

На правах рукописи

ШЕБЛАЕВА АННА СЕРГЕЕВНА

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ
АУТОПРОБИОТИКА ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ
МИКРОБИОЦЕНОЗА ПОЛОСТИ РТА ЧЕЛОВЕКА В УСЛОВИЯХ
ИСКУССТВЕННОЙ СРЕДЫ ОБИТАНИЯ**

3.3.7 – Авиационная, космическая и морская медицина

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва - 2024

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Государственном научном центре Российской Федерации – Институте медико-биологических проблем Российской академии наук.

Научный руководитель: доктор медицинских наук, профессор,
член-корреспондент РАН **Ильин Вячеслав Константинович**

Официальные оппоненты: **Заславская Майя Исааковна**, доктор биологических наук, доцент, профессор кафедры эпидемиологии, микробиологии и доказательной медицины Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования "Нижегородская государственная медицинская академия Министерства здравоохранения РФ.

Панин Александр Леонидович, кандидат медицинских наук, главный специалист по медицинской логистике, Федерального государственного бюджетного учреждения «Арктический и антарктический научно-исследовательский институт»

Ведущая организация: Федеральное бюджетное учреждение науки Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора

Защита состоится « » _____ 2024 г. в _____ часов

на заседании диссертационного совета 24.1.023.01 в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Государственном научном центре Российской Федерации – Институте медико-биологических проблем Российской академии наук по адресу: 123007 г. Москва, Хорошевское шоссе, 76 А.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации – Института медико-биологических проблем Российской академии наук и на сайте <http://www.imbp.ru/WebPages/win1251/ScienceN/DisserSov/Sheblaeva2024/Sheblaeva.html>

Автореферат разослан « ____ » _____ 2024 г.

Учёный секретарь диссертационного совета

кандидат биологических наук

С. В. Поддубко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

В процессе полета космонавты подвергаются постоянному воздействию стрессогенных факторов, таких как радиационное облучение и микрогравитация, следствием последней является перераспределение жидкостных сред организма. К дополнительным факторам относят шум, вибрацию, ограничение подвижности, изоляцию, и др. (Стржижовский, 1998; Уйба и др., 2017; Ушаков и др. 2016; Баевский и др. 2013; Ларина и др. 2011; Garrett-Bakelman et al., 2019; Little et al., 2010; Yu et al., 2011; Crucian et al., 2015; Donaubaauer et al., 2020; Wu et al., 2009). Все эти факторы приводят к изменению функциональной работы организма, в первую очередь это относится к сердечно-сосудистой системе, нарушениям в работе органов чувств, мышечно-скелетным деформациям, когнитивным нарушениям, нарушению работы центральной нервной системы и др. (Носков, 2000; Bettinelli et al., 2002; Prisk et al., 2014; Elliott et al. 1994; Сапецкий А.О. и др., 2017, Баранов и др. 2011).

Зубочелюстная система, включающая пародонт, является одним из важных биотопов организма. Воздействие на человека ряда факторов, присущих условиям космического полета, может приводить к изменению некоторых показателей функционального состояния полости рта вследствие формирования различного вида дисбиозов и вторичных иммунодефицитных состояний, приводящих к развитию воспалительных реакций слизистой полости рта и десен, снижению кровоснабжения пародонта как следствие синдрома вегетативной сосудистой дисфункции (Воронков и др., 2003). При наличии хронического стресса эти процессы могут привести к манифестации воспалительного процесса, приводящего к деструкции костной ткани, а также к экзогенной инфекции и эндогенным ее очагам, формирующимся на поверхности слизистых оболочек открытых полостей зубочелюстной системы (Шумилина и др., 2002). Общей тенденцией изменения физиологических показателей полости рта у обследуемых космонавтов было снижение скорости слюноотделения в 1,5 раза, которое приводило к ухудшению естественного очищения полости рта, увеличению содержания осадка в слюне более 5 %, обильному отложению зубного налета и камня, что сопровождалось изменениями состояния микрофлоры и антиинфекционной резистентности слизистых оболочек полости рта (Дубинин, 1985, Мальнева, 1997., Ильин и др., 2005; Ильин и др., 2019).

Таким образом можно предположить, что экстремальные условия среды обитания и стрессогенные факторы могут стать провокационными для начала развития воспалительных процессов в ротовой полости и изменения микробиоценоза в сторону дисбиотических процессов, сопровождающих активацию патогенных представителей микробиоценоза.

В условиях космических полетов микроорганизмы, являющиеся условными патогенами, могут стать вирулентными вследствие снижения защитных сил организма с последующим нарушением колонизационной резистентности, проявляющейся нарушением трех основных барьеров, первый из которых представлен протективной микробиотой, второй формируется эпителием покровных тканей и слизистых оболочек, третий представлен факторами клеточного и гуморального иммунитета (Ильин и др., 2014). В то же время имеются данные о состоянии организма при гипоксии, где показано, что в условиях высокогорья снижается титр антител и количество антителообразующих клеток (Гранов, 1991). Пребывание человека в условиях гипоксии приводит к снижению реактивности тимусзависимых лимфоцитов. Данные изменения носят стойкий характер (Мураталиев и др., 2003).

Одним из методов повышения иммунной системы и нормализации микробиоценоза является использование пробиотиков (Ильин и др., 2022; Stahl et al., 2016; Кайбышева и др., 2019; Грудянов и др., 2006). Они представляют собой апатогенные для

человека бактерии, обладающие антагонистической активностью в отношении патогенных и условно-патогенных бактерий, обеспечивающие восстановление нормальной микробиоты (Долгорукова и др., 2019). В настоящее время пробиотики используются в качестве активных добавок к пище, пробиотических продуктов, а также в клинической практике, где нашли свое применение при таких заболеваниях как синдром раздраженного кишечника, заболевания желудочно-кишечного тракта, заболевания дыхательных путей, в акушерстве и гинекологии и др. (Симаненков и др., 2019; Соловьева и др., 2011; Донец 2015; Глушанова 2005). Прием пробиотиков при подготовке космонавтов в условиях искусственной среды обитания также содействовал снижению воспалительных реакций (Ильин и др., 2019).

Таким образом, применение пробиотиков показало хороший результат, однако представляется, что для узких профессиональных групп было бы целесообразно использовать пробиотики, основанные на аутологичных микроорганизмах. Возможно предположить большую эффективность от применения аутопробиотика, который, в отличие от пробиотика, имеет более персонифицированный характер. Он создается индивидуально с помощью культивации образцов, взятых у конкретного индивида, тем самым предполагая, что аутологичные культуры будут усваиваться и удерживаться в его организме лучше, нежели другие микроорганизмы. Согласно мнению Б. А. Шендерова (Шендеров, 1998), еще в период внутриутробного развития организм ребенка готовится принять микрофлору матери в качестве «своей», или, другими словами, у него формируется иммунологическая толерантность к нормальной микрофлоре (Ильин и др., 2013). На данный момент аутопробиотики используются как дополнительный источник микроорганизмов при заболеваниях пародонта, аутоиммунных заболеваниях, в эндокринологии, а также при антибиотикорезистентности у этиологического агента (Ипполитов, 2016; Ермоленко и др., 2017; Агеевец, 2012; Дятлов, 2013; Baroud, 2012). Можно предполагать, что использование аутопробиотика на основе протективной микробиоты пародонта, а именно слюварного стрептококка (*Streptococcus salivarius*), будет иметь успех при включении этой методики в комплекс методов, направленных на поддержание гомеостаза в условиях длительных пилотируемых полетах, применительно к задачам профессиональных и микробиологических рисков в экстремальных условиях.

Цель работы:

Экспериментальное обоснование применения аутопробиотика на основе слюварного стрептококка (*Streptococcus salivarius*) в целях коррекции микробиоценоза слизистых оболочек рта и пародонта в экспериментах с участием человека.

Задачи исследования:

1. Оценка эффективности аутопробиотикотерапии в процессе восстановления микробиоценоза полости рта у участников экспериментов, находящихся в условиях измененной среды обитания.
2. Оценка роста и накопления условно-патогенной микробиоты методом масс-спектрометрии микробных маркеров в условиях измененной среды обитания.
3. Изучение возможности и состоятельности работы методом масс-спектрометрии микробных маркеров в ротовой полости у участников экспериментов, находящихся в условиях измененной среды обитания.

Научная новизна

Впервые была проведена сравнительная оценка бактериологического метода и метода масс-спектрометрии микробных маркеров (МСММ) при оценке микробиоценоза пародонта у лиц, находящихся в искусственно изменённой среде обитания.

Впервые методом масс-спектрометрии микробных маркеров при длительной изоляции в гермообъекте изучался качественный и количественный состав условно-патогенной микрофлоры полости рта у испытуемых. Расширенный высокочувствительный анализ показал динамику изменений её количества в зависимости от длительности нахождения в герметично замкнутом объекте, воспроизводящим условия изоляции, специфичные для космического корабля, а также рост таких условно-патогенных представителей как: *Streptococcus mutans*, *Fusobacterium spp.*, *Prevotella spp.*, *Porphyromonas spp.*, *Porphyromonas gingivalis*, *Candida spp.*, *Actinomyces spp.*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Corynebacterium spp.*, *Veilonella spp.*, *Enterococcus faecalis*, *Actinomyces viscosus*, *Klebsiella spp.*

Впервые была проведена оценка эффективности препаратов на основе штаммов салivarного стрептококка М-18 в условиях искусственно измененной среды обитания.

Теоретическая и практическая значимость работы

Экспериментально обосновано применение аутопробиотика *S. salivarius* у лиц, длительное время находящихся в измененной среде обитания. Получены экспериментальные данные, свидетельствующие о перспективности в исследовании аутологических препаратов на основе салivarного стрептококка М-18.

