлению либеркюновых желез (рисунок 24). В собственной пластине кишечника отмечена гиперплазия клеточных элементов. Обнаруживаются солитарные лимфоидные фолликулы. Сосуды визуализируются отчетливо, они умеренно кровенаполнены без признаков альтерации и нарушения циркуляции крови.

Таким образом, применение «БАС-ЧГ» животным в течение 21 суток после приема антибиотика способствовало восстановлению эпителия и элементов соединительной ткани, что сопровождалось снижением воспалительных и дистрофических процессов в кишечнике, а также признаками стимуляции местного иммунитета.

Гистологическая картина печени в группе «IA» представлена некоторыми изменениями данного органа у подавляющего большинства животных. Так, у большинства крыс центральные вены были кровенаполнены и расширены (рисунок 25), у некоторых животных стенка их утолщена, отечная, с признаками выхода клеточных элементов за границы сосуда, отмечена гиперемия синусоидных капилляров, что указывает на картину застойной венозной гиперемии.

Сосуды портальной области расширены, кровенаполнены. У части животных выявлено наличие перивазального пропитывания стенок сосудов клеточными элементами, а также наличие элементов пристеночной лимфоидно-эпителиоидной и макрофагальной инфильтрации в портальной области (рисунок 26).

	
<p>Рисунок 25 – Нарушение балочной структуры печени крысы группы «IA». Расширенная кровенаполненная вена с синусодными капиллярами. Окраска гематоксилином и эозином, × 400</p>	<p>Рисунок 26 – Печень крысы группы «IA». Признаки перивазальной полиморфноклеточной инфильтрации в портальной области. Окраска гематоксилином и эозином, × 400</p>
	
<p>Рисунок 27 – Нарушение балочного строения печени крысы группы «IA». Дистрофические изменения гепатоцитов, вакуолизация смешанного характера. Окраска гематоксилином и эозином, × 400</p>	<p>Рисунок 28 – Клетки печени крысы группы «IA» с признаками белковой дистрофии. Окраска гематоксилином и эозином, × 1000</p>
	
<p>Рисунок 29 – Клетки с разной степенью вакуолизации в печени крысы группы «IA». Окраска гематоксилином и эозином, × 400</p>	<p>Рисунок 30 – Жировая дистрофия гепатоцитов в печени крысы группы «IA». Окраска Суданом III, × 400</p>

Практически у всех животных дольчатое строение печени в целом сохранено, однако при этом у части из них зарегистрировано в разной степени

выраженное нарушение балочного строения в паренхиме. Отмечена очаговая дистрофия гепатоцитов, которая у большинства животных локализована в центральной области, и у единичных особей по периферии долики (рисунок 27).

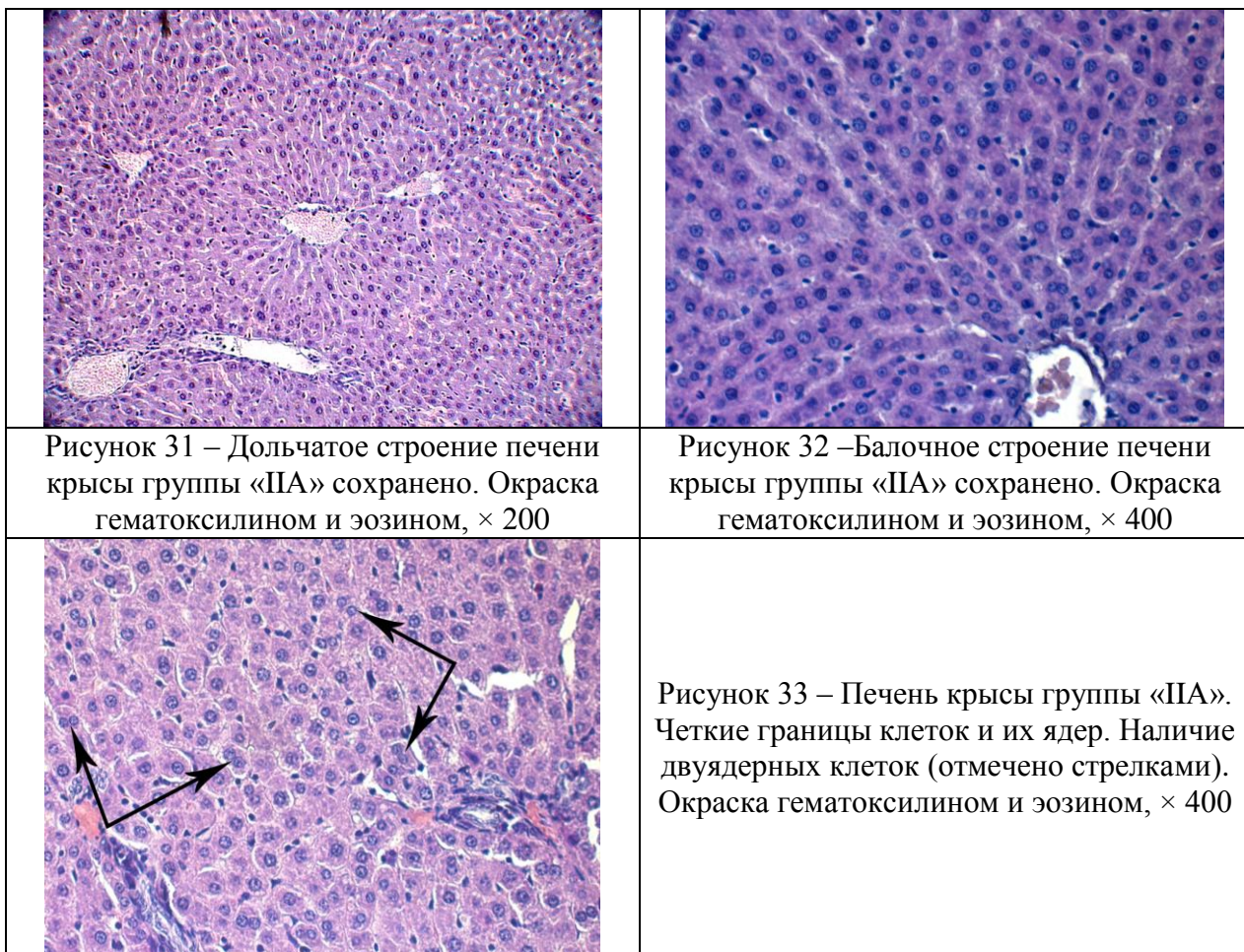
У 7 животных очаги дистрофии обширны. При этом регистрируются крупные гепатоциты с размытыми границами и набухшим ядром, мутной цитоплазмой, иногда с мелкой зернистостью, что дифференцировано нами как белковая дистрофия (стадия мутного набухания и зернистого перерождения) (рисунок 28).

У ряда животных в гепатоцитах присутствуют вакуоли различных размеров (рисунок 29), что при окраске Суданом III определено нами как жировая дистрофия (рисунок 30). У некоторых животных отдельные гепатоциты в очагах дистрофии с признаками некроза. Многоядерные клетки в поле зрения единичны.

В результате гистологического исследования печени животных группы «ПА», которым применяли субстанцию «БАС-ЧГ» в течение 21 суток, выявлено отсутствие выраженных структурных изменений данного органа.

Так, центральные вены и синусоидные капилляры, а также сосуды портальной области печени умеренно кровенаполнены, признаков застойной венозной и артериальной гиперемии не наблюдается. Перивазальная инфильтрация не выражена. Типичное дольчатое строение органа сохранено (рисунок 31). Балочное строение печени у подавляющего большинства животных не нарушено (рисунок 32).

Границы гепатоцитов и их ядер четкие (рисунок 33), встречаются лишь отдельные клетки в состоянии дистрофии. Обнаружено большое количество гепатоцитов с выраженной базофильной зернистостью в цитоплазме, что свидетельствует об усилении белково-синтетической функции печени. Клеток с некротическими поражениями не обнаружено. Число многоядерных клеток в поле зрения увеличено до 4-6, что свидетельствует об интенсификации репаративных процессов в печени (рисунок 33).



Таким образом, у животных группы «IA», которые после индукции экспериментального дисбактериоза не принимали субстанцию «БАС-ЧГ», наблюдались в разной степени выраженные дистрофические изменения в печени, связанные с нарушением как липидного, так и белкового метаболизма, характерные для усиленной токсической нагрузки на орган. В то же время у животных группы «ПА», принимавших разработанную субстанцию, указанные изменения практически не выявлялись.

На основании проведенного исследования можно сделать вывод о том, что применение «БАС-ЧГ», способствует предотвращению или ослаблению признаков дистрофических и воспалительных изменений в кишечнике и печени подопытных животных, а также обеспечивает стимуляцию местного иммунитета.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На данный момент времени мировым сообществом общепризнана существенная роль микрофлоры в корректном функционировании организма. Нормальная микрофлора желудочно-кишечного тракта выполняет целый ряд важнейших функций, а также является обязательным звеном в реализации многих физиологических процессов внутри системы [8-10, 14, 15, 18-21, 49, 66, 71, 122, 125].

К сожалению, в связи с особенностями отрасли в ветеринарии и сельском хозяйстве одними из наиболее ярких проблем здоровья животных по-прежнему остаются заболевания, связанные с нарушением состояния естественного микробиоценоза желудочно-кишечного тракта. Всевозможные факторы, воздействующие на животное, могут нередко приводить к усугублению данных проблем, возникновению глубоких дисбиотических нарушений и развитию сопутствующих им сложных патологий, в которых зачастую очень трудно выделить ту, которая является манифестирующей [30, 53, 67, 72, 131]. Дестабилизация микробного сообщества и его функциональной активности пробивает брешь в защитной системе организма, снижает колонизационную резистентность барьеров, провоцируя развитие эндогенных инфекционных процессов, воспалительных заболеваний кишечника и других органов, а также возникновение иммунодефицита. Снижение трофической и синтетической функции микрофлоры приводит к нарушению всех видов метаболизма, что в свою очередь негативно отражается на целом ряде жизненно важных процессов, таких как кроветворение. Ослабление детоксикационной функции микрофлоры оказывает влияние на ферментные системы печени, провоцируя метаболические и структурные изменения [91, 92, 94, 96, 111, 1220, 143, 157, 177, 197, 206, 211, 227, 231, 235, 253]. Все это естественно отражается на качестве жизни животного, приводит к снижению интенсивности производства, экономическому ущербу для хозяйств и другим последствиям.

Учитывая сложный патогенез дисбиотических процессов, изыскание новых, наиболее совершенных способов профилактики и коррекции нарушений

микрофлоры кишечника, обладающих полипатогенетической направленностью, для ветеринарии до сих пор является актуальным направлением.

Анализ доступной литературы показал, что мероприятия по лечению и предупреждению дисбиотических нарушений должны содержать в себе целый комплекс процедур, направленных на нормализацию количественного и функционального баланса нормальной микрофлоры, включая устранение патогенной бактериальной обсемененности, удаление токсических продуктов обмена микроорганизмов, нормализацию метаболизма и стимуляцию иммунитета организма.

В большинстве случаев для решения проблем дисбактериозов применяют широкий перечень средств, среди которых традиционными являются препараты пробиотики (наиболее распространенные в отрасли ветеринарии), пребиотики и их сочетания. Пробиотиками являются препараты живых бактерий, зачастую доминирующих представителей нормоценоза (бифидобактерии, лактобактерии), чье поступление в организм теоретически способно обеспечить заселение пустующих экологических ниш кишечника и нормализацию физиологических функций микрофлоры. Однако, на практике их использование имеет ряд признанных недостатков, начиная от технических, связанных с их производством, заканчивая низкой выживаемостью штаммов, отсутствием возможностей для размножения внедренных бактерий, генетической чужеродности и даже их потенциальной патогенности при внесении в нестабильную систему в условиях дисбактериоза. Рядом авторов отмечено, что действие пробиотиков реализуется преимущественно транзиторно, и не всегда затрагивает все звенья патогенеза дисбиотических расстройств [90, 114, 128, 168, 210, 238].

К пребиотикам относятся препараты, содержащие растворимые и нерастворимые пищевые волокна, пептиды, ферменты, аминокислоты, органические кислоты, ненасыщенные жирные кислоты. Эти соединения, исходя из многих преимуществ, занимают более выгодное положение в сравнении с пробиотиками, так как оказывают стимулирующее действие по отношению к собственным представителям кишечного микробиоценоза, и обладают целым

рядом «побочных» положительных эффектов разной направленности на организм в целом, которые запускаются напрямую или косвенно. Наиболее эффективными и безопасными средствами из них в настоящее время признаются метабиотики – пребиотические препараты нового поколения, которые имеют в своем составе продукты метаболизма или структурные компоненты пробиотических микроорганизмов (пробиотический компонент) [2, 103, 105, 226, 245, 249, 350].

Особое место в ряду этих препаратов занимают сложные композиции, помимо пробиотического компонента содержащие в своем составе дополнительные вспомогательные вещества (волокна, минералы, органические кислоты и др.), которые многократно усиливают положительные действия препарата и позволяют оказать как можно более полное и в то же время прицельное действие в отношении основных патологических процессов, развивающихся на фоне дисбактериозов [4, 11, 28, 31, 41, 69, 102, 116, 123, 124, 152, 166, 186, 199, 221].

Стоит отметить, что в условиях работы с животными вопрос стоимости используемых средств является особенно значимым, а иногда и решающим. В связи тем, что процесс создания комбинированных метабиотиков является довольно трудоемким и, как следствие, затратным, несмотря на высокую эффективность, их применение для животных в настоящее время очень ограничено, что доказывает практически полное отсутствие их наименований на рынке ветеринарных препаратов.

Вышесказанное заставило нас обратиться к поиску такого сырья, которое бы заведомо сочетало в себе потенциально ценные свойства для создания современного метабиотика, а также обладало довольно низкой себестоимостью.

В результате литературного поиска было выявлено, что большой потенциал в этом отношении содержат в себе естественные микробные симбионты, которые в силу своих сложных межвидовых взаимоотношений внутри консорциума способны продуцировать гораздо больший спектр метаболитов, чем одиночные штаммы микроорганизмов.

Одним из таких объектов является природный микробный симбионт



*Medusomyces gisevii*, сочетающий в своем составе дрожжи и уксуснокислые бактерии. Среди метаболитов чайного гриба находится широкий перечень веществ: органических кислот (яблочная, молочная, уксусная, глюкуроновая, глюконовая, лимонная, щавелевая, пировиноградная, фосфорная, койевая, хинная), сахаров (моносахариды, дисахариды), витаминов (С, В1, РР, D), ферментов (липаза, амилаза, сахараза, протеаза, каталаза), липидов (фосфатиды, стерины, жирные кислоты), альдегидов, белков, сапонинов, нуклеиновых кислот, аминокислот, азотистых оснований, а также бактериальная целлюлоза в виде зооглеи [44-46, 70, 96, 155, 191, 192, 247, 250, 255, 221, 257, 259, 273, 274, 282, 289-292, 306]. Изученные литературные сведения о богатом поликомпонентном составе чайного гриба, указывающие на его высокий потенциал в качестве искомого биологически активного сырья, позволили нам приступить к работе над созданием нашего препарата.

В настоящее время работа с *Medusomyces gisevii* ведется во многих регионах нашей страны, главным образом в отрасли пищевой промышленности, где различные культуры чайного гриба являются сырьем для изготовления продуктов питания и напитков. К числу пищевых предприятий, работающих с культурой чайного гриба, относится компания «ООО Русквас» (Россия, г. Лыткарино) производящая широкий ассортимент напитков под названиями «Чайный гриб», «Комбуча» и др. [172]. Согласно данным предприятия, в процессе производства напитков накапливается большое количество зооглеи симбионта, которую неминуемо извлекают из технологического процесса, в связи с чем накапливаются тонны ценного вторичного сырья, которое может быть направлено на переработку.

