

УДК 615.832.9:61.084:616.34:579.61

И.П. Высеканцев<sup>1</sup>, О.М. Бабинец<sup>1</sup>, В.Ф. Марценюк<sup>1\*</sup>,  
Л.Е. Шатилова<sup>1</sup>, А.В. Щеглов<sup>1</sup>, Ю.В. Войда<sup>2</sup>

## Коррекция популяций ценобионтов *Bifidobacterium spp.* и *Lactobacillus spp.* у мышей с экспериментальным дисбиозом кишечника после терапии иммобилизованными на энтеросорбентах пробиотиками, хранившимися при $-80$ и $-196^{\circ}\text{C}$

UDC 615.832.9:61.084:616.34:579.61

I.P. Vysekantsev<sup>1</sup>, O.M. Babinets<sup>1</sup>, V.F. Martsenyuk<sup>1\*</sup>,  
L.Ye. Shatilova<sup>1</sup>, A.V. Scheglov<sup>1</sup>, Yu.V. Voyda<sup>2</sup>

## Correction of *Bifidobacterium spp.* and *Lactobacillus spp.* Populations in Mice with Experimental Intestinal Dysbiosis after Therapy with Enterosorbent-Immobilized Probiotics Stored at $-80$ and $-196^{\circ}\text{C}$

**Реферат:** В работе было изучено восстановление в мушине мышей с экспериментальным дисбиозом кишечника популяций ценобионтов *Bifidobacterium spp.* и *Lactobacillus spp.* после терапии свободными и иммобилизованными на энтеросорбентах пробиотиками, хранившимися в течение года при температуре  $-80$ ,  $-196^{\circ}\text{C}$ . Экспериментальный дисбиоз кишечника вызывали пероральным введением ампициллина и метронидазола. После индукции дисбиоза мышам проводили терапию свободными клетками пробиотиков *S. boulardii*, *B. bifidum*, *L. bulgaricus*, смесями свободных клеток с энтеросорбентами и комплексами клеток пробиотиков, иммобилизованных на энтеросорбентах. Использовали энтеросорбенты на основе активированного угля «Сорбекс» и «СУМС-1». Установлено, что иммобилизованные пробиотики обеспечивают более быстрое и полное восстановление популяций ценобионтов. Низкотемпературное хранение в течение года (срок наблюдения) и температурный режим хранения не влияют на терапевтические свойства свободных и иммобилизованных клеток пробиотиков. Обсуждаются механизмы действия иммобилизованных пробиотиков.

**Ключевые слова:** низкотемпературное хранение, иммобилизованные пробиотики, энтеросорбенты, дисбиоз кишечника, ценобионты, сорбенты, мыши.

**Реферат:** У роботі було вивчено відновлення в мушині мишей із експериментальним дисбіозом кишечника популяцій ценобіонтів *Bifidobacterium spp.* і *Lactobacillus spp.* після терапії вільними та іммобілізованими на ентеросорбентах пробіотиками, які зберігали протягом року за температури  $-80$ ,  $-196^{\circ}\text{C}$ . Експериментальний дисбіоз кишечника формували пероральним введенням ампіциліну та метронідазолу. Після індукції дисбіозу мишам проводили терапію вільними клітинами пробіотиків *S. boulardii*, *B. bifidum*, *L. bulgaricus*, сумішами вільних клітин із ентеросорбентами та комплексами клітин пробіотиків, іммобілізованих на ентеросорбентах. Використовували ентеросорбенти на основі активованого вугілля «Сорбекс» і «СУМС-1». Встановлено, що іммобілізовані пробіотики забезпечують швидше і повніше відновлення популяцій ценобіонтів. Низькотемпературне зберігання протягом року (термін спостереження) та температурний режим зберігання не впливають на терапевтичні властивості вільних та іммобілізованих клітин пробіотиків. Обговорюються механізми дії іммобілізованих пробіотиків.

**Ключові слова:** низькотемпературне зберігання, іммобілізовані пробіотики, ентеросорбенти, дисбіоз кишечника, ценобіонти, сорбенти, миші.

**Abstract:** The research revealed the recovery of the *Bifidobacterium spp.* and *Lactobacillus spp.* cenobiont populations in mucin of mice with experimental intestinal dysbiosis after treatment with free and immobilized on enterosorbents probiotics, stored for a year at a temperature of  $-80$ ,  $-196^{\circ}\text{C}$ . Experimental intestinal dysbiosis was simulated by Ampicillin and Metronidazole oral administration. Mice with induced dysbiosis were treated with free cells of *S. boulardii*, *B. bifidum*, *L. bulgaricus* probiotics, the mixtures of free cells with enterosorbents as well as the complexes of probiotic cells immobilized on enterosorbents. The enterosorbents based on activated carbon Sorbex and SCMS-1 were used. Immobilized probiotics have been found to provide a more rapid and complete recovery of cenobiont populations. Low-temperature storage for a year (observation period) and temperature storage regimen did not affect the therapeutic properties of free and immobilized cells of probiotics. The mechanisms of action of immobilized probiotics are under discussion.

**Key words:** low-temperature storage, immobilized probiotics, intestinal dysbiosis, cenobionts, sorbents, mice.

<sup>1</sup>Отдел долгосрочного хранения биологических объектов при низких температурах и микробиологии, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков  
<sup>2</sup>Харьковская медицинская академия последипломного образования, г. Харьков

\*Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:  
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015;  
тел.: (+38 057) 373-31-26, факс: (+38 057) 373-30-84,  
электронная почта: martsenyuk@ukr.net

Поступила 03.02.2015  
Принята в печать 26.06.2015

Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2015. – Т. 25, №3. – С. 267–286.  
© 2015 Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

<sup>1</sup>Department of Long Term Preservation of Biological Objects at Low Temperatures and Microbiology, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

<sup>2</sup>Kharkov Medical Academy of Post-Diploma Education, Kharkov, Ukraine

\*To whom correspondence should be addressed:  
23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015;  
tel.: +380 57 373 3126, fax: +380 57 373 3084,  
e-mail: martsenyuk@ukr.net

Received February, 03, 2015  
Accepted June, 26, 2015

Probl. Cryobiol. Cryomed. 2015. 25 (3): 267–286.  
© 2015 Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

В настоящее время среди различных групп населения широко распространен дисбиоз – клинико-лабораторный синдром, характеризующийся изменением качественного и/или количественного состава нормальной микрофлоры кишечника, метаболическими и иммунными нарушениями [10, 21]. Для терапии и профилактики дисбиоза кишечника, а в ряде случаев и кишечных инфекций, применяют пробиотические препараты: пробиотики, пребиотики, синбиотики, метабиотики [4, 11, 23, 32]. Пробиотики – живые микроорганизмы, оказывающие при естественном способе введения положительное влияние на физиологические, биохимические и иммунные реакции организма хозяина за счет стабилизации и оптимизации функций микробиоценоза кишечника [10, 21, 23, 27]. В мире производят большое количество препаратов пробиотиков, клиническая эффективность которых доказана в мультицентровых рандомизированных исследованиях двойным слепым методом [1, 10, 27, 32]. Однако по ряду показателей существующие препараты недостаточно удовлетворяют клиническим требованиям, в связи с этим необходимо создание их новых лекарственных форм, в частности пробиотиков, иммобилизованных в носителях на основе полисахаридных гидрогелей [24, 28] и на энтеросорбентах [6]. Современные фармацевтические препараты иммобилизованных на сорбентах пробиотиков («Бактистатин»; «Крафт»; «Бифидумбактерин форте»; «Экополис»; «Пробифор»; «Партнер»; «Экофлор»; «Вектор-Биальгам», Россия) производят и хранят в лиофилизированном виде [5]. Исследования по созданию жидких форм иммобилизованных на сорбентах пробиотиков и их хранению единичны [19].

Нами были получены экспериментальные препараты пробиотиков, иммобилизованных на энтеросорбентах «СУМС-1» и «Сорбекс» [8]. Было показано, что иммобилизация на энтеросорбентах и хранение при температурах  $-80$  и  $-196^{\circ}\text{C}$  не изменяют исходные биологические свойства пробиотиков, а сами препараты обеспечивают более быстрое восстановление микробиоценоза и эрадикацию кишечной микрофлоры, которая была транслочирована во внутренние органы при коррекции экспериментального дисбиоза у иммуносупрессированных мышей по сравнению со свободными клетками и смесями свободных клеток и энтеросорбентов [2, 3]. Комплексные исследования влияния иммобилизованных на энтеросорбентах пробиотиков, хранившихся при различных температурах, на восстановление популяций ценобионтов и муцин слизистой толстой кишки животных с химиотерапевтическим дисбиозом без иммуносупрессии не проводили.

Various groups of human population suffer from dysbiosis, a clinical and laboratory syndrome characterized by a changed qualitative and/or quantitative composition of the normal intestinal flora, metabolic and immune disorders [14, 17]. To treat and prevent an intestinal dysbiosis and even intestinal infections one uses probiotic preparations: probiotics, prebiotics, synbiotics, metabiotics [4, 6, 8, 31]. Probiotics are live microorganisms positively affecting physiological, biochemical and immune responses of a host body after natural intake due to stabilizing and optimizing the functions of the gut microbiota [6, 13, 14, 17]. There are large amounts of probiotic products produced worldwide possessing the clinical efficacy proved in the randomized multicenter double-blind studies [1, 13, 14, 31]. However, the existing products do not properly meet some clinical requirements and in this connection there is a need in developing medications of new types, in particular, probiotics, immobilized in polysaccharide hydrogel carriers [7, 16] and on enterosorbents [28]. Modern pharmaceutical products being the probiotics immobilized on sorbents (Baktistatin; Kraft, Bifidumbacterin forte, Ecopolis, ProbiFor, Partner, Ecoflor, Vector-Bialgam, Russia) are produced by freeze-drying and stored in a dry form [5]. The studies on creating the liquid forms of probiotic immobilized on sorbents and their storage are single [25].

We have obtained the experimental products of probiotics immobilized on enterosorbents SCMS-1 (Spherical Carbon-Mineral Sorbents) and Sorbex [30]. It has been shown that immobilization on enterosorbents and storage at  $-80$  and  $-196^{\circ}\text{C}$  did not alter the initial biological properties of probiotics and, during the correction of the experimental dysbiosis in immune suppressed mice, the products provided faster recovery of microbiota and eradication of intestinal microflora translocated to internal organs if compared with treatment with free cells and the mixtures of free cells and enterosorbents [2, 3]. To the date there are no comprehensive studies of the effect of immobilized on enterosorbents probiotics stored at different temperatures rendered on the recovery of populations of cenobionts and colonic mucosa mucin of the animals with chemotherapeutic dysbiosis without immune suppression.

There are no quantitative criteria *of in vivo* specific activity of probiotics. Assessing of the overall therapeutic effect of the products allowed to establish its dependence on the concentration and biological properties of microbial cells that have passed through the natural barrier of gastrointestinal tract (GIT), as well as on the ability of cells to colonization or persistence (for microorganisms, not referred to GIT microbiocenosis) [5, 14, 28]. Colonization of intestinal mucosa is known to depend on adhesion properties of microorganisms [8, 14, 15]. Adhesion of the carrier-



Количественные критерии специфической активности пробиотиков *in vivo* на сегодня отсутствуют. При оценке суммарного терапевтического эффекта препаратов установлена его зависимость от концентрации и биологических свойств микробных клеток, прошедших через естественные защитные барьеры желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), способности клеток к колонизации или персистенции (для микроорганизмов, не относящихся к микробиоценозу ЖКТ) [5, 6, 10]. Известно, что колонизация слизистой кишечника во многом зависит от адгезивных свойств микроорганизмов [10, 11, 22]. Адгезию комплексов «носитель-клетки» к муцину кишечника ранее не изучали. На основании вышеизложенного целью работы было исследовать восстановление в муцине животных с экспериментальным дисбиозом кишечника популяций ценобионтов *Bifidobacterium spp.* и *Lactobacillus spp.* после терапии свободными и иммобилизованными на энтеросорбентах пробиотиками, хранившимися в течение года при температуре  $-80$  и  $-196^{\circ}\text{C}$ .