Метод масс-спектрометрии микробных маркеров позволяет контролировать и проводить периодический мониторинг условно-патогенной микробиоты полости рта в условиях измененной среды обитания, а также в обстоятельствах, связанных с трудностью отбора материала, его хранения и транспортировки.

Показано, что метод масс-спектрометрии микробных маркеров применительно к исследованию пародонта и слюны адекватен по количественной и видовой составляющей бактериологическим и ПЦР методами исследования.

Практическое применение метода масс-спектрометрии микробных маркеров позволяет врачам-исследователям и врачам-клиницистам проводить обширное (57 образцов штаммов) исследование за один раз и назначить персонализированную профилактику и терапию.

Положения выносимые на защиту

1. Аутопробиотики на основе салivarного стрептококка (*S. salivarius*) являются более эффективным средством коррекции микрофлоры полости рта у лиц в искусственной среде обитания, нежели аллогенные аналоги.
2. Метод масс-спектрометрии микробных маркеров является быстрым, эффективным и информативным способом исследования микрофлоры пародонта.

Степень достоверности результатов проведённых исследований

Диссертационная работа выполнена с использованием современных методов клеточной и молекулярной биологии, а также адекватной статистической обработки данных. Выносимые на защиту положения и выводы основаны на достоверных результатах экспериментов, проиллюстрированных графиками и таблицами.

Апробация работы

Основные результаты и положения диссертации докладывались и обсуждались на: 56 Научных чтениях памяти К.Э. Циолковского (Калуга, Россия, сентябрь 2021); XIV Международной научно-практической конференции «Пилотируемые полёты в космос»

(Звездный городок, ноябрь 2021); I Всероссийской междисциплинарной научно-практической конференции по микробиологической стоматологии «Современная микробиология для клинической стоматологии. Достижения, проблемы, перспективы» (Ставрополь, Россия, 2021); 71 международных общественно-научных чтениях, посвященных памяти Ю. А. Гагарина (г. Гагарин Смоленской области, март 2022); XVIII конференции по космической биологии и авиакосмической медицине с международным участием «Земля – Орбита – Дальний космос» (г. Москва, ноябрь 2023).

По теме диссертации написано 3 статьи в журналах из перечня журнала ВАК РФ и баз данных Scopus/Web of Science; 4 тезисов докладов, 1 свидетельство о регистрации базы данных.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 182 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, главы «Материалы и методы исследования», главы собственных исследований и обсуждения результатов исследований, выводов и указателя литературы, включающего 252 работы, из них 136 отечественных и 112 иностранных авторов. Диссертация иллюстрирована 30 таблицами и 9 рисунками.

Основное содержание работы

Для достижения поставленной цели в исследованиях участвовало 63 добровольца. Эксперименты «Эскиз» и «Sirius 21» проводились в специальном медико-техническом экспериментальном комплексе (НЭК) ГНЦ РФ – ИМБП РАН, предназначенном для моделирования условий космического полета. Данный комплекс является полностью изолированным и рассчитан на длительное пребывание человека в нем, полностью оснащен автономной системой жизнеобеспечения. Участники были предварительно обучены самостоятельно брать пробы друг у друга. В эксперименте «Эквивалентность» пробы брались однократно у свободной выборки людей с целью выбора оптимального микробиологического метода. В эксперименте «Immersion-7» участники находились в течение недели в иммерсионной ванне, имитирующей фактор невесомости космического полета. В экспериментальной работе «Гипобария», испытуемые поднимались в высокогорье до 5.5 тыс. над уровнем моря.

Основной отбор проб и направления экспериментальных исследований представлен в таблице 1.

Таблица 1. Модельные эксперименты

Эксперимент	Периодичность исследования	Длительность исследований	Кол-во испытуемых	Методы исследования	Биотопы
1	2	3	4	5	6
«Эскиз»	Фон Выход 6 сутки после окончания эксперимента 18 сутки после окончания эксперимента	14	6	МСММ, Бактериологический метод, ИФА, УЗДП	Десневая жидкость (пародонт)
«Эквивалентность»	Однократно	1 день	20	ПЦР, МСММ	Десневая жидкость (пародонт)
«Immersion –7»	Фон Выход 7 сутки после окончания эксперимента	7 суток	10	Бактериологический метод, МСММ	Десневая жидкость (пародонт)
«Sirius 2021-22»	Фон Затем каждые 30 сутки	240 дней	6	Бактериологический метод, МСММ, ИФА	Зев, десневая жидкость (пародонт)
«Гипобария»	Фон 14 сутки после окончания эксперимента 7 сутки после окончания эксперимента	14 суток	21	МСММ, ИФА	Десневая жидкость (пародонт)

Материалы и методы исследования

В работе использовался некультуральный подход к идентификации микроорганизмов методом масс-спектрометрии микробных маркеров (МСММ). Отбор биоматериалов проводился в области десневой борозды нижних зубов с язычной стороны. При отборе проб для метода МСММ использовались одноразовые стерильные зонды с тампоном в пробирке без среды. Основные манипуляции с образцами в рамках пробоподготовки – это дозирование, перемешивание и нагрев. Для нагрева использовали твердотельный термостат (поддержание температуры 80 °С с точностью $\pm 0,1$ °С), для перемешивания лабораторный одноместный встряхиватель типа «Вортекс». Все пробы помещали в стеклянные вials, стандартные для метода масс спектрометрии микробных маркеров. Головку тампона с мазком отрезали от штока и помещали в вials целиком. К сухому остатку в охлажденном

до комнатной температуры вials добавляли 20 мкл. NO-бис (трихлорфосфоранимин), закрывали крышкой, помещали в термостат (80 °С, 5 мин), охлаждали до комнатной температуры, затем к реакционной смеси добавляли 40 мкл гексана, полученный раствор переносили в коническую вставку и герметично закрывали в вials. Для анализа использовали микробиологический анализатор МАЭСТРО (ООО «Интерлаб», Россия).

Бактериологический метод

Пробы микрофлоры для бактериологического анализа отбирались в области нижних моляров. Все пробы брались утром натощак до чистки зубов. С помощью стерильного ватного тампона протиралась область зубодесневого прикрепления, без контаминации с ротовой жидкостью и помещалось в пробирку со средой Де Ингли. Для проведения бактериологического анализа и выявления видовой идентификации выполнялись посевы на следующих питательных средах:

а) Стафилококковый агар №110 (M521). Состав питательной среды (грамм/литр): триптон – 10,5; дрожжевой экстракт – 2,0; желатин – 31,11; лактоза – 2,05; D-маннит – 10,1; натрия хлорид – 75,0; калия дигидроортофосфат – 5,0; агар – 15,0. Посевы помещали в термостат при температуре 36,7 °С на 48 часов.

б) Основа колумбийского кровяного агара (M144), с 5 % (об/об) дефибрированной крови и селективной добавкой для выделения неспоровых анаэробов. Состав питательной среды (грамм/литр): пептон – 22,0; крахмал – 1,1; натрия хлорид – 4,0; агар – 15,0. Посев предварительно помещали в анаэрозат HiAnaerobic System Mark VI 67 («Himedia», Индия), а затем в термостат при температуре 36,9 °С на 12 суток.

в) Mitis Salivarius Agar (M259) – селективная питательная среда для стрептококков с добавлением теллурита калия в виде добавки. Состав питательной среды (г/л): гидролизат казеина – 13,0; перевар животной ткани – 5,3; глюкоза – 1,1; сахароза – 53,0; калия гидрофосфат – 4,0; трипановый синий – 0,075; кристаллический фиолетовый – 0,0008; агар-агар – 15,0. Посев помещали в термостат при температуре 36,7 °С на 48 часа.

д) Хромогенный агар для грибов Candida (M1297). Состав питательной среды (грамм/литр): пептический перевар животной ткани – 15,0; калия гидрофосфат – 1,0; хромогенная смесь – 11,2; хлорамфеникол – 0,5; агар – 15,0. Посев помещали в термостат при температуре 30,2 °С на 48 часов. Посев проводили с применением техники секторального количественного культивирования по методу Голда. Создание условий анаэробноз достигалось при помощи вакуумного насоса, прямой заменой кислорода на поверочную газовую смесь: H₂ – 10 %; CO₂ – 10 %; NO₂ – (ГСО ПГС 10700–2018 (АО «Линде Газ Рус», Россия)). Для контролирования сохраняемых условий анаэробноз использовался индикатор разрежения для анаэрозатов Anaero Indicator Tablet R.T. («Himedia», Индия). Культивирование проводили в термостатах при температурном диапазоне от 36,7 до 37,4 °С. Проводился учет макроскопических характеристик, а также морфологическая оценка с использованием техники световой микроскопии. Проводились тесты на протеазную активность, лецититиназную активность, тест на аэротолерантность, тест на каталазу и оксидазу. Поверочная идентификация чистоты культуры проводилась с помощью биохимических идентификационных тестов Biochem-Identification T-Kits («Himedia», Индия) и систем API («BioMérieux», Франция).

Концентрация иммуноглобулинов (sIgA, IgM) и цитокинов (IL-6, IL-8, IL-1β, I-L4, INFγ, TNFα) в ротовой жидкости определялась иммуноферментным анализом (ИФА) с помощью наборов реагентов для проведения иммуноферментного анализа производства ЗАО «Вектор – Бест». Для проведения экспериментов с методикой ИФА проводилось взятие проб ротовой жидкости. Пробы брались по следующей схеме: на верхней челюсти, снаружи между 1 и 2 резцами справа, между 1 и 2 резцами слева. На нижней челюсти по такой же схеме. Пробы отбирались стерильными тампонами, которые прикладывались к месту отбора на 2 минуты.