В своей работе мы использовали зооглею, полученную при культивировании микробной культуры *Medusomyces gisevii alfa* ВКПМ Sa-10. На начальном этапе работы нами был предложен способ переработки, включающий ее фрагментирование механическим способом, помещение в низкотемпературную камеру на 48 ч, последующую лиофилизацию, повторное измельчение в лабораторной мельнице, инактивацию микробного компонента путем

автоклавирования в течение 10 минут при температуре 105°C, давлении 1,1 атм. Полученному продукту было присвоено тестовое название «БАС-ЧГ» [83, 84, 181, 212].

Проведенные исследования подтвердили наличие в готовой субстанции широкого перечня аминокислот, макро- и микроэлементов, органических кислот, углеводов, сырой клетчатки, фермента амилазы (в результате исследования амилолитической активности).

Бактериальная целлюлоза, присутствующая в составе «БАС-ЧГ», является истинным пребиотиком – пищевым волокном, которое обладает устойчивостью к действию желудочного сока, не расщепляется ферментами желудочно-кишечного тракта и не всасывается в нем. Доходя до средних отделов кишечника, она на 70% метаболизируется микрофлорой, создает дополнительную поверхность для прикрепления микроорганизмов и их размножения. Кроме того, особенность строения зооглеи позволяет ей выступать в качестве матрицы-носителя биологически активных веществ и ферментов, содержащихся в препарате, которые способны достигать нижних отделов кишечника и реализовывать свой потенциал направленно. Также согласно литературным сведениям, бактериальная целлюлоза может выступать в качестве сорбента, способствующего элиминации из кишечника токсических продуктов обмена веществ патогенных и условно-патогенных микроорганизмов [3, 54, 148, 191, 192, 200, 147, 274, 280, 307, 321, 332, 351, 353].

Содержащиеся в составе разработанной субстанции макро- и микроэлементы, органические кислоты, аминокислоты способны обеспечивать питательные потребности микроорганизмов кишечника, являются одним из ключевых источников энергии для разных органов и тканей. Присутствие в составе фермента амилазы не только способствует более успешному усвоению углеводов, но и способно снижать уровень воспаления, зачастую сопутствующего дисбактериозам [6, 56, 93, 108, 116, 118, 216, 245, 246, 350].

Мы солидарны с мнениями Н.С. Егорова (1989), С.И. Прудникова и А.А. Духовского (2002), В.В. Павленко с соавт. (2015), Т. В. Рябцева, Е. Л. Седёлкина

(2017), Е. С. Замятиной, А. В. Канарского (2018) и других авторов о том, что глюканы, маннаны, гликогеноподобные единицы и другие элементы клеточных стенок дрожжей и уксуснокислых бактерий являются иммуномодуляторами. В связи с этим считаем, что одним из важнейших свойств «БАС-ЧГ» являются присутствующие в ней в силу особенностей строения и развития зооглеи инактивированные микроорганизмы культуры чайного гриба и их фрагменты, напрямую обуславливающие иммунную стимуляцию организма.

Кроме того, не исключаем сохранение в итоговой субстанции других термостабильных соединений, по сообщениям Л.Т. Даниелян (2005) присущих сырой зооглее чайного гриба, среди которых, по нашему мнению, могут оказаться антибиотико-подобные вещества, оказывающие избирательный эффект в отношении патогенных микроорганизмов.

Мы считаем, что вышеперечисленный комплекс компонентов вполне соответствуют и даже превосходит по составу целый ряд современных пребиотических препаратов, в том числе метабиотиков, которые могут выступать в качестве аналогов. Среди таковых можно выделить «Бактистатин» (ООО «Крафт», Россия), содержащий высушенную культуральную жидкость *Bacillus subtilis*, минерал цеолит, гидролизат соевой муки, и препарат «Эубиокор» (НПК «Бик», Россия), содержащий пищевые волокна, продукты метаболизма и инактивированные клетки дрожжей штамма *Saccharomyces cerevisiae (vini)*. Оба препарата согласно наставлениям предприятий-производителей оказывают стимулирующее действие на микрофлору, параллельно иммуномодулирующие, сорбирующие, метаболизмкорректирующие и другие эффекты, однако, следует отметить, что они, к сожалению, не используются в ветеринарной практике [1, 62, 173].

Вышесказанное позволило приступить к дальнейшим испытаниям влияния разработанной субстанции на лабораторных моделях, в качестве которых были использованы белые крысы линии Вистар. Выбор данной модели обусловлен удобством контроля эндогенных (в том числе генетических) и экзогенных (условия кормления, содержания и др.) факторов, способных оказывать

существенное влияние на ход эксперимента.

Особое внимание мы уделили подходу к моделированию дисбиотического процесса. Подтверждение пребиотической эффективности, отработку оптимальной пребиотической дозы «БАС-ЧГ» и изучение ее влияния на морфофункциональные показатели организма осуществляли на модели антибиотик-ассоциированного дисбактериоза по модифицированной методике И.В. Дармова с соавторами (2013), вызванного применением гентамицина сульфата перорально в дозе 15 мг/кг живой массы дважды в сутки в течение 7-ми дней. Данная методика успешно применяется авторами с целью моделирования дисбиотических изменений у животных и испытания эффективности пробиотических и пребиотических препаратов. По нашему мнению, выбранная доза антибиотика и продолжительность введения позволяет не только в краткие сроки добиться существенных изменений состава кишечной микрофлоры, но и способна вызвать достаточно выраженные сопутствующие дисбактериозу патогенетические эффекты по отношению к другим системам организма, которые будут развиваться и сохраняться в течение продолжительного времени.

Так, в результате моделирования антибиотик-ассоциированного дисбактериоза в экспериментальной группе животных, которым не применяли разработанную субстанцию, были подтверждены признаки дисбиотических и морфофункциональных нарушений, сохранявшихся в течение 21 суток после окончания приема антибиотика. В данной группе количественный баланс микрофлоры не восстановился полностью до первоначальных значений, а имел лишь тенденцию к восстановлению. Оставался сниженным уровень бифидо-, лактобактерий, кишечной палочки с выраженными ферментативными свойствами. У 100% животных отмечалось наличие кишечной палочки с низкой ферментативной активностью, а также сохранялся повышенный уровень грибов рода *Candida*. У ряда особей выделяли золотистый стафилококк.

У всех животных были обнаружены признаки расстройств пищеварительного тракта (беспокойство или вялость, нарушение аппетита, снижение количества потребляемого корма, метеоризм, диарея), которые

сохранялись вплоть до окончания эксперимента.

В результате исследований были выявлены изменения морфофункциональных показателей организма, что по нашему мнению, несомненно, связано со снижением функциональной активности собственной микрофлоры кишечника. Так, при изучении гематологических, иммунологических и биохимических показателей обнаружена динамика, в целом свидетельствующая о повышении общего уровня воспалительной реакции в организме, не исключая аллергизацию, признаки развития иммунодефицита, ослабления эритропоэза, некоторых метаболических нарушений в организме, выражающихся в снижении интенсивности белкового, углеводного, жирового и минерального обмена.

Перечисленные результаты были подтверждены гистологическими исследованиями органов-мишеней, в качестве которых были определены кишечник (подвздошная, слепая и ободочная кишка) и печень. Обнаружены некоторые дистрофические изменения основных структурных компонентов слизистой оболочки кишечника, выступающими как самостоятельно, так и у части животных в сочетании с экссудативным и пролиферативным компонентом, свидетельствующим о развитии катарального воспаления (не исключено аллергического характера). Практически у 100% животных перечисленные патологические процессы сопровождались морфологическими признаками иммунной недостаточности кишечной стенки и низкой регенераторной активностью клеток эпителия. Отмечены в разной степени выраженные дистрофические изменения в печени, связанные с нарушением как липидного, так и белкового метаболизма, характерные для усиленной токсической нагрузки на орган.

В результате исследования «БАС-ЧГ» было выявлено, что разработанная биологически активная субстанция из чайного гриба оказывает положительное влияние на микрофлору кишечника животных, что выражается в восстановлении количества представителей традиционно нормального эубиоза, таких как *Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Escherichia coli* с выраженными

ферментативными свойствами, и снижении количества представителей условно-патогенной микрофлоры (*Escherichia coli* со сниженной ферментативной активностью, *Staphylococcus aureus*, грибов рода *Candida*) к 21 суткам испытания. Стоит отметить выраженные лактостимулирующие свойства субстанции, которые проявляются уже на 7 сутки ее применения, а на 21 сутки исследования количество лактобактерий в двух экспериментальных группах на  $0,99 \lg$  КОЕ/г и  $1,15 \lg$  КОЕ/г соответственно превышало показатели в данных группах, до начала эксперимента.

Полученный в эксперименте *in vivo* эффект доказывает пребиотические свойства «БАС-ЧГ» [29, 349].

Кроме того, начиная с первой недели приема субстанции, отмечалось ослабление признаков расстройства желудочно-кишечного тракта у животных, улучшение аппетита и качества фекалий. К концу эксперимента у всех животных, принимавших биологически активную субстанцию, полностью исчезли явления метеоризма, и стабилизировалась пищеварительная функция.

В качестве наиболее оптимальной эффективной пребиотической дозы субстанции была выбрана доза 400 мг/кг, в которой производили дальнейшие исследования влияния «БАС-ЧГ» на морфофункциональные показатели организма с целью изучения патогенетического эффекта при развившихся сопутствующих патологиях.

Проведенные исследования показали, что применение субстанции «БАС-ЧГ» оказало положительное влияние на динамику гематологических, биохимических и иммунологических показателей, что выражалось в их нормализации, начиная уже с 14 суток исследования.

К 21 суткам эксперимента все исследуемые показатели (количество эритроцитов, гемоглобина, параметры лейкоформулы, скорость оседания эритроцитов, уровень гематокрита, общего белка, альбуминов, глобулинов, альбумин-глобулиновый коэффициент, С-реактивного белка, аспаратаминотрансферазы, аланинаминотрансферазы, общего билирубина, лактатдегидрогеназы, щелочной фосфатазы, глюкозы, общего холестерина,

мочевины, триглицеридов, кальция, фосфора, железа, магния, лизоцимная, бактерицидная, комплементарная активность сыворотки крови, функциональная активность фагоцитов, содержание IgG, IgM, IgA) достигали первоначальных значений, полученных до начала применения антибиотика. При этом следует отметить, что в группе с «БАС-ЧГ» содержание лейкоцитов на  $0,77 \cdot 10^9/\text{л}$  выше, чем до начала эксперимента, процент лимфоцитов на 5,55% выше, чем до начала эксперимента. Уровень глобулинов на 3,2 г/л и уровень IgG на 0,25 г/л превысил исходные показатели.

Учитывая, что перечисленные показатели находятся в это время в пределах физиологической нормы для данного вида животных, мы расцениваем полученные результаты как положительные. Так, по нашему мнению, отмечена выраженная тенденция к нормализации некоторых показателей белкового, углеводного, жирового и минерального обмена, а динамику уровня глюкозы можно рассматривать как следствие улучшения углеводного обмена из-за активизации пищеварительной функции сахаролитической микрофлоры желудочно-кишечного тракта. Восстановление уровня эритроцитов, повышение лейкоцитов и глобулинов может свидетельствовать об усилении гемопоэза и повышении иммунорезистентности у животных, снижении уровня воспаления и аллергической нагрузки по сравнению с животными, которым не применяли испытуемую субстанцию [77-82, 85, 146].

Гистологическое исследование тонкого и толстого отделов кишечника животных (подвздошной, слепой и ободочной кишки) под влиянием «БАС-ЧГ» показало отсутствие выраженных признаков дистрофических или воспалительных процессов в тонком и толстом кишечнике, выявленных в группе, которой испытуемая субстанция не применялась. Более того, выявленная картина свидетельствует о нормализации регенераторной активности эпителия, уровня секреции и неспецифической резистентности. В качестве подтверждения иммуностимулирующего действия субстанции можно отметить гиперплазию клеточных элементов и лимфоидных фолликул в собственной пластине кишечника [86].

Полученные данные подтверждают, что применение «БАС-ЧГ» животным способствовало стимуляции функций местного иммунитета, снижению признаков воспаления и интенсификации регенеративных процессов эпителия кишечного тракта.

В результате микроскопического исследования печени установлено, что в гистологической картине данного органа у животных под влиянием «БАС-ЧГ» не отмечается дистрофических изменений, связанных с нарушением как липидного, так и белкового метаболизма, характерных для усиленной токсической нагрузки на орган. Напротив, отмечены признаки усиления белково-синтетической функции печени и интенсификации репаративных процессов.

Подводя итог вышесказанному, можно отметить, что разработанная субстанция на основе зооглеи *Medusomyces gisevii* обладает выраженным пребиотическим эффектом по отношению к представителям кишечной микрофлоры. Ее применение оказывает положительное действие на процессы белкового, углеводного, жирового обмена. Гематологические показатели, отражающие лейкопоз и эритропоз, нормализуются к 21 суткам применения, что свидетельствует о положительной динамике воспалительной реакции и кроветворения. В ходе исследования было выявлено положительное влияние препарата на иммунный статус организма, при этом можно выделить особую динамику уровня иммуноглобулинов, показателей неспецифической резистентности, С-реактивного белка, подтверждающих иммуномодулирующий и противовоспалительный эффект применяемой субстанции. Гистологически подтверждено, что исследуемая субстанция способствует стимуляции местного иммунитета, снижению уровня аллергизации и воспалительной реакции, интенсивности регенераторного процесса в кишечнике, уменьшению выраженности признаков дистрофических процессов в печени, и активизации регенерации и белковосинтетической функции данного органа.

Таким образом, уже на экспериментальном этапе исследования препарата «БАС-ЧГ», разработанного на основе зооглеи *Medusomyces gisevii*, был подтвержден высокий потенциал и возможность применения субстанции на



практике. «БАС-ЧГ» испытана на домашних, сельскохозяйственных животных и птицах, в результате чего получила положительные отзывы ветеринарных специалистов о своей эффективности в качестве препарата, оказывающего позитивное влияние на микрофлору кишечника, и морфофункциональные показатели организма, что позволяет рекомендовать ее для лечения и профилактики у животных при дисбактериозе и его последствиях.

### Итоги выполненного исследования

1. Разработанная оригинальная биологически активная субстанция «БАС-ЧГ» обладает высоким потенциалом пребиотического действия, обуславливающим возможность ее применения при дисбактериозах и их последствиях у животных.

2. Биологически активная субстанция «БАС-ЧГ» способствует восстановлению естественного баланса основных представителей кишечного эубиоза, с наиболее выраженным лактостимулирующим эффектом и обеспечивает уменьшение количества условно-патогенных представителей микробиоценоза кишечника (*Escherichia coli* со сниженной ферментативной активностью, *Staphylococcus aureus*, грибов рода *Candida*). Оптимальный пребиотический эффект субстанции выявлен в дозе 400 мг/кг живой массы.

3. При применении «БАС-ЧГ» экспериментальным животным отмечена положительная динамика таких гематологических показателей, как абсолютное число эритроцитов и лейкоцитов, содержание гемоглобина, уровень гематокрита, лейкоцитарной формулы (количества лимфоцитов, сегментоядерных нейтрофилов, эозинофилов, моноцитов), отражающих уровень кроветворения, степень воспалительной реакции и аллергического эффекта.

4. Изменения биохимических показателей (количества общего белка, альбуминов, глобулинов, общего билирубина, аланинаминотрансферазы, аспаргатаминотрансферазы, лактатдегидрогеназы, мочевины, глюкозы, холестерина, триглицеридов, ионов кальция, фосфора, магния, железа) под влиянием «БАС-ЧГ» свидетельствуют об оптимизации белкового, жирового, углеводного, минерального обмена. Положительная динамика уровня С-реактивного белка и вышеперечисленных ферментов свидетельствуют о противовоспалительном потенциале исследованного препарата.

