

На правах рукописи

Усанова Нонна Альбертовна

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ
АУТОПРОБИОТИКОВ В КАЧЕСТВЕ СРЕДСТВ КОРРЕКЦИИ
МИКРОФЛОРЫ ЧЕЛОВЕКА В УСЛОВИЯХ ГЕРМОИЗОЛЯЦИИ И СУХОЙ
ИММЕРСИИ**

3.3.7 – авиационная, космическая и морская медицина

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

МОСКВА 2025

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

Научный руководитель: Ильин Вячеслав Константинович, доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент Российской академии наук.

Официальные оппоненты: Соловьева Ирина Владленовна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник – заведующий лабораторией «Микробиома человека и средство его коррекции», Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора.

Миронов Андрей Юрьевич, доктор медицинских наук, профессор Руководитель отдела микробиологии Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Московского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии им.Г.Н.Габричевского» Роспотребнадзора

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Оренбургский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук.

Защита диссертации состоится «___» _____ 2025 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, д.76А.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке в Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации – Института медико-биологических проблем Российской академии наук ГНЦ РФ – ИМБП РАН и на сайте: <http://www.imbp.ru/WebPages/win1251/ScienceN/DisserSov/Usanova2025/Usanova.html>

Автореферат разослан «___» _____ 2025 г

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Светлана Викторовна Поддубко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

В связи с развитием космонавтики, разработкой программ по длительным космическим полетам, включая межпланетные, созданием лунных баз для длительного пребывания в них экипажей, необходимо создание средств и методов оперативного контроля микробного ценоза человека в этих условиях и профилактики микробиологических рисков. Для того чтобы обосновать применение средств и методов коррекции микробиоценоза необходимо проведение экспериментов по их использованию в исследованиях, имитирующих воздействие ряда факторов космического полета: эксперименты с изоляцией и эксперименты «сухая иммерсия».

В условиях изоляции, особенно в период острой адаптации, увеличивается риск развития ауто- и перекрестных инфекций из-за усиленного микробного обмена, в процессе которого увеличивается массив условно-патогенной микрофлоры на фоне угнетения протективной микрофлоры. В последующие периоды возрастает реципиентная способность экипажей, их зависимость от внесения экзогенной микрофлоры в гермообъект. Поэтому профилактика микробиологических рисков длительной изоляции экипажей за счет укрепления естественного барьера колонизации с использованием пробиотических средств является очень актуальной.

В условиях иммерсии имитируется воздействие микрогравитации на организм, приводящее к перераспределению биологических жидкостей, и, как следствие, к транслокации микроорганизмов из исходных биотопов в другие, в том числе несвойственные тому или иному биотопу, что приводит к дисбиотическим сдвигам, также нуждающимся в коррекции за счет пробиотических средств.

Цели и задачи

Целью работы является: Экспериментальное обоснование использования аутопробиотиков в качестве средств коррекции микрофлоры человека в условиях гермоизоляции и сухой иммерсии.

Задачи:

1. Осуществить анализ архивных данных микробиологических исследований микрофлоры профессиональных испытателей и волонтеров в гермокамерных экспериментах различной длительности, проводимых в период с 1980 по 1990 годы в Институте медико-биологических проблем.
2. Разработать эффективный критерий оценки динамики изменений количественного и качественного состава микрофлоры организма под влиянием факторов измененной среды обитания и использования препаратов.
3. Исследовать эффективность воздействия аутопробиотиков на количественный и качественный состав микрофлоры животных, а также человека в экспериментах с длительной изоляцией и сухой иммерсией

Научная новизна

Впервые продемонстрировано стабилизирующее воздействие аутопробиотиков на количественные и качественные характеристики кишечной микрофлоры, микрофлоры верхних дыхательных путей и покровных тканей в экспериментах с участием человека, моделирующих воздействие таких

факторов космического полета, как длительная изоляция в гермообъекте и невесомость (эксперимент «сухая иммерсия»), а также животных в экспериментах симулирующих воздействие радиации во время космического полета. Проведены сравнительные исследования микрофлоры кишечника у человека в период длительной изоляции без приема профилактических средств, с приёмом профилактических средств на основе пробиотиков, выполненных на основе коллекционных культур и аутопробиотиков.

Научно-практическая значимость работы

Разработан эубиотический индекс для оценки динамики изменений количественного и качественного состава микрофлоры организма под влиянием факторов измененной среды обитания и использования препаратов. Обоснован курс приема аутопробиотических средств с целью оптимизации количественного и качественного состава микрофлоры операторов гермопомещений в период острой адаптации с целью профилактики развития синдрома нарушения колонизационной резистентности.

Положения, выносимые на защиту

1. Эубиотический индекс является информативным критерием оценки динамики изменений количественного и качественного состава микрофлоры организма под влиянием факторов измененной среды обитания, и использования препаратов, в т.ч. аутопробиотиков.
2. Аутопробиотики на основе микроорганизмов *Enterococcus faecium*, семейство *Lactobacillales*, *Bifidobacterium spp.* осуществляют эффективную оптимизацию качественного и количественного состава микрофлоры кишечника в составе аутопробиотических препаратов у человека в искусственной среде обитания (изоляция, имитируемая невесомость).

Личный вклад соискателя ученой степени

Соискателем собрана и проанализирована научная литература по теме диссертации, лично получены экспериментальные данные, составляющие основу диссертационной работы, осуществлена их систематизация, анализ, обобщение и статистическая обработка, подготовлены публикации. Соавторами публикаций являются сотрудники лаборатории «Микробной экологии человека» ГНЦ РФ Института медико-биологических проблем РАН.

Степень достоверности и апробация результатов

Результаты проведенных исследований были представлены в форме устных и стендовых докладов на следующих научных конференциях: XVII Конференция по космической биологии и аэрокосмической медицине с международным участием, посвященная 100-летию со дня рождения академика О.Г.Газенко 2018 г.; 53-и Научные чтения памяти К.Э.Циолковского 2018 г.; симпозиум «Человек в космосе» (IAA Humans in Space Symposium) 2019 г.; XLVI Общественно-научные чтения, посвященные памяти Ю.А.Гагарина 2019 г.; 55-ые Научные чтения памяти К.Э.Циолковского 2020 г.; XLVIII Общественно-научные чтения, посвященные памяти Ю.А.Гагарина 2021 г.; 56-е Научные чтения, посвященные памяти К.Э.Циолковского 2021 г.; XXIII Международный симпозиум «Человек в космосе» (Human in Space Symposium)

2021 г.; V Международная научная конференция "Микробиота человека и животных", Россия, Санкт-Петербург, 11-13 октября 2023; XVIII конференция по космической биологии и авиакосмической медицине с международным участием «Земля - Орбита – Дальний космос», 7-8 ноября 2023 года.

В результаты работы опубликованы в 7 научных журналах индексируемые в базах данных Web of Science и/или Scopus, 2 статьи входящие в Перечень рецензируемых научных изданий ВАК, 13 тезисов в сборниках докладов научных конференций

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 161 страницах машинописного текста, состоит из введения, 3 основные главы, заключения, выводов, список списка литературы. Работа содержит 5 формул, 29 таблиц и 57 рисунков. Список цитируемой литературы включает 153 источников, 80 из них на русском языке и 73 на иностранном языке.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характеристика экспериментов

Исследования осуществлялись в наземных экспериментах в герметизированном объекте и в условиях сухой иммерсии с участием человека, а также в экспериментах с обезьянами (макака резус).

Эксперимент «Гамма-Бриз»

Цель эксперимента – оценка состояния животных (макак резус) при их экспозиции в условиях повышенного радиационного фона. В исследованиях принимали участие 26 животных, которые использовали кисломолочные продукты, обогащенные культурами аутологичных лактобацилл в концентрации до 10^8 КОЕ на мл и аутологичных бифидобактерий в концентрации до 10^9 КОЕ на мл.

Эксперименты «Марс 105» и «Марс 500»

Цель экспериментов - сбор информации о состоянии здоровья и работоспособности экипажа в условиях, приближенных к марсианскому полету: длительное нахождение в замкнутом пространстве (105 и 520 суток), автономность. Отработка технологий медицинского обеспечения космонавтов для межпланетных полетов и оценка возможностей современных технологий.