Метод полимеразной цепной реакции

При отборе проб методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовали стерильный стоматологический бумажный пин. С его помощью отбирались пробы в области десневой борозды нижних зубов с язычной стороны. Затем пин помещался в 0,5 мл стерильного физиологического раствора, содержащегося в пробирке по типу Eppendorff. ДНК выделяли с помощью набора реагентов «Пробоподготовка Универсальная» (ООО НПФ «Генлаб», Россия) в соответствии с инструкциями фирмы-производителя. Амплификацию генетических маркеров пародонтопатогенных бактерий проводили в термоциклере «Терцик МС-2» («ДНКтехнология», Россия) с помощью мультпраймерного ПЦР набора «Мультидент-5» (ООО НПФ «Генлаб», Россия). Детекцию амплифицированной смеси проводили методом горизонтального гель-электрофореза в 1,6% агарозном геле после окрашивания бромистым этидием.

Метод ультразвуковой доплеровской флоуметрии

Для экспериментов в искусственной среде обитания применяли ультразвуковой высокочастотный доплерограф «Минимакс Допплер-К» (Санкт-Петербург) с ультразвуковым датчиком непрерывного излучения, рабочая частота которого составляла 20 МГц.

Методика изготовления аутопробиотического препарата *S. salivarius*

Посев слюны осуществляли по методу Голда в двух повторностях на колумбийский агар с бараньей кровью, желточно-солевой агар, агар Сабуро, агар Шедлера. Посевы помещали в термостат на 37 °С (в аэробных и анаэробных условиях). Через 24 часа посеvy просматривали под микроскопом при увеличении в 20 раз и отсеивали единичные колонии для получения «чистой» культуры. На следующий день делали мазки из выросших культур, окрашивали по Граму и микроскопировали при увеличении в 1000 раз. Полученные «чистые» культуры идентифицировали с помощью масс-спектрометрического анализа MALDI-TOF.

Статистическая обработка результатов

Статистический анализ был проведен при помощи пакета прикладных программ «Statistica 12.0», с использованием непараметрического критерия Вилкоксона для связанных групп с принятым уровнем значимости $p < 0,05$. Также в некоторых случаях (при сравнении дифференцированных методов), использовался для расчетов тест Мак-Немара, так как условие независимости наблюдений не выполняется, но, напротив, учет признака выполняется на одних и тех же субъектах (Ильин и др., 2022).

Результаты исследований и обсуждения

14-суточный эксперимент «Эскиз» по нахождению участников в герметично замкнутом помещении, имитирующем капсулу космического корабля

Установлено, что нахождение в герметично-замкнутом пространстве повышает тоническое напряжение периферических сосудов, происходит снижение капиллярного кровотока в пародонте. Для максимальной средней скорости (V_m) отмечается достоверное увеличение относительно фона на 7-е сутки после завершения эксперимента на 33%, для максимальной диастолической скорости (V_d) – для всех исследований после завершения изоляции (на 65,6 %, 69 % и 61,4% относительно фона сразу после выхода, на 7-сутки по окончании эксперимента и 18-е сутки соответственно) (рис. 1).

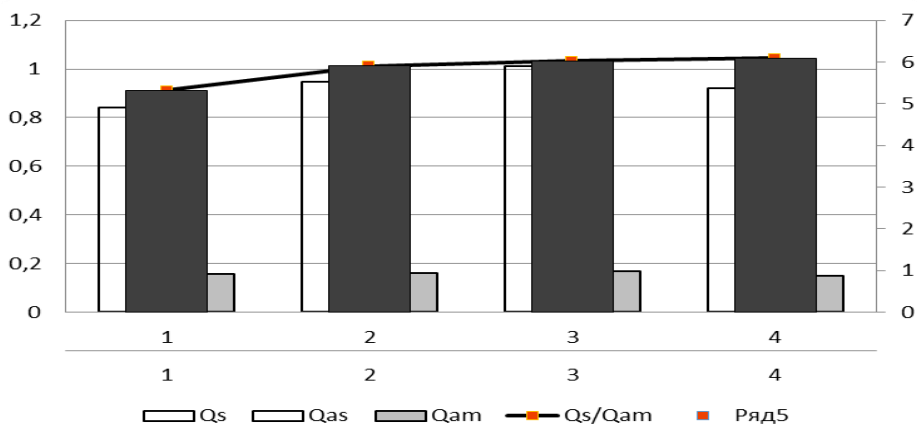
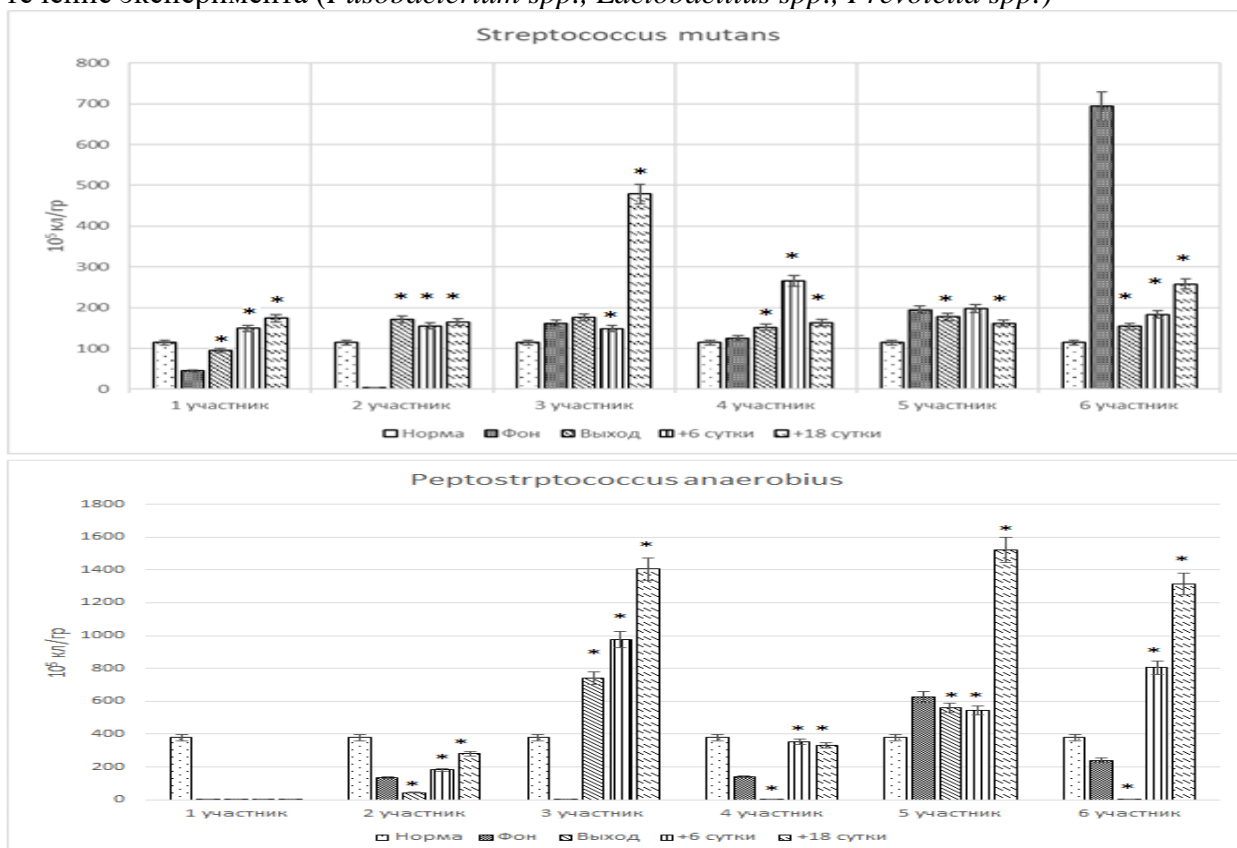


Рис.1. Динамика объемных скоростей кровотока в тканях пародонта

Методом МСММ были идентифицированы следующие группы микроорганизмов: *S. mutans*, *P. anaerobius*, *Fusobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Prevotella spp.*, *Porphyromonas spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Actinomyces spp.* (рис.2).