5. Применение разработанной субстанции «БАС-ЧГ» оказывает стимулирующее влияние на показатели неспецифической резистентности и иммунобиологической реактивности организма, что выражается в положительной

динамике бактерицидной, лизоцимной и комплементарной активности сыворотки крови, восстановлении уровня фагоцитарной активности лейкоцитов, иммуноглобулинов IgG, IgA, IgM.

6. Применение «БАС-ЧГ» способствует предотвращению или ослаблению признаков дистрофических и воспалительных изменений в кишечнике и печени, а также обеспечивает активизацию местного иммунитета и регенераторной активности кишечника.

## Практические предложения

1. Результаты исследований влияния разработанной субстанции «БАС-ЧГ» на микрофлору кишечника, гематологические, биохимические, иммунологические и гистологические показатели организма животных являются основанием для рекомендации к использованию в ветеринарной практике с лечебной и профилактической целью при дисбактериозе и его последствиях.

2. Зооглея *Medusomyces gisevii* (чайный гриб) может быть использована в процессе переработки вторичного сырья на предприятиях, работающих с культурой чайного гриба, с целью изготовления пребиотического препарата для животных с полипатогенетическими свойствами.

3. Материалы диссертационной работы могут быть использованы в научных целях, при составлении учебных и справочных пособий, организации учебного процесса по дисциплинам: «Клиническая диагностика», «Внутренние незаразные болезни», «Патологическая анатомия», «Кормление животных», «Микробиология» и «Биотехнология».

## Перспективы дальнейшей разработки темы

Проведенные исследования создают предпосылки для дальнейших испытаний биологически активной субстанции «БАС-ЧГ» на различных видах домашних и сельскохозяйственных животных с целью разработки схем лечения и профилактики и последующего внедрения субстанции в качестве средства выбора для коррекции дисбактериоза и сопутствующих ему метаболических нарушений.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

А/Г – альбумин-глобулиновый коэффициент;

АлАТ – аспаратаминотрансфераза;

АсАТ – аланинаминотрансфераза;

БАСК – бактерицидная активность сыворотки крови;

ГОСТ – Государственный стандарт;

ЕД – единицы;

КОЕ – колониеобразующая единица;

М – среднеарифметическая величина;

КАСК – комплементарная активность сыворотки крови;

ЛАСК – лизоцимная активность сыворотки крови;

ЛДГ – лактатдегидрогеназа;

МСН – среднее содержание гемоглобина в отдельном эритроците в абсолютных единицах;

Нст-тест сп. – нст-тест спонтанный;

Нст-тест инд. – нст-тест индуцированный;

ПЗФ – процент завершенности фагоцитоза;

СОЭ – скорость оседания эритроцитов;

СРБ – С-реактивный белок;

ФИ – фагоцитарный индекс;

ФЧ – фагоцитарное число;

ЩФ – щелочная фосфатаза;

m – средняя квадратическая ошибка.

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Авдеева, Ю. А. Влияние пробиотиков бактистатин и нормобакт на состав микробиоценоза толстого кишечника при экспериментальном дисбиозе / Ю. А. Авдеева, О. А. Медведева, В. А. Королев, А. П. Калущий // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2016. – № 6 (194). – С. 45-68.
2. Алдобаева, Н. А. Перспективы использования пробиотиков и пребиотиков в промышленном птицеводстве / Н. А. Алдобаева, С. Ю. Метасова // Сетевой научный журнал. – 2016. – №2 (7)– С. 34.
3. Алешина, Л. А. Исследование структуры бактериальной целлюлозы методом рентгеноструктурного анализа / Л. А. Алешина, Е. К. Гладышева, Е. А. Скиба, В. В. Будаева // Сборник второй Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Структура и физико-химические свойства целлюлоз и нанокompозитов на их основе» – 2016. – С. 132-136.
4. Аминова, А. И. Эволюция развития науки от микробиоты и микробиома-к метаболуму, от пробиотиков-к метабиотикам / А. И. Аминова, Г. Д. Абдуллаева, 3. Ф. Гумбатова, А. С. Пестова // Вопросы практической педиатрии. – 2017. – Т. 12. – №. 2. – С. 47-57.
5. Андрианова, И. Е. Гематологический статус мышей, получавших пре-, про-, сим- и антибиотики / И. Е. Андрианова, В. Н. Мальцев, А. М. Уланова, Н. М. Ставракова, А. А. Иванов // Медицина экстремальных ситуаций. – 2012. – №. 3 (41). – С. 109-116.
6. Ардатская, М. Д. Метабиотики как естественное развитие пробиотической концепции / М. Д. Ардатская, Л. Г. Столярова, Е. В. Архипова, О. Ю. Филимонова // Трудный пациент. – 2017. – Т. 15. – №. 6-7. – С. 35.
7. Ардатская, М. Д. Клиническое значение короткоцепочечных жирных кислот при патологии желудочно-кишечного тракта: автореф. дис. ... д-ра мед. наук : 14.00.05 / Ардатская, М. Д. – Москва, 2003. – 233 с.
8. Ардатская, М. Д. Пробиотики, пребиотики и метабиотики в коррекции микрoэкологических нарушений кишечника / М. Д. Ардатская // Медицинский

совет. – 2015. – № 13. – С. 94-99.

9. Ардатская, М. Д. Дисбактериоз кишечника: современные аспекты изучения проблемы, принципы диагностики и лечения / М. Д. Ардатская, А. В. Дубинин, О. Н. Минушкин // Терапевтический архив. – 2001. – № 2. – С. 67–62.

10. Ардатская, М.Д. Дисбактериоз кишечника: эволюция взглядов. Современные принципы диагностики и фармакологической коррекции / М.Д. Ардатская, О.Н. Минушкин // Consilium medicum. Гастроэнтерология. – 2006. – № 2. – С. 4–18.

11. Арушанян, А. Я. Профилактика острых кишечных заболеваний новорожденных телят бактериальной этиологии с использованием метаболитных пребиотиков: автореф. дис. канд. вет. наук : 06.02.02 / Арушанян А. Я. – Краснодар, 2013.—132 с.

12. Аршинова, О. Ю. Вспомогательные вещества в технологии лиофилизации лекарственных препаратов / О. Ю. Аршинова, Н.А. Оборотова, Е.В. Санарова // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2013. – №1(2). – С. 20-25

13. Ахсанова А. Р. Действие пробиотика на организм животных. / А. Р. Ахсанова // Молодежь - науке и практике АПК: материалы 101-й Международной научно-практической конференции студентов и магистрантов (г. Витебск, 26-27 мая 2016 г.). – Витебск: ВГАВМ. – 2016. – С. 7.

14. Бабин, В.Н. Биохимические и молекулярные аспекты симбиоза человека и его микрофлоры / В.Н. Бабин, И.В. Домарадский, А.В. Дубинин // Росс, химический журнал. – 2002. –№ 6. – Т. 38. – С. 66-78.

15. Баймуратова, М. А. Бактериологическая диагностика дисбактериоза кишечника: методические указания / М. А. Баймуратова, В. Э. Воронина, К. С. Оспанов. – Астана. – 2004. – 30 с.

16. Бакулина, Л. Ф. Пробиотики на основе спорообразующих микроорганизмов рода *Bacillus* и их использование в ветеринарии / Л. Ф. Бакулина, И. В. Тимофеев, Н. Г. Перминова, А. Ф. Полушкина, Н. И. Печоркина // Биотехнология. – 2001. – № 2. – С. 48.

17. Балукова, Е. В. Место пробиотиков в лечении неалкогольной жировой болезни печени / Е. В. Балукова, Ю. П. Успенский // РМЖ. – 2012. – Т. 20. – №. 15. – С.

788-791.

18. Барановский, А.Ю., Кондрашина Э. Ю. Дисбактериоз и дисбиоз кишечника / А. Ю. Барановский, Э. Ю. Кондрашина. – СПб.: Питер, – 2002. – 224 с.
19. Бельмер, С.В. Кишечная микрофлора и антибактериальная терапия / С. В. Бельмер, Т. В. Гасилина // Consilium Medicum. Педиатрия. – 2005. – № 1. – С. 14–16.
20. Бельмер, С.В. Кишечная микрофлора и значение пребиотиков для ее функционирования / С. В. Бельмер, А. В. Малкоч // Лечащий врач. – 2006. – № 4. – С. 60–65.
21. Бельмер, С.В. Микрофлора пищеварительного тракта / С.В. Бельмер, А.В. Горелов, И.Н. Захарова и др.; под ред. А.И. Хавкина. – М.: Фонд социальной педиатрии, 2006. – 416 с.
22. Бережной, В. В. Микрoэкологические нарушения у детей и современные возможности повышения эффективности их коррекции / В. В. Бережной, С. А. Крамарев, В. Ю. Мартынюк // Здоровье женщины. – 2002. – Т. 4. – №. 12. – С. 79-92.
23. Беркетова, Л. В. Пищевые волокна как сорбенты токсинов в организме человека / Л. В. Беркетова // Организм и окружающая среда. – 2000. – Т. 1. – С. 46.
24. Бобрик, О.Н. Профилактическое и ростостимулирующее действие пробиотика Бифинорм и бифидогенной добавки Ветелакт при комплексном применении / О. Н. Бобрик // Современные проблемы ветеринарной диетологии и нутрициологии. Материалы III Международного симпозиума. – С.-П. – 2005. –С.118-119.
25. Бовкун, Г. Ф. Пробиотикотерапия и профилактика при смешанной кишечной инфекции цыплят / Г. Ф. Бовкун // Птица и птицепродукты. – 2003. – №. 4 – С. 33-35.
26. Бовкун, Г.Ф. Микрoэкология кишечника при заболеваниях органов пищеварения у молодняка птиц, крупного рогатого скота и целесообразность пробиоти-ческой и пребиотической коррекции: учебное пособие / Г. Ф. Бовкун, Е. П. Ващекин, Н. И. Малик, Е. В. Малик // Брянск: Брянская ГСХА. – 2005. – 80 с.
27. Бойцов, А. Г. Дисбиотические нарушения микрофлоры толстого кишечника:



- проблемы диагностики и коррекции / А. Г. Бойцов, Л. Ю. Нилова, Е. А. Оришак // Профилактическая и клиническая медицина. – 2008. – №. 3. – С. 120-123.
- 28.Бокова, Т. А. Микробиоценоз желудочно-кишечного тракта: место метабиотиков в коррекции дисбиотических нарушений /Т. А. Бокова // Вопросы практической педиатрии. – 2016. – Т. 11. – №. 5. – С. 38-42.
- 29.Бондарева, Н. И. Микробиоценоз толстого кишечника крыс при пероральном применении зооглеи *Medusomyces gusevii* (чайный гриб) / Н. И. Бондарева, Л. Д. Тимченко, Е. В. Алиева, Ю. М. Добрыня, Н. И. Гандрабурава, С. И. Писков, Л. И. Калмыкова // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2017. – Т.12. №1 – С. 87-90.
- 30.Бондаренко, В. М. Генетические маркеры вирулентности условно патогенных бактерий / В. М. Бондаренко // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2011. – №. 3. – С. 94-99.
- 31.Бондаренко, В. М. Метаболитные пробиотики: механизмы терапевтического эффекта при микрoэкологических нарушениях / В. М. Бондаренко // Consilium Medicum. Гастроэнтерология. – 2005. – Т. 7. – №. 6. – С. 437-443.
32. Бондаренко, В.М. Дисбактериоз кишечника как клинико-лабораторный синдром: современное состояние проблемы / В.М. Бондаренко, Т.В. Мацулевич. – М.,: «ГЭОТАР-Медиа». – 2007. – 300 с.
- 33.Бондаренко, В. М. Терапевтический эффект пробиотиков / В. М. Бондаренко, О. В. Рыбальченко // Гастрoэнтерология Санкт-Петербурга. – 2009. – № 1. – С. 2-3.
- 34.Бордин, Д. Хронический панкреатит и синдром избыточного бактериального роста / Д. Бордин, Л. Винокурова, Е. Дубцова, Ю. Осипенко // Врач. – 2011. – №. 13. – С. 5-10.
- 35.Ботина, С. Г. Молекулярно–генетические характеристики и пробиотический потенциал бактерий рода *Lactobacillus* / С. Г. Ботина, Н. Ю. Ивашкина, И. В. Маев // Молекулярная медицина. – 2011. – № 2 . – С . 53 – 57.
- 36.Бурцева, Т. В. Экологические аспекты применения пробиотиков в ветеринарии / Т. В. Бурцева // Аграрный вестник Урала. – 2013. – №. 7. – С. 15-17.

- 37.Бухарин, О. В. Симбиотические взаимоотношения микроорганизмов при инфекции / О. В. Бухарин // Журнал микробиологии – 2013. – №. 1. – С. 93-97.
- 38.Бучахчян, Ж. В. Сравнение пребиотической активности производных хитозана и лактозы / Ж. В. Бучахчян, Л. Р. Алиева, И. К. Куликова, И. А. Евдокимов, М. В. Каледина, О. В. Жигулина // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. – 2011. – №. 73. – С. 1-12.
- 39.Буяров, В. С. Использование препарата «Экофилтрум» в технологии производства мяса бройлеров / В. С. Буяров, И. В. Червонова // Вестник АПК Ставрополья. – 2015. – № 2 (18). – С. 125-129.
- 40.Васильев, Н. В. Профилактические мероприятия эшерихиоза молодняка крупного рогатого скота в ставропольском крае: дис. ... канд. биол. наук: 06.02.02 / Н. В. Васильев. – Ставрополь. – 2017. – 158 с.
- 41.Вахитов, Т. Я. Актофлор-С индуцирует синтез бактериоцина штаммами пробиотических лактобацилл / Т. Я. Вахитов, В. А. Торопов, О. Н. Шалаева, Е. К. Рощина, С. И. Ситкин // Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. – 2017. – №. 1. – С. 71-71.
- 42.Вахитов, Т. Я. Влияние метаболитов пробиотических и патогенных бактерий на антагонистическую активность *Lactobacillus acidophilus* д№ 75 / Т. Я. Вахитов, Н. Б. Вербицкая, О. В. Добролеж, Е. В. Полевая, А. И. Кобатов // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. – 2013. – №. 92. – С.1-19.
- 43.Великанов, В. В., Влияние препарата Экофилтрума на качество мяса кроликов / В. В. Великанов, Т. В. Бондарь, А. А. Малков // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2011. – Т. 3. – №. 31-1. – С. 129-130.
- 44.Веревкина, М.Н. Возрастная динамика аминокислотного обмена ассоциации микроорганизмов «чайного гриба» / М.Н. Веревкина // Актуальные вопросы диагностики, профилактики и борьбы с болезнями сельскохозяйственных животных. – 1999. – С. 50-52.
- 45.Веревкина М.Н. Технология приготовления, характеристика и применение

- стимулятора роста микроорганизмов ТС-1 в биологической промышленности: дис. ... канд.биол. наук: 03.00.07 / М.Н. Вережкина – Ставрополь., 2000 – 197 с.
- 46.Вережкина, М. Н., Природные микробные ассоциации / М. Н. Вережкина, Е. В. Светлакова, С. Н. Поветкин, С. В. Пруцаков // Ветеринария Кубани. – 2010. –№ 4. – С. 19-20.
- 47.Виноградова, А. А. Лабораторный практикум по общей технологии пищевых производств / А. А. Виноградова, Г. М. Мелькина, Л. А. Фомичева. – М.: Агропромиздат, 1991. – 335 с.
- 48.Волков, М. Ю. Комбинированный пробиотический препарат Бактистатин и его эффективность при желудочно-кишечных болезнях сельскохозяйственных животных: автореф. ... док. биол. наук.: 03.00.23 / М.Ю. Волков. – М., 2006. – 39 с.
- 49.Воробьев, А. А. Бактерии нормальной флоры: биологические свойства и защитные функции / А. А. Воробьев, Е. А. Лыкова // Журн. микробиол. 1999. – № 6. – С. 102-105.
- 50.Габитова, Г. Х. Способы депонирования хлебопекарных дрожжей / Г. Х. Габитова, М. З. Шайдуллина, И. Д. Гурьянов, О. А. Решетник // Вестник Казанского технологического университета. – 2017. – Т. 20. – №. 18. – С. 153-158.
- 51.Гаврилов, Г. Б. Использование лактулозы при создании кормовых средств нового поколения / Г. Б. Гаврилов // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2006. – №. 4. – С. 32-34.
- 52.Гандрабурава, Н. И. Микробиоценоз кишечника у собак и его оптимизация с помощью нового биологически активного препарата «Эмбриоприм»: автореф. ... канд. биол.наук.: 03.02.03 / Н.И. Гандрабурава. – Ставрополь., 2010. – 30 с.
- 53.Гапон, М. Н. Показатели антиоксидантной защиты организма при экспериментальном дисбактериозе кишечника, обусловленном применением антибиотика широкого спектра действия: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.04, 03.00.07/ М. Н. Гапон. – Ростов-на-Дону. – 2007. – 153 с.
- 54.Гладышева, Е.К. Исследование влияния температуры на синтез бактериальной целлюлозы продуцентом *Medusomyces gisevii* / Е.К. Гладышева // Современные наукоемкие технологии. – 2016. –№ 8. – С. 36-40.