### Материалы и методы

Объектами исследования были дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii*, бактерии *Bifidobacterium bifidum*, штамм ЛВА-3 (*B. bifidum*), *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus* (*L. bulgaricus*). Дрожжи *S. boulardii* выделены из коммерческого препарата «Энтерол» («Biocodex», Франция). Бактерии *B. bifidum* получены из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов ГосНИИ генетики (Россия), бактерии *L. bulgaricus* – из коллекции Санкт-Петербургского филиала ФГБНУ «НИИ хлебопекарной промышленности» (Россия).

Для иммобилизации использовали энтеросорбенты «СУМС-1» (ОАО «Новосибхимфарм», Россия) и «Сорбекс» (АО «Экосорб», Украина). Энтеросорбент «СУМС-1» представляет собой гранулы окиси алюминия, покрытые углеродной пленкой, «Сорбекс» – гранулы активированного угля. Иммобилизацию микробных клеток проводили как описано ранее [8].

Свободные и иммобилизованные на энтеросорбентах микробные клетки замораживали в 5%-м растворе сахарозы. Суспензии свободных клеток и взвеси комплексов «носитель-клетки» помещали в криопробирки «Corning» («Corning Inc.», США) с рабочим объемом 1,8 мл. Часть образцов охлаждали в программном замораживателе «Cryoson» (Германия) до  $-40^{\circ}\text{C}$  со скоростью 1 град/мин, затем погружали в жидкий азот. Эти условия криоконсервирования обеспечивали высокую сохранность комплексов «носитель-клетки» [2]. Вторую часть

cells complexes to intestinal mucin has not been previously investigated. Based on the above, the research aim was to investigate the recovery of the *Bifidobacterium spp.* and *Lactobacillus spp.* ceno-biont populations in mucin of experimental animals with an intestinal dysbiosis after treatment with free and enterosorbents-immobilized probiotics, stored for a year at  $-80$  and  $-196^{\circ}\text{C}$ .

### Materials and methods

The research objects were *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii*, bacteria *Bifidobacterium bifidum*, LVA-3 strain (*B. bifidum*), *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus* (*L. bulgaricus*). *S. boulardii* yeasts were isolated from Enterol commercial drug (Biocodex, France). *B. bifidum* bacteria were obtained from the All-Russian Collection of Industrial Microorganisms of Research Institute for Genetics (Russian Federation), *L. bulgaricus* bacteria were from the collection of Saint-Petersburg Branch of the Research Institute of the Bakery Industry (Russia).

For immobilization we used SCMS-1 (Novosibkhimfarm, Russia) and Sorbex (Ecosorb, Ukraine) enterosorbents. SCMS-1 enterosorbent represents the aluminum oxide granules coated with a carbon film, Sorbex consists of activated carbon granules. Microbial cells were immobilized as described previously [30].

Free and immobilized on enterosorbents microbial cells were frozen in 5% sucrose solution. Suspensions of free cells and the carrier-cells complexes were placed into Corning cryovials (Corning Incorporated, USA) with 1.8 ml handling volume. The part of the samples was cooled in a programmable freezer Cryoson (Germany) down to  $-40^{\circ}\text{C}$  with the rate of 1 deg/min, followed by the immersion into liquid nitrogen. These cryopreservation conditions ensured a high preservation rate of the carrier-cells complexes [2]. The second part of the samples was placed into low-temperature chamber Jouan VX380 (France) with temperature of  $(-80 \pm 4)^{\circ}\text{C}$ . The samples were stored for a year at  $-196$  and  $(-80 \pm 4)^{\circ}\text{C}$ , and were thawed in a water bath at  $30^{\circ}\text{C}$ .

The experiments were carried out in accordance with the General Principles of Experiments in Animals approved by the 5<sup>th</sup> National Congress in Bioethics (Kiev, 2013) and consistent with the statements of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986).

Experimental dysbiosis was simulated in white 7–8-month-old outbred laboratory mice of 18–20 g weight. Dysbiosis in animals was initiated by oral administration for 3 days of Ampicillin (Kyivmedpreparat, Ukraine) and Metronidazole (Unique Pharmaceutical Laboratories, India) [9] dissolved in a distilled water



образцов помещали на полки низкотемпературной камеры «Joan VX380» (Франция) с температурой  $(-80 \pm 4)^\circ\text{C}$ . Образцы хранили в течение года при температуре  $-196$  и  $(-80 \pm 4)^\circ\text{C}$ , отогревали на водяной бане при  $30^\circ\text{C}$ .

Эксперименты проводили в соответствии с «Общими принципами экспериментов на животных», одобренными V Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2013) и согласованными с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986).

Экспериментальный дисбиоз воспроизводили у белых 7–8-месячных беспородных лабораторных мышей массой 18–20 г. Для формирования дисбиоза животным вводили перорально в течение 3-х суток «Ампициллин» (ОАО «Київмедпрепарат», Украина) и «Метронидазол» («Unique Pharmaceutical Laboratories», Индия) [12] соответственно в 5 и 2 мг чистого вещества, растворенного в дистиллированной воде. Были проведены три серии экспериментов, в которых животным вводили энтеросорбенты и препараты клеток *B. bifidum* (1-я серия), *L. bulgaricus* (2-я серия), *S. boulardii* (3-я серия). Описание групп животных приведено в табл. 1–5. Каждая контрольная и опытная группы включала по 10 животных. Группы формировали из животных одной партии методом случайной выборки. Микробиологический статус всех мышей до экспериментов определялся как улучшенно-конвенциональный (II категория). Основу рациона составляла кормовая смесь. Содержание, питание и уход за животными соответствовали специальным требованиям при сходных условиях (температура, влажность, освещение, рацион питания) [13]. Забой животных проводили с премедикацией эфиром для наркоза.

Через 48 ч после последнего введения химиопрепаратов (1-е сутки наблюдения) мышам также перорально (с помощью зонда) вводили в течение 12 суток (раз в сутки) препараты пробиотиков и энтеросорбентов (свободные клетки, смеси свободных клеток с энтеросорбентами, иммобилизованные пробиотики). Суточные дозы пробиотиков и энтеросорбентов рассчитывали по массе животных в соответствии с инструкциями по использованию препаратов. Для свободных клеток *S. boulardii* они составляли  $1,6 \times 10^4$ , *B. bifidum* –  $2,5 \times 10^6$ , *L. bulgaricus* –  $2,5 \times 10^5$  КОЕ. Суточная доза «СУМС-1» соответствовала 0,02 г, «Сорбекс» – 0,01 г. С учетом установленной ранее сохранности комплексов иммобилизованных клеток после низкотемпературного хранения их дозы увеличивали в 2 раза.

На 5-, 12-е сутки терапии дисбиоза (5-, 12-е сутки наблюдения) и через 5, 10 суток после по-

by 5 and 2 mg of pure substance, respectively. There have been performed three series of experiments in which the animals were administered with the enterosorbents and preparations of *B. bifidum* cells (1<sup>st</sup> series), *L. bulgaricus* (2<sup>nd</sup> series), *S. boulardii* (3<sup>rd</sup> series). The groups of animals are specified in Tables 1–4. Each of control and experimental groups consisted of 10 animals. Groups were formed from the same batch of animals randomly. The microbiological status of all mice before experiments was defined as improved-conventional (category 2). The diet basis was a standard feed mixture. Maintaining, nutrition and care of the animals were in accordance to the special requirements and under the similar conditions (temperature, humidity, light, diet) [32]. The animals were ether premedicated for anesthesia when perished.

In 48 hrs after the last administration of medications (observation day 1) the mice were also orally (with enteral feeding tube) administered within 12 days (once a day) the preparations of probiotics and enterosorbents (free cells, a mixture of free cells with enterosorbents, and immobilized probiotics). Daily doses of probiotics and enterosorbents were calculated by weight of the animals in accordance with the application instructions of the products. For free *S. boulardii* cells they were  $1.6 \times 10^4$ , for *B. bifidum* the number was  $2.5 \times 10^6$  and  $2.5 \times 10^5$  CFU for *L. bulgaricus*. The daily dose of SCMS-1 was 0.02 g, and 0.01 for Sorbex. Taking into account the established previously survival of the complexes of immobilized cells after low temperature storage their therapeutic doses were twice increased.

To days 5, 12 of a dysbiosis therapy (observation days 5, 12), and in 5, 10 days after the last treatment with probiotics (observation days 17, 22) the colon mucin samples were collected for microscopic and microbiological examinations [6, 11]. To do this, different parts of the colon were dissected in two adjacent fragments of 5 cm length. Chyme was removed by washing the intestine fragments with  $4^\circ\text{C}$  Ringer's solution (pH 7.0–7.4), then the fragments were twisted by plastic rods with mucosa outside, then placed into the vessels with chilled Ringer's solution (5 ml) and shaken for 10 min, afterwards the removed with a spatula mucin was placed into the solution.

The content in mucin of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* bacteria was examined according to the guidelines [24], the content of the *S. boulardii* cells was found with Koch plate techniques [20]. For this aim the mucin serial dilutions were plated on Sabouraud agar medium supplemented with Chloramphenicol (0.05 g/l) [23]. Mucin preparations for light microscopy were stained according Gram and Romanovsky-Giemsa [18]. Enterosorbents granules were additionally fixed by coating the surface with 1% agar gel solution in phosphate buffer (pH 7.2–7.4) [22]. Mucin preparations were examined using Zeiss Primo Star micro-



следнего приема пробиотиков (17-, 22-е сутки наблюдения) забирали пробы муцина толстой кишки для микробиологического и микроскопического исследования [7, 12]. Для этого из разных отделов толстой кишки иссекали по два смежных фрагмента длиной 5 см. Химус удаляли промыванием фрагментов кишки охлажденным до 4°C раствором Рингера (рН 7,0–7,4), затем пластиковыми стержнями фрагменты выворачивали слизистой оболочкой наружу, помещали в сосуды с охлажденным раствором Рингера (5 мл) и встряхивали в течение 10 мин, после чего в этот же раствор помещали муцин, который снимали с помощью шпателя.

Содержание в муцине бактерий родов *Bifidobacterium* и *Lactobacillus* определяли в соответствии с методическими рекомендациями [14], содержание клеток *S. bouhardii* – «чашечным методом» Коха [15]. Для этого серийные разведения муцина высевали на агаризованную среду Сабуро с добавлением хлорамфеникола (0,05 г/л) [18]. Препараты муцина для проведения световой микроскопии окрашивали по Граму и Романовскому-Гимзе [16]. Для дополнительной фиксации гранул энтеросорбентов поверхность препаратов покрывали 1%-м агаровым гелем на растворе фосфатного буфера (рН 7,2–7,4) [17]. Препараты муцина исследовали с помощью микроскопа «Zeiss Primo Star» (Германия) с программным обеспечением «Axio Vision 4» («Zeiss», Германия).

Для статистического анализа полученных результатов использовали t-тест Стьюдента и пакет программ «SPSS 17.0» («IBM», США). Порог статистической погрешности был установлен на уровне 5%.