В эксперименте «Марс – 105» принимали участие 6 человек. В первые 30 дней, в том числе в период острой адаптации, члены экипажа принимали аутопробиотики на основе *Enterococcus faecium*, выделенных от каждого члена экипажа, нанесённые на угольные таблетки, насыщенные культурами *Enterococcus faecium*, в количестве 10^8 КОЕ в каждой таблетке.

В эксперименте «Марс-500» принимали участие 6 человек. В первые 30 дней, в том числе в период острой адаптации, члены экипажа принимали аутопробиотики на основе культур *Enterococcus faecium*, выделенных от каждого члена экипажа, нанесённые на угольные таблетки, в концентрации 10^8 КОЕ в каждой таблетке. В дальнейшем члены экипажа принимали пробиотики (коммерческие штаммы) через каждые 2 месяца.

Эксперимент «Сухая иммерсия» предусматривал исследования состояния человеческого организма в условиях имитированной невесомости. При этом воспроизводятся такие факторы космического полета, как опорная и весовая аксиальная разгрузка, перераспределение жидких сред организма, гиподинамия. Модель позволяет проводить исследования эффективности различных средств и методов профилактики негативных влияний гравитационной нагрузки.

В эксперименте «Сухая иммерсия» принимали участие добровольцы от 6 до 12 человек, добровольцы принимали кефир, обогащённый культурами семейства *Lactobacillales* (аутопробиотик) в количестве 10^9 КОЕ/мл выделенных от каждого человека (испытателя).

Методы микробиологических исследований

Исследование микрофлоры кишечника проводили согласно методике Гугуцидзе Е.Г., Зубков М.Н., Шендеров Б.А. кал (исследование на дисбактериоз) «Клиническая лаборатория аналитика» под ред. В.В. Меньшикова 2003 г. Исследования микрофлоры покровных тканей и слизистой проводили согласно приказу Минздрава СССР от 22 апреля 1985 г. № 535 «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений»

Изоляция и идентификация аутологичных культур и приготовление аутопробиотиков

В процессе исследования были использованы классические микробиологические, молекулярно-генетические методы и их модификации: биохимические тесты, ПЦР - полимеразная цепная реакция, MALDI-TOF – метод времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией.

Посев материала для выделения аутологичных культур.

Выделение лактобацилл. Отбор материала производился следующим образом: 1 г нативного кала разводили в 9 мл физиологического раствора - получали исходное разведение. Суспензию фекалий в разведении 1:10 высевали 100 мкл на селективную среду для лактобацилл (МРС - 4). Культивировали в течение 48-72 часов при температуре 37°C в анаэробных условиях. Затем производили выделение чистых культур от колоний лактобацилл. Эти колонии пересевали на новую чашку со средой МРС и культивировали в течение 48-72 часов при температуре 37°C в анаэробных условиях.

Выделение энтерококков. Суспензию фекалий в разведении 1:10 высевали 100 мкл на селективную среду для энтерококков производства Института прикладной микробиологии, г. Оболенск. Посевы инкубировали в течение 24-48 часов при температуре 37°C. На среде вырастали энтерококки. Проводили идентификацию энтерококков до вида.

Выделение бифидобактерий. Суспензию фекалий в разведении 1:10 в Бифидо среде, переносили по 1 мл суспензии в новую пробирку с 9 мл среды.

Культивировали в течение 48-72 часов при температуре 37°C. Затем производили отбор характерных колоний бифидобактерий. Отдельные колонии пересекали на новую чашку с бифидоагаром и культивировали в течение 48 часов 37°C в строго анаэробных условиях.

Идентификация чистой культуры аутопробиотика производили отбор чистых культур микроорганизмов. Идентификацию чистой культуры осуществляли на основании культурально-морфологических свойств.

Идентификация чистой культуры *Enterococcus faecium* на среде Энтеро отбирались типичные по морфологии колонии *E. faecium* сиренево-розового цвета со светло-розовым ободком и отсеивались их на новую чашку Петри с плотной средой Энтеро с целью накопления чистой культуры. Культивировали в течение 24 часов при температуре 37°C. Препараты из чистых культур микроскопировали при окрашивании по Грамму. *E. faecium* при окрашивании по Грамму приобретали темно-синий цвет, форма округлая и располагались в виде коротких цепочек. Чистые культуры направлялись на генетический анализ.

Идентификация чистой культуры семейства *Lactobacillales* на среде МРС-4 отбирались типичные по морфологии колонии лактобацилл и отсеивались на новую чашку Петри со средой МРС-4 с целью накопления чистой культуры. Культивировались в течение 48 часов при 37°C в анаэробных или микроаэрофильных условиях. Препараты из чистых культур микроскопировались при окрашивании по Грамму. Клетки лактобацилл при окрашивании имели темно-синий цвет, имели форму палочек и располагались в виде цепочек или отдельных клеток. Чистые культуры направлялись на генетический анализ.

Идентификация чистой культуры *Bifidobacterium spp.* На Бифидо среде отбирались типичные по морфологии колонии бифидобактерий и отсеивались их на новую чашку Петри со средой бифидоагар с целью накопления чистой культуры. Культивировались в течении 48 часов при 37°C в строго анаэробных условиях. Препараты из чистых культур микроскопировались при окрашивании по Грамму. Клетки бифидобактерий при окрашивании имели темно-синий цвет, имели форму слегка изогнутых палочек и располагались в виде отдельных клеток. Чистые культуры направлялись на генетический анализ.

Изготовление аутопробиотика. Методика изготовления аутопробиотического препарата включала в себя отбор проб фекалий у практически здоровых лиц в период их клинически здорового состояния за 30 дней до предполагаемого применения. Из проб выделялись и идентифицировались аутоштаммы лактобактерий и бифидобактерий. Биомасса выделенных микроорганизмов наращивались на селективных питательных средах: MRS для культивирования лактобактерий и Бифидо среда для бифидобактерий в анаэробных условиях до титра не менее 10^9 КОЕ/мл. Нарботанная биомасса подвергалась лиофилизации, т.е. высушиванию в замороженном состоянии под вакуумом в пенициллиновых флаконах. Содержание клеток аутологичных лактобацилл в одном флаконе было не менее 10^8 КОЕ/мл и бифидобактерий в одном флаконе было не менее 10^9 КОЕ/мл.

Идентификация микроорганизмов проводилась с использованием коммерческих микротест-систем различных производителей, таких как BioMerieux – Франция, Lachema – Чехия.

Статистическая обработка

Математическая обработка полученных данных проводилась при помощи программного обеспечения Microsoft Excel 2010. Анализ результатов, полученных в исследованиях, показал нормальное распределение величин определяемых показателей, что позволило применить при их обработке общепринятые методы вариационной статистики с использованием t-критерия Стьюдента. Различия считались статистически значимыми при вероятности не менее 95 % ($p < 0,05$).

Результаты эксперимента были обработаны с использованием пакета прикладных программ «Statistica v.10.0 for Microsoft Windows». Данные исследования представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха (Q25–Q75). Достоверность полученных результатов оценивали при помощи непараметрического критерия Вилкоксона.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Эубиотический индекс

Для оптимизации оценки эффективности пробиотического средства нами был разработан «эубиотический индекс». Его отличие от других аналогов заключается в отношении общего количества положительных изменений в составе микрофлоры обследуемых лиц в динамике к отрицательным изменениям. Это позволяет быстро и достоверно оценить эффективность применяемых пробиотических препаратов.

К положительным свойствам препаратов, способных обеспечить позитивные сдвиги в составе микрофлоры отнесены: количественный рост микроорганизмов - представителей видов, относящихся к протективным группам; стабилизация количества микроорганизмов - представителей видов, относящихся к протективным группам на определенных приемлемых величинах; снижение количества микроорганизмов - представителей видов, относящихся к условно-патогенным группам; стабилизация количества микроорганизмов - представителей видов, относящихся к условно-патогенным группам на определенных приемлемых величинах.

К отрицательным показателям препаратов отнесены: количественный рост микроорганизмов - представителей видов, относящихся к условно-патогенным группам; стабилизация количества микроорганизмов - представителей видов, относящихся к условно-патогенным группам на высоких количественных уровнях; снижение количества микроорганизмов - представителей видов, относящихся к протективным группам; стабилизация количества микроорганизмов - представителей видов, относящихся к протективным группам, на низких количественных уровнях.

При анализе изменений анализируются как данные, полученные непосредственно после приема препарата, так и отсроченные данные. Индекс выражается в виде отношения количества положительных изменений на количество отрицательных.