- 55.Гласкович, М. А. Влияние кормовых антибиотиков на кишечный микробиоценоз сельскохозяйственных животных: краткий аналитический обзор / М. А. Гласкович, Е. А. Капитонова / Ученые записки УО ВГАВМ. – 2010. – Т. 46. – №. 1 —С. 194-197.
- 56.Головенко, О. В. Роль масляной кислоты в лечении органических и функциональных заболеваний толстой кишки / О. В. Головенко, И. Л. Халиф, А. О. Головенко // Клинические перспективы гастроэнтерологии, гепатологии. – 2001.– № 3. – С. 20–29.
- 57.Головинская, О. В. Математическая модель процесса развития чайного гриба *meuromyces gisevi* / О.В. Головинская // Биотехнологии и ресурсосберегающие инженерные системы. – С. 41-42.
- 58.Голубев, В. Румистарт для профилактики и лечения ацидоза рубца / В. Голубев // Животноводство России. – 2016. – №. 10. – С. 35-35.
- 59.Голушко, О. Г. Растительный стимулятор «Вилоцим-МВ» в рационах молодняка крупного рогатого скота до шестимесячного возраста / О. Г. Голушко, А. И. Козинец, М. А. Надаринская, Т. Г. Козинец // Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства. – 2015. – №. 18 (1). – С. 242-250.
- 60.Гончар, Н. В. Выбор пробиотика для рациональной терапии клебсиеллезной инфекции у детей / Н. В. Гончар, Л. В. Березина, О. В. Тихомирова, О. Добролеж // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2009. – №. 2. – С. 85-89.
- 61.Горчаков, А. М. Метод комплексной оценки фагоцитарной активности нейтрофилов крови / А. М. Горчаков, Н. Г. Кручинский, Ф. Т. Горчакова, И. Н. Коростелева. – Республика Беларусь: НИИ экологической и профессиональной патологии, 2003. – 15 с.
- 62.ГОСТ Р. 50258-92 «Комбикорма полнорационные для лабораторных животных. Технические условия». – М.: Госстандарт России, 1992–7с.
- 63.Грачева, Н. М. Пробиотические препараты в терапии и профилактике дисбактериоза кишечника / Н. М. Грачева, В. М. Бондаренко // Инфекционные болезни. – 2004. – Т. 2. – №. 2. – С. 53-58.

- 64.Гриневич, В. Б. Теоретическое и практическое обоснование клинического применения препарата «Эубикор» при заболеваниях органов пищеварения». Методическое пособие / В. Б. Гриневич. – Санкт-Петербург, 2002. – 22 с.
- 65.Гриневич, В. Б., Пребиотики как основа микробиоценоз-ориентированной терапии / В. Б. Гриневич, С. М. Захаренко, Е. И. Сас // Лечащий врач. – 2008. – Т. 10. – С. 47-50.
- 66.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.
- 67.Грозина, А. А. Состав микрофлоры желудочно-кишечного тракта у цыплят-бройлеров при воздействии пробиотика и антибиотика (по данным T-RFLP-RT-PCR) / А. А. Грозина // Сельскохозяйственная биология. – 2014. – №. 6. – С. 20-25
- 68.Гужвинская, С. А. Поиск перспективных штаммов- бифидобактерий и лактобактерий для разработки биопрепаратов / С. А. Гужвинская // Ветеринария сегодня. – 2013. – № 4. – С. 40-44.
- 69.Гулюшин, С. Ю. Эффективность применения пребиотика Агримос в комбикормах для бройлеров // Птицеводство. – 2010. – №. 5. – С. 11-12.
- 70.Даниелян, Л. Т. Чайный гриб и его биологические особенности / Л. Т. Даниелян. – М.: Медицина, 2005. – 83 с
- 71.Данилевская, Н. В. Физиологическая роль основных представителей нормальной микрофлоры мелких домашних животных / Н. В. Данилевская // Российский ветеринарный журнал. Мелкие домашние и дикие животные. – 2008. – №. 1. – С. 28-31.
- 72.Данилевская, Н. В. О некоторых последствиях длительной антибактериальной терапии / Н. В. Данилевская, В. В. Субботин // JSAP. Российское издание. – 2012. – Т. 3. – №. 3. – С. 52-53.
- 73.Дармов, И. В. Выживаемость микроорганизмов пробиотиков в желудочно-кишечном тракте экспериментальных животных / И. В. Дармов, И. Ю. Чичерин, И. П. Погорельский, И. А. Лундовских, Е. А. Дурнев // Журнал инфектологии. – 2014. – Т. 4. – №. 1. – С. 68-74.

74. Дармов, И. В. Выживаемость микроорганизмов пробиотиков в условиях *in vitro*, имитирующих процесс пищеварения у человека / И. В. Дармов, И. Ю. Чичерин, И. П. Погорельский, И. А. Лундовских // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2011. – № 3. – С. 6–11.
75. Директива Европейского парламента и Совета Европейского Союза 2010/63/ЕС от 22 сентября 2010 г о защите животных, используемых для научных целей // Санкт-Петербург. – 2012. – 48 с.
76. Добрыня, Ю. М. Определение антимикробной активности культуральной жидкости и тела чайного гриба (*medusomyces gisevii*), культивированного в лабораторных условиях / Ю. М. Добрыня, Н. И. Бондарева, Л. С. Катунина // Биоразнообразие, биоресурсы, биотехнологии и здоровье населения Северо-Кавказского региона. – 2014. – С. 129-132.
77. Добрыня, Ю. М. Биохимические показатели крови лабораторных животных в условиях модельного дисбактериоза при применении им биологически активной субстанции из *Medusomyces gisevii* / Ю. М. Добрыня // Ветеринарная патология. – 2017. – № 4. – С. 26-22.
78. Добрыня, Ю. М. Влияние биологически активной субстанции из *Medusomyces gisevii* (чайный гриб) на иммунитет белых крыс в условиях антибиотико-ассоциированного дисбактериоза. / Ю. М. Добрыня, Л. Д. Тимченко, И. В. Ржепаковский, Н. И. Бондарева, С. И. Писков // Ветеринарная патология. – 2017. – № 3 (61). – С. 22-30.
79. Добрыня, Ю. М. Влияние биологически активной субстанции из *Medusomyces gisevii* (чайный гриб) на показатели фагоцитарной активности нейтрофилов крови белых крыс / Ю. М. Добрыня, Л. Д. Тимченко, Н. И. Бондарева, С. И. Писков // Аграрный вестник Урала. – 2018. – № 01 (168). – С. 8-11.
80. Добрыня, Ю. М. Влияние биологически активной субстанции из *Medusomyces gisevii* (чайный гриб) на показатели белой крови крыс / Ю. М. Добрыня, Н. И. Бондарева, С. И. Писков // Сборник: Биоразнообразие, биоресурсы, вопросы химии, биотехнологии и здоровье населения Северо-Кавказского региона Материалы IV-й ежегодной научно-практической конференции «Университетская

наука – региону». – Ставрополь. – 2016. – С. 99-102.

81.Добрыня, Ю. М. Влияние биологически активной субстанции из *Medusomyces gisevii* (чайный гриб) на показатели красной крови крыс / Ю. М. Добрыня, Н. И. Бондарева, Л. Д. Тимченко, И. В. Ржепаковский // Сборник Материалы международной научно-практической интернет-конференции «Инновационные подходы в ветери-нарной и зоотехнической науке и практике». – 2016. – С. 81-85.

82.Добрыня, Ю. М. Влияние биологически активной субстанции из *Medusomyces gisevii* (чайный гриб) на тромбоциты крыс / Ю. М. Добрыня // Сборник «Современные достижения биотехнологии. Новации пищевой и перерабатывающей промышленности материалы VI Международной научно-практической конференции». – 2016. –С. 159-161.

83.Добрыня, Ю. М. Влияние озонирования на содержание этилового спирта в куль-туральной жидкости *Medusomyces gisevii* (чайный гриб) при разных температурных режимах культивирования / Ю. М. Добрыня, С. С. Аванесян, Н. И. Бондарева, Л. Д. Тимченко, И. В. Ржепаковский, Е. И. Симечева // Фундаментальные исследования. –2015. – № 7. –С. 454-457.

84.Добрыня, Ю. М. Динамика амилолитической активности культуральной жидко-сти *Medusomyces gisevii* (чайного гриба) в процессе культивирования / Ю. М. Добрыня, С. С. Аванесян, Н. И. Бондарева, Л. Д. Тимченко, И. В. Ржепаковский, Е. И. Симечева // Современные проблемы науки и образования. – 2015. –№ 3. URL: — [www.science-education.ru/123-18777](http://www.science-education.ru/123-18777) (дата обращения: 29.05.2018).

85.Добрыня, Ю. М. Изменение показателей фагоцитарной активности нейтрофилов крови белых крыс при применении активной субстанции из *Medusomyces gisevii* (чайный гриб) / Ю. М. Добрыня, Л. Д. Тимченко, Н. И. Бондарева, С. И. Писков // Сборник: Материалы 19-й международной научно-методической конференции по патологической анатомии животных. Актуальные вопросы патологии, морфологии, и терапии животных. – 2017. С. 275-278.

86.Добрыня, Ю. М. Морфологическая характеристика печени под влиянием субстанции из *Medusomyces gisevii* (чайный гриб) в условиях дисбактериоза

- кишечника / Ю. М. Добрыня // Ветеринарная патология. –2018.– № 4.– С. 34-39.
- 87.Доронин, А. Ф. Функциональное питание / А.Ф. Доронин. – М.: Издательство ГРАНТЪ, 2002. – 96с.
- 88.Егоров, Н. С. Промышленная микробиология / Н. С. Егоров. – М.: Высш., 1989. – 688 с.
- 89.Епишин, В. А. Пробиотик зоонорм при эндометрите коров / В. А. Епишин, В. И. Сенников, С. А. Епишин, Ф. Ф. Мягих // Ветеринария. – 2004. – №. 7. – С. 33-34.
- 90.Ердякова, А. С. Экспериментальная оценка лимфоцитотоксического действия бифидобактерий и лактобактерий / А. С. Ердякова, И. Ю. Чичерин, И. А. Лундовских, И. П. Погорельский // Кишечная микрофлора: Сб. науч. статей. – 2012. – № 1. – С. 21–23.
- 91.Ерина, Т. А. Микробиоценоз кишечника и иммунный статус новорожденных телят с разным морфофункциональным развитием и их коррекция: дис. ... канд. вет. наук: 06.02.02 / Т. А. Ерина.– Курск, 2015. – 156 с.
- 92.Ерюхин, И. А. Псевдомембранозный колит и «кишечный сепсис» – следствие дисбактериоза, вызванного антибиотиками / И. А. Ерюхин, С. А. Шляпников, В. Ф. Лебедев, Г. А. Иванов // Вестник хирургии им. И.И.Грекова.– 1997.– Т. 156.– №2.– С.108–111.
- 93.Ефименко, Н. А. Протеолитические энзимы в хирургии: исторические аспекты и современные представления о применении / Н. А. Ефименко, М. В. Лысенко, Ю. И. Стернин, А. А. Новожилов, Г. Ю. Кнорринг // РМЖ. – 2011. – Т. 19. – №. 5. – С. 368-372.
- 94.Жичкина, Л. В. Панкреатит и дисбактериоз у кошек и собак / Л. В. Жичкина, М. К. Касумов, И. В. Марцинковская // Актуальные вопросы ветеринарной биологии. – 2010. – №. 3. – С. 42-46.
- 95.Жумабекова, К. А. Управление составом смешанной культуры «чайного гриба» / К. А. Жумабекова // Биотехнология. Теория и практика. – 2005. – № 1. – С. 88-90.
- 96.Завгородняя, Е. Ф. Дисбактериоз кишечника (обзор) / Е. Ф. Завгородняя //



- Дальневосточный журнал инфекционной патологии. – 2010. – №. 16. – С. 131-141.
97. Зайнуллин Р. А. Влияние условий культивирования чайного гриба (*Combucha*) на его функциональные свойства в пищевых профилактических напитках / Р. А. Зайнуллин, Р. В. Кунакова, Х. К. Гаделева, О. А. Данилова, А. А. Никитина // Известия вузов. Химическая и пищевая биотехнология. – 2010. – № 4. – С. 29-31.
98. Замятина, Е. С. Хитин-глюкановый комплекс как иммуномодулятор / Е. С. Замятина, З. А. Канарский, М. А. Канарская // Вестник Казанского технологического университета. – 2007. – № 5. – С 83-85.
99. Западнюк, И. П. Лабораторные животные / И. П. Западнюк, В. И. Западнюк, Е. А. Захария, Б. В. Западнюк. – Рипол Классик, 1983. – 386 с.
100. Захаренко, С.М. Современные подходы к профилактике антибиотик-ассоциированной супрессии микрофлоры желудочно-кишечного тракта / С. М. Захаренко // Лечащий врач. — 2010. — № 11. — С. 68-73.
101. Захарченко, С.М. Принципы коррекции дисбиозов кишечника. / С.М. Захарченко // Клиническая микробиология и антимикробная терапия. – 2001. – Т. 3. – №. 1. – С. 79-80.
102. Зинченко, Е.В. Иммунобиотики в ветеринарной практике: о механизме действия пробиотиков и иммунопробиотических препаратов при использовании в ветеринарии / Е.В. Зинченко, А.П. Пронин. – М.: Пушкино, 2000. – 163 с.
103. Зухрабов, М. Г. Результаты применения пребиотиков при лечении телят, больных диспепсией / М. Г. Зухрабов, О. Ю. Иваненко, З. М. Зухрабова // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. НЭ Баумана. – 2014. – Т. 219. – №. 3.
104. Ивановский, А. А. Новый пробиотик для борьбы с диарейным синдромом у телят / А. А. Ивановский, О. Н. Лагунова, В. В. Зимирева, О. В. Белорыбкина // Аграрная наука Евро-Северо-Востока. – 2005. – № 7. – С. 131-133.
105. Имангулов, Ш.А. Использование пробиотиков, пребиотиков и сим-биотиков в птицеводстве: методические рекомендации / Ш.А. Имангулов, И.А. Егоров, Т.Н. Ленкова и др. Сергиев Посад : ВНИТИИ, 2008. - 42 с.
106. Ионичев, Д. С. Применение пробиотика Лактобифадол в схемах лечения и

профилактики желудочно-кишечных заболеваний телят: дис. ... канд. вет. наук: 06.02.01, 06.02.02 / Д.С. Ионичев. – М., 2014. – 198 с

107. Калуцкий, П. В. Особенности структуры пристеночной флоры кишечника животных при дисбактериозах в условиях воздействия аномального магнитного поля / П. В. Калуцкий, О. А. Медведева, А. В. Беседин // Материалы пятого съезда Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова (г. Москва, 2-4 декабря 2008 г.). – М.: ИАЦ, 2008. – С. 63-65.