Все микроорганизмы можно разделить на те, которые показали свой рост в течение эксперимента (*S. mutans*, *Porphyromonas spp.*, *Candida spp.*, *Corynebacterium spp.*, *P. anaerobius*, *Actinomyces spp.*) и те, число которых оставалось стабильным или снизилось в течение эксперимента (*Fusobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Prevotella spp.*)



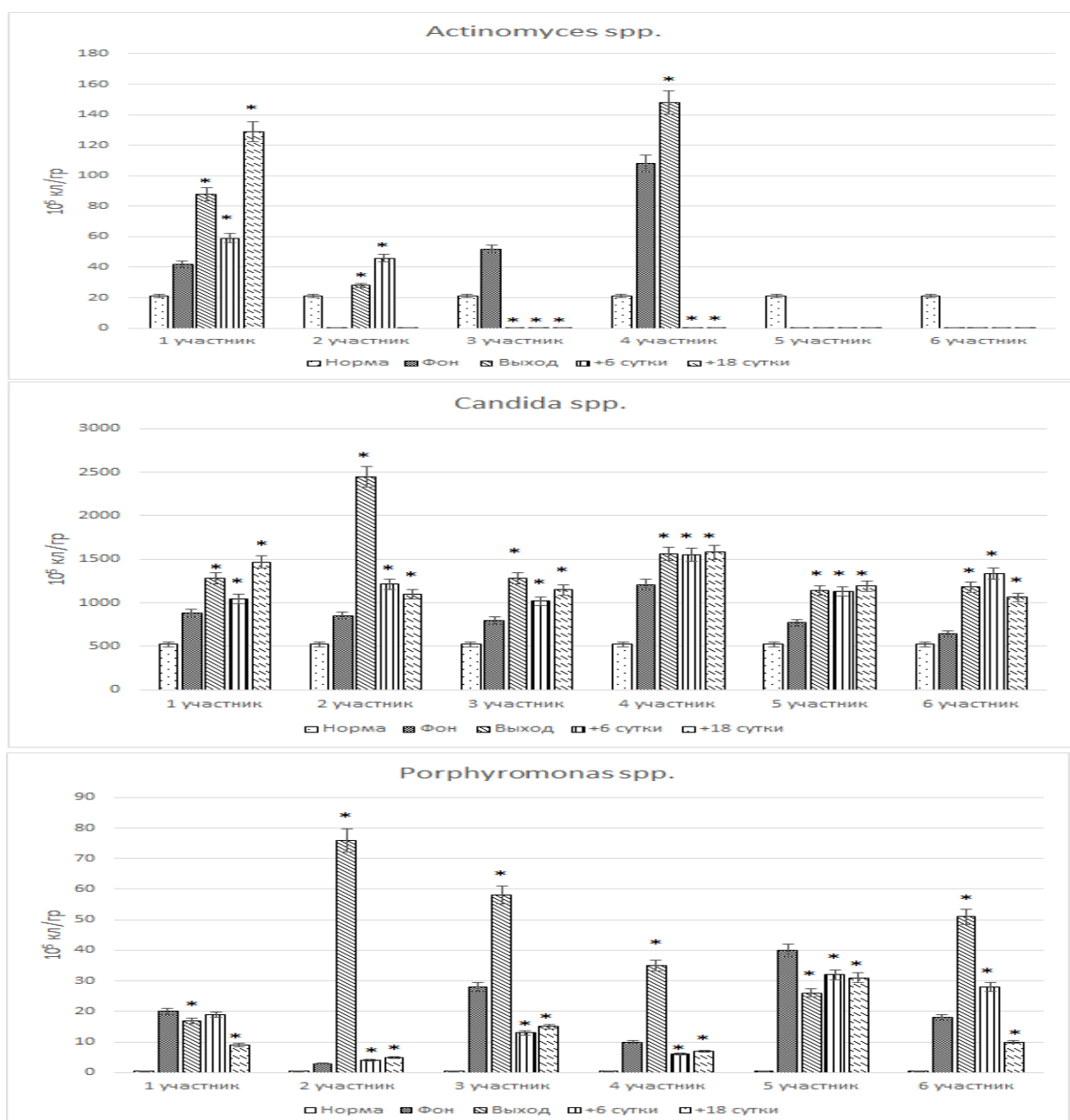
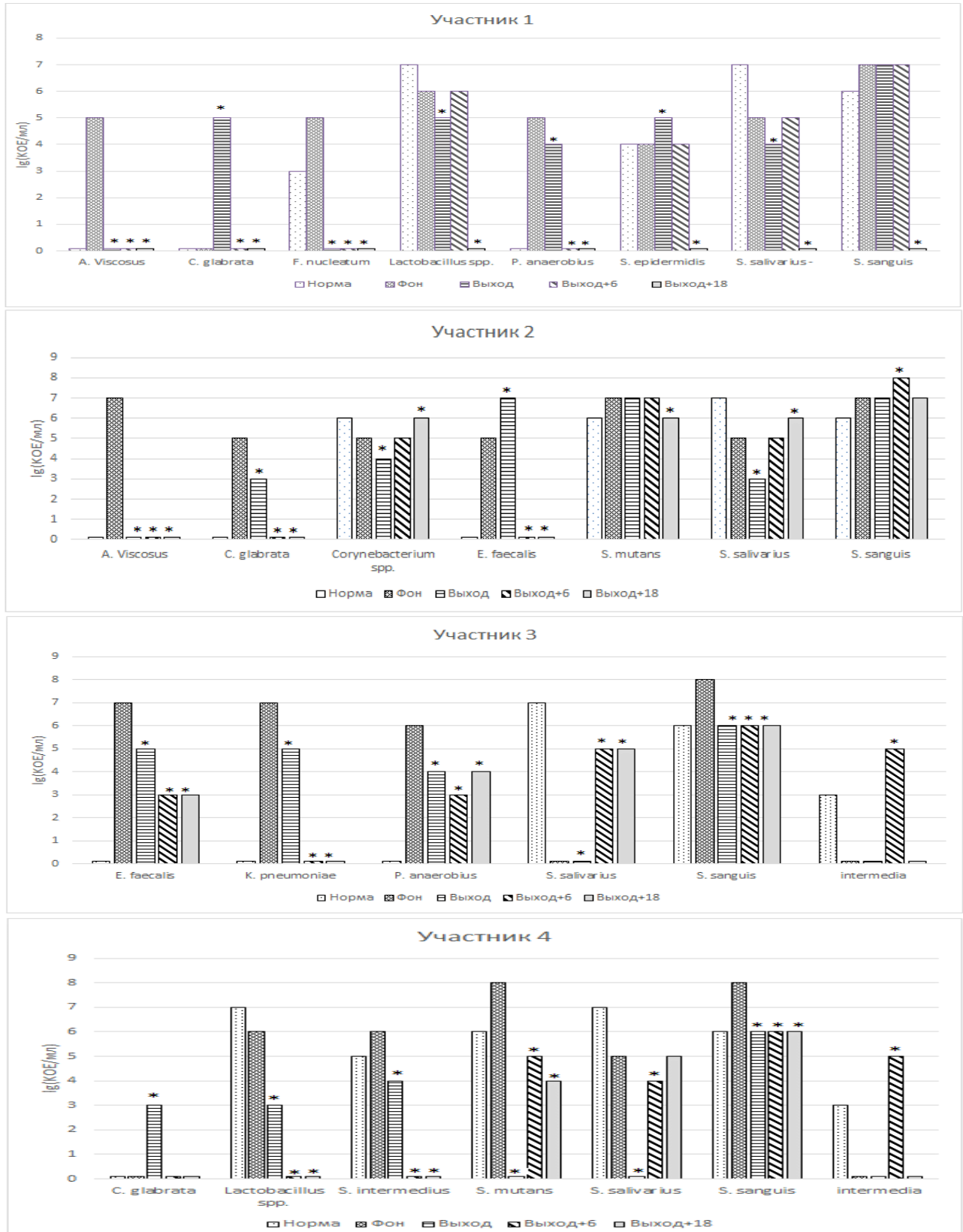


Рис.2. Динамика роста *S. mutans*, *P. anaerobius*, *Porphyromonas spp.*, *Actinomyces spp.*, *Candida spp.* у участников эксперимента 14 суточной изоляции по методу масс-спектрометрии микробных маркеров. По горизонтальной оси – сроки отбора проб и участники; по вертикальной оси - уровень содержания *S. mutans*, *P. anaerobius*, *Porphyromonas spp.*, *Actinomyces spp.*, *Candida spp.* кл/мл. Примечание – * обозначены статистически значимые различия по сравнению с соответствующим показателем фона ($p < 0,05$)

Рост условно-патогенных микроорганизмов говорит о накопительном эффекте микробиоты полости рта и смещении гомеостатического баланса в сторону дисбиоза в условиях измененной среды обитания, а также о нарушении барьеров колонизационной резистентности в виде снижения протективной микробиоты.

С помощью бактериологического метода были изолированы и идентифицированы следующие условные патогены: *S. mutans*, *E. faecalis*, *S. epidermidis*, *A. viscosus*, *C. glabrata*, *Streptococcus sangius*, *F. nucleatum*, *P. anaerobius*, *Corynebacterium spp.*, *K. pneumoniae*, *Intermedia*, *S. intermedius*, *A. naeslundii*, а также протективная микробиота: *Lactobacillus spp.*, *S. salivarius* (рис.3 a-f).

При анализе результатов позволительно предположить два процесса изменений микробиоты: индивидуальные колебания количественного и видового состава микрофлоры пародонта и спорадический количественный кратковременный рост представителей пародонтопатогенной микрофлоры. При анализе графиков виден общий накопительный рост условно-патогенной микробиоты на выходе из эксперимента и общее снижение протективной микрофлоры, что подтверждают оба метода.