Положительный эффект от приема препарата квалифицируется как высокий показатель эубиотического индекса (больше единицы). При отрицательном эффекте - индекс меньше единицы.

Исследования микрофлоры профессиональных испытателей и волонтеров в гермокамерных экспериментах продолжительностью до 20 суток

Целью данного исследования являлся анализ архивных данных микробиологических исследований микрофлоры испытателей в гермокамерных экспериментах продолжительностью от 8 до 20 суток, проводимых в период с 1980 по 1990 годы в Институте медико-биологических проблем, для изучения влияния периода острой адаптации на микрофлору испытателей.

Задачи исследования:

1. Оценить состояние микрофлоры верхних дыхательных путей и кишечника в период изоляции;
2. Определить сроки наиболее выраженных изменений;
3. Оценить степень выраженности изменений микробиоценоза в период изоляции у испытателей.

При анализе результатов учитывался опыт участия испытателей в экспериментах. Это позволило вычленить группу «профессионалов» или постоянных испытателей (обозначены на диаграммах как «Постоянные») и волонтеров (обозначены на диаграммах как «Новые участники»). Исследовались данные микробиоценоза верхних дыхательных путей (нос, глотка) и кишечника. Результаты представлены на рисунках 1-3.

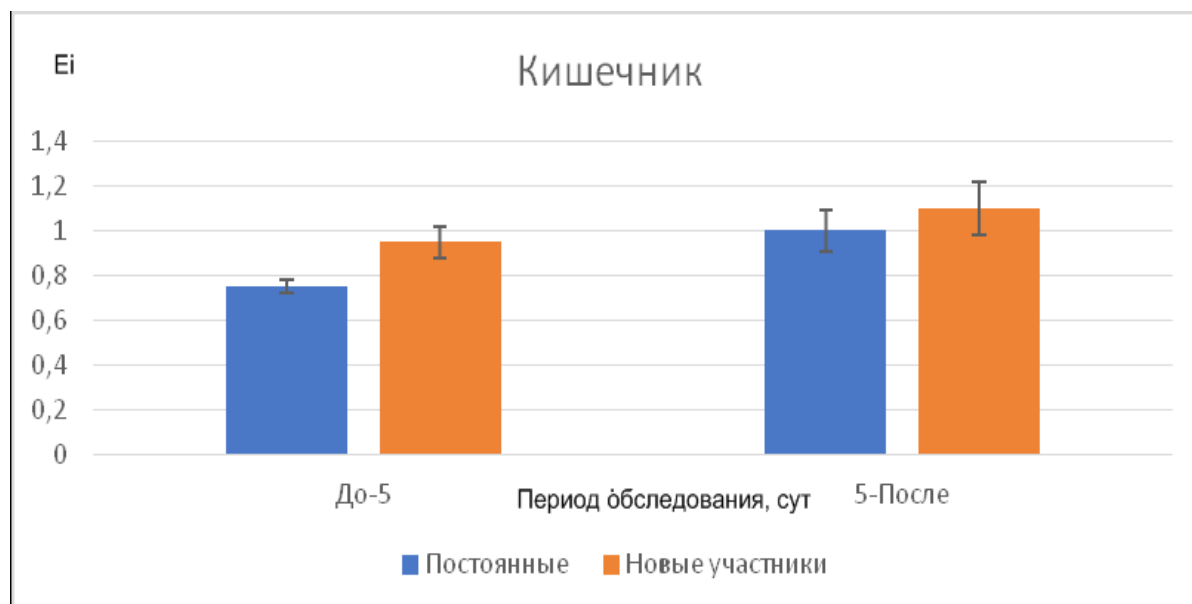


Рисунок 1. Эубиотический индекс (E_i) испытателей в 8-ми суточном изоляционном эксперименте, (микрофлора кишечника)

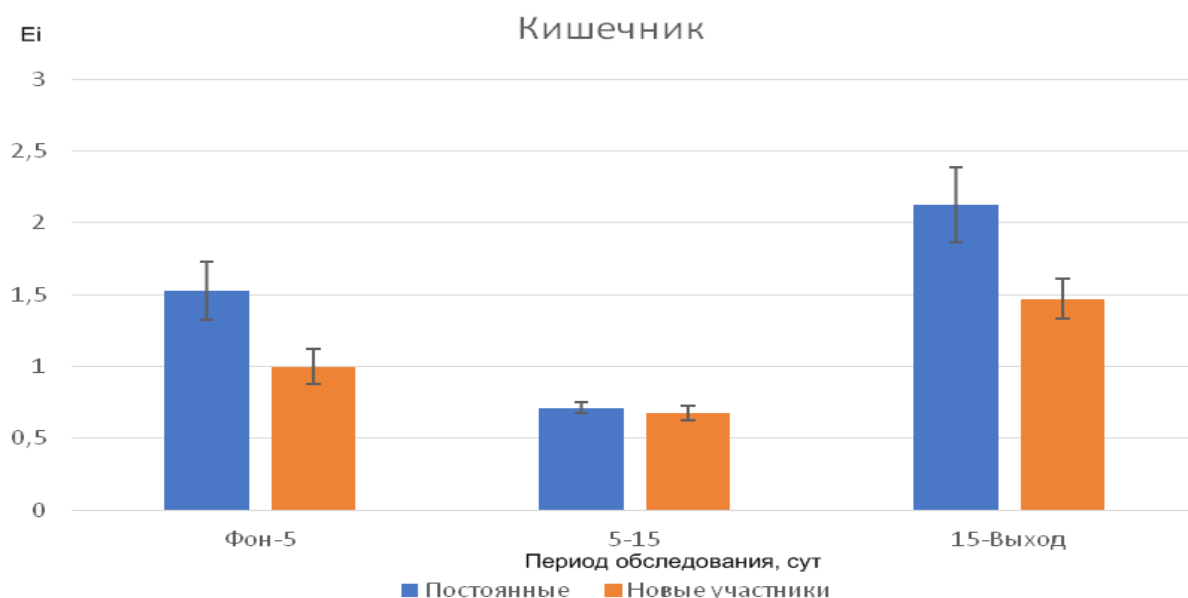


Рисунок 2. Эубиотический индекс (E_i) микрофлоры кишечника у испытуемых 20-ти суточного изоляционного эксперимента

Полученные результаты свидетельствуют о том, что в обеих группах наблюдается ухудшение состояния микробиоты к концу периода острой адаптации, более выраженное у новых участников экспериментов с последующей стабилизацией состояния. Поэтому, стабилизацию микробиоценоза в этом случае, возможно, провести благодаря приёму пробиотических и аутопробиотических препаратов с первых дней пребывания в гермообъекте. Эксперименты с короткой изоляцией повторялись несколько раз. Таким образом, был получен достаточный объем данных для статистической обработки результатов и построения математической модели изменения баланса кишечной микрофлоры человека в изоляционном эксперименте.

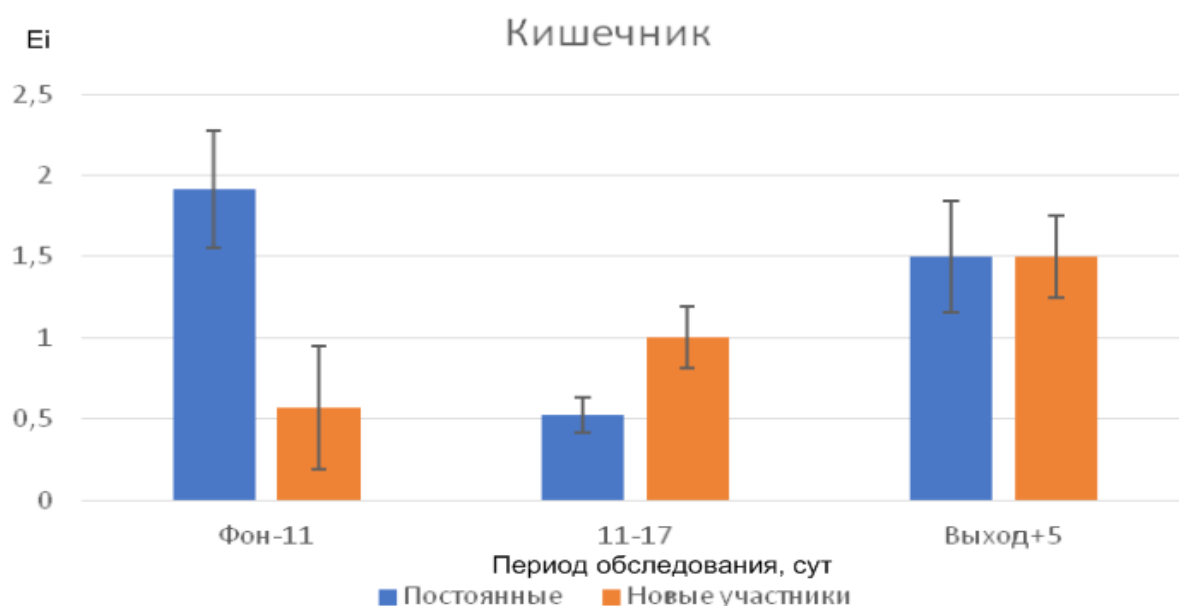


Рисунок 3. Эубиотический индекс (E_i) микрофлоры кишечника у испытуемых 17-ти суточного изоляционного эксперимента