108. Камакин, Н. Ф. Функциональная активность пищеварительных ферментов при патологии желудочно-кишечного тракта с нарушением микробиоценоза кишечника / Н. Ф. Камакин, И. А. Частоедова, М. С. Григорович, Л. А. Лопатина // Вопросы питания. – 2012. – Т. 81, № 4. – С. 53-57.

109. Карамов, Э. В. Мукозный иммунитет и его особенности / Э. В. Карамов, А. В. Гарманова // Иммунология. – 2008. – № 6. – С. 377–384.

110. Карнаух, Е. В. Пробиотики в коррекции кишечного микробиоценоза / Е. В. Карнаух, А. Н. Базалеева // Проблемы экологической и медицинской генетики и клинической иммунологии: сб. науч. Трудов. – 2013. – Выпуск 1 (115). – С. 204-215.

111. Карнейро, М. де Мур. Неалкогольный стеатогепатит / Карнейро М. де Мур // Клинические перспективы в гастроэнтерологии. – 2001. – №. 2. – С. 12-15.

112. Кароматов, И. Д. Чайный гриб и его использование в лечебной практике / И. Д. Кароматов // European science review. – 2014. – №. 3-4. – С. 5-9.

113. Каширская, Н. Ю. Значение пробиотиков и пребиотиков в регуляции кишечной микрофлоры / Н. Ю. Каширская // Русский медицинский журнал. – 2000. – № 13–14.

114. Кван, О. В. Неоднозначность влияния пробиотиков на обмен токсических элементов в организме кур-несушек / О. В. Кван, С. А. Мирошников, Д. Г. Дерябин, В. Н. Беседин // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2006. – №. 2 (52-2).

115. Кислюк, С. Ферментативный пробиотик Целлобактерин—ответ на многие вопросы / С. Кислюк, Н. Новикова, Г. Лаптев // Аграрный эксперт. – 2008. – Т. 1. –

С. 26-27.

116. Колб, В. Г. Справочник по клинической химии / В. Г. Колб, В. С. Камышников – Минск: Беларусь, 1982. – 366 с.

117. Коломеец, Н. Ю. Эффективность применения «Рекицена-РД» в лечении экспериментального острого постстрептококкового гломерулонефрита у животных / Н. Ю. Коломеец, Н. И. Аверьянова, П. В. Косарева // Фундаментальные исследования. – 2011. – №. 7. – С. 84-86.

118. Комарова, С. А. Изучение активности ферментов антиоксидантной защиты и уровня цитокинов у больных остеоартрозом в процессе лечения препаратом вобэнзим / С. А. Комарова, Л. А. Ибрагимова, Ф. Х. Камилов // Медицинский вестник Башкортостана. – 2012. – Т. 7. – №. 2. – С. 37-40.

119. Кондрахин, И.П. Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики / И.П. Кондрахин. – М.: Колос, 2004 – 520 с.

120. Копанев, Ю. А. Взаимосвязь функции местного иммунитета и микробиоценоза кишечника, возможности иммунокоррекции дисбактериоза / Ю. А. Копанев // Лечащий врач. – 2009. – Т. 9. – С. 66-69.

121. Копанев, Ю. А. Применение Хилак форте для коррекции микрoэкологических нарушений и функциональных расстройств у детей и взрослых // Трудный пациент. – 2007. – Т. 10. – С. 46-50.

122. Крамарев, С. А. Защитные функции микрофлоры кишечника / С. А. Крамарев, О. В. Выговская, Д. С. Янковский, Г. С. Дымент // Здоровье ребенка. – 2008. – №. 2. – С. 11.

123. Краснова, Е. И. Острые кишечные инфекции у детей и возможности терапии с применением метабиотиков / Е. И. Краснова, Н. И. Хохлова, В. В. Проворова, В. Г. Кузнецова // Лечащий врач. – 2017. – №. 2. – С. 73-73.

124. Курдеко, А. П. Применение пребиотика "Экофилтрум" при лечении желудочно-кишечных заболеваний у телят на загрязненной территории / А. П. Курдеко, Л. А. Ланцова // Ученые записки учреждения образования Витебская государственная академия ветеринарной медицины: научно-практический журнал. – Витебск: УО ВГАВМ, 2011. – Т. 47, вып. 1. – С. 194-197.

125. Кучумова, С. Ю. Физиологическое значение кишечной микрофлоры / С. Ю. Кучумова, Е. А. Полуэктова, А. А. Шептулин, В. Т. Ивашкин // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2011. – Т. 21. – №. 5. – С. 17-27.
126. Лакин, Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
127. Ланг, С. М. Лабораторная крыса (справочный материал) / С. М. Ланг, Д. Уилсон – Лабораторные животные. – 1993. – Т. 3. – №. 2. – С. 100-110.
128. Лебедев, К. А. Болезни конфликта организма с его микрофлорой новый вид иммунопатологии, связанной с нарушением реакции толл-подобных и других образраспознающих рецепторов / К. А. Лебедев, И. Д. Понякина // Успехи современной биологии. – 2008. – Т. 128. – №. 3. – С. 252-259.
129. Левахин, В. И. Пробиотики в животноводстве / В. И. Левахин, Ю. А. Ласыгина, А. В. Харламов, Л. Н. Ворошилова // Вестник мясного скотоводства. – 2013. – Т. 1. – № 79.– С. 7-10.
130. Литюшкина, М. И. Активность кишечных ферментов у больных с осложненным течением язвенной болезни / М. И. Литюшкина // Вестник новых медицинских технологий. – 2008. – Т. 15. – № 2. – С. 73-75.
131. Лобзин, Ю.В. Дисбактериоз или полезны ли антибиотики / Ю.В. Лобзин, С.М. Захаренко, К.П. Плотников. – СПб.: СпецЛит, 2002. – 77 с.
132. Макаров, В. Г. Справочник. Физиологические, биохимические и биометрические показатели нормы экспериментальных животных / Под ред. В. Г. Макарова, М. Н. Макаровой. – СПб.:Изд-во «ЛЕМА», 2013.-116 с.
133. Малик, Н.И. Пробиотики: теоретические и практические аспекты / Н.И. Малик, Л.Н. Панин, И.Ю. Вершинина // Птицефабрика – 2006. – №1.– С.20-26.
134. Малкоч, А. В. Показатели короткоцепочечных жирных кислот у детей с кишечным дисбиозом на фоне терапии лактулозой / А. В. Малкоч, С. В. Бельмер, М. Д. Ардатская // Вопросы детской диетологии. – 2007. – Т.5. – №1. – С. 72–73.
135. Маннапова, Р. Т. Иммунный статус, естественный микробиоценоз птиц и методы их оценки / Р. Т. Маннапова, А. Н. Панин, А. Г. Маннапов, А. А. Гусев. – М: Изд-во Башк. аграр. ун-та и ВГНКИ, 2001. – 339 с.

136. Маннапова, Р. Т. Молочная сыворотка и пробиотик для коррекции биологических и повышения продуктивных показателей животных / Р. Т. Маннапова, И. М. Файзуллин // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2010. – Т. 202. – С. 127-130.
137. Маянский, А. Н. Дисбактериоз: иллюзии и реальность / А. Н. Маянский // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2000. – Т. 2. – №. 2. – С. 61-64.
138. Маянский, Д.Н. Определение биоцидности лейкоцитов / Д.Н. Маянский. – Новосибирск: Изд-во СО РАМН. – 1996. – Т.2. –32 с.
139. Методики клинических лабораторных исследований. Справочное пособие. Том III. Клиническая микробиология / Под ред. В. В. Меньшикова. – Изд. «Лабора», 2009. – 880 с.
140. Методические рекомендации по микробиологической диагностике дисбактериозов кишечника в лечебно-диагностических учреждениях армии и флота / сост. В. М. Добрынин, И. А. Добрынина, В. В. Калацуха, О. В. Хлопунова. – СПб.: Гл. военно-мед. упр., 1999. – 23 с.
141. Методические рекомендации. Программа восстановления микрофлоры (био-фитокоррекция) и профилактика дисбактериоза / сост. Л.В. Погорельская, И.П. Трякина. – М.: М-во здравоох. РФ, РМАПО, 2002. – 31 с.
142. Методы общей бактериологии. Том 1 / Под ред. Ф. Герхардта. – М.:Мир.,1983 – 194 с.
143. Минушкин, О. Н. Дисбактериоз кишечника / О. Н. Минушкин, М. Д. Ардатская, В. Н. Бабин, И. В. Домарадский, А. В. Дубинин // Российский медицинский журнал. – 1999. – Т. 3. – С. 40-45.
144. Миронов, А. Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / Под ред. А.Н. Миронова. — М.: Гриф и К, – 944 с.
145. Мирошников, С. А. Влияние пробиотических препаратов на обмен химических элементов в организме животных / С. А. Мирошников, О. В. Кван, Д.

Г. Дерябин, С. В. Лебедев, О. Ю. Сипайлова // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2006. – №. 12-2. – С. 151-153.

146. Митина, С. С. Показатели биологической активности культуральной жидкости чайного гриба (*Medusomyces gusevii*) в процессе культивирования / С. С. Митина, С. С. Аванесян, Н. И. Бондарева // Биоразнообразие, биоресурсы, биотехнологии и здоровье населения Северо-Кавказского региона. – 2015. – С. 203-208.

147. Митина, С. С. Влияние биологически активной композиции на основе чайного гриба (*medusomyces gusevii*) на показатели липидного спектра крови белых крыс / С. С. Митина, С. И. Писков, Л. Д. Тимченко, Н. И. Бондарева, И. В. Ржепаковский, Ю. М. Добрыня, В. А. Андреюк // Современные проблемы науки и образования. – 2016. – № 3. URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=24460> (дата обращения: 29.05.2018).

148. Могильный, М. П. Современные направления использования пищевых волокон в качестве функциональных ингредиентов / М. П. Могильный, Т. В. Шленская, М.К. Галюкова, Т.Ш. Шалтумаев, А.Ю. Баласанян // Новые технологии. – 2013. – №. 1. – С. 1-6.

149. Мокия-Сербина, С. А. Дифференцированная тактика использования пробиотиков в лечении атопического дерматита у детей первого года жизни / С. А. Мокия-Сербина, Н. В. Василенко, Т. В. Литвинова, В. А. Вирина // Современная педиатрия. – 2013. – №. 1. – С. 18-23.

150. Мордасова, В. И. Эффективность применения препарата «закофальк» при лучевых поражениях толстой кишки / В. И. Мордасова, Т. Н. Свиридова, Е. А. Фурсова // Прикладные информационные аспекты медицины. – 2016. – Т. 19. – №.3. – С. 91-95.

151. Мухина, Ю.Г. Факторы, влияющие на формирование микрофлоры у детей раннего возраста / Ю.Г. Мухина, М.И. Дубровская // Индивидуальные подходы к проблеме дисбактериоза: тез. докл. научно-практ. семинара 5 июня 2003 г. – М., 2003. – С. 14-19.

152. Некрасов, Р. В. Широкое внедрение пробиотиков нового поколения в

практику животноводства / Р. В. Некрасов, Н. А. Ушакова // Ветеринарная медицина. – 2012. – С. 1201-2138.

153. Немцов, В. И. Новые подходы к представлению о синдроме раздраженного кишечника (СРК) и его лечению / В. И. Немцов // Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. – 2015. – №. 1-2. – С. 10-15.

154. Несвижский, Ю.В. Изучение изменчивости кишечного микробиоценоза человека в норме и при патологии / Ю. В. Несвижский // Вестник РАМН. – 2003. – № 1. – С. 49-53.

155. Неумывакин, И.П. Чайный гриб – природный целитель. Мифы и реальность / И.П. Неумывакин. – Санкт-Петербург: Изд-во «ДИЛЯ», 2007. – 60 с.

156. Никитин, И. Г. Дюфалак (лактолоза) в лечении дисбиоза кишечника при неалкогольном стеатогепатите / И. Г. Никитин, Г. И. Сторожаков, И. Г. Федоров // Клинические перспективы гастроэнтерологии, гепатологии. – 2002. – № 1. – С. 24-29.

157. Николаева, Т. Н. Иммуностимулирующая и антиканцерогенная активность нормальной лактофлоры кишечника / Т. Н. Николаева, В. В. Зорина, В. М. Бондаренко // Экспериментальная клиническая гастроэнтерология – 2004. – № 4. – С. 39–43.

158. Никулин, В. Н. Показатели белкового обмена цыплят бройлеров при комплексном применении пробиотика лактоамиловорина и иодида калия / В. Н. Никулин, И. А. Колесникова // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2011. – №. 15 (134). – С. 98-100.

159. Нилова, Л. Ю. Характеристика условно-патогенных микроорганизмов, выделенных при диагностике дисбактериоза толстого кишечника: автореф. дисс... канд. мед. наук : 03.00.07 / Л. Ю. Нилова. – СПб., 2009. – 31 с.

160. Новик, Г. И. Биологическая активность микроорганизмов пробиотиков / Г. И. Новик, А. А. Самарцев, Н. И. Астапович // Прикладная биохимия и микробиология. – 2006. – №2 (42). – С. 187-194.

161. Новосад, В. В. Коррекция дисбактериоза кишечника у детей с врожденной непроходимостью верхних отделов пищеварительного тракта / В. В. Новосад, И.

- В. Кумова // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2009. – №. 2 (26). – С. 186 - 188.
162. Ноздрин, Г. А. Прирост живой массы мясных гусей, бройлерных индеек и цыплят при скармливании пробиотика ветом 1.1 / Г. А. Ноздрин, А. И. Шевченко // Достижения науки и техники АПК. – 2009. – №. 4. – С. 44 – 45.
163. Общая фармакопейная статья «Определение концентрации микробных клеток. ОФС.1.7.2.0008.15» Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII издание. Том II / Москва, 2015 – 1003 с.
164. Овчарова, А. Н. Морфологическая характеристика иммунной системы мышей BALB/c при нарушении состава микрофлоры и коррекции его пробиотиками «Энтероцин» и «Колибактерин» / А. Н. Овчарова, Л. П. Михайлова, С. Н. Серебряков, О. В. Макарова, Ю. Е. Козловский, К. Ш. Матевосян, Н. Б. Тихонова // Российский медико-биологический вестник имени академика И. П. Павлова. – 2009. – №.1. – С. 1-13.
165. Озниева, И. Эффективная профилактика диареи поросят: опыт «Клинского» / И. Озниева // Животноводство России. – 2012. – № 11. – С. 22-23.
166. Онищенко, Г. Г. Иммунобиологические препараты и перспективы их применения в инфектологии / Г. Г. Онищенко, В. А. Алешкин, С. С. Афанасьев и др. – М.: ГОУ ВУНМЦ МЗ РФ, 2002. – 608 с.
167. Опыт применения препарата Закофальк в различных областях гастроэнтерологии : сб. науч.-практ. работ / под ред. М. Д. Ардатской. – М.: 4ТЕ Арт, 2013. – 64 с.
168. Оришак, Е. А. Антибиотикорезистентность и фагорезистентность условно-патогенных микроорганизмов при дисбактериозе толстого кишечника / Е. А. Оришак, А. Г. Бойцов, Л. Ю. Нилова // Профилактическая и клиническая медицина. – 2008. – №. 4. – С. 167-170.
169. Осипов, Г. А. Сравнительное хромато-масс-спектрометрическое исследование состава химических маркеров микроорганизмов в крови и биоптатах слизистой оболочки кишечника / Г. А. Осипов, А. И. Парфенов, П.О. Богомоллов // Российский гастроэнтерологический журнал. – 2001. – Т. 1. – С. 54-



69.