### Результаты и обсуждение

На 3-и сутки после введения ампициллина и метронидазола у животных отмечали симптомы дисбиоза кишечника: полифекалию, чередование диареи и запоров, изменение консистенции стула, ухудшение аппетита, снижение массы тела на (3,5 ± 0,5) г. Через 48 ч после введения химиопрепаратов в муцине толстого кишечника было установлено снижение числа lg КОЕ/г бактерий *Bifidobacterium spp.* и *Lactobacillus spp.* с 7,4 до 2,0 и с 8,1 до 2,3 соответственно (см. табл. 1, 2).

В течение 17 суток содержание бактерий *Bifidobacterium spp.* и *Lactobacillus spp.* в пристеночном муцине животных, не получавших терапию пробиотиками и энтеросорбентами, не менялось. На 22-е сутки наблюдения содержание данных бактерий в муцине значимо повышалось, но было ниже контрольного. У всех животных этих групп в течение всего срока наблюдения отмечали описан-

scope (Germany) and AxioVision 4 software (Zeiss, Germany).

For statistical analysis of the results the Student t-test and SPSS 17.0 (IBM, USA) software were used. The threshold of statistical error was set at 5%.

### Results and discussion

To day 3 after the Ampicillin and Metronidazole treatment the animals got the symptoms of intestinal dysbiosis: polyfekalia, diarrhea and constipation interchange, altered stool consistency, appetite and weight loss by (3.5 ± 0.5) g. In 48 hrs after administration of medications the colon mucin had number of lg CFU/g of *Bifidobacterium spp.* and *Lactobacillus spp.* bacteria decreased from 7.4 down to 2.0 and from 8.1 down to 2.3, respectively (Tables 1 and 2).

During 17 days the content of *Bifidobacterium spp.* and *Lactobacillus spp.* bacteria in parietal mucin of the animals non-treated with probiotics and enterosorbents was not changed. To observation day 22 the content of these bacteria in mucin was significantly increased, but it was still lower than in the control. All the animals of these groups had the mentioned above clinical manifestations of gastrointestinal tract digestive functions disorders during the entire period of observation.

In the animals of groups 1–3, treated with native or stored at –80, –196°C free *B. bifidum* cells, the total number of *Bifidobacterium spp.* bacteria in mucin was significantly increased to day 12 of therapy as compared with the values after administration of chemical drugs (see Table 1). To day 5 after the treatment (observation day 17) the total number of *Bifidobacterium spp.* bacteria decreased if compared to day 12 of *B. bifidum* receiving. To day 10 after the end of therapy course (observation day 22) the total number of *Bifidobacterium spp.* bacteria increased again and exceeded the value corresponding to day 12 of the treatment. For all the terms of observation (during therapy and 10 days after its finishing) the total number of *Bifidobacterium spp.* bacteria in mucin was lower than before the dysbiosis induction.

In the animals of groups 4–9 the therapy was performed using the mixtures of enterosorbents SCMS-1, Sorbex with free native or stored at –80 and –196°C *B. bifidum* cells (see Table 1). In the animals of these groups, as well as in those of groups 1–3, a significant increase of the total number of *Bifidobacterium spp.* bacteria in mucin was observed to days 5–12 of treatment. The number of bifidobacteria in mucin within 10 days after the therapy stop did not change and was significantly lower than before the dysbiosis induction.

The animals of groups 10–15 were treated with the enterosorbent-immobilized *B. bifidum* cells (see



ные выше клинические проявления нарушений пищеварительных функций ЖКТ.

У животных групп 1–3, которым вводили нативные и хранившиеся при температуре –80, –196°C свободные клетки *B. bifidum*, суммарное количество бактерий *Bifidobacterium spp.* в муцине на 12-е сутки курса терапии значимо повышалось по сравнению с данным показателем после введения химиопрепаратов (см. табл. 1). На 5-е сутки после лечения (17-е сутки наблюдения) суммарное количество бактерий *Bifidobacterium spp.* снижалось по сравнению с 12-ми сутками приема *B. bifidum*. На 10-е сутки после окончания курса терапии (22-е сутки наблюдения) суммарное количество бактерий *Bifidobacterium spp.* снова увеличилось и превысило показатель, соответствующий 12-м суткам приема препаратов. На всех сроках наблюдения (во время терапии и через 10 суток после ее окончания) суммарное количество бактерий *Bifidobacterium spp.* в муцине было ниже показателя до индукции дисбиоза.

Животным групп 4–9 терапию проводили с использованием смесей энтеросорбентов «СУМС-1», «Сорбекс» со свободными нативными и хранившимися при температурах –80 и –196°C клетками *B. bifidum* (см. табл. 1). У животных из этих групп, как и в группах 1–3, значимое повышение суммарного количества бактерий *Bifidobacterium spp.* в муцине наблюдалось на 5–12-е сутки лечения. Количество бифидобактерий в муцине в течение 10 суток после окончания курса терапии не изменялось и было значимо ниже показателя до индукции дисбиоза.

Животным групп 10–15 вводили препараты иммобилизованных на энтеросорбентах клеток *B. bifidum* (см. табл. 1). Уже на 5-е сутки терапии значимо увеличилось суммарное количество бактерий *Bifidobacterium spp.* в муцине. На 12-е сутки терапии и в течение последующих 10 суток (17–22-е сутки наблюдения) суммарное количество бактерий *Bifidobacterium spp.* в муцине не отличалось от данного показателя для бифидобактерий до индукции дисбиоза.

Во всех группах экспериментальных животных различия показателей восстановления в муцине суммарного количества *Bifidobacterium spp.* после введения свободных и иммобилизованных клеток *B. bifidum* до и после хранения при низких температурах отсутствовали. Также не были установлены различия и в терапевтическом эффекте препаратов *B. bifidum*, хранившихся при температурах –80 и –196°C.

После лечения дисбиоза кишечника свободными и иммобилизованными бактериями *L. bulgaricus* были получены результаты, сходные с данными

Table 1). To day 5 of therapy, the total number of *Bifidobacterium spp.* bacteria in mucin was significantly increased. To day 12 of therapy and during the next 10 days (observation days 17–22), the total number of *Bifidobacterium spp.* bacteria in mucin did not differ from the one prior to the dysbiosis induction.

In all the groups of experimental animals we found no differences in recovery of the total amount of *Bifidobacterium spp.* in mucin after administration of free and immobilized *B. bifidum* cells stored or not stored at low temperatures. There were no differences in therapeutic effect of *B. bifidum* products stored at either –80 and –196°C as well.

After treatment of intestinal dysbiosis with free and immobilized *L. bulgaricus* bacteria the results similar to the ones when using *B. bifidum* were obtained. The total amount of *Lactobacillus spp.* bacteria in mucin of the animals treated with free cells and the mixtures of free cells with enterosorbents significantly increased to day 12 of administration (see Table 2: groups 1–3 and 4–9). In 5 days after the treatment the index declined and 10 days later it again increased to the values close to the ones prior to the dysbiosis induction. In the groups of animals treated with immobilized *L. bulgaricus* cells, the total amount of *Lactobacillus spp.* bacteria in mucin started rising to observation day 5 (Table 2: groups 10–15), and to day 22 it restored to the control values.

In mucin of the animals treated with *L. bulgaricus* products stored and not stored at low temperatures the amount of *Lactobacillus spp.* bacteria did not differ like in previous experiments. There were no differences in therapeutic effect of *L. bulgaricus* stored at –80 and –196°C as well.

In the third set of experiments we examined the persistence of *S. boulardii* yeast in the colon mucin and recovery of *Bifidobacterium spp.* and *Lactobacillus spp.* bacteria populations after introduction of free and immobilized *S. boulardii* cells. *Saccharomyces spp.* cells were absent in mucin of the animals before dysbiosis induction and 48 hrs later administering the chemical drugs. To days 5 and 12 of treatment (observation day 5 and 12) the equal amounts of *Saccharomyces spp.* cells were isolated from the mucin of the animals treated with *S. boulardii* cells and mixtures of free cells with enterosorbents, *i. e.* from 3.5 to 4.4 lg CFU/g (Table 3: Groups 1–9). In 5 days after the treatment (observation day 17) only single *Saccharomyces spp.* cells were identified in mucin of the animals of these groups, and 10 days later (observation day 22) the yeast cells were absent in mucin. During the whole period of treatment with the enterosorbent-immobilized *S. boulardii* cells and 5 days later the equal amounts of yeast cells were isolated from the mucin, which were significantly higher



**Таблица 1.** Содержание *Bifidobacterium spp.* в пристеночном муцине толстой кишки мышей с химиотерапевтическим дисбиозом кишечника после введения свободных и иммобилизованных клеток *B. bifidum* и энтеросорбентов, *Ig* КОЕ/г,  $x \pm Sx$

**Table 1.** Content of *Bifidobacterium spp.* in parietal mucin colon of mice with chemotherapeutical intestinal dysbiosis after injection of free and immobilized *B. bifidum* cells and enterosorbents, *Ig* CFU/g,  $x \pm Sx$