Таким образом, в период гермоизоляции состояние микробиоценоза кишечника претерпевает неблагоприятные изменения. Эти изменения наиболее выражены в период острой адаптации и по окончании эксперимента. Неблагоприятные изменения микробиоценоза менее выражены у профессиональных испытуемых по сравнению с волонтерами.

Экспериментальное обоснование использования аутопробиотических средств для стабилизации микробиоценоза организма.

Сравнительное исследование эффективности аутопробиотического препарата в кисломолочном продукте лечебно-профилактического действия.

Материалы и методы

В исследовании принимали участие 26 животных макак резус из вивария ГНЦ РФ ИМБП РАН.

В эксперименте использовались следующие препараты:

1. Кисломолочные продукты на основе аутологичных штаммов лактобацилл (группа «Аутоштаммы»)
2. Кисломолочный продукт на основе штамма *Lactobacillus acidophilus* (группа «Кефир»)

В эксперименте использовали 26 обезьян вида макак резус. 13 обезьян из их числа массой до 8-ми кг были высажены в приматологические кресла и в течение 6-ти дней выявляли животных, которые охотно потребляют кефир. С этой целью использовали специальные поилки. Точно также тестировали обезьян, находившихся в клетках. На основе этих наблюдений было отобрано 10 обезьян стабильно потребляющие кефир.

Поскольку точное дозирование препаратов с использованием поилок вызывало значительные трудности (обезьяны могли и отвлекаться, и просто отказываться от потребления препарата, вырывать поилку друг у друга или выдергивать пробку) было решено добавлять необходимое количество препарата в рацион каш по 50 мл 2 раза в день с промежутком 3,5-4 часа. Все обезьяны были высажены в индивидуальные клетки по группам. Таким образом, образовалось 2 экспериментальные группы, по 5 обезьян и группа контроля из 6-ти животных. Курс приема данных препаратов составил 14 дней. Отбор проб фекалий для микробиологических исследований осуществлялся перед курсом приема препарата, на 14 сутки (по окончании курса), а также на 28 сутки после приема препарата. Кроме того, осуществляли клиническое обследование животных. Все животные, участвующие в эксперименте, адаптированы к условиям средней широты и содержания в индивидуальных клетках в помещениях вивария. Рацион питания состоял из натуральных продуктов в соответствии с рекомендациями приматологических руководств.

Микрофлора кишечника оценивалась по наличию следующих видов: *Bifidobacterium spp.*, семейство *Lactobacillales*, *Enterococcus spp.*, *Escherichia coli*, порядок *Enterobacteriales*. *Staphylococcus spp.*, *S. aureus*, *Clostridium spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus spp.*, *Candida spp.* Оценивалось количество микроорганизмов у животных всех групп в динамике, после употребления кефира с добавлением аутопробиотического препарата и других препаратов. На основе полученных данных определялось: повысилось или понизилось количество данного микроорганизма у испытуемых обеих групп. Для оценки эффективности динамики изменений количественных и качественных

характеристик микрофлоры нами был использован эубиотический индекс. Результаты представлены в таблицах 1 и 2.

Таблица 1. Сравнительная оценка частоты диагностики дисбиозов при приеме аутопробиотика на основе лактобацилл и других пробиотических препаратов (% случаев дисбактериоза)

Категории	Фон	После 2-недельного курса	Месяц спустя после курса
Кисломолочный продукт на основе аутопробиотиков	100	8	58
Кисломолочный продукт лечебно-профилактического назначения	100	20	85

Из данных представленных в таблице 2 следует, что безусловное преимущество в части коррекции дисбиоза принадлежит аутопробиотикам. Аутопробиотики быстро и эффективно восстанавливают оптимальный микробиоценоз кишечника. Следующими по значимости явились кисломолочный продукт лечебно-профилактического назначения (кефир)

Таблица 2. Результаты микробиологических обследований обезьян (эубиотический индекс)

категории	контроль			аутоштаммы			кефир		
Кол-во особей	6			5			5		
Сроки (сутки)	фон	14	30	фон	14	30	фон	14	30
Эубиотический индекс		0,9	0,8		4	1,5		2,3	0,5

Исследование эффективности аутопробиотических средств в эксперименте с длительной изоляцией

Применение пробиотиков на основе аутоштаммов для коррекции микробиоценоза кишечника испытуемых в условиях 105 и 520- суточного эксперимента по длительной изоляции «Марс-105» и «Марс-500». Как уже указывалось выше, длительная изоляция ведет к развитию дисбиозов, вызванных увеличением доли условно-патогенных микроорганизмов в составе микрофлоры покровных тканей и слизистых оболочек, что ведет к перекрестному инфицированию и спонтанному формированию нозокомиальных штаммов. Для профилактики дисбиоза операторов в условиях эксперимента «Марс-500» был применён препарат, созданный на основе аутоштаммов энтерококков. Для коррекции дисбактериоза кишечника применялись угольные таблетки, насыщенные культурами *Enterococcus faecium*, в количестве 10^8 КОЕ. Аутоштаммы *E. faecium*, были выделены из состава микрофлоры кишечника испытуемых, за 1 месяц до начала эксперимента. Препараты применялись в течение первых 30 суток эксперимента по 1 таблетке 2 раза в день во время приёма пищи.

Оценка эффективности аутопробиотиков на основе энтерококков в эксперименте со 105-суточной изоляцией.

Как свидетельствуют данные 105-суточного изоляционного эксперимента, предваряющего эксперимент с 520-суточной изоляцией. Во время изоляции произошло снижение количества видов микроорганизмов, относящихся к условно-патогенной группе: патогенные эшерихии (неферментирующие лактозу), дрожжи, клебсиеллы, гемолитические и золотистые стафилококки, клебсиелла и протей, с тенденцией к восстановлению только спустя 30 суток после окончания курса приема препарата аутопробиотика на основе *Enterococcus faecium*. При этом популяция протективных групп – лактобацилл, бифидобактерий, непатогенных кишечных палочек и энтерококков находилась в пределах нормы.

На рисунках 4 и 5 показана динамика количественного изменения облигатной и факультативной микрофлоры кишечника у испытуемых. Также надо отметить динамику количественного изменения группы неферментирующих бактерий и плесневых грибов у испытателей (рисунок 6),