170. Острикова, Э. Е. Влияние пробиотиков на становление кишечного биоценоза у поросят-сосунов / Э. Е. Острикова // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. – 2011. – № 74. – С. 695-707.

171. Отраслевой стандарт «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника» (ОСТ 91500.11.0004-2003). / – М., 2003. – 173 с.

172. Официальный сайт компании «ООО РУСКВАС» [сайт]. URL: <http://www.interkvas.ru/>

173. Павленко, В. В. Пробиотики и воспалительные заболевания кишечника: оценка эффективности пробиотического комплекса «бактистатин» в терапии больных язвенным колитом / В. В. Павленко, Г. А. Катаганова, С. Б. Александрова, Н. В. Кораблина, А. Ф. Павленко // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – №. 5. – С. 75-75.

174. Панин, А. Н. Селекция штаммов для изготовления пробиотиков ветеринарного назначения / А. Н. Панин, Н. И. Малик // Пробиотики, пребиотики, синбиотики и функциональные продукты питания. Современное состояние и перспективы: материалы Международной конференции. М. – 2005. – С. 8-9.

175. Панин, А. Н. Пробиотики в животноводстве - состояние и перспективы / А. Н. Панин, Н. И. Малик, О. С. Илаев // Ветеринария. – 2012. – №3. – С. 3-8.

176. Панин В. А. Применение препарата Бифидогенная добавка «Ветелакт» для лечения и профилактики дисбактериозов у телят : дис. ... канд. вет. наук: 16.00.02 / В.А. Панин. – М., 2003. –162 с.

177. Парахонский, А. П. Взаимосвязь дисбактериоза и аллергических заболеваний /А. П. Парахонский // Живые и биокосные системы. – 2013. – №. 4. – С. 8-8.

178. Парфенов, А. И. Кишечный дисбактериоз / А. И. Парфенов // Лечащий врач. – 2001. – Т. 5. – С. 6.

179. Парфенов, А. И. Системные проявления болезней кишечника / А.И. Парфенов // Клиническая медицина. – 2001. – №. 4. – С. 9-12.

180. Пархоменко, Л. К. Микроэкология кишечника и ее коррекция в детском

возрасте / Л. К. Пархоменко, Е. В. Репетева // Сучасна гастроентерологія. – 2006. – №. 3. – С. 72-75.

181. Пат. 2500198 Российская Федерация МПК A23L1/30, A23L2/00, A23F3/16. Способ получения биологически активного материала и биоматериал, полученный данным способом / Хачатрян В.Х.; заявитель и патентообладатель Хачатрян В. Х. / заявл. 21.08.2012; опубл. 10.12.2012 Бюл. № 34. – 8 с.

182. Пат. 2630457 Российская Федерация, МПК A23K 10/30, A23L 33/10. Способ получения биологически активной субстанции с пребиотическим эффектом на основе *Medusomyces gisevii* / Л.Д. Тимченко, Н.И. Бондарева, С.С. Аванесян, В.Н. Вакулин, И.В. Ржепаковский, Ю.М. Добрыня и др.; заявитель и патентообладатель «ФГАОУ ВО Северо-Кавказский федеральный университет // заяв. 12.07.2016, опубл. 08.09.2017 Бюл. №25. – 11 с.

183. Пат. 2552485 (13) С2 Российская Федерация, МПК C12N 1/20, A23L 1/212. Культуры микроорганизмов, способ получения сброженной основы для производства квасов, способ получения культуральной жидкости чайного гриба, культуральная жидкость чайного гриба, способ получения напитков / М.А. Скрипицына; заявитель и патентообладатель Скрипицына М.А. // опубл: 10.06.2015. Бюл. № 16.

184. Пат. 2477894 Российская Федерация МПК G09B 23/28. Способ моделирования дисбактериоза кишечника у лабораторных животных / И.В. Дармов, И.Ю. Чичерин, А.С. Ердякова, И.П. Погорельский, И.А. Лундовских; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВПО «Вятский государственный университет // опубл. 20.03.2013; Бюл. № 8.

185. Петрачев, Д. А. Бактерицидная активность крови поросят/ Д. А. Петрачев // Ветеринария. – 1981. – №9. – С. 71 -72.

186. Пиневиц, А. В. Чудо-пленки, или слово о бактериальной целлюлозе / А. В. Пиневиц // Санкт-Петербургский университет. – 2007. – №. 3. – С. 33-39.

187. Плоскирева, А. А. Метаболитная терапия нарушений микробиоценозов различных биотопов организма человека / А. А. Плоскирева // Лечащий врач. – 2016. – №. 6. – С. 21-21.

188. Позняковский, В. М. Биологически активные добавки в современной нутрициологии / В. М. Позняковский, Б. П. Суханов // Техника и технология пищевых производств. – 2009. – №. 2 (13). – С. 44-50.
189. Прудников, С. И. Повышение неспецифической резистентности организма поросят иммуностимуляторами нуклеиновой природы / С. И. Прудников, А. А. Духовский, Т. М. Прудникова // Ветеринарная патология. – 2003. – №. 3. – С. 14-16.
190. Рецкий, М. И. Значение антиоксидантного статуса в адаптивной гетерогенности и иммунологической резистентности животных / М. И. Рецкий, В. С. Бузлима, А. Г. Шахов // Актуальные проблемы болезней молодняка в современных условиях: мат-лы междунар. науч.-практ. конф. 23-25 мая 2002 г. – Воронеж, 2002. – С. 33-36.
191. Ржепаковский, И. В. Влияние озонирования на содержание этилового спирта в культуральной жидкости *Medusomyces gisevii* (чайный гриб) при разных температурных режимах культивирования / И. В. Ржепаковский // Фундаментальные исследования. 2015. N 7-3. С. 454-457.
192. Рогожин, В. В. Оценка продуктивности *medusomyces gisevii* с помощью величин pH и электропроводимости / В. В. Рогожин, Ю. В. Рогожин // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени юа овчинникова. – 2017. – С. 38.
193. Рогожин, Ю. В. Использование кондуктометрического метода для контроля за продуктивностью *Medusomyces gisevii* / Ю. В. Рогожин, В. В. Рогожин // Тр. XVI Междунар. научно-практич. конф. «Стратегические направления развития АПК стран СНГ». – Барнаул. – 2017. – С. 518-520.
194. Рок, О. Кишечная микрофлора и пребиотики / О. Рок // Педиатрическая фармакология. – 2011. – Т. 8. – №. 2. – С. 91-92.
195. Рябцева, Т. В. Синтез провоспалительных цитокинов и экспрессия молекул адгезии нейтрофилами человека *in vitro* в ответ на действие активатора на основе клеток *Saccharomyces cerevisiae* / Т. В. Рябцева, Е. Л. Седёлкина, Д. А. Макаревич, Г. Н. Бычко, В. В. Кирковский, В. П. Голубович // Известия Национальной

- академии наук Беларуси. Серия биологических наук. – 2017. – №. 1. – С. 95-100.
196. Сабельникова, Е. А. Клинические аспекты дисбактериоза кишечника / Е. А. Сабельникова // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2011. – №.3. – С. 111 – 116.
197. Саруханов, В. Я. Метод определения лизоцимной активности крови у сельскохозяйственных животных / В. Я. Саруханов, Н. Н. Исамов, И. М. Колганов // Сельскохозяйственная биология. – 2012. – №. 2. – С. 119-122.
198. Селиверстов, П. В. Взаимоотношения печени и кишечника на фоне дисбаланса микрофлоры толстой кишки / П. В. Селиверстов, В. Г. Радченко, И. Г. Сафроненкова, С. И. Ситкин // Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. – 2010. – Т. 2. – С. 15.
199. Симонян, Г.А. Ветеринарная гематология / Г. А. Симонян, Ф. Ф. Хисамутдинов. – М: Колос, 1995. – 256 с.
200. Скворцова, Л. Эффективность использования пребиотика Ветелакт при выращивании бройлеров / Л. Скворцова // Комбикорма. – № 6.– 2005.– С.64.
201. Скорлупкина, Н. Н. Изучение пребиотических свойств бактериальной целлюлозы, синтезируемой продуцентом *gluconacetobacter hansenii* / Н. Н. Скорлупкина // Вестник магистратуры. – 2016. – С. 9.
202. Соколенко, Г. Г. Пробиотики в рациональном кормлении животных / Г. Г. Соколенко, Б. П. Лазарев, С. В. Миньченко // Технологии пищевой и перерабатывающей промышленности АПК – продукты здорового питания. – 2015. – № 1 (5). – С. 72-78.
203. Сорокулова, И. Б. Сравнительное изучение биологических свойств биоспорина и других препаратов на основе бацилл (краткое сообщение) / И. Б. Сорокулова // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2008. – Т. 53. – №. 6. – С. 41.
204. Сотникова, Т. А. Использование современных кормовых добавок в кормлении птицы / Т. А. Сотникова // Инновации в АПК: проблемы и перспективы. – 2017. – №. 2. – С. 117-125.
205. Старовойтова, С. А. Пробиотики на основе трансгенных микроорганизмов /

- С. А. Старовойтова, О. И. Скроцкая // *Biotechnologia Acta*. – 2013. – Т. 6. – № 1.– С. 34-45.
206. Субботин, В. В. Профилактика желудочно-кишечных болезней новорожденных животных с симптомокомплексом диареи / В. В. Субботин, М. А. Сидоров // *Ветеринария*. – 2001. – Т. 4. – С. 3-7.
207. Субботин, И. Г. Сравнительная морфофункциональная характеристика желудочно-кишечного тракта крыс при применении некоторых пребиотиков: дис. ... канд. вет. наук: 16.00.02 / И. Г. Субботин. – Саратов, 2009. – 115 с.
208. Сулейманов, С.М. Методы морфологических исследований (методическое пособие) / С.М. Сулейманов, П.А. Паршин, Ю.П. Жарова. – Воронеж, 2000. – 64 с.
209. Суханова, С. Ф. Мясная продуктивность и качество мяса гусей при включении пребиотика Агримос в состав комбикормов / С. Ф. Суханова, И. Г. Корниенко // *Достижения науки и техники АПК*. – 2017. – №. 9. – С. 68-71.
210. Сычёва, Л. В. Переваримость и использование питательных веществ рационов цыплятами-бройлерами при скармливании препарата Сел-Плекс / Л.В. Сычёва // *Известия Оренбургского государственного аграрного университета*. – 2013. – №. 2 (40). – С. 167-169.
211. Тараканов, Б. В. Механизмы действия пробиотиков на микрофлору пищеварительного тракта и организм животных / Б. В. Тараканов // *Ветеринария*. – 2000. – № 1. – С. 42-54.
212. Тетерина, Л. А. Роль микрофлоры толстой кишки в развитии латентной печеночной энцефалопатии / Л. А. Тетерина, Е. А. Чихачева, П. В. Селиверстов, С. И. Ситкин, В. Г. Радченко // *Лечащий врач*. – 2012. – Т. 9. – С. 73-78.
213. Тимченко, Л. Д. Основы микроскопии биообъектов: учебное пособие /Л.Д. Тимченко, В.Н. Вакулин. – Ставрополь: Изд-во Светличная С.Г., 2014. – 184 с.
214. Тимченко, О. А. Влияние озона на прирост биомассы *Medusomyces gusevii* (чайного гриба) / Л. Д. Тимченко, Е. И. Симечева, Ю. М. Добрыня, С. С. Аванесян, Н. И. Бондарева // *Сборник научных трудов Международной научно-практической конференции, посвященной 100-летию со дня рождения профессора О. П. Стуловой «Актуальные вопросы морфологии и биотехнологии в*

животноводстве». – Кинель: РИЦ СГСХА. – 2015. – С. 334.

215. Точилина, О. А. Ферментный гомеостаз при нарушениях микробиоценоза кишечника у детей / О. А. Точилина, И. А. Частоедова // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». – 2017. – №. 4. – С.

216. Трашкова, Т. М. Влияние карбоновых кислот на пролиферативную активность бактерий нормобиоты / Т. М. Трашкова // Знание. – 2016. – №. 2-1. – С. 40-47.

217. Тропская, Н. С. Нарушения моторно-эвакуаторной функции желудочнокишечного тракта в раннем послеоперационном периоде / Н. С. Тропская, Т. С. Попова, Г. И. Соловьева // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2005. – Т.15. – № 5. – Прил. 26. – С. 37.

218. Трушина, Е. Н. Влияние рационов, обогащенных инулином и олигофруктозой в питании на клеточный и гуморальный иммунитет у крыс / Е. Н. Трушина, Е. А. Мартынова, Д. Б. Никитюк // Вопросы питания. — 2005. – № 74(3). – С.22-27.

219. Тутов, И. К. Биотехнологические условия выращивания чайного гриба / И. К. Тутов, М. Н. Вережкина // Вестник ветеринарии. – 1996. – №. 2. – С. 84-88.

220. Улитко, В. Е. Инновационные подходы в решении проблемных вопросов в кормлении сельскохозяйственных животных / В. Е. Улитко // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2014. – №. 4 (28). – С. 136-146.

221. Урсова, Н. И. Дисбактериозы кишечника у детей: особенности пробиотикотерапии / Н. И. Урсова // РМЖ. – 2013. – Т. 21. – №. 2. – С. 89-94.

222. Урсова, Н. И. Итоги и перспективы использования Хилак Форте в практической медицине / Н. И. Урсова // Трудный пациент. – 2005. – Т. 3. – №. 2. – С. 37-44.

223. Урсова, Н. И. Базовые функции кишечной микрофлоры и формирование микробиоценоза у детей / Н. И. Урсова // Практика педиатра. – 2006. – № 3. – С. 54–56.

224. Усачев, И. И. Коррекции энтеральных дисбиотических нарушений у животных / И. И. Усачев, В. Ф. Поляков // Вестник Брянской государственной

сельскохозяйственной академии. – 2009. – №. 2. – С. 1-6.

225. Файзуллин, И. М. Пробиотик и прополис для повышения уровня витаминов в молоке коров / И. М. Файзуллин, Р. Т. Маннапова // Вестник Башкирского государственного аграрного университета. – 2011. – № 3. – С. 40-45.

226. Федорова, Р. А. Хлеб функционального назначения с добавкой настоя чайного гриба / Р. А. Федорова, О. В. Головинская // Хлебопечение России – 2011. – №6. – С. 22–23.

227. Феофилактова, О. В. Использование пребиотиков в производстве пищевых продуктов для коррекции нарушений микробиоценоза населения Уральского региона / О. В. Феофилактова // Труды Уральского государственного экономического университета.– 2016. – С. 206-209.

228. Хавкин, А. И. Микроэкология кишечника и аллергия / А. И. Хавкин // Лечащий врач. – 2003. – №. 2. – С. 10.

229. Хавкин, А. И. Микрофлора пищеварительного тракта / Под ред. А. И. Хавкина. – М.: Фонд социальной педиатрии, 2006. – 416 с.

230. Хазиахметов, Ф. С. Основные результаты использования пробиотиков серии Витафорт при выращивании телят / Ф. С. Хазиахметов, А. А. Башаров // Вестник БГАУ. – 2012. – №. 2. – С. 17-19.

231. Хайруллов, Р. Г. Применение пробиотика «Спас» для профилактики и лечения желудочно-кишечных болезней: автореф. дис. ... канд. биол. наук. : 16.00.04 / Р. Г. Хайруллов. – Казань, 2007. – 23 с.

232. Харченко, Н. В. Роль кишечной микрофлоры в развитии хронических заболеваний желудочно-кишечного тракта / Н. В. Харченко, В. В. Черненко, Д. С. Янковский, Г. С. Дымент // Журнал практичного лікаря. – 2003. – №. 4. – С. 20-27.