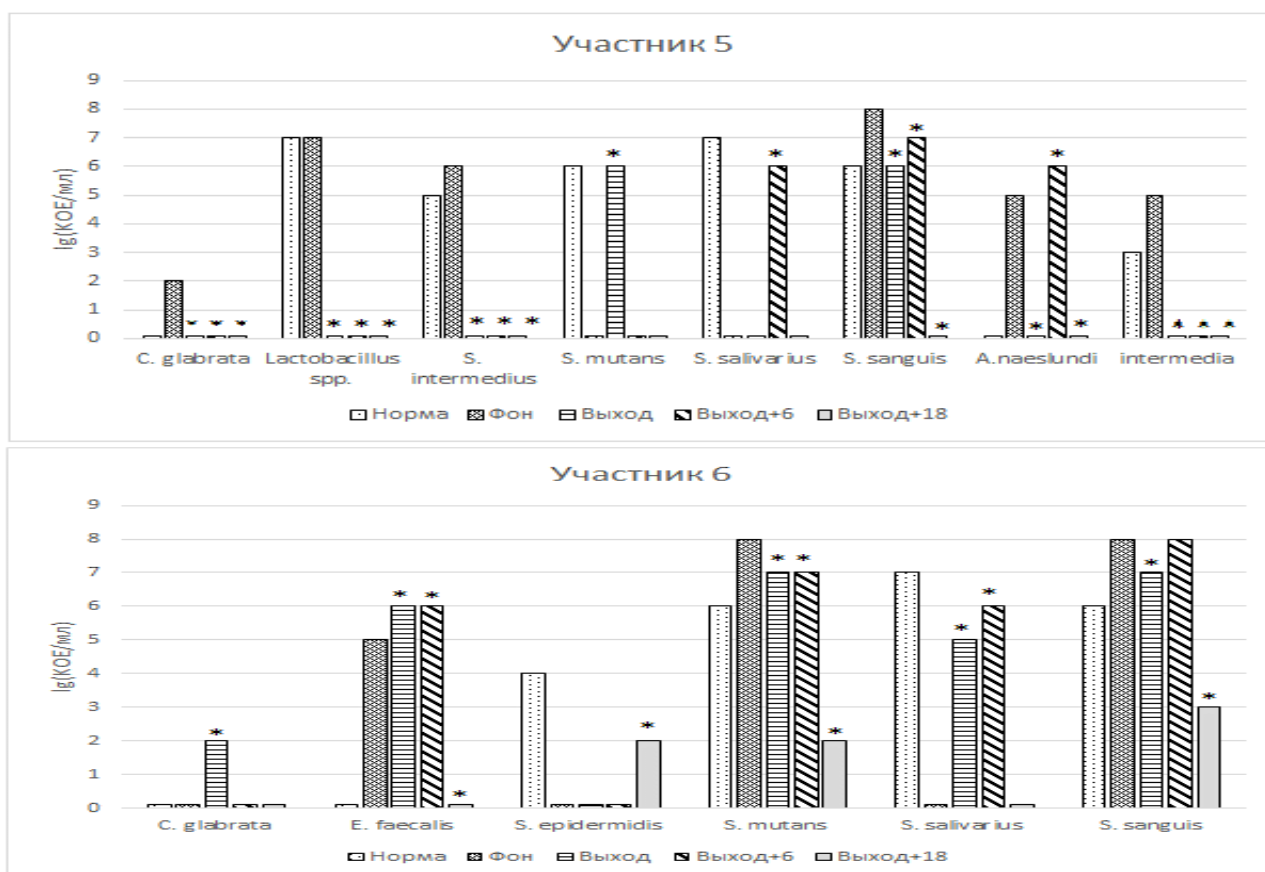


Рис.3 (а-г). Участник 1,2,3,4,5,6 эксперимента 14 суточной изоляции. Бактериологический метод. По горизонтальной оси – сроки отбора проб. По вертикальной оси – уровень содержания *A. viscosus*, *C. glabrata*, *F. nucleatum*, *Lactobacillus spp.*, *P. anaerobius*, *S. epidermidis*, *S. salivarius*, *S. sanguis*, *Corynebacterium spp.*, *E. faecalis*, *K. pneumoniae* КОЕ/мл. Примечание – * обозначены статистически значимые различия по сравнению с соответствующим показателем фона ($p < 0,05$)

Метод ИФА эксперимента «Эскиз».

Как видно из таблицы 2, уровень роста провоспалительных цитокинов ИЛ-6, ИЛ-8 повышается по сравнению с фоновыми значениями (пик на выходе из эксперимента) и постепенно снижается к изначальным значениям вплоть до 18 суток после окончания эксперимента, соответственно с показателями секреторного иммуноглобулина (sIgA, IgA, IgM) (табл. 2).

Таблица 2. Содержание цитокинов в ротовой жидкости испытуемых-добровольцев в условиях 14 суточной изоляции

Сроки отбора проб	ИЛ-8	ИЛ-6	ИЛ-4
Фон *	3.397 ± 0.698	0.413 ± 0.138	5.169 ± 0.604
Выход *	6.963 ± 1.253	1.402 ± 1.112	4.773 ± 0.352
6 сутки *	3.237 ± 0.666	0.262 ± 0.069	6.244 ± 0.525
18 сутки *	3.921 ± 1.193	0.196 ± 0.049	5.213 ± 0.260

Примечания: * фон – за неделю до начала эксперимента; выход – 2 недели от начала эксперимента; + 6сутки – через 6 дней после окончания эксперимента; + 18 суток – через 18 дней после окончания эксперимента.

Сравнение масс-спектрометрии с бактериологическим и ПЦР-методами (Эксперименты «Immersion-7» и «Эквивалентность»)

В связи с трудностью взятия проб в условиях космического полета, а также в условиях измененной среды обитания возникла необходимость выбора оптимального микробиологического метода. Было решено провести сравнительный анализ между методами: бактериологическим, ПЦР и методом МСММ. Были идентифицированы следующие условные патогены: *Fusobacterium spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Streptococcus spp.*, *P. anaerobius*. На примере *Corynebacterium spp.* (рис. 4) графики показывают более высокий доверительный интервал количественных результатов исследования проб, полученных методом МСММ по сравнению с бактериологическим методом, что может быть связано с высокой чувствительностью метода МСММ, который регистрирует структурные жирные кислоты бактериальных клеточных мембран. В целом оба метода показывают схожие результаты и являются достоверными ($p < 0,05$).

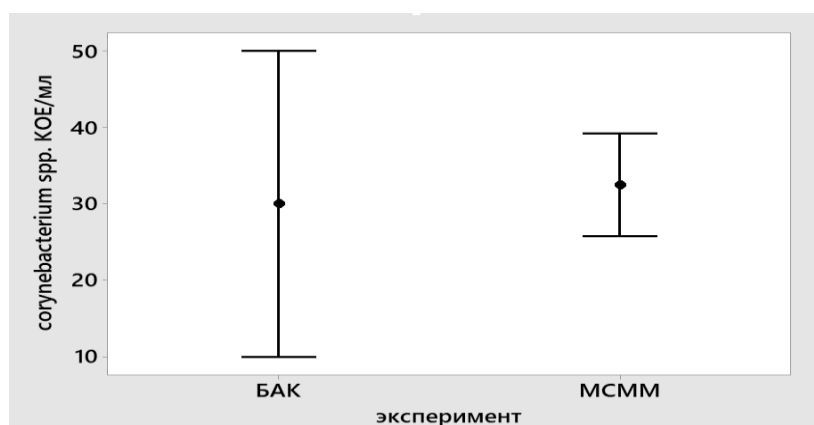


Рис. 4 Сравнение двух методов на примере *Corynebacterium spp.* По горизонтальной оси – методы анализа. По вертикальной оси – уровень содержания *Corynebacterium spp.* КОЕ/мл, кл/мл

При сравнении ПЦР метода и МСММ были идентифицированы следующие микроорганизмы: *Prevotella spp.*, *Veillonella spp.*, *Candida spp.*, *P. gingivalis* (Таблица 2). У 20 волонтеров обоими методами (ПЦР и метод МСММ) были идентифицированы следующие микроорганизмы: *Prevotella spp.*, *Veillonella spp.*, *Candida spp.*, *P. gingivalis*. Как видно из таблицы 3, метод МСММ оказался более чувствительным по сравнению с методом ПЦР и выявил большее наличие следующих условных патогенов: *Prevotella spp.*, *P. gingivalis*, *Veillonella spp.* Таким образом метод МСММ сопоставим с методом ПЦР и может в дальнейшем использоваться в условиях измененной среды обитания и условиях космического полета.

Таблица 3. Сравнение методов ПЦР и МСММ с использованием критерия Мак-Немара

Микроорганизмы	Исходы	МСММ +	МСММ -	Значение распределения χ^2 и уровень значимости
<i>Prevotella spp.</i>	ПЦР+	2	1	Q = 0.025, p = 0.671
	ПЦР-	3	14	
<i>Veillonella spp.</i>	ПЦР+	8	7	Q = 0.36364, p = 0.5465
	ПЦР-	4	1	
<i>Candida spp.</i>	ПЦР+	0	2	Q = 0, p = 1
	ПЦР-	2	16	
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	ПЦР+	1	3	Q = 0.125, p = 0.7237
	ПЦР-	5	11	

Примечание – в приведенной таблице:

- ПЦР «+» – количество проб в выборке, превышающих клинически значимое пороговое значение, полученное методом ПЦР;
- ПЦР «-» – количество проб в выборке, не превышающих клинически значимое пороговое значение, полученное методом ПЦР;
- метод масс-спектрометрии микробных маркеров «+» – количество проб в выборке, превышающих клинически значимое пороговое значение, полученное методом масс-спектрометрии микробных маркеров;
- метод масс-спектрометрии микробных маркеров «-» – количество проб в выборке, не превышающих клинически значимое пороговое значение, полученное методом масс-спектрометрии микробных маркеров;
- Q – значение распределения χ^2 для использования с критерием Мак-Немара с поправкой mid-P;
- p – критический уровень значимости при проверке статистической гипотезы.