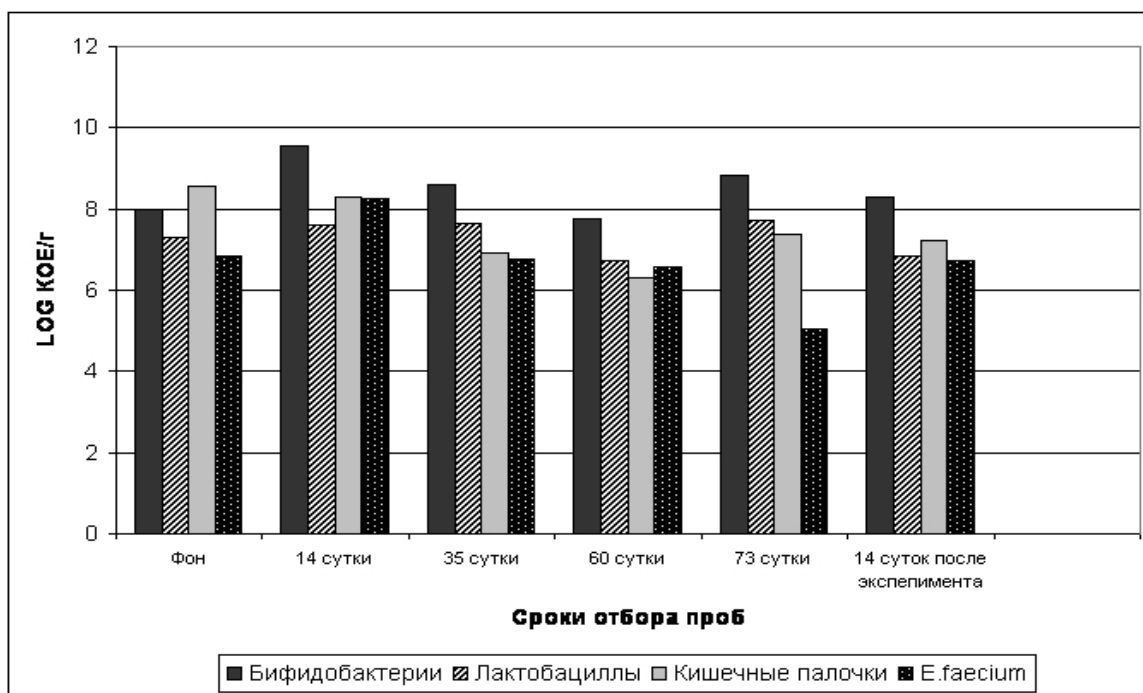


Рисунок 4. Динамика количественных изменений облигатной микрофлоры кишечника у испытуемых в 105-суточном эксперименте

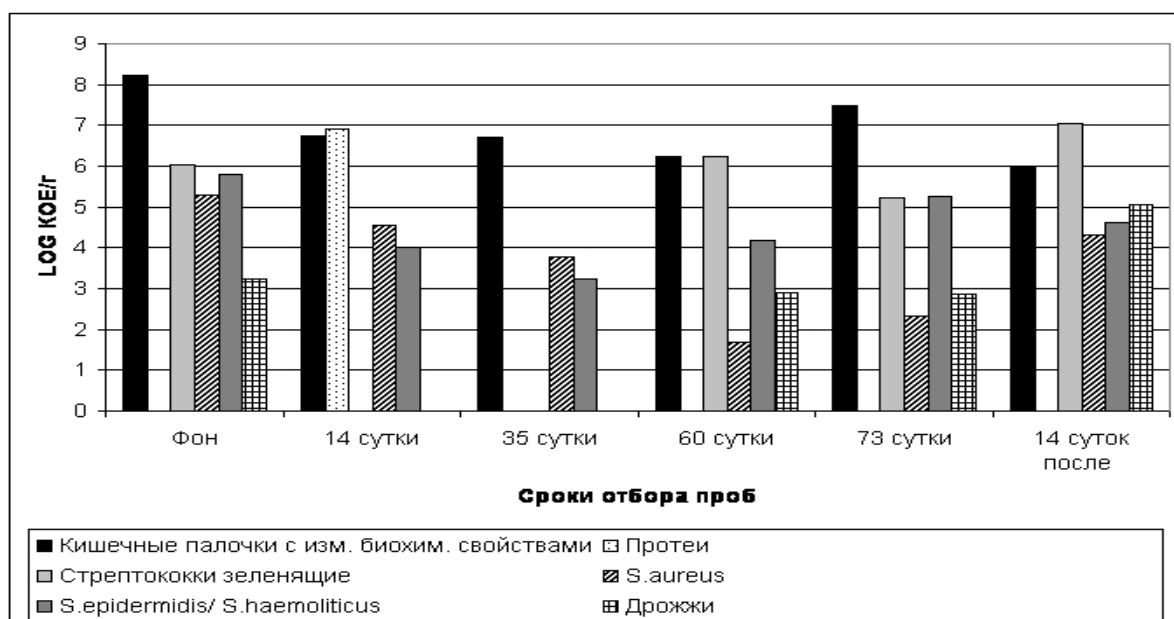


Рисунок 5. Динамика количественных изменений факультативной микрофлоры кишечника у испытуемых в 105-суточном эксперименте

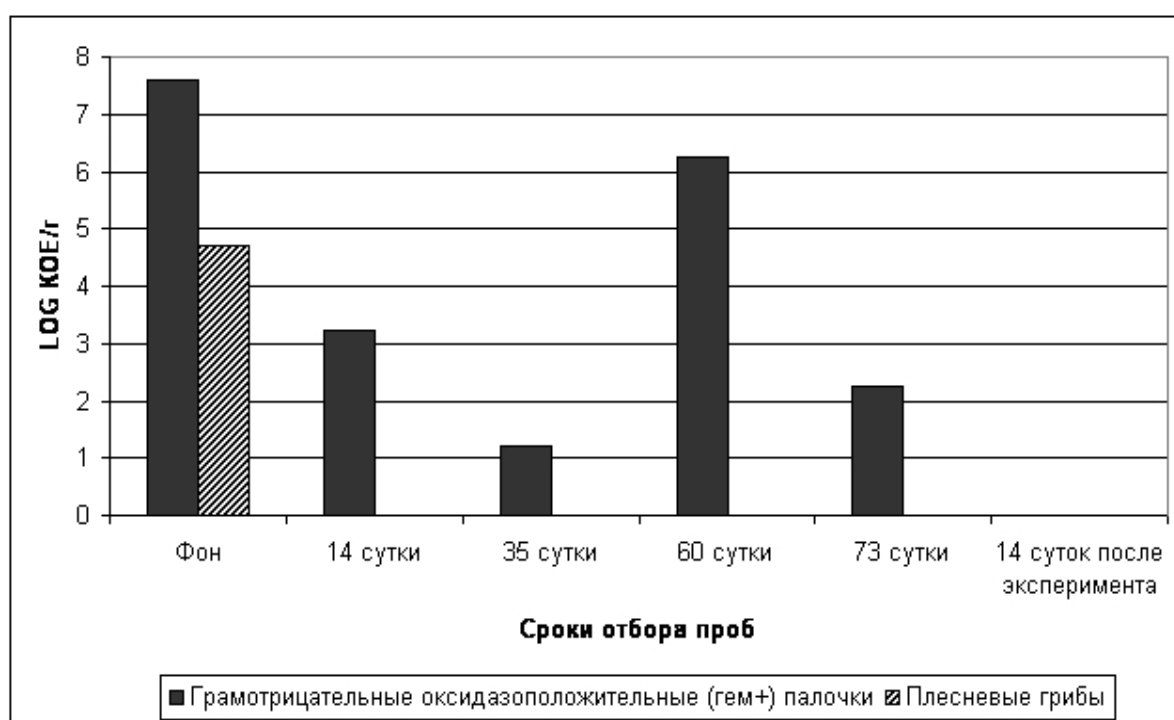


Рисунок 6. Динамика количественных изменений группы неферментирующих бактерий и плесневых грибов у испытуемых в 105-суточном эксперименте

Исследование в изоляционном эксперименте длительностью 520 суток (Марс-500)

При использовании препаратов на основе аутологичных препаратов на основе

E. faecium удалось избежать количественного роста условно-патогенных микроорганизмов в период острой адаптации в течение первых нескольких недель эксперимента. Микрофлора кишечника в течение периода приема препарата отличалась стабильностью и достаточно высокими показателями облигатной микрофлоры – бифидобактерий, лактобацилл, непатогенных энтерококков (рис. 7).