233. Хачатрян, В. Чайный гриб: трезвый выход / В. Хачатрян. – М.-СПб.:Диля, 2012. – 101 с.

234. Ходырева, И. А. Коррекция микробиоценоза кишечника молодняка свиней препаратами микробиологического синтеза / И. А. Ходырева, Н. А. Садомов // Животноводство и ветеринарная медицина. – 2013. – №.1. – С. 15-19.

235. Хурса, Р. В. Кишечная микрофлора: роль в поддержании здоровья и развитии

патологии, возможности коррекции: учеб.-метод. пособие / Р. В. Хурса, И. Л. Месникова, Я. С. Микша. – Минск: БГМУ. – 2017. – 36 с.

236. Частоедова, И. А. Оценка рациона питания и ферментовыделительной функции у детей раннего возраста с дисбактериозом кишечника / И. А. Частоедова, О. А. Точилина // Вятский медицинский вестник. – 2011. – № 3-4. – С. 50-53.

237. Чеботарь, И. В. Антибиотикорезистентность биоплёночных бактерий / И. В. Чеботарь, А. Н. Маянский, Е. Д. Кончакова, А. В. Лазарева, В. П. Чистякова // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2012. – Т.14. – №1. – С. 51-58.

238. Чичерин, И. Ю. Исследование влияния больших доз пробиотика бифидумбактерин и микроорганизмов аутофлоры кишечника на организм белых мышей и показатели клеточного иммунитета / И. Ю. Чичерин, И. В. Дармов, Н. В. Богачева, И. П. Погорельский, И. А. Лундовских, А. Н. Шевцов // Кишечная микрофлора: Сборник научных статей. – 2012. – № 1. – С. 24–29.

239. Чичерин, И. Ю. Заместительное действие пробиотиков: миф или реальность / И. Ю. Чичерин, И. В. Дармов, И. П. Погорельский, И. А. Лундовских, К. Е. Гаврилов // Кишечная микрофлора: Сборник научных статей. – 2012. – № 1. – С. 35 – 40.

240. Шамолина, И. И. Перспективы использования микробного сырья при получении волокнистых и пленочных материалов / И. И. Шамолина // Химические волокна. – 1997. – №.1. – С. 3-10.

241. Шаршунова, М. Тонкослойная хроматография в фармации и клинической биохимии / М. Шаршунова, В. Шварц, Ч. Михалец. – М.: Мир, 1980. – 622 с.

242. Шахов, А.Г., Методические рекомендации по оценке и коррекции неспецифической резистентности животных / А.Г. Шахов, Ю.Н. Бригадиров, А.И. Ануфриев. – Воронеж, 2005. – 115 с.

243. Шевяков, М. А. Стандарты и перспективы фармакотерапии кандидоза органов пищеварения / М. А. Шевяков // Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. – 2006. – №. 1-2. – С. 17-20.



244. Шендеров, Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание. Микрофлора человека и животных и ее функции / Б.А. Шендеров. – М.: Грантъ, 1998. – Т. 1. – 288 с.
245. Шкурин, А. Пребиотический эффект НПС-ферментов / А. Шкурин // Животноводство России. – 2016. – Т. 12. – С. 18-20.
246. Шошина, Д. А. Дигестивный жидкий подкислитель кормов / Д. А. Шошина, А.Т. Столляр // Ветеринария Кубани. - 2012. - №3. - С. 15-16.
247. Щеглова, А.В. Чайный гриб. Чудо-целитель в трехлитровой банке / А.В. Щеглова. – М.: Изд-во Рипол классик, 2005. – 64 с.
248. Эйриян, С. Использование Целлобактерина в кормлении бройлеров / С. Эйриян, О. Боровикова, С. Кислюк // Птицеводство. – 2008. – №. 9. – С. 28-29.
249. Эль, Х. М. Профилактика кишечного дисбактериоза у телят пребиотической кормовой добавкой на основе молочного сырья / Х. М. Эль, И. В. Соболев // Материалы конференций 2012 Студенты - науке и практике АПК: материалы 97-ой Международной научно-практической конференции, (г. Витебск, 22-23 мая 2012 г.). – 2012. – С.78-79.
250. Юркевич, Д. И. Medusomyces (гриб чая): научная история, состав, физиология, и метаболизм / Д. И. Юркевич, В. П. Кутюшенко // Биофизика. – 2002. – №6. – С. 1116–1129.
251. Юркевич, Д. И. Медузомицет (Чайный гриб): научная история, состав, особенности физиологии и метаболизма / Д. И. Юркевич, В. П. Кутюшенко // Биофизика. – 2002. – № 6. – С. 1116-1129.
252. Ягодин, Б.А. Практикум по агрохимии. / Б. А. Ягодин, И. П. Дерюгин, Ю. П. Жуков. – М., 1987. – 511 с.
253. Яковенко, Э. П. Метаболические заболевания печени как системные проявления дисбактериоза кишечника. Роль пробиотиков в нормализации кишечной микрофлоры / Э. П. Яковенко, А. Н. Иванов, А. В. Яковенко, Н. А. Агафонова, Б. И. Обуховский, А. С. Прянишникова, И. П. Солуянова // РМЖ. – 2008. – Т. 16. – №. 6. – С. 396-401.
254. Янковский, Д. С. Состав и функции микробиоценозов различных биотопов

- человека / Д. С. Янковский // *Здоровье женщины*. – 2003. – Т. 4. – №. 16. – С. 145-158.
255. Aloulou, A. Hypoglycemic and antilipidemic properties of kombucha tea in alloxan-induced diabetic rats. / A. Aloulou, K. Hamden, D. Elloumi, M. B. Ali, K. Hargafi, B. Jaouadi, F. Ayadi, A. Elfeki, E. Ammar // *Alternative Medicine Review*. – 2012, May. – № 12. – P. 63.
256. Backhed, F. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage / F. Backhed, H. Ding, T. Wang et al. // *Proc. Nat. Acad. Scienses*. – 2004. – Vol. 101. - № 11. – P. 15718-15723.
257. Banerjee, D. Comparative healing property of kombucha tea and black tea against indomethacin-induced gastric ulceration in mice: possible mechanism of action. / D. Banerjee, S. A. Hassarajani, B. Maity, G. Narayan, S. K. Bandyopadhyay, Chattopadhyay S. // *Food & Function journal*. – 2010, Dec. – № 1 (3). – P. 284–293.
258. Bassonga, E. Cytokine mRNA expression in mouse colon: IL-15 mRNA is overexpressed and is highly sensitive to a fibre-like dietary component (short-chain fructo-oligosaccharides) in an Apc gene manner / E. Bassonga, V. Forest, F. Pierre // *Cytokine*. – 2001. – №14. – P. 243-246.
259. Battikh, H. Antibacterial and antifungal activities of black and green kombucha teas / H. Battikh, K. Chaieb, A. Bakhrouf, E. Ammar // *J. Food Biochem*. – 2012. – №37. – P. 231–236.
260. Bauer-Petrovska, B. Mineral and water-soluble vitamin contents in the kombucha drink / B. Bauer-Petrovska, L. Petrushevska-Tozi // *Int. J. Food Sci. Technol*. – 2000. – №35. – P. 201–205.
261. Berdy, J. Bioactive Microbial Metabolites: A Personal View / J. Berdy // *J. Antibiot*. –2005. – Vol. 58. – №1. – P. 1–26.
262. Bezkorovainy, A. Probiotics: determinants of survival and growth in the gut / A. Bezkorovainy // *The American journal of clinical nutrition*. – 2001. – №. 2. – P. 399-405.
263. Bhattacharya, S., Protective effect of kombucha tea against tertiary butyl hydroperoxide induced cytotoxicity and cell death in murine hepatocytes. / S.

- Bhattacharya, P. Manna, R. Gachhui, P. C. Sil // *Indian Journal of Experimental Biology*. – 2011, Jul. – № 49 (7). – P.511–524.
264. Bondareva, N. I. Influence of Biologically Active Substances On the Basis of *Medusomyces Gysevii* (The Tea Mushroom) On Bacteria of the Genus *Lactobacillus* / N. I. Bondareva, L. D. Timchenko, I. V. Rzhepakovsky, M. A. Selimov, , E. R. Magamedova, S. S. Avanesyan, D. A. Areshidze // *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. – 2016. – v. 7. – №. 6. – C. 1224-1230.
265. Boumandouki, P. Orthopoxvirose simienne (ou variole du singe): étude de 8 cas observés à l'hôpital d'Impfondo de la République du Congo / P. Boumandouki, R. Bileckot, J. R. Ibara, C. Satounkazi, D. W. Wassa, F. Libama, C. Ngokaba // *Bull. Soc. Pathol. Exot.* – 2007. – V. 100. – №. 1. – C. 17-21.
266. Bunout, D. Effects of prebiotics on the immune response to vaccination in the elderly / D. Bunout, S. Hirsch, M. P. Maza // *J. Parenter. Enteral. Nutr.* – 2002. – № 26. – P. 372-376.
267. Chen, Y. S. Effects of prebiotic oligosaccharides and trehalose on growth and production of bacteriocins by lactic acid bacteria / Y. S. Chen, S. Sriannual, T. Onda, F. Yanagida // *Lett. Appl. Microbiol.* – 2007. – №45 (2). – P. 190-193.
268. Cherbut, C. Short-chain fatty acids modify colonic motility through nerves and polypeptide YY release in the rat / C. Cherbut, L. Ferrier, C. Rozé, Y. Anini, H. Blottière, G. Lecannu, J. P. Galmiche // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 1998. – V. 275. – №6. – P. 1415–1422.
269. Clere N. Toux et maux de gorge: quel conseil officinal? / N. Clere // *Actualités Pharmaceutiques*. – 2013. – V. 52. – №. 530. – C. 38-41.
270. Corzo, G. Bile salt hydrolase activity of three strains of *Lactobacillus acidophilus* / G. Corzo, S.E. Gilliland // *J. Dairy*. – 1999. – № 82. – P. 472-480.
271. Cvetkovic, D.D. Antimicrobial activiti of kombucha made from Rtanj tea / D.D. Cvetkovic, S.L. Markov, A. Velicanski // *Hemijaska Industrija*. – 2005. – №59. – P. 248.
272. Daumas, C. Benefits of FortiFlora in the successful management of canine chronic colitis / C. Daumas. – *Pro Plan Veterinary diets Clinical Case: Canine FortiFlora*. – 2 p.
273. Dipti, P. Lead induced oxidative stress: beneficial effects of Kombucha tea. / P.

- Dipti, B. Yogesh, A. K. Kain, T. Pauline, B. Anju, M. Sairam, B. Singh, S. S. Mongia, G. I. Kumar, W. Selvamurthy // *Biomedical and Environmental Sciences*. – 2003, Sep. – № 16 (3). – P. 276–282.
274. Dufresne, C. Tea, kombucha, and health: a review / C. Dufresne, E. Farnworth // *Food. Res. Int.* – 2000. – № 4. P. 409–421.
275. Duggan, Ch. Oligofructose-supplemented infant cereal: 2 randomized, blinded, community-based trials in Peruvian infants / Ch. Duggan, M. E. Penny, P. Hibberd // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2003. – №77. – P. 937-942.
276. Dutta, D. Nitrogen-fixing and cellulose-producing *Gluconacetobacter kombuchae* sp. nov., isolated from Kombucha tea / D. Dutta, R. Gachhui // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2007. – №57. – P. 353–357.
277. Fukumoto, S. Short-chain fatty acids stimulate colonic transit via intraluminal 5-HT release in rats / S. Fukumoto, M. Tatewaki, T. Yamada, M. Fujimiya, C. Mantyh, M. Voss, T. Takahashi // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* – 2003. – V. 284. – №5. – P. 1269–1276.
278. Gharib, O. A., Effects of Kombucha on oxidative stress induced nephrotoxicity in rats / O. A. Gharib // *Chinese Medical Journal* – 2009, Nov 27. – № 4. – P. 23.
279. Gibson, G.R. Dietary modulation of the human colonic micro-biota: introducing the concept of prebiotics / G.R. Gibson, M.B. Roberfroid // *J. Nutr.* – 1995. –V. 125. – P. 1401-12.
280. Goginyan, V. B. Antioxidant properties of Tea fungus (Kombucha) and its microflora / V. B. Goginyan // *Biol. J. Armenia*. – 2001. –V. 53. – P. 296-299.
281. Gordon, D.M., Bacteriocin diversity and the frequency of multiple bacteriocin production in *Escherichia coli* / D.M. Gordon, C.L. O'Brien // *Microbiology*. – 2006. – V. 152. – P. 3239–3244.
282. Greenwalt, C. J. Kombucha, the fermented tea: micro-biology, composition, and claimed health effects / C. J. Greenwalt, K. H. Steinkraus, R. A. Ledford // *Journal of Food Protection*. – 2000, Jul. – № 63 (7). – P. 976–981.
283. Guarner, F. Gut microflora in health and disease / F. Guarner, J.R. Malagelada // *Lancet*. – 2003. – V. 360. – P. 512–519.

284. Haenel H. Eubiose end Dysbiose der menschlichen Darmbesiedlung / H. Haenel // «Ernährungsforschung». – 1965. – №10. – P.289.
285. Hempel, S. Probiotics for the prevention and treatment of antibiotic-associated diarrhea: a systematic review and meta-analysis / S. Hempel, S. J. Newberry, A. R. Maher, Z. Wang, J. N. Miles, R. Shanman, P. G. Shekelle // *Jama*. – 2012. – V. 307. – №. 18. – C. 1959-1969.
286. Hentges, D.Y. Intestinal microflora in Health and Disease / D.J. Hentges. – N.Y., 1983. – 156 p.
287. Jacobsen, N. Some properties of salivary amylase: a survey of the literature and some observations / N. Jacobsen, K. L. Melvaer, A. Hensten-Pettersen // *Journal of dental research*. – 1972. – V. 51. – №. 2. – P. 381-388.
288. Jarrell, J. The kombucha consortia of yeasts and bacteria / J. Jarrell, T. Cal, J.W. Bennett // *Mycologist*. – 2000. – 14. – 166–170.
289. Jayabalan, R. A Review on Kombucha Tea - Microbiology, Composition, Fermentation, Beneficial Effects, Toxicity, and Tea Fungus. Comprehensive Review / R. Jayabalan, R. V. Malbasa, E. S. Loncar, J.S. Vitas // *Food Science and Food Safety*. – 2014. – № 13. – P. 538-550.
290. Jayabalan, R. Changes in free-radical scavenging ability of kombucha tea during fermentation / R. Jayabalan, P. Subathradevi Marimuthu, M. Sathishkumar, K. Swaminathan // *Food. Chem.* – 2008. – №109. – P. 227–234.
291. Jayabalan, R., Changes in free-radical scavenging ability of kombucha tea during fermentation / R. Jayabalan, P Subathradevi Marimuthu., M. Sathishkumar, K. Swaminathan // *Food Chemistry*. – 2008. – № 109. – P. 227–234.
292. Jayabalan, R. Changes in content of organic acids and tea polyphenols during Kombucha fermentation / R. Jayabalan, S. Marimuthu, K. Swaminathan // *Food Chemistry*. – 2007. – № 102. – P. 392–398.
293. Jenkins, D. J. A. Inulin, oligofructose and intestinal function / D.J.A. Jenkins, C.W.C. Kendall, V. Vuksan // *J. Nutr.* – 1999. – V. 129. – P. 1431–1433.
294. Jouet, P. Colonic motility in humans. Recent physiological, pathophysiological and pharmacological data / P. Jouet, B. Coffin, E. Cuillerier, J. C. Soulé, B. Flourié, M.

Lémann // *Gastroenterol. Clin. Biol.* – 2000. – V. 24. – P. 284–298.