Группы животных (вводимые препараты) Groups of animals (introduced preparations)	До индукции дисбиоза Before dysbiosis induction	48 ч после индукции дисбиоза (1-е сутки наблюдения) 48 h post dysbiosis induction (1 <sup>st</sup> day of observation)	5-е сутки приема препаратов (5-е сутки наблюдения) 5 <sup>th</sup> day of treatment (5 <sup>th</sup> day of observation)	12-е сутки приема препаратов (12-е сутки наблюдения) 12 <sup>th</sup> day of treatment (12 <sup>th</sup> day of observation)	5-е сутки после приема препаратов (17-е сутки наблюдения) 5 <sup>th</sup> day post treatment (17 <sup>th</sup> day of observation)	10-е сутки после приема препаратов (22-е сутки наблюдения) 10 <sup>th</sup> day post treatment (22 <sup>nd</sup> day of observation)
Животные без лечения Animals without treatment			2,8 ± 0,4*	3,0 ± 0,5 <sup>a</sup>	3,1 ± 0,3 <sup>a</sup>	4,0 ± 0,4 <sup>a</sup>
1. Свободные клетки <i>B. bifidum</i> 1. Free <i>B. bifidum</i> cells			2,4 ± 0,5*	4,6 ± 0,4 <sup>a</sup>	3,9 ± 0,5 <sup>ab</sup>	5,4 ± 0,4 <sup>ab</sup>
2. Свободные клетки <i>B. bifidum</i> , хранившиеся при -80°C 2. Free <i>B. bifidum</i> cells, stored at -80°C			2,5 ± 0,1*	4,8 ± 0,3 <sup>a</sup>	3,8 ± 0,4 <sup>ab</sup>	5,5 ± 0,3 <sup>ab</sup>
3. Свободные клетки <i>B. bifidum</i> , хранившиеся при -196°C 3. Free <i>B. bifidum</i> cells, stored at -196°C			2,4 ± 0,5*	4,7 ± 0,4 <sup>a</sup>	3,9 ± 0,3 <sup>ab</sup>	5,6 ± 0,4 <sup>ab</sup>
4. Свободные клетки <i>B. bifidum</i> + «СУМС-1» 4. Free <i>B. bifidum</i> cells + SCMS-1			3,0 ± 0,4 <sup>a</sup>	5,5 ± 0,5 <sup>a</sup>	5,9 ± 0,4 <sup>a</sup>	5,8 ± 0,3 <sup>a</sup>
5. Свободные клетки <i>B. bifidum</i> + «Сорбекс» 5. Free <i>B. bifidum</i> + Sorbex			2,9 ± 0,3 <sup>a</sup>	5,1 ± 0,5 <sup>a</sup>	5,7 ± 0,2 <sup>a</sup>	5,8 ± 0,3 <sup>a</sup>
6. Свободные клетки <i>B. bifidum</i> , хранившиеся при -80°C, + «СУМС-1» 6. Free <i>B. bifidum</i> cells, stored at -80°C, + SCMS-1			3,1 ± 0,3 <sup>a</sup>	5,0 ± 0,4 <sup>a</sup>	5,6 ± 0,2 <sup>a</sup>	5,7 ± 0,5 <sup>a</sup>
7. Свободные клетки <i>B. bifidum</i> , хранившиеся при -80°C, + «Сорбекс» 7. Free <i>B. bifidum</i> cells, stored at -80°C, + Sorbex			3,0 ± 0,4 <sup>a</sup>	5,2 ± 0,5 <sup>a</sup>	5,7 ± 0,5 <sup>a</sup>	5,9 ± 0,3 <sup>a</sup>
8. Свободные клетки <i>B. bifidum</i> , хранившиеся при -196°C, + «СУМС-1» 8. Free <i>B. bifidum</i> cells, stored at -196°C, + SCMS-1	7,4 ± 0,4	2,0 ± 0,6*	3,4 ± 0,4 <sup>a</sup>	5,1 ± 0,3 <sup>a</sup>	5,5 ± 0,4 <sup>a</sup>	5,8 ± 0,4 <sup>a</sup>
9. Свободные клетки <i>B. bifidum</i> , хранившиеся при -196°C, + «Сорбекс» 9. Free <i>B. bifidum</i> cells, stored at -196°C, + Sorbex			3,3 ± 0,4 <sup>a</sup>	5,0 ± 0,4 <sup>a</sup>	5,6 ± 0,3 <sup>a</sup>	5,9 ± 0,5 <sup>a</sup>
10. Иммобилизованные на «СУМС-1» клетки <i>B. bifidum</i> 10. Immobilized with SCMS-1 <i>B. bifidum</i> cells			4,5 ± 0,4 <sup>a</sup>	7,0 ± 0,3 <sup>a</sup>	7,0 ± 0,5 <sup>a</sup>	7,1 ± 0,3 <sup>a</sup>
11. Иммобилизованные на «Сорбексе» клетки <i>B. bifidum</i> 11. Immobilized with Sorbex <i>B. bifidum</i> cells			4,4 ± 0,3 <sup>a</sup>	7,1 ± 0,4 <sup>a</sup>	7,0 ± 0,4 <sup>a</sup>	7,2 ± 0,4 <sup>a</sup>
12. Иммобилизованные на «СУМС-1» клетки <i>B. bifidum</i> , хранившиеся при -80°C 12. Immobilized with SCMS-1 <i>B. bifidum</i> cells, stored at -80°C			4,5 ± 0,5 <sup>a</sup>	6,9 ± 0,5 <sup>a</sup>	7,1 ± 0,4 <sup>a</sup>	7,1 ± 0,2 <sup>a</sup>
13. Иммобилизованные на «Сорбексе» клетки <i>B. bifidum</i> , хранившиеся при -80°C 13. Immobilized with Sorbex <i>B. bifidum</i> cells, stored at -80°C			4,4 ± 0,4 <sup>a</sup>	7,0 ± 0,3 <sup>a</sup>	7,1 ± 0,4 <sup>a</sup>	7,2 ± 0,3 <sup>a</sup>
14. Иммобилизованные на «СУМС-1» клетки <i>B. bifidum</i> , хранившиеся при -196°C 14. Immobilized with SCMS-1 <i>B. bifidum</i> cells, stored at -196°C			4,6 ± 0,3 <sup>a</sup>	7,0 ± 0,4 <sup>a</sup>	7,2 ± 0,2 <sup>a</sup>	7,1 ± 0,4 <sup>a</sup>
15. Иммобилизованные на «Сорбексе» клетки <i>B. bifidum</i> , хранившиеся при -196°C 15. Immobilized with Sorbex <i>B. bifidum</i> cells, stored at -196°C			4,2 ± 0,5 <sup>a</sup>	6,9 ± 0,3 <sup>a</sup>	7,1 ± 0,4 <sup>a</sup>	7,3 ± 0,3 <sup>a</sup>

**Примечание:** \* – статистически значимые отличия по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ); а – данными после индукции дисбиоза; b – данными на 12-е сутки терапии.

**Note:** \* – statistically significant changes ( $p < 0.05$ ) if compared with control (before dysbiosis); a – after induction of dysbiosis; b – 12<sup>th</sup> day of therapy.



ми для *B. bifidum*. Суммарное количество в муцине бактерий *Lactobacillus spp.* в группах животных, которым вводили свободные клетки и смеси свободных клеток с энтеросорбентами, значимо повышалось на 12-е сутки введения (см. табл. 2: группы 1–3 и 4–9). Через 5 суток после лечения указанный показатель снижался, а через 10 суток снова повышался до значений, близких к показателям до индукции дисбиоза. В группах животных, которым вводили иммобилизованные клетки *L. bulgaricus*, суммарное количество в муцине бактерий *Lactobacillus spp.* начинало увеличиваться к 5-м суткам наблюдения (см. табл. 2: группы 10–15), а на 22-е сутки восстановилось до контрольных значений.

В муцине животных, получавших препараты *L. bulgaricus*, до и после хранения при низких температурах количество бактерий *Lactobacillus spp.*, как и в предыдущих экспериментах, не отличалось. Отсутствовали и различия в терапевтическом действии препаратов *L. bulgaricus*, хранившихся при температурах  $-80$  и  $-196^{\circ}\text{C}$ .

В третьей серии экспериментов исследовали персистенцию в муцине толстой кишки дрожжей *S. boulardii* и восстановление популяций бактерий *Bifidobacterium spp.* и *Lactobacillus spp.* после приема свободных и иммобилизованных клеток *S. boulardii*. В муцине животных до индукции дисбиоза и через 48 ч после окончания введения химиопрепаратов клетки *Saccharomyces spp.* отсутствовали. Из муцина животных, которым вводили свободные клетки *S. boulardii* и смеси свободных клеток с энтеросорбентами, на 5- и 12-е сутки лечения (5- и 12-е сутки наблюдения) выделяли одинаковое количество клеток *Saccharomyces spp.* – от 3,5 до 4,4 lg КОЕ/г (см. табл. 3: группы 1–9). Через 5 суток после лечения (17-е сутки наблюдения) в муцине животных этих групп были обнаружены единичные клетки *Saccharomyces spp.*, а через 10 суток (22-е сутки наблюдения) дрожжевые клетки в муцине отсутствовали. На протяжении всего периода приема препаратов иммобилизованных на энтеросорбентах клеток *S. boulardii* и через 5 суток после лечения из муцина выделяли также одинаковое количество дрожжевых клеток, которое было значимо выше, чем в группах 1–9. На 22-е сутки наблюдения количество дрожжевых клеток в муцине животных групп 10–15 значимо снижалось по сравнению с результатами 15–17-х суток.

Хранение свободных и иммобилизованных на энтеросорбентах клеток *S. boulardii* в течение года при  $-80$  и  $-196^{\circ}\text{C}$  не влияло на их способность к персистенции в муцине мышей. Температура хранения не оказывала значимого влияния на способность дрожжевых клеток к персистенции в слизистой толстой кишки мышей.

than in groups 1–9. To observation day 22 the amounts of yeast cells in mucin of the animals in groups 10–15 were significantly lower if compared with those of days 15–17.

Storage of free and enterosorbent-immobilized *S. boulardii* cells within a year at  $-80$  and  $-196^{\circ}\text{C}$  did not affect their ability to persistence in the mucin of mice. Storage temperature had no significant effect on the ability of yeast cells to persistence in the colon mucosa of mice.

In addition to the testing the persistence of yeast cells in mucin the groups of the *S. boulardii* treated animals were assessed for the presence of *Bifidobacterium spp.* and *Lactobacillus spp.* bacteria. Before the dysbiosis induction the animals of these groups had the number of lg CFU/g for bifidobacteria of  $7.6 \pm 0.5$ , for lactobacilli this was  $8.0 \pm 0.4$ , and 48 hrs later the administration of chemodrugs the amounts were  $2.1 \pm 0.4$  and  $2.4 \pm 0.5$ , respectively. In mucin of the animals of groups 1–3 (Table 4, 5) to day 12 day of therapy the number of lg CFU/g for bifidobacteria was 3.3, for lactobacilli this was 4.2. In 10 days after the therapy termination, when the yeast cells were already absent in mucin, the amount of bifidobacteria was increased up to 4.3 lg CFU/g and the one of lactobacilli enhanced up to 4.8 lg CFU/g. Similar results were observed in the groups 4–9, where the animals were treated with the mixture of *S. boulardii* cells and enterosorbents. In groups 10–15 of the animals treated with preparations of *S. boulardii* cells immobilized on enterosorbents, the number of lg CFU/g of bifidobacteria and lactobacilli were higher than in groups 1–9. In 10 days after treatment, the number of yeast cells in mucin of mice of groups 10–15 decreased and the number of bifidobacteria and lactobacilli increased if compared to the last day of therapy.

Storage of free and immobilized *S. boulardii* cells throughout the year at  $-80$  and  $-196^{\circ}\text{C}$  did not affect their ability of recovering the *Bifidobacterium spp.* and *Lactobacillus spp.* cenobiont populations.

The increase of the numbers of bifido- and lactobacteria in mucin after receiving the non-stored and stored at low temperatures free or immobilized probiotics correlated with a decrease in clinical manifestations of disorders in gastrointestinal tract digestive functions. In the groups of mice treated with immobilized probiotics no clinical manifestations were found to observation day 22. In 30% of the animals treated with a mixture of free cells and enterosorbents the polyfecalia was kept, thereat the animals treated with free probiotic cells had just some clinical manifestations less pronounced than in the animals non-treated with probiotics and enterosorbents after the dysbiosis induction.

A comparative microscopic investigation of colon mucin in the animals of all the groups was performed





**Таблица 2.** Содержание *Lactobacillus spp.* в пристеночном муцине толстой кишки мышей с химиотерапевтическим дисбиозом кишечника после введения свободных и иммобилизованных клеток *L. bulgaricus* и энтеросорбентов, Ig КОЕ/г,  $x \pm Sx$

**Table 2.** Content of *Lactobacillus spp.* in parietal mucin colon of mice with chemotherapeutic intestinal dysbiosis after injection of free and immobilized *L. bulgaricus* cells and enterosorbents, Ig CFU/g,  $x \pm Sx$