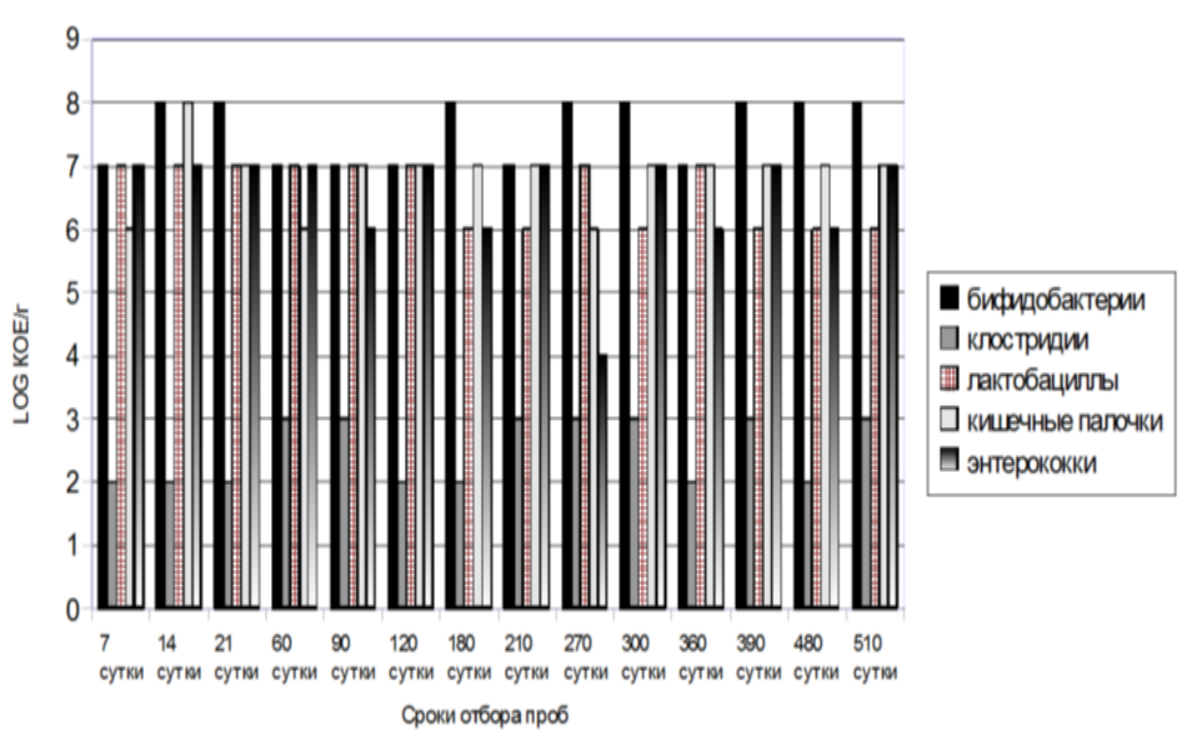


Рисунок 7. Динамика факультативной микрофлоры кишечника у испытуемых в 520-суточной изоляции (n=6)

Кроме того, в результате приема препарата значительно снизился уровень содержания в кишечнике неферментирующих бактерий и грибов (рис. 8). Это происходило даже несмотря на значительный уровень контаминации среды обитания условно-патогенными микроорганизмами. В течение времени приема препарата отмечалась стабилизация клостридий, кишечной палочки. После отмены препарата появились спорадические подъемы уровня обсемененности лактозонегативных кишечных палочек, дрожжей и клебсиелл, отмечался подъем кокковой микрофлоры.

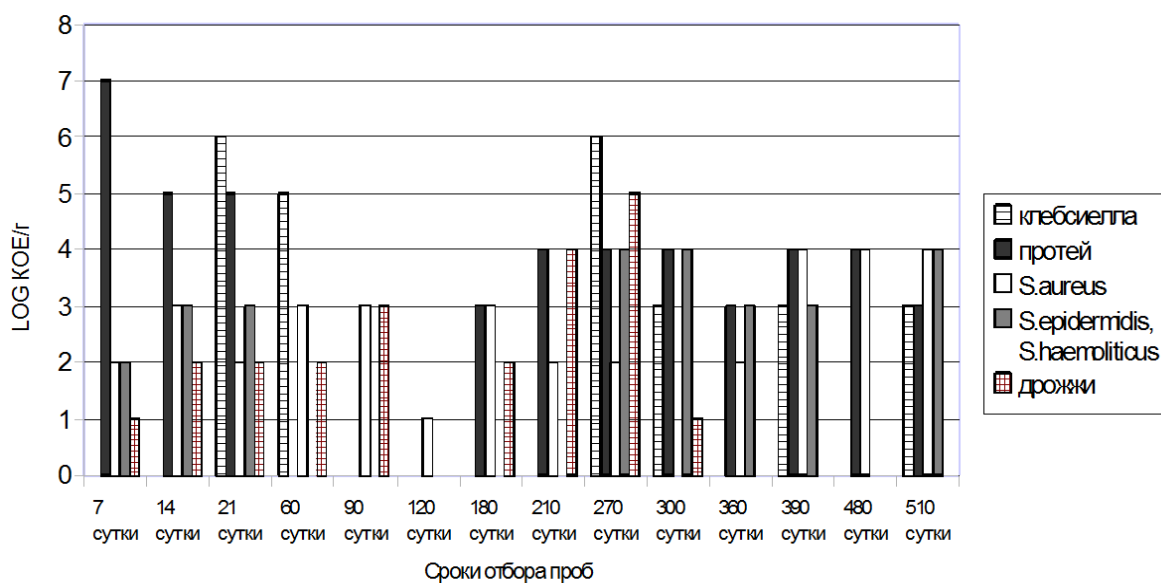


Рисунок 8. Динамика облигатной микрофлоры кишечника у испытуемых в 520-суточной изоляции (n=6) контаминации среды обитания условно-патогенными микроорганизмами.

В ротоглотке в период приема препаратов и в последующие 200 суток отсутствовали стафилококки, нейссерии и зеленящие стрептококки. Начиная с сотого дня эксперимента, наблюдались разовые подъемы синегнойной палочки, бактерий кишечной группы, не встречавшихся в начале эксперимента. В начале эксперимента на кожных покровах доминировали представители непатогенной кокковой микрофлоры, практически отсутствовал золотистый стафилококк. Вместе с тем, на влагосодержащих кожных покровах практически отсутствовали такие важнейшие комменсалы кожной микрофлоры как коринебактерии, и присутствовали представители кишечной флоры, в том числе лактозонегативные кишечные палочки, элиминировавшие из биотопа по окончании курса приема аутопробиотика. В отдаленные сроки после отмены препарата отмечались спорадические подъемы уровня обсемененности патогенными дрожжами и нейссериями, появились и доминировали до окончания эксперимента гемолитические зеленящие стрептококки. В подмышечной впадине отсутствовали эпидермальные и золотистые стафилококки, энтерококки и коринебактерии. Спорадически наблюдался количественный рост патогенной микрофлоры. Наивысший показатель зубиотического индекса для кишечной микрофлоры достигался лишь при приеме аутопробиотических препаратов (6,3) со значительным потенцированным эффектом. Значительно меньших характеристик (4,1) индекс достиг при приеме пробиотика на основе коллекционных штаммов энтерококка. Несколько большие величины (4,4) были достигнуты при использовании последнего препарата вкупе с пребиотиком. Использование отечественного пребиотика и пробиотика, а также кваса на основе сахаромисет было охарактеризовано достаточно скромными позициями индекса (2,5 и 2,1 соответственно) (таблицы 3 и 4).

Таблица 3. Значение эубиотического индекса в экспериментах без использования пробиотических средств и в эксперименте «Марс-500»

Эксперимент в гермообъекте без профилактики	
Период	Эубиотический индекс
Фон – 14 сутки	1,1
14 – 30 сутки	0,9
Эксперимент с использованием аутопробиотика на основе <i>Enterococcus faecium</i>	
фон-14 сутки	5
14 сутки – 30 сутки	5,2

Таблица 4. Значения эубиотического индекса при приеме различных препаратов в эксперименте «Марс-500»

Сут-ки взя-тия проб	Вид препарата	Интервал времени	Эубиотический индекс		
			кишечник	Верхние дыха- тельные пути	Пок- ровные ткани
14	Препарат на основе аутоштаммов <i>E. faecium</i> 0-30 сутки	фон-14	5	1,5	1,7
21		14-21	5,2	1,5	Не опр.
60		21-60	4,9	0,7	
75	Перерыв	60-75	6,3	0,8	1,7
90		75-90	4	1,5	1,2
120	Пробиотик на основе <i>E. faecium</i> (Университет Тусция, Италия)	90-120	4,9	2,3	1,4
150	Перерыв	120-150	3,5	1,4	3,8
180		150-180	2,9	1,8	3,4
210	пробиотик на основе <i>E. faecium</i> (Университет Тусция, Италия)	180-210	2,6	2,4	1,8
240	Перерыв	210-240	4,1	1,2	1,1
270	251-265 - квас	240-270	1,4	1,4	0,8
300	пробиотик на основе <i>E. faecium</i> + пребиотик Neutraceuticals (Университет Тусция, Италия)	270-300	2,1	0,7	0,5
330	Перерыв	300-330	3,2	0,9	0,5
360		330-360	4,4	1,6	0,7
390	пребиотик Neutraceuticals (Университет Тусция, Италия)	360-390	2,3	1,8	1,2
420	Перерыв	390-420	2,1	2,1	1,5
450		420-450	2,5	1,4	0,5
480		450-480	1,2	1,2	0,7
520	Пребиотик Эубикор (ООО «Валмед», Россия) + пробиотик Витафлор; (Институт особо чистых препаратов, Россия)	480-520	2,5	2	0,5