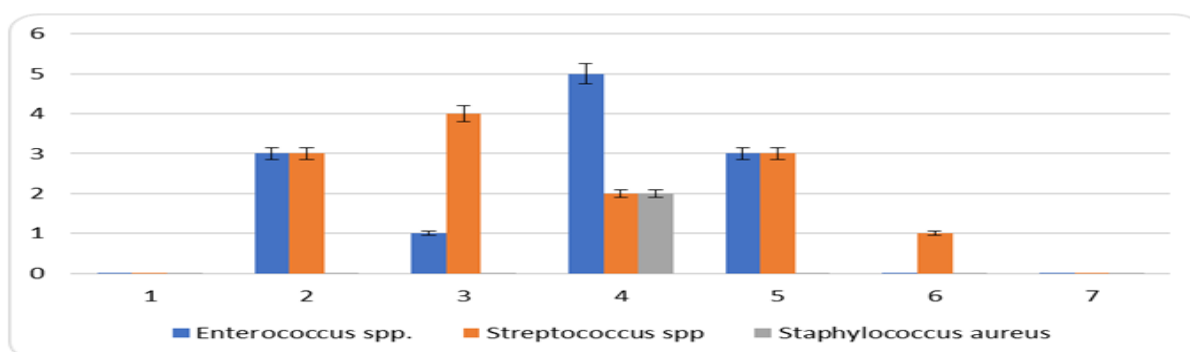
Применение аутопробиотического препарата саливарного стрептококка в условиях измененной среде обитания в эксперименте «Sirius 2021–22»

В данном эксперименте изучалась динамика до и после применения аутопробиотического препарата на зубочелюстную систему, включающую пародонт и слизистые оболочки полости рта. Методом масс-спектрометрии микробных маркеров были обнаружены следующие микроорганизмы: *S. mutans*, *S. aureus*, *Fusobacterium spp.*, *Prevotella spp.*, *Klebsiella spp.*, *Porphyromonas spp.*, *Candida spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Actinomyces spp.*, *Candida spp.* В данном эксперименте мы наблюдаем несколько видов микроорганизмов, которые можно разделить на группы: 1 группа – рост условно-патогенной микробиоты в слюне, 2 группа – рост условно-патогенной микробиоты в зеве, 3 группа – отреагировала на аутопробиотическую терапию, 4 – группа – не отреагировавшая на аутопробиотическую терапию (таблица 4).

Таблица 4. Сравнение динамики роста микробиоты в слюне и слюне после приема аутопробиотического и пробиотического препаратов

Условно-патогенная микробиота	Слюна	Зев
Рост (накопление) УПМ в течение эксперимента	<i>S. mutans</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Fusobacterium spp.</i> , <i>Prevotella spp.</i> , <i>Actinomyces spp.</i> , <i>Klebsiella spp.</i> , <i>Porphyromonas spp.</i> , <i>Candida spp</i>	<i>S. mutans</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Corynebacterium spp.</i> , <i>Klebsiella spp.</i> ,
Количество УПМ снижается или изменяется незначительно в течение эксперимента	<i>Corynebacterium spp.</i> ,	<i>Fusobacterium spp.</i> , <i>Prevotella spp.</i> , <i>Actinomyces spp.</i> , <i>Porphyromonas spp.</i> , <i>Candida spp</i>
УПМ, отреагировавшая на аутопробиотическую терапию	<i>S. mutans</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Fusobacterium spp.</i> , <i>Prevotella spp.</i> , <i>Actinomyces spp.</i> , <i>Klebsiella spp.</i> , <i>Porphyromonas spp.</i> , <i>Candida spp.</i>	<i>Fusobacterium spp.</i> , <i>Prevotella spp.</i> , <i>Corynebacterium spp.</i> , <i>Klebsiella spp.</i> , <i>Porphyromonas spp.</i> , <i>Candida spp.</i>
УПМ, не отреагировавшая на аутопробиотическую терапию		<i>S. mutans</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Actinomyces spp.</i>

С использованием бактериологического метода у участников исследования была высеяна следующая микробиота: *Streptococcus spp.*, *S. aureus*, *Enterococcus spp.*(рис.5).



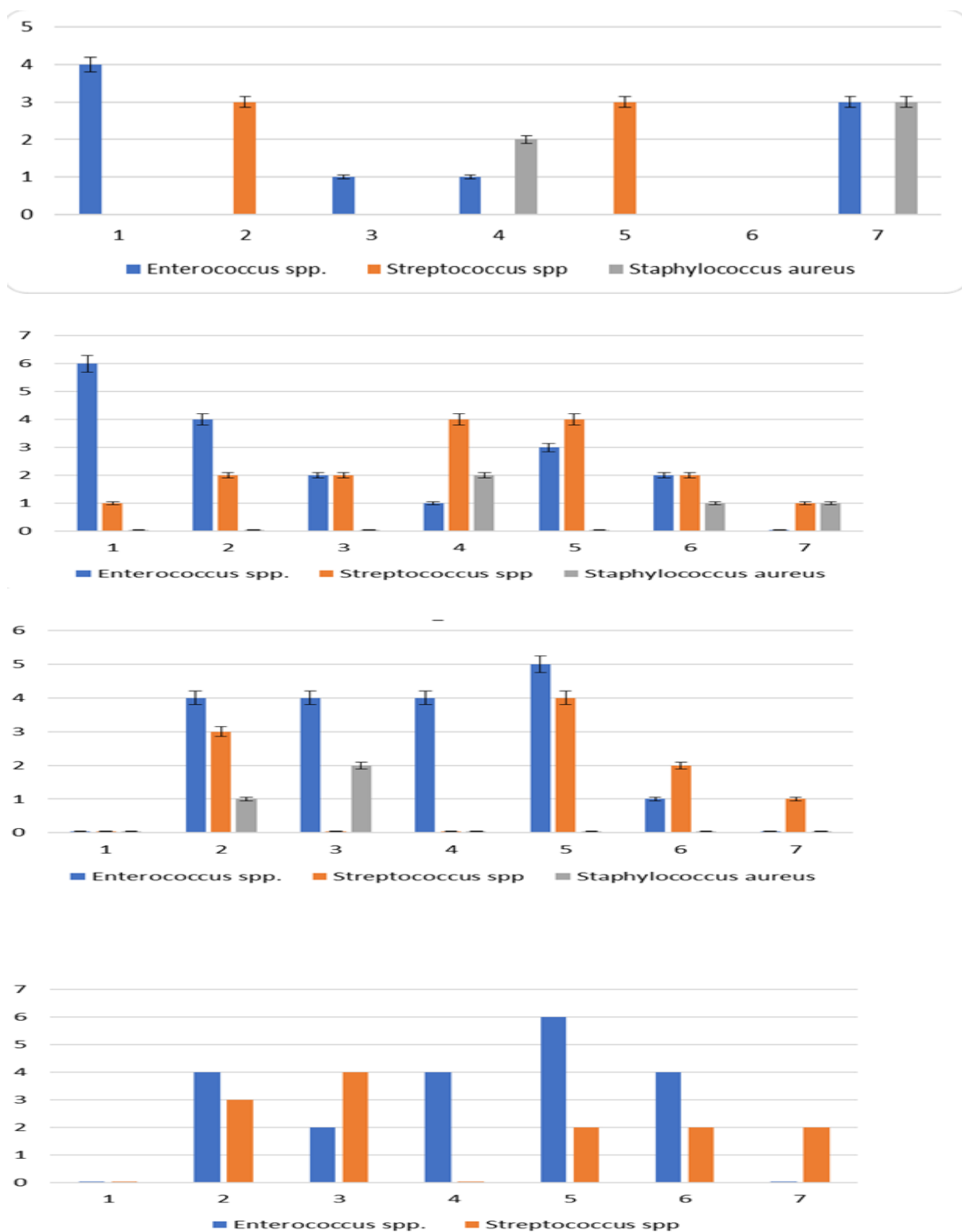


Рис. 5. Участники 1, 2, 3, 4, 5. Показатели слюны и мазков из зева бактериологическим методом. По горизонтальной оси – сроки отбора проб. По вертикальной оси – содержание *Enterococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *S. aureus*, 1g(КОЕ/мл). Сроки отбора проб: 1 – 60 сутки, 2 – 90 сутки, 3 – 120 сутки, 4 – 150 сутки, 5 – 180 сутки, 6 – 210 сутки, 7 – 240 сутки; $p < 0.05$.

К началу приема аутопробиотического препарата (150 сутки) наблюдался накопительный рост условно-патогенной микрофлоры. К 180-м суткам (окончание приема аутопрепарата) отмечалась полная элиминация *S. aureus* у всех участников эксперимента и повышение показателей протективной группы, представителями которой являются

Enterococcus spp. На 210-е сутки и 240-е сутки у всех участников эксперимента уровень микробной обсемененности *Streptococcus spp.*, *S. aureus*, *Enterococcus spp.* не превышал нормальных значений, что может говорить о пролонгированном действии аутопробиотического препарата.

Результаты иммуноферментного анализа в эксперименте «Sirius 2021–22»

Как видно на всех трех графиках (рис. 6), на 30-е сутки эксперимента, возрастает уровень провоспалительного цитокина IL-8 и содержания иммуноглобулина класса sIgA. При этом противовоспалительный цитокин IL-10 заметно снижается, что может согласовываться с ранее полученными данными о том, что активация пародонтопатогенными микробами моноцитов и макрофагов на уровне зубодесневого соединения увеличивает продукцию этими клетками провоспалительных цитокинов, вызывая дисбаланс между их провоспалительным и противовоспалительным пулами.