Группы животных (вводимые препараты) Groups of animals (introduced preparations)	До индукции дисбиоза Before dysbiosis induction	48 ч после индукции дисбиоза (1-е сутки наблюдения) 48 h post dysbiosis induction (1 <sup>st</sup> day of observation)	5-е сутки приема препаратов (5-е сутки наблюдения) 5 <sup>th</sup> day of treatment (5 <sup>th</sup> day of observation)	12-е сутки приема препаратов (12-е сутки наблюдения) 12 <sup>th</sup> day of treatment (12 <sup>th</sup> day of observation)	5-е сутки после приема препаратов (17-е сутки наблюдения) 5 <sup>th</sup> day post treatment (17 <sup>th</sup> day of observation)	10-е сутки после приема препаратов (22-е сутки наблюдения) 10 <sup>th</sup> day post treatment (22 <sup>nd</sup> day of observation)
Животные без лечения Animals without treatment			2,3 ± 0,5*	2,6 ± 0,3*	3,0 ± 0,4*	3,8 ± 0,3 <sup>a</sup>
1. Свободные клетки <i>L. bulgaricus</i> 1. Free <i>L. bulgaricus</i> cells			2,5 ± 0,3*	5,1 ± 0,4 <sup>a</sup>	4,0 ± 0,3 <sup>a</sup>	7,2 ± 0,3 <sup>ab</sup>
2. Свободные клетки <i>L. bulgaricus</i> , хранившиеся при -80°C 2. Free <i>L. bulgaricus</i> cells, stored at -80°C			2,4 ± 0,4*	5,3 ± 0,4 <sup>a</sup>	4,0 ± 0,3 <sup>a</sup>	7,0 ± 0,3 <sup>ab</sup>
3. Свободные клетки <i>L. bulgaricus</i> , хранившиеся при -196°C 3. Free <i>L. bulgaricus</i> cells, stored at -196°C			2,5 ± 0,4*	5,2 ± 0,4 <sup>a</sup>	4,1 ± 0,3 <sup>a</sup>	7,2 ± 0,3 <sup>ab</sup>
4. Свободные клетки <i>L. bulgaricus</i> + «СУМС-1» 4. Free <i>L. bulgaricus</i> cells + SCMS-1			3,1 ± 0,3*	6,0 ± 0,3 <sup>a</sup>	5,2 ± 0,4 <sup>a</sup>	7,4 ± 0,4 <sup>ab</sup>
5. Свободные клетки <i>L. bulgaricus</i> + «Сорбекс» 5. Free <i>L. bulgaricus</i> + Sorbex			3,3 ± 0,4*	6,1 ± 0,3 <sup>a</sup>	5,4 ± 0,3 <sup>a</sup>	7,4 ± 0,4 <sup>ab</sup>
6. Свободные клетки <i>L. bulgaricus</i> , хранившиеся при -80°C, + «СУМС-1» 6. Free <i>L. bulgaricus</i> cells, stored at -80°C, + SCMS-1			3,4 ± 0,4*	6,3 ± 0,3 <sup>a</sup>	5,2 ± 0,4 <sup>a</sup>	7,5 ± 0,4 <sup>ab</sup>
7. Свободные клетки <i>L. bulgaricus</i> , хранившиеся при -80°C, + «Сорбекс» 7. Free <i>L. bulgaricus</i> cells, stored at -80°C, + Sorbex			3,1 ± 0,3*	6,3 ± 0,4 <sup>a</sup>	5,4 ± 0,3 <sup>a</sup>	7,3 ± 0,4 <sup>ab</sup>
8. Свободные клетки <i>L. bulgaricus</i> , хранившиеся при -196°C, + «СУМС-1» 8. Free <i>L. bulgaricus</i> cells, stored at -196°C, + SCMS-1	8,1 ± 0,4	2,3 ± 0,4*	3,3 ± 0,4*	6,2 ± 0,4 <sup>a</sup>	5,4 ± 0,3 <sup>a</sup>	7,4 ± 0,3 <sup>ab</sup>
9. Свободные клетки <i>L. bulgaricus</i> , хранившиеся при -196°C, + «Сорбекс» 9. Free <i>L. bulgaricus</i> cells, stored at -196°C, + Sorbex			3,2 ± 0,3*	6,3 ± 0,3 <sup>a</sup>	5,2 ± 0,4 <sup>a</sup>	7,5 ± 0,4 <sup>ab</sup>
10. Иммобилизованные на «СУМС-1» клетки <i>L. bulgaricus</i> 10. Immobilized with SCMS-1 <i>L. bulgaricus</i> cells			4,0 ± 0,3 <sup>ab</sup>	7,8 ± 0,3 <sup>a</sup>	7,2 ± 0,3 <sup>a</sup>	7,6 ± 0,4 <sup>a</sup>
11. Иммобилизованные на «Сорбексе» клетки <i>L. bulgaricus</i> 11. Immobilized with Sorbex <i>L. bulgaricus</i> cells			4,1 ± 0,3 <sup>ab</sup>	7,9 ± 0,4 <sup>a</sup>	7,2 ± 0,3 <sup>a</sup>	7,6 ± 0,4 <sup>a</sup>
12. Иммобилизованные на «СУМС-1» клетки <i>L. bulgaricus</i> , хранившиеся при -80°C 12. Immobilized with SCMS-1 <i>L. bulgaricus</i> cells, stored at -80°C			4,1 ± 0,4 <sup>ab</sup>	7,8 ± 0,3 <sup>a</sup>	7,3 ± 0,4 <sup>a</sup>	7,6 ± 0,4 <sup>a</sup>
13. Иммобилизованные на «Сорбексе» клетки <i>L. bulgaricus</i> , хранившиеся при -80°C 13. Immobilized with Sorbex <i>L. bulgaricus</i> cells, stored at -80°C			4,2 ± 0,4 <sup>ab</sup>	7,7 ± 0,4 <sup>a</sup>	7,2 ± 0,4 <sup>a</sup>	7,8 ± 0,4 <sup>a</sup>
14. Иммобилизованные на «СУМС-1» клетки <i>L. bulgaricus</i> , хранившиеся при -196°C 14. Immobilized with SCMS-1 <i>L. bulgaricus</i> cells, stored at -196°C			4,1 ± 0,4 <sup>ab</sup>	7,7 ± 0,4 <sup>a</sup>	7,2 ± 0,4 <sup>a</sup>	7,7 ± 0,4 <sup>a</sup>
15. Иммобилизованные на «Сорбексе» клетки <i>L. bulgaricus</i> , хранившиеся при -196°C 15. Immobilized with Sorbex <i>L. bulgaricus</i> cells, stored at -196°C			4,0 ± 0,4 <sup>ab</sup>	7,8 ± 0,3 <sup>a</sup>	7,3 ± 0,3 <sup>a</sup>	7,9 ± 0,4 <sup>a</sup>

**Примечание:** \* – статистически значимые отличия по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ); a – данными после индукции дисбиоза; b – данными на 12-е сутки терапии.

**Note:** \* – statistically significant changes ( $p < 0.05$ ) if compared with control (before dysbiosis); a – after induction of dysbiosis; b – 12<sup>th</sup> day of therapy.

**Таблица 3.** Содержание *Saccharomyces spp.* в пристеночном муцине толстой кишки мышей с химиотерапевтическим дисбиозом кишечника после введения свободных и иммобилизованных *S. boulardii* и энтеросорбентов, *Ig* КОЕ/г,  $x \pm Sx$

**Table 3.** Content of *Saccharomyces spp.* in parietal mucin colon of mice with chemotherapeutic intestinal dysbiosis after injection of free and immobilized *S. boulardii* cells and enterosorbents, *Ig* CFU/g,  $x \pm Sx$

Группы животных (вводимые препараты) Groups of animals (introduced preparations)	До индукции дисбиоза Before dysbiosis induction	48 ч после индукции дисбиоза (1-е сутки наблюдения) 48 h post dysbiosis induction (1 <sup>st</sup> day of observation)	5-е сутки приема препаратов (5-е сутки наблюдения) 5 <sup>th</sup> day of treatment (5 <sup>th</sup> day of observation)	12-е сутки приема препаратов (12-е сутки наблюдения) 12 <sup>th</sup> day of treatment (12 <sup>th</sup> day of observation)	5-е сутки после приема препаратов (17-е сутки наблюдения) 5 <sup>th</sup> day post treatment (17 <sup>th</sup> day of observation)	10-е сутки после приема препаратов (22-е сутки наблюдения) 10 <sup>th</sup> day post treatment (22 <sup>nd</sup> day of observation)
Животные без лечения Animals without treatment			отсутствуют absent	отсутствуют absent	отсутствуют absent	отсутствуют absent
1. Свободные клетки <i>S. boulardii</i> 1. Free <i>S. boulardii</i> cells			4,0 ± 0,3	4,1 ± 0,3	0,7 ± 0,04 <sup>c</sup>	отсутствуют absent
2. Свободные клетки <i>S. boulardii</i> , хранившиеся при -80°C 2. Free <i>S. boulardii</i> cells, stored at -80°C			3,8 ± 0,3	3,9 ± 0,3	0,5 ± 0,02 <sup>c</sup>	отсутствуют absent
3. Свободные клетки <i>S. boulardii</i> , хранившиеся при -196°C 3. Free <i>S. boulardii</i> cells, stored at -196°C			3,9 ± 0,3	4,0 ± 0,2	0,6 ± 0,03 <sup>c</sup>	отсутствуют absent
4. Свободные клетки <i>S. boulardii</i> + «СУМС-1» 4. Free <i>S. boulardii</i> cells + SCMS-1			3,5 ± 0,2	3,9 ± 0,4	0,9 ± 0,03 <sup>c</sup>	отсутствуют absent
5. Свободные клетки <i>S. boulardii</i> + «Сорбекс» 5. Free <i>S. boulardii</i> + Sorbex			3,7 ± 0,3	4,0 ± 0,2	0,9 ± 0,03 <sup>c</sup>	отсутствуют absent
6. Свободные клетки <i>S. boulardii</i> , хранившиеся при -80°C, + «СУМС-1» 6. Free <i>S. boulardii</i> cells, stored at -80°C, + SCMS-1			4,1 ± 0,3	4,2 ± 0,4	0,8 ± 0,03 <sup>c</sup>	отсутствуют absent
7. Свободные клетки <i>S. boulardii</i> , хранившиеся при -80°C, + «Сорбекс» 7. Free <i>S. boulardii</i> cells, stored at -80°C, + Sorbex			3,9 ± 0,2	4,3 ± 0,5	0,7 ± 0,03 <sup>c</sup>	отсутствуют absent
8. Свободные клетки <i>S. boulardii</i> , хранившиеся при -196°C, + «СУМС-1» 8. Free <i>S. boulardii</i> cells, stored at -196°C, + SCMS-1	отсутствуют absent	отсутствуют absent	3,9 ± 0,4	4,2 ± 0,4	0,9 ± 0,03 <sup>c</sup>	отсутствуют absent
9. Свободные клетки <i>S. boulardii</i> , хранившиеся при -196°C, + «Сорбекс» 9. Free <i>S. boulardii</i> cells, stored at -196°C, + Sorbex			3,8 ± 0,4	4,4 ± 0,3	0,8 ± 0,03 <sup>c</sup>	отсутствуют absent
10. Иммобилизованные на «СУМС-1» клетки <i>S. boulardii</i> 10. Immobilized with SCMS-1 <i>S. boulardii</i> cells			6,4 ± 0,3	6,7 ± 0,3	6,1 ± 0,2	3,0 ± 0,2 <sup>c</sup>
11. Иммобилизованные на «Сорбексе» клетки <i>S. boulardii</i> 11. Immobilized with Sorbex <i>S. boulardii</i> cells			6,7 ± 0,5	6,8 ± 0,4	6,0 ± 0,4	3,1 ± 0,4 <sup>c</sup>
12. Иммобилизованные на «СУМС-1» клетки <i>S. boulardii</i> , хранившиеся при -80°C 12. Immobilized with SCMS-1 <i>S. boulardii</i> cells, stored at -80°C			6,2 ± 0,4	6,5 ± 0,3	6,0 ± 0,4	2,9 ± 0,4 <sup>c</sup>
13. Иммобилизованные на «Сорбексе» клетки <i>S. boulardii</i> , хранившиеся при -80°C 13. Immobilized with Sorbex <i>S. boulardii</i> cells, stored at -80°C			6,3 ± 0,3	6,6 ± 0,2	6,2 ± 0,35	3,0 ± 0,3 <sup>c</sup>
14. Иммобилизованные на «СУМС-1» клетки <i>S. boulardii</i> , хранившиеся при -196°C 14. Immobilized with SCMS-1 <i>S. boulardii</i> cells, stored at -196°C			6,0 ± 0,5	6,5 ± 0,4	5,9 ± 0,46	3,0 ± 0,3 <sup>c</sup>
15. Иммобилизованные на «Сорбексе» клетки <i>S. boulardii</i> , хранившиеся при -196°C 15. Immobilized with Sorbex <i>S. boulardii</i> cells, stored at -196°C			6,1 ± 0,4	6,6 ± 0,3	6,1 ± 0,25	2,8 ± 0,4 <sup>c</sup>

**Примечание:** <sup>c</sup> – статистически значимые отличия с данными животных, получавших препараты свободных клеток ( $p < 0,05$ ).