295. Kagermeier- Callaway, A. S. In vitro colonisation of acrylic resin denture base materials by *Streptococcus oralis* and *Actinomyces viscosus* / A. S. Kagermeier- Callaway, B. Willershausen, T. Frank, E. Stender // *International dental journal.* – 2000. – V. 50. – №. 2. – P. 79-85.

296. Kara, C. Effects of Supplemental Mannanligosaccharides on Growth Performance, Faecal Characteristics and Health in Dairy Calves / C. Kara, H. Cihan, M. Temizel, S. Catik, Y. Meral, A. Yibar, H. Gencoglu // *AsianAustralas J Anim Sci.* – 2015. – Vol. 28. – № 11. – P. 1599-1605.

297. Kaur, N. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition / N. Kaur, A. K. Gupta // *J. Biosci.* – 2002. – №27. – P. 703-714.

298. Kazakova, H. Effect of monoassociation with probiotic strain *Bifidobacterium bifidum* on enterocyte brush-border enzymes in gnotobiotic mice / H. Kazakova, Z. Rchakova, J. Kolinska // *British Journal of Nutrition.* – 2002. – V. 88. – № 3. – P. 113-115.

299. Kelly-Quagliana, K. A. Dietary oligofructose and inulin modulate immune functions in mice / K. A. Kelly-Quagliana, P. D. Nelson, R. K. Buddington // *Nutr. Res.* – 2003. – № 23. – 257-267.

300. Koenen, M.E. Modulation of the immune response by probiotics in chicken / M.E. Koenen, S.H.N. Jeurissen, W.J.A. Boersma // *British Journal of Nutrition.* – 2002. – Vol. 88. – № 3. – P. 120-121.

301. Kozyrovska, N. O. Kombucha microbiome as a probiotic: a view from the perspective of post-genomics and synthetic ecology / N. O. Kozyrovska, O. M. Reval, V. B. Goginyan, J.-P. de Vera // *Biopolymers and cell.* – 2012. – № 28 (2). – P. 103–113.

302. Krinke, G. J. *The laboratory rat* / G. J. Krinke. – Elsevier, 2000. – 740 p.

303. Leijdekkers, A. G. In vitro fermentability of sugar beet pulp derived oligosaccharides using human and pig fecal inocula / A. G. Leijdekkers, M. Aguirre, K. Venema, G. Bosch, H. Gruppen, H. A. Schols // *Journal of agricultural and food chemistry.* – 2014. – V. 62. – №. 5. – P. 1079-1087.

304. Licht, T. R. Dietary carbohydrate source influences molecular fingerprints of the rat faecal microbiota / T. R. Licht, M. Hansen, M. Poulsen, L. O. Dragsted // *BMC Microbiol.* — 2006. — №30 (6). — P. 98.
305. Lin, S.P. Biosynthesis, production and applications of bacterial cellulose / S.P. Lin, I.L. Calvar, J.M. Catchmark, J.R. Liu, A. Demirci, K.C. Cheng // *Cellulose.* — 2013. — V. 20. — P. 2191-2219.
306. Lobanova, A. V. The study of structure and properties of Kombucha *Medusomyces gisevi* / A. V. Lobanova, M. V. Kaloyanova, O. P. Strilets, L. S. Strel'nikov // *Электронный архив НФаУ.* — 2015. — С. 256.
307. Malbasa, R.V. Influence of starter cultures on the antioxidant activity of kombucha beverage / R.V. Malbasa, E.S. Loncar, J.S. Vitas, J.M. Canadanovic-Brunet // *Food. Chem.* — 2011. — №127. — P. 1727–1731.
308. Mantere-Alhonen, S. Propionibacteria used as probiotics - A review / S. Mantere-Alhonen // *Lait.* — 1995. — V. 75. — № 4-5. — P. 447-452.
309. Marteau, P. Basic aspects and pharmacology of probiotics – an overview on pharmacokinetics, mechanisms of action and side effects / P. Marteau, F. Shanahan // *Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* — 2003. — V. 17(5). — P. 725–740.
310. Mazmanian, S. A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease / S. Mazmanian, J. Round, D. Casper // *Nature.* — 2008. — V. 453. — P. 620-625.
311. McCracken, V. The gastrointestinal ecosystem: a precarious alliance among epithelium, immunity and microbiota / V. McCracken, R.G. Lorenz // *Cellular Microbiology.* — 2001. — № 3. — P. 1-11.
312. Michanowicz, A. E. Clinical report on the use of alpha amylase (Buclamase) following periapical surgery / A. E. Michanowicz, J. P. Michanowicz, E. B. Watkins // *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology.* — 1964. — V. 18. — №. 3. — P. 377-380.
313. Mischke, M. The Gut Microbiota and their Metabolites: Potential Implications for the Host Epigenome / M. Mischke, T. Plösch // *Adv. Exp. Med. Biol.* — 2016. — № 902. — P. 33–44.
314. Mitsuoka, T. Probiotics and intestinal flora / T. Mitsuoka // *Bioscience and microflora.* — 2002. — V. 21. — №. 1. — P. 3-12.

315. Mohammad, S.M An overview of biocellulose production using *Acetobacter xylinum* culture / S.M. Mohammad, N.A. Rahman, M.S. Khalil, S.R.S. Abdullah // *Advances in Biological Research*. – 2014. –V 8. – № 6. – P. 307-313.
316. Murugesan, G. S. Supplementation of waste tea fungal biomass as a dietary ingredient for broiler chicks / G. S. Murugesan, M. Sathishkumar, K. Swaminathan // *Bioresource technology*. – 2005. – V. 96. – №. 16. – P. 1743-1748.
317. Murugesan G.S., Hepatoprotective and curative properties of kombucha tea against carbon tetrachloride-induced toxicity. / G.S. Murugesan, M. Sathishkumar, R. Jayabalan, A.R. Binupriya, K. Swaminathan, S.E. Yun // *Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2009. – № 19. – P.397–402.
318. Muster, D. Médicaments de l'inflammation / Muster D. // *EMC-Stomatologie*. – 2005. – V. 1. – №. 1. – P. 21-29.
319. Nocek, J.E. Direct-fed microbial supplementation on the performance of dairy cattle during the transition period / J.E. Nocek, W.P. Kautz, J.A.Z. Leedle // *J. Dairy Sci.* – 2003. - № 86. - P. 331-335.
320. Palmer, C. Development of the human infant intestinal microbiota / C. Palmer, E. M. Bik, D. B. DiGiulio, D. A. Relman, P. O. Brown // *PLoS. biology*. – 2007. – V. 5. – №. 7. – P. 77.
321. Pauline, T.P., Studies on toxicity, anti-stress and hepatoprotective properties of Kombucha tea. / T.P. Pauline, B. Dipti, S. Anju, S.K. Kavimani, A.K. Sharma // *Biomedical and Environmental Sciences*. – 2001. – № 14. – P. 207–213.
322. Perdigon, G. Interaction of lactic acid bacteria with the gut immune system / G. Perdigon, C. M. Galdeano, J. C. Valdez, M. Medici // *European journal of clinical nutrition*. – 2003. – V. 56. – №. 4. – P. 21.
323. Pool-Zobel, B. L. Overview of Experimental Data on Reduction of Colorectal Cancer Risk by Inulin-Type Fructans / B. L. Pool-Zobel, J. Sauer // *J. Nutr.* – 2007. – №137 (11). – P. 2580–2584.
324. Pryde, S.E. The microbiology of butyrate formation in the human colon / S.E. Pryde, S.H. Duncan // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2002. – V. 217. – P. 133–139.
325. Qiao, H. Immune responses in rhesus rotavirus-challenged Balb/c mice treated with



- bifidobacteria and prebiotic supplements / H. Qiao, L. C. Duffy, E. Griffiths // *Pediatr. Res.* – 2002. – №51. – P. 750-755.
326. Rambaud, J.-C. *Gut Microflora: Digestive Physiology and Pathology (Hardback)* / J.-C. Rambaud, J.-P. Buts, G. Corthier, B. Flourié – Paris: John Libbey eurotext, 2006. – 247 p.
327. Rawls, J.F. Gnotobiotic zebrafish reveal evolutionarily conserved responses to the gut microbiota / J.F. Rawls, B.S. Samuel, J.I. Gordon // *PNAS.* – 2004. – V. 101. – № 13. – P. 4596-4601.
328. Roberfroid, M. B. Inulin-Type Fructans: Functional Food Ingredients / M. B. Roberfroid // *J. Nutr.* – 2007. – №137 (11). – P. 2493–2502.
329. Roberfroid, M. Prebiotics: the concept revisited / M. Roberfroid // *The Journal of nutrition.* – 2007. – V. 137. – №. 3. – P. 830-837.
330. Rogelj, I. Fermented milk as a functional food / I. Rogelj // *Animal products and human health.* – 2000. – №6– P. 105.
331. Rogelj, I. Fermented milk as a functional food / I. Rogelj // *Agriculture.* –2000. – V.6. – №1. – P.105-107.
332. Sai Ram, M., Effect of Kombucha tea on chromate (VI)-induced oxidative stress in albino rats. / M. Sai Ram, B. Anju, T. Pauline, P. Dipti, A. K. Kain, S. S. Mongia, S. K. Sharma, B. Singh, R. Singh, G. Ilavazhagan, D. Kumar, W. Selvamurthy // *Journal of Ethnopharmacology.* – 2000, Jul. - № 71 (1–2). – P. 235–240.
333. Sanders M.E. Sporeformers as Human Probiotics: *Bacillus*, *Sporolactobacillus*, and *Brevibacillus* / M.E. Sanders, L. Morelli, T.A. Tompkins // *Compr. Rev. Food Sci. and Food Safety.* – 2003. – V. 2. – P. 101-110.
334. Scaldaferri, F. Gut microbial flora, prebiotics, and probiotics in IBD: their current usage and utility / F. Scaldaferri, V. Gerardi, L. R. Lopetuso, F. Del Zompo, F. Mangiola, I. Boškoski, E Gaetani // *BioMed research international.* – 2013. – V. 2013. – P. 2-9.
335. Schley, P. D. The immune-enhancing effects of dietary fibres and prebiotics / P. D. Schley, C. J. Field // *British Journal of Nutrition.* – 2002. – № 87 (2). – P. 221-230.
336. Schneeman, B.O. *Gastrointestinal physiology and functions* / B.O. Schneeman //

British Journal of Nutrition. – 2002. – № 88. – P. 159-163.

337. Seo, J. K. Direct-fed Microbials for Ruminant Animals / J. K. Seo, S.W. Kim, M. H. Kim, S. D. Upadhaya, D. K. Kam, J. K. Ha // Asian-Aust. J. Anim. Sci. – 2010. – V. 23. – № 12. – P. 1657 - 1667.

338. Sharma, M. Role of Lactic Acid Bacteria as Probiotics in Health and Disease / M. Sharma, D. R. Modi, M. Saxena // Prensa Med Argent. – 2014. – V. 101. Is. 2. – P. 1-9.

339. Shenderov, B.A. Metabiotics: novel idea or natural development of probiotic conception / B.A. Shenderov // Microbial ecology in Health and Disease. – 2013. – V. 24. – № 1. – P. 20399.

340. Simmering, R. Pro- and prebiotics—the tasty guardian angels? / R., Simmering M. Blaut // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2001. – №55. –19–28.

341. Sitkin, S. Metabolic dysbiosis concept and its biomarkers in ulcerative colitis and celiac disease / S. Sitkin, T. Vakhitov, E. Tkachenko, L. Oreshko, T. Zhigalova // Journal of Crohn's and Colitis. – 2015. –V. 9. – P. 437.

342. Sreeramulu, G. Characterization of antimicrobial activity in kombucha fermentation / G. Sreeramulu, Y. Zhu, W. Knol // Acta. Biotechnol. – 2001. – №21. – P. 49–56.

343. Sreeramulu, G. Kombucha fermentation and its antimicrobial activity /, G. Sreeramulu, Y. Zhu, W. Knol // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2000. – № 48. – P. 2589–2594.

344. Steinkraus, K.H. Investigations into the antibiotic activity of tea fungus / kombucha beverage / K.H. Steinkraus, K.B. Shapiro, J.H. Hotchkiss, R.P. Mortlock // Acta. Biotechnol. – 1996. – №16. – P.199–205.

345. Su, P. Selected prebiotics support the growth of probiotic mono-cultures in vitro / P. Su, A. Henriksson, H. Mitchell // Anaerobe. – 2007. – №13 (3-4). – P. 134-9.

346. Sukhov B. G. Prebiotic effect of native noncovalent arabinogalactan—flavonoid conjugates on bifidobacteria / B. G. Sukhov, N. N., Pogodaeva, S. V. Kuznetsov, Y. N. Kupriyanovich, G. V. Yurina, D. S. Selivanova, P. A. Medvedeva // Russian Chemical Bulletin. – 2014. – V. 63. – №. 9. – P. 2189-2194.

347. Swidsinski, A. Functional biostructure of colonic microbiota (central fermenting

- area, germinal stock area and separating mucus layer) in healthy subjects and patients with diarrhea treated with *Saccharomyces boulardii* / A. Swidsinski, V. Loening-Baucke, S. Kirsch, Y. Doerffel // *Gastroenterol. Clin. Biol.* – 2010. – V. 34. – №. 1. – P. 79-92.
348. Tannock, G.W. Normal microflora. An introduction to microbes inhabiting the human body / G.W. Tannock. – London: Chapman and Hall, 1995. – 135 p.
349. Timchenko, L. D. Influence of biologically active substances from Kombucha (*Medusomyces gisevii*) on rat gut microbiota with experimental antibiotic-associated dysbiosis / L. D. Timchenko, Y. M. Dobrynya, N. I. Bondareva, E.V. Alieva, I. V. Rzhepakovsky, E.S. Likhacheva, M. N. Sizonenko, S. I. Piskov, M. Kozlova, D. Areshidze // *The Indian Journal of Animal Sciences.* – 2017 (May). – V. 89. – Issue 5. – P. 624-629.
350. Tsukahara, T. Stimulation of butyrate production by gluconic acid in batch culture of pig cecal digesta and identification of butyrate-producing bacteria / T. Tsukahara, H. Koyama, M. Okada, K. Ushida // *The Journal of nutrition.* – 2002. – V. 132. – №. 8. – P. 2229-2234.
351. Velicanski, A.S. Characteristics of kombucha fermentation on medicinal herbs from Lamiaceae family / A.S. Velicanski, D.D. Cvetkovic, S.L. Markov // *Roum. Biotechnol. Lett.* – 2013. – №18. – 8034–8042.
352. Vibhute, V.M. Effect of probiotics supplementation on the performance of lactating crossbred cows / V.M. Vibhute, R.R. Shelke, S.D. Chavan, S.P. Nage // *Vet. World.* – 2011. – V. 4 – P. 557-561.
353. Vitas, J.S. The antioxidant activity of kombucha fermented milk products with stinging nettle and winter savory / J.S. Vitas, R.V. Malbasa, J.A. Grahovac, E.S. Loncar // *Chem. Ind. Chem. Eng. Q.* – 2013. – № 19. – P. 129–139.
354. Vos, A. P. Dietary supplementation of neutral and acidic oligosaccharides enhances Th1-dependent vaccination responses in mice / A. P. Vos, M. Haarman, J. W. van Ginkel // *Pediatr. Allergy. Immunol.* – 2007. – №18 (4). – P. 304-312.
355. Watzl, B. Inulin, oligofructose and immu-nomodulation / B. Watzl, S. Girrback, M. Roller // *British. J. of Nutrition.* – 2005. – № 93 (1). – P. 49-55.

356. Yuniarto, A. K. Antifungal activity of kombucha tea against human pathogenic fungi / A. K. Yuniarto, Anggadiredja, R. Annisa Nur Aqidah // Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research. – 2016. – V. 9. – № 5, Sept. – P. 253-255.