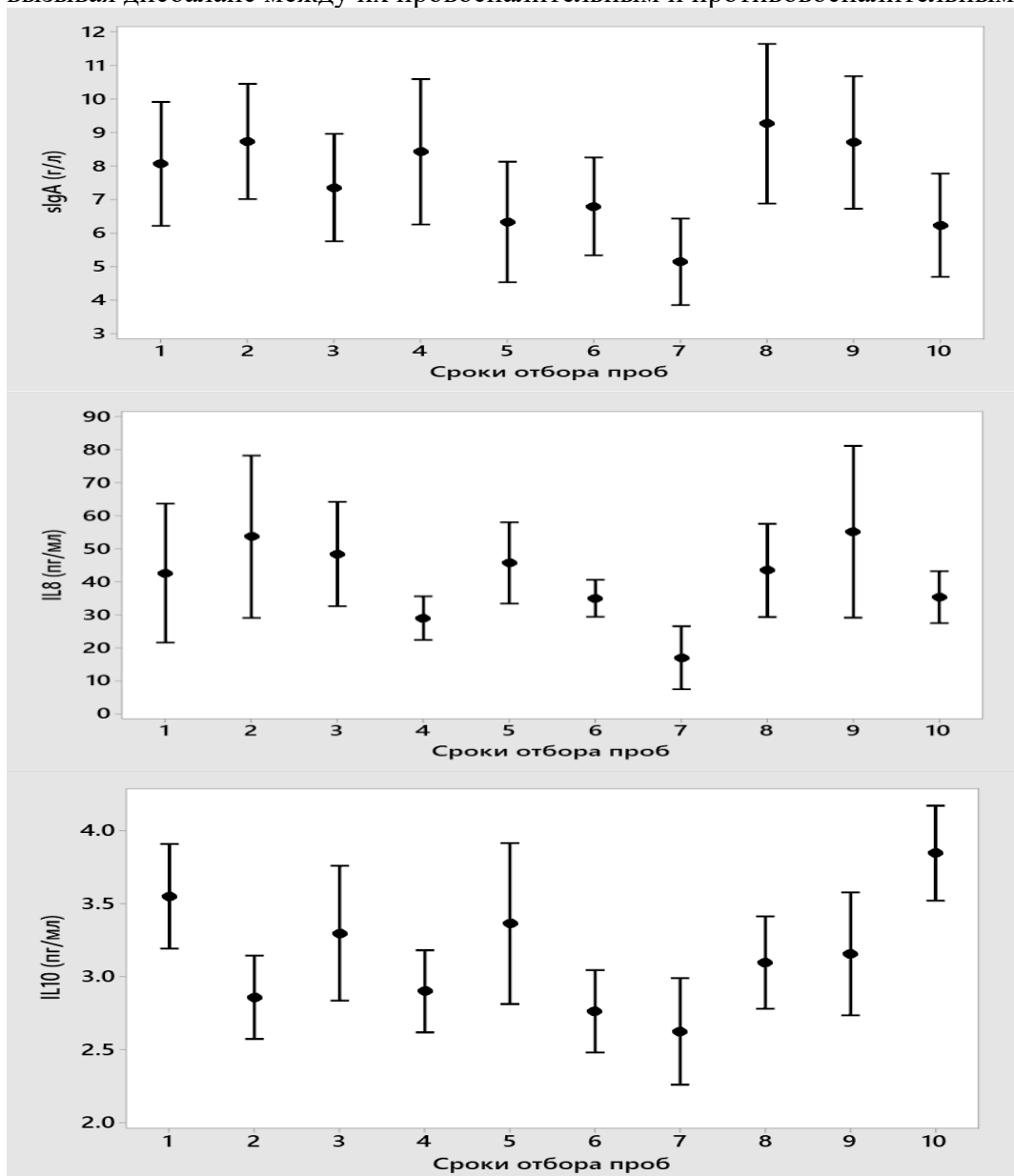
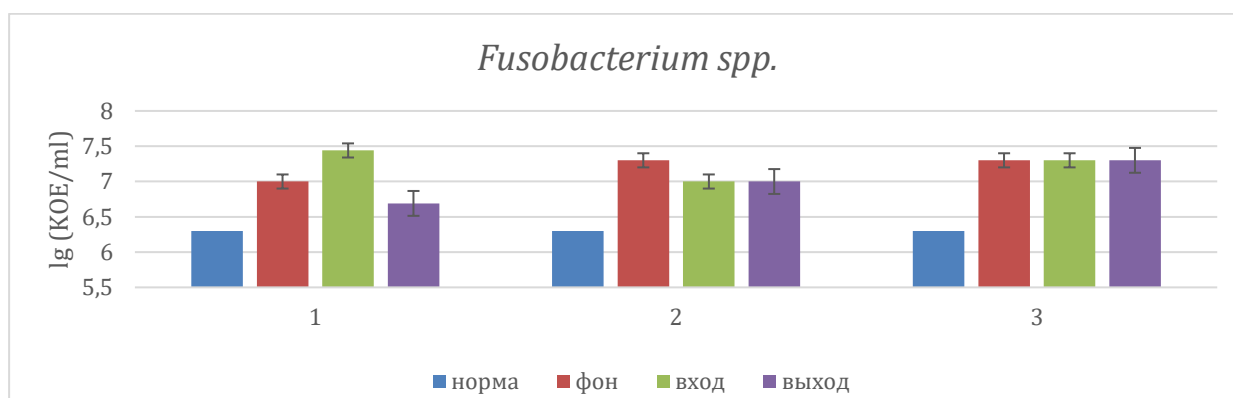
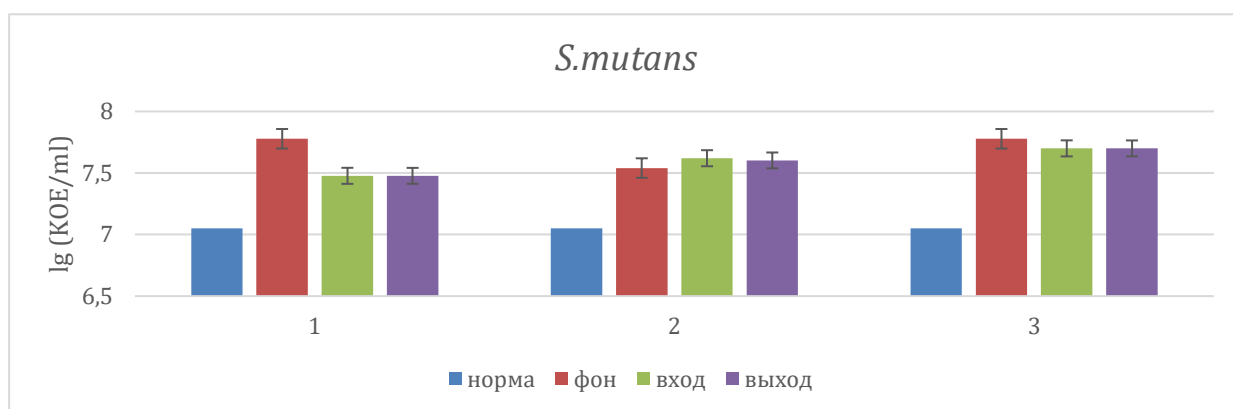


Рис. 6. Результаты анализа проб ротовой жидкости методом ИФА. По горизонтальной оси – сроки отбора проб. По вертикальной оси – уровень содержания sIgA [г/л] и уровень содержания IL8, IL10 [пг/мл]. Сроки отбора проб: 1. – 14 сутки, 2. – 30 сутки, 3. – 60 сутки, 4. – 90 сутки, 5. – 120 сутки, 6. – 150 сутки, 7. – 160 сутки, 8. – 180 сутки, 9. – 210 сутки, 10. – 240 сутки; $p < 0.05$.

Сравнение аутопробиотического слюварного стрептококка и официального препарата «дентоБЛИС» в условиях изменённой среды обитания в эксперименте «Гипобария»

Все участники были разделены на 3 группы, где 1 группа принимала аутопробиотический слюварный стрептококк, 2 группа – «дентоБЛИС», 3 группа – контрольная группа. В пробах методом масс-спектрометрии микробных маркеров были выделены следующие микроорганизмы: *S. mutans*, *S. aureus*, *Fusobacterium spp.*, *Candida spp.*, *Prevotella spp.*, *Lactobacillus spp.* (табл. 5). У участников всех трех групп изначально наблюдались высокие фоновые значения *S. mutans*, *S. aureus*, *Fusobacterium spp.*, *Prevotella spp.*

Ко второй неделе эксперимента у второй группы значения продолжали расти в отличие от первой и третьей групп. После начала приема аутопробиотического и пробиотического препаратов самые низкие значения *S. mutans*, *S. aureus*, *Fusobacterium spp.*, *Candida* из трех групп наблюдались у первой группы, принимающей аутопробиотический препарат *S. salivarius*. Самые высокие показатели концентрации условно-патогенной микрофлоры наблюдались у третьей (контрольной) группы. Значения в протективной группе (*Lactobacillus spp.*) изначально наблюдались выше значений нормы во всех трех группах. К концу эксперимента наблюдался рост *Lactobacillus spp.* у первой группы и снижение в третьей группе (рис.7а-7с).



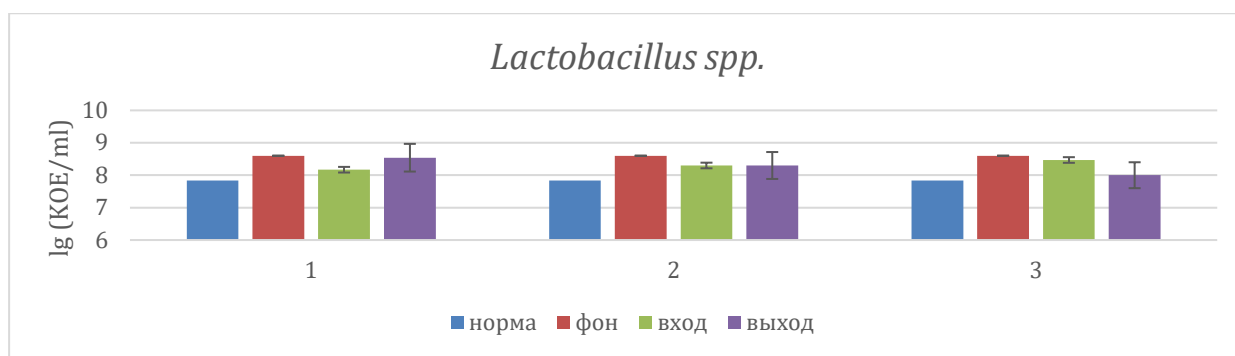


Рис. 7 (а-с). Количественные показатели микробиоты в мазках десневой жидкости, метод МСММ. По горизонтальной оси: 1 – группа, принимающая аутопробиотик; 2 – группа, принимающая «дентоБлис»; 3 – контрольная группа. По вертикальной оси (7а-7с) – уровень содержания *S. mutans*; *Fusobacterium spp.*; *Lactobacillus spp.*, lg (КОЕ/мл.); $p < 0.05$.