**Note:** <sup>c</sup> – statistically significant changes with data of animals, which received free cells preparations ( $p < 0.05$ ).



В группах животных, получавших препараты *S. boulardii*, одновременно с персистенцией дрожжевых клеток в муцине оценивали наличие бактерий *Bifidobacterium spp.* и *Lactobacillus spp.* До индукции дисбиоза у животных этих групп количество lg КОЕ/г для бифидобактерий составляло  $7,6 \pm 0,5$ , для лактобактерий –  $8,0 \pm 0,4$ , а через 48 ч после окончания введения химиопрепаратов –  $2,1 \pm 0,4$  и  $2,4 \pm 0,5$  соответственно. В муцине животных групп 1–3 (см. табл. 4, 5) на 12-е сутки терапии количество lg КОЕ/г для бифидобактерий составляло 3,3, для лактобактерий – 4,2. Через 10 суток после окончания курса терапии, когда в муцине дрожжевые клетки уже отсутствовали, количество бифидобактерий повысилось до 4,3 lg КОЕ/г, а лактобактерий – до 4,8 lg КОЕ/г. Аналогичные результаты наблюдали и у животных групп 4–9, которым вводили смеси клеток *S. boulardii* с энтеросорбентами. У животных групп 10–15, получавших препараты иммобилизованных на энтеросорбентах клеток *S. boulardii*, количество lg КОЕ/г бифидо- и лактобактерий было выше, чем в группах 1–9. Через 10 суток после лечения количество дрожжевых клеток в муцине мышей групп 10–15 снизилось, а количество бифидо- и лактобактерий повысилось по сравнению с последними сутками терапии.

Хранение свободных и иммобилизованных клеток *S. boulardii* в течение года при температурах  $-80$  и  $-196^{\circ}\text{C}$  не влияло на их способность восстанавливать популяции ценобионтов *Bifidobacterium spp.* и *Lactobacillus spp.*

Повышение в муцине количества бифидо- и лактобактерий после приема нативных и хранившихся при низких температурах свободных и иммобилизованных пробиотиков коррелировало с уменьшением клинических проявлений нарушений пищеварительных функций ЖКТ. В группах мышей, получавших иммобилизованные пробиотики, к 22-м суткам наблюдения клинические проявления отсутствовали. У 30% животных, получавших смеси свободных клеток и энтеросорбентов, сохранялась полифекалия, а у получавших свободные клетки пробиотиков – отдельные клинические проявления, которые были менее выражены, чем у животных, не получавших после индукции дисбиоза препараты пробиотиков и энтеросорбентов.

Параллельно с исследованиями по восстановлению популяций ценобионтов *Bifidobacterium spp.* и *Lactobacillus spp.* было проведено сравнительное микроскопическое изучение муцина толстой кишки животных всех групп. При микроскопическом анализе препаратов муцина мышей после индукции дисбиоза наблюдали характерную картину микро-

simultaneously with studies on the recovery of *Bifidobacterium spp.* and *Lactobacillus spp.* populations. Microscopic analysis of the mucin preparations of mice after dysbiosis induction revealed a characteristic microbiota of wall layer of the colon, *i. e.* presence of single gram-positive and gram-negative bacterial cells of different structures and a small amount of mucus in the vision field (Figure 1). Mucin microscopic preparations did not differ in case of treatments with cells stored and non-stored at  $-80$  and  $-196^{\circ}\text{C}$ , so thereafter the data for the cells stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  are provided.

The colon mucin in mice of groups 1–15 to day 12 of treatment (observation day 22) had increased number of cells, similar in morphology to those of *Bifidobacterium spp.* and *Lactobacillus spp.* (Fig. 2–4). Some preparations contained the particles of enterosorbents.

The yeast cells, bifidobacteria and lactobacilli were observed in the animals treated with free cells of the *S. boulardii* probiotic (groups 1–3) and a mixtures of yeast cells with enterosorbents (groups 4–9) to day 12 after treatment and in 5 days after finishing the course. In 5 days after treatment the number of yeast cells decreased. In 10 days, the yeast cells in mucin were absent (Fig. 5).

Throughout the observation period, mucin of animals of the groups of 10–15 treated with immobilized *S. boulardii* cells contained yeast cells, enterosorbent granules without cells and the ones with immobilized yeast cells, as well as the bifidobacteria and lactobacilli. The number of yeast cells in mucin in 10 days after the therapy end was insignificant.

The research results suggest a more pronounced therapeutic effect of enterosorbent-immobilized probiotics if compared to free cells. Studying internal and external mechanisms of formation and preservation of intestinal natural bacterial homeostasis revealed that aggregation of microbial cells into conglomerates (microcolonies) of different size contributed to a successful transfer of eubiotics from an external environment to a recipient and subsequent formation of intestinal microbiocenosis [25].

The conglomerates of microbial cells are formed due to co-adhesion (immobilization of cells on carriers which do not originate from living tissues). In biological aspect the colonies originated from conglomerates, unlike the clones generated from single free cells, are characterized by heterogenic population and higher probability of preserving the viability as a part of the conglomerate when exposed to damaging physical and chemical factors [11, 26]. Developed experimental products of enterosorbent-immobilized probiotics are also conglomerates with an amount of cells on their surface capable of reproduction in the local site of biotope. After adhesion of the carrier-cells complexes



**Таблица 4.** Содержание *Bifidobacterium spp.* в пристеночном муцине толстой кишки мышей с химиотерапевтическим дисбиозом кишечника после введения свободных и иммобилизованных *S. bouardii* и энтеросорбентов, *Ig* КОЕ/г,  $x \pm Sx$

**Table 4.** Content of *Bifidobacterium spp.* in parietal mucin colon of mice with chemotherapeutic intestinal dysbiosis after injection of free and immobilized *S. bouardii* cells and enterosorbents, *Ig* CFU/g,  $x \pm Sx$

Группы животных (вводимые препараты) Groups of animals (introduced preparations)	До индукции дисбиоза Before dysbiosis induction	48 ч после индукции дисбиоза (1-е сутки наблюдения) 48 h post dysbiosis induction (1 <sup>st</sup> day of observation)	12-е сутки приема препаратов (12-е сутки наблюдения) 12 <sup>th</sup> day of treatment (12 <sup>th</sup> day of observation)	10-е сутки после приема препаратов (22-е сутки наблюдения) 10 <sup>th</sup> day post treatment (22 <sup>nd</sup> day of observation)
Животные без лечения Animals without treatment			2,8 ± 0,3	3,6 ± 0,4 <sup>b</sup>
1. Свободные клетки <i>S. bouardii</i> 1. Free <i>S. bouardii</i> cells			3,5 ± 0,5	4,3 ± 0,4 <sup>b</sup>
2. Свободные клетки <i>S. bouardii</i> , хранившиеся при -80°C 2. Free <i>S. bouardii</i> cells, stored at -80°C			3,3 ± 0,4	4,3 ± 0,3 <sup>b</sup>
3. Свободные клетки <i>S. bouardii</i> , хранившиеся при -196°C 3. Free <i>S. bouardii</i> cells, stored at -196°C			3,3 ± 0,5	4,5 ± 0,5 <sup>b</sup>
4. Свободные клетки <i>S. bouardii</i> + «СУМС-1» 4. Free <i>S. bouardii</i> cells + SCMS-1			3,8 ± 0,4	4,9 ± 0,3 <sup>b</sup>
5. Свободные клетки <i>S. bouardii</i> + «Сорбекс» 5. Free <i>S. bouardii</i> + Sorbex			3,8 ± 0,5	4,9 ± 0,4 <sup>b</sup>
6. Свободные клетки <i>S. bouardii</i> , хранившиеся при -80°C, + «СУМС-1» 6. Free <i>S. bouardii</i> cells, stored at -80°C, + SCMS-1			3,8 ± 0,3	4,9 ± 0,3 <sup>b</sup>
7. Свободные клетки <i>S. bouardii</i> , хранившиеся при -80°C, + «Сорбекс» 7. Free <i>S. bouardii</i> cells, stored at -80°C, + Sorbex			3,8 ± 0,3	5,0 ± 0,5 <sup>b</sup>
8. Свободные клетки <i>S. bouardii</i> , хранившиеся при -196°C, + «СУМС-1» 8. Free <i>S. bouardii</i> cells, stored at -196°C, + SCMS-1	7,6 ± 0,5	2,1 ± 0,4	3,9 ± 0,4	4,9 ± 0,3 <sup>b</sup>
9. Свободные клетки <i>S. bouardii</i> , хранившиеся при -196°C, + «Сорбекс» 9. Free <i>S. bouardii</i> cells, stored at -196°C, + Sorbex			3,8 ± 0,5	4,91 ± 0,4 <sup>b</sup>
10. Иммобилизованные на «СУМС-1» клетки <i>S. bouardii</i> 10. Immobilized with SCMS-1 <i>S. bouardii</i> cells			4,1 ± 0,4	5,3 ± 0,3 <sup>b</sup>
11. Иммобилизованные на «Сорбексе» клетки <i>S. bouardii</i> 11. Immobilized with Sorbex <i>S. bouardii</i> cells			4,2 ± 0,3	5,3 ± 0,4 <sup>b</sup>
12. Иммобилизованные на «СУМС-1» клетки <i>S. bouardii</i> , хранившиеся при -80°C 12. Immobilized with SCMS-1 <i>S. bouardii</i> cells, stored at -80°C			4,3 ± 0,4	5,3 ± 0,3 <sup>b</sup>
13. Иммобилизованные на «Сорбексе» клетки <i>S. bouardii</i> , хранившиеся при -80°C 13. Immobilized with Sorbex <i>S. bouardii</i> cells, stored at -80°C			4,3 ± 0,4	5,4 ± 0,3 <sup>b</sup>
14. Иммобилизованные на «СУМС-1» клетки <i>S. bouardii</i> , хранившиеся при -196°C 14. Immobilized with SCMS-1 <i>S. bouardii</i> cells, stored at -196°C			4,1 ± 0,5	5,5 ± 0,4 <sup>b</sup>
15. Иммобилизованные на «Сорбексе» клетки <i>S. bouardii</i> , хранившиеся при -196°C 15. Immobilized with Sorbex <i>S. bouardii</i> cells, stored at -196°C			4,3 ± 0,3	5,4 ± 0,3 <sup>b</sup>

**Примечание:** <sup>b</sup> – статистически значимые отличия по сравнению с данными на 12-е сутки терапии ( $p < 0,05$ ).

**Note:** <sup>b</sup> – statistically significant changes if compared with data on 12<sup>th</sup> day of treatment ( $p < 0.05$ ).