«Сухая» иммерсия - метод, разработанный в качестве наземного метода моделирования воздействий микрогравитации на организм. Метод состоит в погружении испытуемого в иммерсионную ванну с водой, от которой он отделен водонепроницаемой тонкой тканью с площадью, существенно превышающей зеркало воды. При этом человек оказывается свободно "подвешенным" в толще воды и давление, оказываемое на различные части тела, уравновешено, что воссоздает условия, близкие к безопорности. Пребывание в сухой иммерсии сопровождается гипокинезией, снижением мышечного тонуса, перераспределением жидкостных сред в организме человека и как следствие увеличением объема выделяемой жидкости из организма.

Эксперимент проводился по принятой методике. Одновременно с лицами, принимавшими участие в эксперименте, проводились клинко-физиологические исследования, направленные на изучение биохимических и метаболических аспектов адаптации и изменений, происходящих в органах и системах организма. Длительность пребывания в иммерсионной ванне – от 3 до 7 суток.

Микробиологические исследования

При микробиологических исследованиях у здоровых лиц использовались пробы, взятые из глотки и полости носа. Отбор проб из глотки и полости носа осуществлялся натошак, до чистки зубов, с помощью тампонов с транспортными средами «Амиес с углём» (Сорап, Италия).

Отбор проб фекалий производился в стерильный контейнер, материал доставлялся в лабораторию в течение 2 часов.

Методы профилактики

Препараты – аутопробиотики на основе лактобацилл. Микроорганизмы выделялись из кишечника обследуемых, тестировались на отсутствие патогенности. Нарбатывалась биомасса препарата, асептически смывалась стерильным физраствором и добавлялась в кефир 3.2% жирности, приобретаемый в торговой сети, таким образом, чтобы конечная концентрация аутоштаммов в кефире составила бы 1×10^7 КОЕ/мл. Такой кефир, обследуемый выпивал по утрам в течение всего эксперимента в объеме 200 мл.

Опытная и контрольная группы по 6 человек. Основные результаты влияния используемых препаратов на микробиоценоз кишечника можно суммировать в таблице 5. Из данных, представленных в таблице, следует, что при приеме аутопробиотиков происходила оптимизация количественного и видового состава кишечной микрофлоры, что нашло свое отражение в значениях эубиотического индекса.

Таблица 5. Показатели эубиотического индекса кишечной микробиоты в эксперименте «Сухая иммерсия»

Экспериментальная группа	Контрольная группа
4,55	1,54

Показатели эубиотического индекса убедительно свидетельствуют об активности аутопробиотиков в составе кисломолочного продукта. В данном исследовании обращает на себя внимание рост молочнокислых бактерий групп лактобацилл и бифидобактерий, которые существенно выросли количественно в

опытной группе. Из данных, представленных, на рисунках 9 и 10 следует, что при использовании кисломолочного продукта с суспендированной культурой лактобацилл происходит интенсивное восстановление лактобацилл и в меньшей степени бифидобактерий. В контрольной группе эти показатели были без изменений.

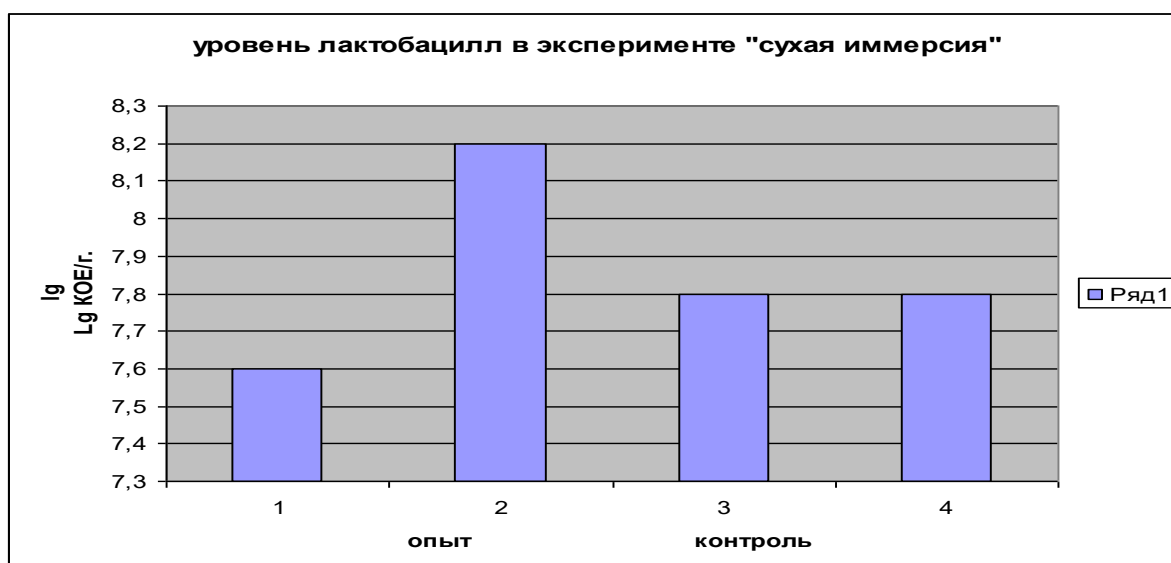


Рисунок 9. Динамика изменения уровня лактобацилл в кишечнике у опытной и контрольной групп в эксперименте «Сухая иммерсия»



Рисунок 10. Динамика изменения уровня бифидобактерий в кишечнике у опытной и контрольной групп в эксперименте «Сухая иммерсия».

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленные в работе результаты свидетельствуют о возможности использовать культуры аутологичных микроорганизмов – представителей протективной микрофлоры организма, для создания аутопробиотических средств для оптимизации микробного ценоза организма, находящегося в искусственно измененной среде обитания.

Для оптимизации количественного и качественного состава микрофлоры кишечника рекомендуется использовать пробиотики, основанные на аутологичных штаммах, лактобацилл. Аутопробиотики на основе лактобацилл успешно использовались нами в нашей работе для оптимизации микробиоценоза человека в различных экспериментах – нормобарическая изоляция, сухая иммерсия, и др. в различных формах выпуска – таблетки, лиофилизаты, обогащенные кисломолочные продукты и др. Отсутствие проблем развития инфекционных и аллергологических осложнений, биологической несовместимости и приживляемости позволяет предположить эффективность применения аутопробиотиков в качестве средств профилактики при реализации космической пилотируемой программы. Применение индивидуализированного подхода в выборе препаратов позволит повысить эффективность профилактики и лечения, а также понизить риск развития неблагоприятных эффектов у каждого отдельного человека.

В настоящее время концепция создания криобанков микробиоценозов человека и аутопробиотиков может рассматриваться как отдельная часть опережающих исследований в реализации лунной программы и других долгосрочных полетов. Поэтому дальнейшими перспективными исследованиями в направлении разработки средств профилактики инфекций для успешной реализации лунной программы являются исследования сроков хранения аутопробиотических препаратов в лиофилизированном виде и в условиях криохранилищ; исследование стабильности препаратов в условиях воздействия радиации в параметрах, характерных для лунного грунта; исследование эффективности новых аутопробиотиков и новых форм их выпуска в экспериментах, имитирующих факторы космического полета (гипокинезия, сухая иммерсия, длительная изоляция).