Заключение

Исследования показывают, что нахождение в гермозамкнутом помещении приводит к снижению слюноотделения и вымываемости из слюны десквамационного эпителия, лейкоцитов, остатков пищи и других компонентов осадка слюны. Это провоцирует рост зубных отложений и является резервуаром для роста бактериальной микрофлоры полости рта. Процессы, происходящие в пародонте, напрямую связаны с кровоснабжением организма. В ответ на снижение поступления кислорода и гипокинегию на примере участников эксперимента «Эскиз» наблюдались характерные явления в пародонте человека в виде снижения иммунной резистентности организма.

Методом доплерографии показано снижение реологических свойств крови во время нахождения в гермозамкнутом помещении как в области капиллярного русла, так и в области более крупных сосудов, омывающих бассейн челюстно-лицевой области. Проведенные эксперименты подтверждают, что нахождение участников в условиях измененной среды обитания приводит к накоплению и росту условно-патогенной микробиоты. В процессе исследований, выделены два кластера микробных ассоциаций: отреагировавшие на условия измененной среды обитания (*Streptococcus mutans*, *Actinomyces spp.*, *Porphyromonas spp.*, *Candida spp.*, *S. sangius* в слюне) и не отреагировавшие на данные изменения (*Streptococcus mutans*, *S. aureus*, *Actinomyces spp.* в зеве).

Проведенные исследования зафиксировали рост условно-патогенной микробиоты на 14 сутках экспериментов («Sirius 2021–22», «Эскиз», «Гипобария»), что можно отнести к одному из адаптационных скачков организма в ответ на стрессовые факторы внешней среды. Эти данные подтверждаются анализом интерлейкинов в экспериментах «Sirius 2021–22», «Эскиз», «Гипобария», где наблюдалось повышение провоспалительных цитокинов (IL-6, IL-8) на второй неделе пребывания в измененной среде обитания. Эти данные также соответствуют ранее проведенным экспериментам («Пародонт–2»). Организм, выделяя и повышая противовоспалительные интерлейкины, тем самым подавляет воспаление и выравнивает иммунную составляющую в сторону нормы. Практически у всех участников на протяжении экспериментов фиксировались высокие показатели условно-патогенной микробиоты не только на 2 неделе эксперимента, но и на выходе из него, у некоторых участников ее рост продолжался даже через 7 суток по окончании эксперимента («Эскиз», «Гипобария»).

Ранее пробиотические препараты изготавливались из кала пациента, где выделялся нужный штамм, который затем многократно культивировался, затем подвергался проверке на его безопасность. В нашей методике использовалась слюна реципиента для

выращивания аутопробиотика. Это не вызывает отторжения у испытуемого с одной стороны и является полностью индивидуальным средством. Реципиент может начать принимать заранее, чтобы усилить иммунный ответ организма, будучи еще не в условиях измененной среды обитания. Также испытуемый может начать терапию во время неблагоприятных условий, как моделировалось в эксперименте «Sirius 2021–22», где участники в течение двух недель принимали заранее приготовленный лиофилизат. И в том, и в другом случае аутопробиотическое средство не дает побочных эффектов и значительно снижает рост условно-патогенной микробиоты.

Для идентификации выбраны как основные два метода: метод масс-спектрометрии микробных маркеров и бактериологический метод. Метод масс-спектрометрии был более удобен в применении, так как не требовал транспортной среды, образцы могли храниться в любых температурных условиях и неограниченное количество времени. Это было немаловажным обстоятельством при проведении экспериментов, особенно в высокогорье, где не было возможности быстрой транспортировки образцов в лабораторию и дополнительных условий для их хранения.

При оценке микробного статуса у спонтанной популяционной выборки при сравнении двух методов (метод масс-спектрометрии микробных маркеров и ПЦР), первый метод показал достоверные результаты в идентификации условно-патогенной микробиоты. Метод масс-спектрометрии в условиях измененной среды обитания отвечал заявленным требованиям и удовлетворял всем потребностям эксперимента, не уступая остальным методам в качественной идентификации.

Применяя в качестве профилактического средства аутопробиотический *S. salivarius* и сравнивая его с официальным препаратом «ДентоБлис», в экспериментах наблюдалось следующее:

1. Снижение уровня следующей условно-патогенной микробиоты у испытуемых, принимавших оба препарата: *S. mutans*, *Fusobacterium spp.*, *S. aureus*, *Candida spp.*, *Actinomyces spp.*, *P. anaerobius*, *Corynebacterium spp.* В отличие от официального препарата (дентоБлис), аутопробиотический штамм *S. salivarius* показал оптимальный результат после окончания его приема, при этом уровень воспаления снизился на 50 % по сравнению с фоновыми значениями.
2. Показано пролонгированное действие аутопробиотического средства *S. salivarius* по сравнению с официальным препаратом (эксперимент «Sirius 2021–22»).

Предложена новая методика с использованием слюны испытуемого для выращивания аутопробиотика, что не вызывает отторжения и является полностью индивидуальным средством, которое можно начать принимать заранее. Его прием можно начать непосредственно во время неблагоприятных условий, что было показано в эксперименте «Sirius 2021–22», где участники в течение двух недель принимали заранее приготовленный лиофилизат. Аутопробиотик на основе саливарного стрептококка (*S. salivarius*) не давал побочных эффектов и значительно снизил рост условно-патогенной микробиоты по сравнению с официальным препаратом.

Выводы

1. Среди участников экспериментов наблюдалось нарушение трех барьеров колонизационной резистентности организма, связанной с накоплением условно-патогенной микробиоты. Она в свою очередь разделялась на два кластера: первый кластер, отвечал ростом на условия измененной среды обитания (*Fusobacterium spp.*, *A. comitans*, *Corynebacterium spp.*, *Klebsiella spp.*, *Streptococcus spp.*), второй – либо не проявлял роста, либо проявлялся единичными «всплесками» в течение всего эксперимента (*P. anaerobius*, *A. viscosus*).

2. Методом масс-спектрометрии микробных маркеров подтвердился рост и накопление условно-патогенной микробиоты у участников экспериментов, находящихся в условиях измененной среды обитания.
3. Результаты исследований показали состоятельность метода масс-спектрометрии микробных маркеров в сравнении с бактериологическим и ПЦР методами для анализа условно-патогенной микробиоты полости рта и подтвердили возможность применения данного метода в условиях измененной среды обитания и имитации космического полета (эксперименты «Эскиз», «Immersion-7», «Sirius 2021–22», «Гипобария»).
4. Проведенные исследования подтвердили гипотезу о благотворном влиянии аутопробиотика на слизистые оболочки рта и пародонта. Показано, что аутопробиотик на основе слюварного стрептококка (*Streptococcus salivarius*) является более эффективным средством коррекции микробиоценоза у лиц в искусственной среде обитания, нежели аллогенные аналоги (эксперимент «Sirius 2021–22», «Гипобария»).
5. Наблюдалось пролонгированное действие аутопробиотического слюварного стрептококка по сравнению с официальным препаратом «ДентоБЛИС» (эксперимент «Sirius 2021–22», «Гипобария»).

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. **Шеблаева А. С.**, Ильин В. К., Соловьёва З. О., Рыкова М. П., Скедина М. А., Ковалева А. А., Носовский А. М., Царев В. Н., Подпорин М. С., Быстрова О. В., Гизингер О. А., Ловцевич С. М., Комиссарова Д. В. Взаимосвязь изменения орального микробиоценоза и мукозального иммунитета в условиях 14-суточной изоляции человека в гермообъекте с искусственной средой обитания // Вестник Российской Академии Медицинских Наук. – 2022. – Т. 77. – №5. – С. 346-355.
2. **Шеблаева А. С.**, Соловьёва З. О., Рукавишников И. В., Носовский А. М., Царёв В. Н., Подпорин М. С., Быстрова О. В., Ловцевич С. М., Ильин В. К. Сравнение бактериологического метода и метода масс-спектрометрии микробных маркеров для количественной оценки пародонтопатогенной микробиоты у испытуемых, находящихся в условиях «сухой» иммерсии // Авиакосмическая и экологическая медицина. – 2023. – Т. 57. – № 1. – С.29-33
3. **Шеблаева А. С.**, Ильин В. К., Соловьёва З. О., Носовский А. М., Рыкова М. П., Шеблаев М.В., Ловцевич С. М., Краева Л.А., Гизингер О.А. Исследование влияния профилактического приема аутопробиотика на основе *Streptococcus salivarius* на состояние микробиоты полости рта у участников изоляционного эксперимента «SIRIUS-2021» //Авиакосмическая и экологическая медицина. –2024. –Т.58. – №.1 – С. 94-97.

Основные сокращения, использованные в работе:

МСММ – масс-спектрометрия микробных маркеров

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ИФА – иммуно ферментный анализ

sIgA – секреторный иммуноглобулин А