**Таблица 5.** Содержание *Lactobacillus spp.* в пристеночном муцине толстой кишки мышей с химиотерапевтическим дисбиозом кишечника после введения свободных и иммобилизованных *S. boulardii* и энтеросорбентов, lg КОЕ/г,  $x \pm Sx$

**Table 5.** Content of *Lactobacillus spp.* in parietal mucin colon of mice with chemotherapeutic intestinal dysbiosis after injection of free and immobilized *S. boulardii* cells and enterosorbents, lg CFU/g,  $x \pm Sx$

Группы животных (вводимые препараты) Groups of animals (introduced preparations)	До индукции дисбиоза Before dysbiosis induction	48 ч после индукции дисбиоза (1-е сутки наблюдения) 48 h post dysbiosis induction (1 <sup>st</sup> day of observation)	12-е сутки приема препаратов (12-е сутки наблюдения) 12 <sup>th</sup> day of treatment (12 <sup>th</sup> day of observation)	10-е сутки после приема препаратов (22-е сутки наблюдения) 10 <sup>th</sup> day post treatment (22 <sup>nd</sup> day of observation)
Животные без лечения Animals without treatment			2,3 ± 0,3	3,0 ± 0,4 <sup>b</sup>
1. Свободные клетки <i>S. boulardii</i> 1. Free <i>S. boulardii</i> cells			4,2 ± 0,4	4,8 ± 0,4 <sup>b</sup>
2. Свободные клетки <i>S. boulardii</i> , хранившиеся при -80°C 2. Free <i>S. boulardii</i> cells, stored at -80°C			4,1 ± 0,4	4,8 ± 0,4 <sup>b</sup>
3. Свободные клетки <i>S. boulardii</i> , хранившиеся при -196°C 3. Free <i>S. boulardii</i> cells, stored at -196°C			4,3 ± 0,3	4,9 ± 0,5 <sup>b</sup>
4. Свободные клетки <i>S. boulardii</i> + «СУМС-1» 4. Free <i>S. boulardii</i> cells + SCMS-1			4,5 ± 0,4	5,2 ± 0,3 <sup>b</sup>
5. Свободные клетки <i>S. boulardii</i> + «Сорбекс» 5. Free <i>S. boulardii</i> + Sorbex			4,6 ± 0,4	5,3 ± 0,3 <sup>b</sup>
6. Свободные клетки <i>S. boulardii</i> , хранившиеся при -80°C, + «СУМС-1» 6. Free <i>S. boulardii</i> cells, stored at -80°C, + SCMS-1			4,5 ± 0,4	5,4 ± 0,4 <sup>b</sup>
7. Свободные клетки <i>S. boulardii</i> , хранившиеся при -80°C, + «Сорбекс» 7. Free <i>S. boulardii</i> cells, stored at -80°C, + Sorbex			4,5 ± 0,3	5,3 ± 0,3 <sup>b</sup>
8. Свободные клетки <i>S. boulardii</i> , хранившиеся при -196°C, + «СУМС-1» 8. Free <i>S. boulardii</i> cells, stored at -196°C, + SCMS-1	8,0 ± 0,4	2,4 ± 0,5	4,4 ± 0,3	5,3 ± 0,4 <sup>b</sup>
9. Свободные клетки <i>S. boulardii</i> , хранившиеся при -196°C, + «Сорбекс» 9. Free <i>S. boulardii</i> cells, stored at -196°C, + Sorbex			4,5 ± 0,4	5,4 ± 0,3 <sup>b</sup>
10. Иммобилизованные на «СУМС-1» клетки <i>S. boulardii</i> 10. Immobilized with SCMS-1 <i>S. boulardii</i> cells			4,9 ± 0,4	5,9 ± 0,3 <sup>b</sup>
11. Иммобилизованные на «Сорбексе» клетки <i>S. boulardii</i> 11. Immobilized with Sorbex <i>S. boulardii</i> cells			4,9 ± 0,4	6,0 ± 0,4 <sup>b</sup>
12. Иммобилизованные на «СУМС-1» клетки <i>S. boulardii</i> , хранившиеся при -80°C 12. Immobilized with SCMS-1 <i>S. boulardii</i> cells, stored at -80°C			4,9 ± 0,4	5,9 ± 0,3 <sup>b</sup>
13. Иммобилизованные на «Сорбексе» клетки <i>S. boulardii</i> , хранившиеся при -80°C 13. Immobilized with Sorbex <i>S. boulardii</i> cells, stored at -80°C			4,5 ± 0,3	5,9 ± 0,3 <sup>b</sup>
14. Иммобилизованные на «СУМС-1» клетки <i>S. boulardii</i> , хранившиеся при -196°C 14. Immobilized with SCMS-1 <i>S. boulardii</i> cells, stored at -196°C			5,0 ± 0,4	6,0 ± 0,4 <sup>b</sup>
15. Иммобилизованные на «Сорбексе» клетки <i>S. boulardii</i> , хранившиеся при -196°C 15. Immobilized with Sorbex <i>S. boulardii</i> cells, stored at -196°C			5,1 ± 0,4	6,2 ± 0,5 <sup>b</sup>

**Примечание:** <sup>b</sup> – статистически значимые отличия по сравнению с данными на 12-е сутки терапии ( $p < 0,05$ ).

**Note:** <sup>b</sup> – statistically significant changes if compared with data on 12<sup>th</sup> day of treatment ( $p < 0.05$ ).



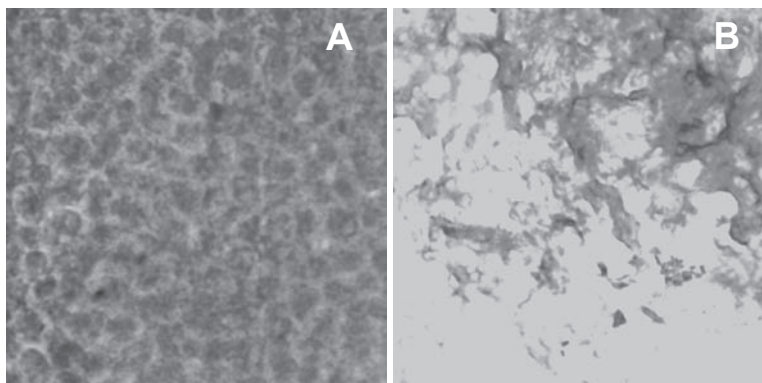
биоты пристеночного слоя толстой кишки – наличие в поле зрения единичных грамположительных и грамотрицательных микробных клеток разного строения и небольшое количество слизи (рис. 1). Микроскопические препараты муцина после терапии нативными и хранившимися при температуре  $-80$  и  $-196^{\circ}\text{C}$  клетками не отличались, поэтому далее приводятся данные для клеток, которые хранились при  $-80^{\circ}\text{C}$ .

В муцине толстой кишки мышей групп 1–15 на 12-е сутки приема препаратов (22-е сутки наблюдения) отмечали увеличение количества клеток, по морфологии сходных с клетками *Bifidobacterium spp.* и *Lactobacillus spp.* (рис. 2–4). В некоторых препаратах присутствовали частицы энтеросорбентов.

У животных, получавших свободные клетки пробиотика *S. boulandii* (группы 1–3) и смеси дрожжевых клеток с энтеросорбентами (группы 4–9), на 12-е сутки терапии и через 5 суток после окончания курса наблюдали дрожжевые клетки, клетки бифидо- или лактобактерий. Через 5 суток после окончания лечения количество дрожжевых клеток уменьшилось. Через 10 суток дрожжевые клетки в муцине отсутствовали (рис. 5).

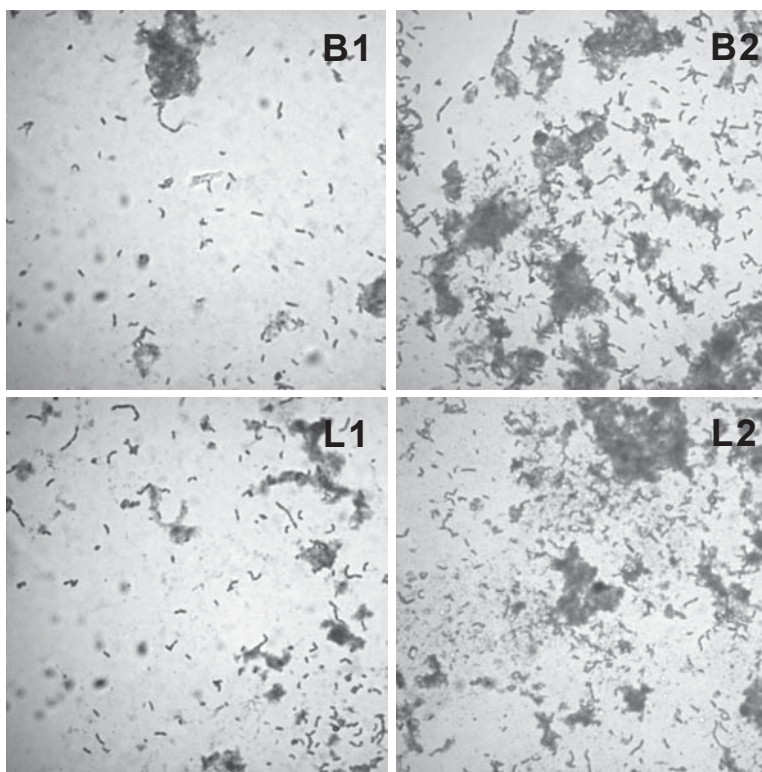
В муцине животных групп 10–15, получавших препараты иммобилизованных клеток *S. boulandii*, на протяжении всего срока наблюдений выявлялись дрожжевые клетки, гранулы энтеросорбентов без клеток и с иммобилизованными дрожжевыми клетками, а также клетки бифидо- или лактобактерий. Количество дрожжевых клеток в муцине через 10 суток после окончания курса терапии было незначительным.

Результаты исследования позволяют сделать вывод о более выраженном терапевтическом действии иммобилизованных на энтеросорбентах пробиотиков по сравнению со свободными клетками. При изучении внешних и внутренних механизмов формирования и сохранения естественного бактериального гомеостаза кишечника установлено, что успешному переносу эубиотиков из внешней среды реципиенту и последующему формированию кишечного микробиоценоза способствует агрегирование микробных клеток в разные по размеру конгломераты (микрocolонии) [9].