ВЫВОДЫ

1. Анализ архивных данных экспериментов с участием человека свидетельствует, что в период гермоизоляции состояние микробиоценоза верхних дыхательных путей и кишечника претерпевают неблагоприятные изменения, заключающиеся в количественном снижении протективных групп микроорганизмов и количественное увеличение представителей условно-патогенной микрофлоры. Эти изменения наиболее выражены в период острой адаптации.
2. Разработан эубиотический индекс в качестве информативного критерия оценки динамики изменений количественного и качественного состава микробиоты организма под влиянием факторов измененной среды обитания, и использования препаратов, в т.ч. аутопробиотиков.
3. Применение аутопробиотических препаратов в экспериментах, имитирующих воздействие факторов космического полета на организм человека (изоляция, сухая иммерсия) и животных (облучение) позволяет оптимизировать количественный и качественный состав микрофлоры, таким образом, препятствуя риску формирования ауто- и перекрестных инфекций в период острой адаптации. Использование препаратов-аутопробиотиков ведет к стойкой стабилизации протективной микрофлоры и количественной редукцией условно-патогенной микрофлоры с длительным – до 30 суток - потенцированным эффектом.

**СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО МАТЕРИАЛАМ
ДИССЕРТАЦИИ
Статьи**

1. Ильин В.К., Комиссарова Д.В., Орлов О.И., Рыкова М.П., **Усанова Н.А.**, Антропова Е.Н., Кутько О.В., Калинин С.А., Пономарев С.А., Шеф К.А., Сахарова А.В. Состав микрофлоры и состояние системы сигнальных образраспознающих рецепторов семейства Toll-подобных клеточных факторов врожденного иммунитета во время 120-суточной изоляции в гермообъекте с искусственной средой обитания // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии, 2021, 98, 1
2. Ильин В.К., Комиссарова Д.В., Садчикова Е.Р., Гольдман И.Л., Колупаев А.К., Садчиков П.Е., Лукичёва Н.А., Жиганшина А.А., **Усанова Н.А.**, Морозова Ю.А. Влияние приёма лактоферрина на кишечную микрофлору крыс при имитации микрогравитации // Биомедицинская радиоэлектроника, 2023, Т. 26, № 1
3. Ильин В.К., Суворов А.Н., Кирюхина Н.В., **Усанова Н.А.**, Старкова Л.В., Бояринцев В.В., Карасева Н.Н. Аутопробиотики как средство профилактики инфекционно-воспалительных заболеваний у человека в искусственной среде обитания // «Вестник Российской Академии медицинских наук», 2013 №2, 56-62
4. Смирнов С.К., Ильин В.К., **Усанова Н.А.**, Орлов О.И. Влияние профилактического приема пребиотика Эубикора на состояние микрофлоры в эксперименте с изоляцией // Авиакосмическая и экологическая медицина 2016, т. 50, №2
5. Смирнов С.К., Ильин В.К., **Усанова Н.А.**, Гордеев Ю.В., Орлов О.И. Исследование эффективности использования пребиотика эубикора для профилактики дисбактериозов в отдаленном восстановительном периоде организма после у-облучения // Авиакосмическая и экологическая медицина 2016, 50. 3. 30-34
6. **Усанова Н.А.**, Морозова Ю.А., Носовский А.М., Ильин В.К. Опыт использования аутопробиотиков на основе энтерококков и лактобацилл в экспериментах с длительной изоляцией и в условиях "сухой" иммерсии // Авиакосмическая и экологическая медицина 2018 том 52 №5 С.34-38
7. Ильин В.К., Комиссарова Д.В., **Усанова Н.А.**, Морозова Ю.А. Исследования микрофлоры профессиональных испытуемых и волонтеров в гермокамерных экспериментах продолжительностью до 20 суток // Авиакосмическая и экологическая медицина, 2021, 55, 3
8. Ильин В.К., Комиссарова Д.В., **Усанова Н.А.**, Морозова Ю.А., Старкова Л.В., Хижняк С.В. Исследования микрофлоры профессиональных испытуемых и волонтеров в длительных гермокамерных экспериментах // Авиакосмическая и экологическая медицина 2022, Т. №1
9. Ильин В.К., Комиссарова Д.В., Афонин Б.В., **Усанова Н.А.**, Морозова Ю.А., Муравьева В.В., Байрамова Г.Р., Припутневич Т.В. // Влияние приема пробиотиков в состав напитка брожения на микрофлору кишечника, слизистых оболочек и состояние желудочно-кишечного тракта человека // Авиакосмическая и экологическая медицина 2022, том 56 №3 С.47-53

Тезисы докладов:

1. Ильин В.К., **Усанова Н.А.**, Тюрина Д.А., Морозова Ю.А. Изучение антагонистически активных штаммов бифидобактерий, изолированных от космонавтов // XII Конференция «Космическая биология и авиакосмическая медицина», Москва, 2006
2. Ilyin V., **Usanova N.**, Starkova L., Morozova J., Suvorov A. Autoprotobiotics in prevention of intestinal disbacteriosis of operators in long-term experiment in confined habitat // 19th IAA Humans in Space Symposium, Cologne, Germany. 2013
3. Ильин В.К., Усанова Н.А. Autoprotobiotics in prevention of microbial risks of humans in artificial environment // 20-ый Симпозиум «Человек в космосе», Чешская республика, Прага, 2015г
4. Ильин В.К., Смирнов С.К., **Усанова Н.А.**, Орлов О.И. Экспериментальное обоснование использования пребиотика для оптимизации количественного и видового состава микрофлоры организма в искусственной среде обитания // I Научные чтения памяти К.Э. Циолковского, Калуга 2015г.
5. Ильин В.К., Кирюхина Н.В., **Усанова Н.А.**, Морозова Ю.А., Соловьева З.О. Опыт использования микробной имплантации для укрепления колонизационной резистентности носоглотки, рта и зубочелюстной системы // Перспективные технологии в системе обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия войск; р; Россия;. Кубинка; 2015
6. Ilyin Viacheslav., Kiryukhina Nataliya., **Usanova Nonna.**, Morozova Julia., Fialkina Svetlana New probiotics for enhancement of human colonial resistance in artificial environment: achievements and prospective // 42 Ассамблея КОСПАР 2018
7. **Усанова Н.А.**, Морозова Ю.А., Кирюхина Н.В., Ильин В.К. Факторы микробиологического риска и обоснование подходов к обеспечению противоинфекционной безопасности экипажей межпланетных космических полетов и лунных баз // 53-и Научные чтения памяти К.Э. Циолковского, Калуга, 2018
8. Ильин В.К., Кирюхина Н.В., **Усанова Н.А.**, Соловьева З.О., Морозова Ю.А. Экспериментальное обоснование использования аутопробиотиков в качестве средств коррекции микрофлоры человека в условиях гермоизоляции и сухой иммерсии // XVII Конференция по космической биологии и аэрокосмической медицине с международным участием, посвященная 100-летию со дня рождения академика О.Г.Газенко, 2018
9. **Усанова Н.А.** Экспериментальное обоснование использования аутопробиотиков в качестве средств коррекции микрофлоры человека в условиях гермоизоляции и сухой иммерсии // XVIII конференция по космической биологии и авиакосмической медицине с международным участием Земля-Орбита-Дальний космос, Москва 2023
10. Ильин В.К., Суворов А.Н., **Усанова Н.А.**, Старкова Л.В., Батов А.Б., Морозова Ю.А., Тихонова Г.А. Аутопробиотики в профилактике дисбактериозов кишечника у операторов в эксперименте «МАРС-520» // Международный симпозиум по результатам экспериментов, моделирующих пилотируемый полёт на Марс (МАРС-500); Россия, Москва, 2012, с.26
11. Ильин В.К., Каспранский Р.Р., Гернет М.В., **Усанова Н.А.**, Старкова Л.В., Каспранский Р.Р. Исследование эффектов употребления кваса в качестве пробиотического средства в условиях эксперимента «МАРС-520» // Международный симпозиум по результатам экспериментов, моделирующих пилотируемый полёт на Марс (МАРС-500); Россия, Москва, 2012, с. 27

12. Ilyin V.K., Suvorov A.N., **Usanova N.** et al. Autoprobiotics as prophylactic means for humans in confined habitats // Материалы XLVIII Научных чтений памяти К.Э. Циолковского; Россия; Калуга; 2012, с.26-27
13. Ильин В.К., Суворов А.Н., **Усанова Н.А.**, Старкова Л.В., Батов А.Б., Морозова Ю.А., Тихонова Г.А. Аутопробиотики в профилактике дисбактериозов кишечника у операторов в обитаемых гермообъектах // Гагаринский сборник: материалы XXXIX общественно-научных чтений, посвященных памяти Ю.А. Гагарина, Гагарин, 2013, часть 1, с. 246-255