**Рис. 1.** Муцин толстой кишки мышей: **A** – до индукции дисбиоза; **B** – после индукции дисбиоза.  $\times 400$ .

**Fig. 1.** Murine colon mucin: **A** – before dysbiosis induction; **B** – after dysbiosis induction.  $\times 400$ .



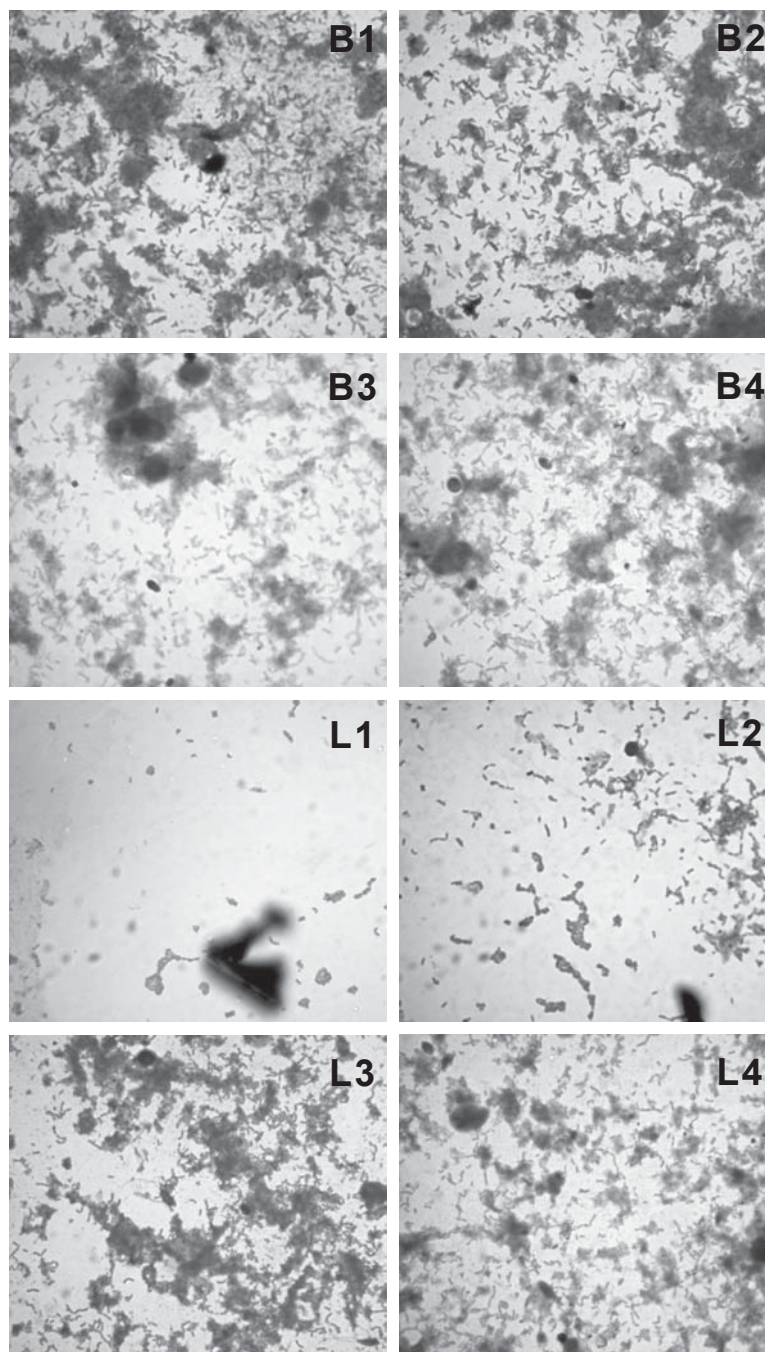
**Рис. 2.** Муцин толстой кишки мышей с дисбиозом после терапии препаратами свободных клеток *B. bifidum* (**B**) и *L. bulgaricus* (**L**), хранившимися при  $-80^{\circ}\text{C}$ : **B1**, **L1** – 12-е сутки терапии; **B2**, **L2** – через 10 суток после окончания терапии;  $\times 400$ .

**Fig. 2.** Colon mucin of mice with dysbiosis after treatment with preparations of free cells *B. bifidum* (**B**) and *L. bulgaricus* (**L**), stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ : **B1**, **L1** – day 12 of therapy; **B2**, **L2** – in 10 days after therapy end;  $\times 400$ .

to the intestinal mucosa the microcolonies are formed with a specific architecture: probiotic cells – enterosorbent granule – mucin – epithelium. During the reproduction the probiotic cells colonize the adjacent mucosa areas. In the adhesion sites of the complexes their metabolites are accumulated which inhibit the growth of opportunistic pathogenic and pathogenic microflora, and intra- and inter-species cooperative



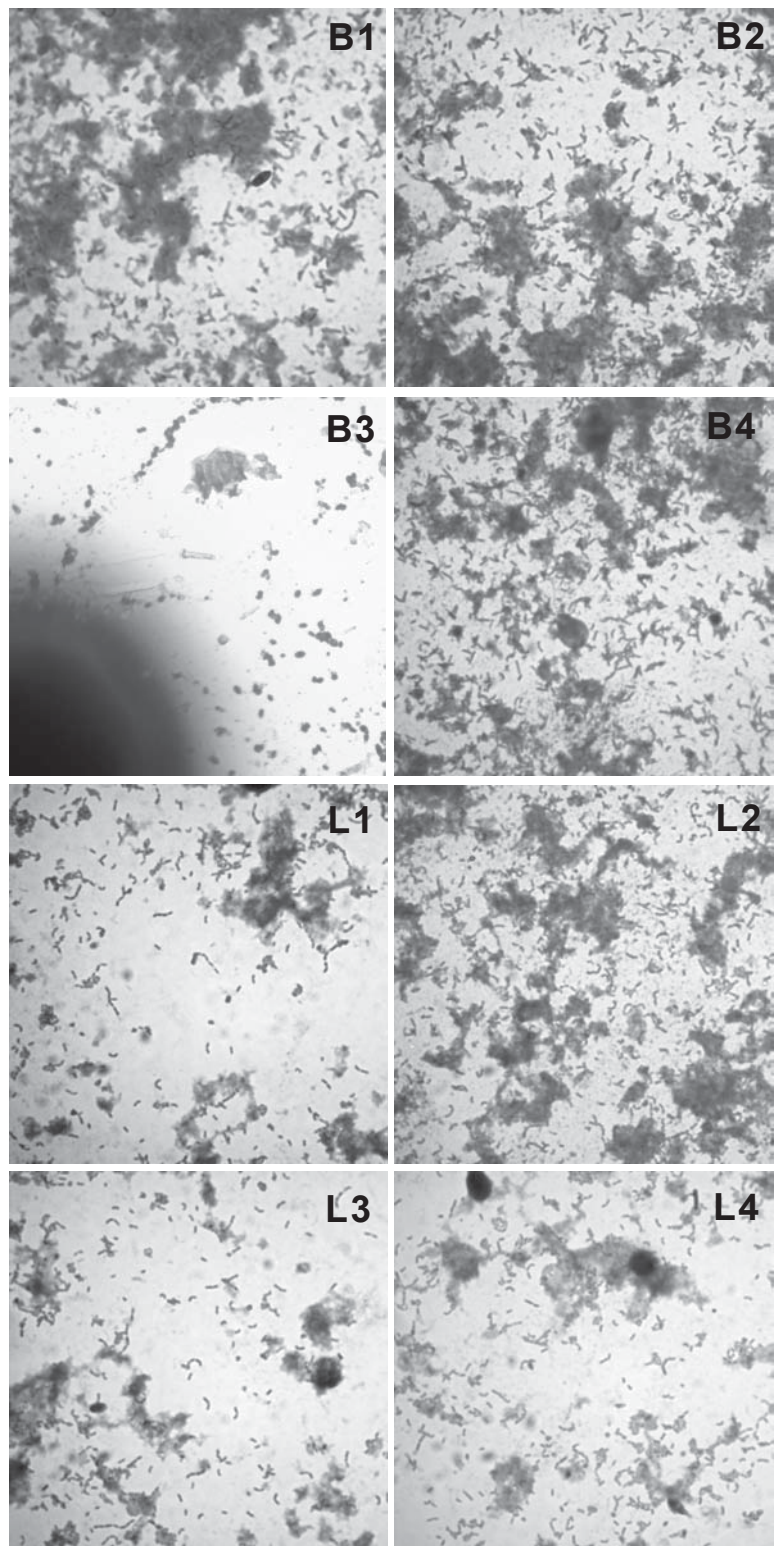
Известно, что конгломераты микробных клеток формируются за счет ко- или соадгезии (иммобилизация клеток на носителях, не являющихся структурными компонентами живых тканей). В биологическом плане образованные из конгломератов колонии, в отличие от клонов, происходящих от единичных свободных клеток, характеризуются гетерогенностью популяции и большей вероятностью сохранения жизнеспособности при воздействии повреждающих физико-химических факторов в составе конгломерата [9, 20]. Разработанные экспериментальные препараты иммобилизованных на энтеросорбентах пробиотиков также являются конгломератами, в которых на поверхности носителей находится доза клеток, способных к репродукции в локальном участке биотопа. После адгезии комплексов «носитель-клетки» к слизистой кишечника формируются микроколонии со специфической архитектоникой: клетки пробиотиков – гранула энтеросорбента – муцин – эпителий слизистой. По мере репродукции клетки пробиотиков заселяют прилегающие участки слизистой. В зоне адгезии комплекса накапливаются их метаболиты, подавляющие рост условно-патогенной и патогенной микрофлоры, и устанавливаются внутри- и межвидовые кооперативные связи с другими зубиотическими сочленами кишечного микробиоценоза. По мере освобождения от иммобилизованных клеток пробиотиков энтеросорбент может реализовать и детоксикационную функцию, адсорбируя из кишечника токсины. Все перечисленные процессы способствуют восстановлению популяций ценобионтов. При этом речь не идет о селективном заселении муцина штаммами пробиотиков, которые вводили в кишечник. В экспериментах с пробиотиками *B. bifidum* и *L. bulgaricus* (см. табл. 1, 2) мы не имели технической возможности идентифицировать виды и штаммы бифидо- или лактобактерий из биоптатов слизистой животных через 10 суток после окончания терапии. Популяции *Bifidobacterium spp.* и *Lactobacillus spp.* могут восстановиться за счет как вводимых штаммов, так



**Рис. 3.** Муцин толстой кишки мышей с дисбиозом после терапии смесями энтеросорбентов и клеток, хранившихся при  $-80^{\circ}\text{C}$ : **B1** – *B. bifidum* + «Сорбекс» (12-е сутки терапии); **B2** – *B. bifidum* + «Сорбекс» (через 10 суток после окончания терапии); **B3** – *B. bifidum* + «СУМС-1» (12-е сутки терапии); **B4** – *B. bifidum* + «СУМС-1» (через 10 суток после окончания терапии); **L1** – *L. bulgaricus* + «Сорбекс» (12-е сутки терапии); **L2** – *L. bulgaricus* + «Сорбекс» (через 10 суток после окончания терапии); **L3** – *L. bulgaricus* + «СУМС-1» (12-е сутки терапии); **L4** – *L. bulgaricus* + «СУМС-1» (через 10 суток после окончания терапии);  $\times 400$ .

**Fig. 3.** Colon mucin of mice with dysbiosis after treatment with mixtures of enterosorbents and the cells stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ : **B1** – *B. bifidum* + Sorbex ( day 12 of therapy); **B2** – *B. bifidum* + Sorbex (10 days later the therapy end); **B3** – *B. bifidum* + SCMS-1 (day 12 of therapy); **B4** – *B. bifidum* + SCMS-1 (10 days later the therapy end); **L1** – *L. bulgaricus* + Sorbex (day 12 of therapy); **L2** – *L. bulgaricus* + Sorbex (10 days later the therapy end); **L3** – *L. bulgaricus* + SCMS-1 (day 12 of treatment); **L4** – *L. bulgaricus* + SCMS-1 (10 days later the therapy end );  $\times 400$ .





**Рис. 4.** Муцин толстой кишки мышей с дисбиозом после терапии препаратами пробиотиков, иммобилизованных на энтеросорбентах: **B1** – *B. bifidum* – «Сорбекс» (12-е сутки терапии); **B2** – *B. bifidum* – «Сорбекс» (через 10 суток после окончания терапии); **B3** – *B. bifidum* – «СУМС-1» (12-е сутки терапии); **B4** – *B. bifidum* – «СУМС-1» (через 10 суток после окончания терапии); **L1** – *L. bulgaricus* – «Сорбекс» (12-е сутки терапии); **L2** – *L. bulgaricus* – «Сорбекс» (через 10 суток после окончания терапии); **L3** – *L. bulgaricus* – «СУМС-1» (12-е сутки терапии); **L4** – *L. bulgaricus* – «СУМС-1» (через 10 суток после окончания терапии);  $\times 400$ .

**Fig. 4.** Colon mucin of mice with dysbiosis after therapy with probiotics immobilized on enterosorbents: **B1** – *B. bifidum* – Sorbex (day 12 of therapy); **B2** – *B. bifidum* – Sorbex (10 days later the therapy); **B3** – *B. bifidum* – SCMS-1 (day 12 of therapy); **B4** – *B. bifidum* – SCMS-1 (10 days later the therapy end); **L1** – *L. bulgaricus* – Sorbex (day 12 of therapy); **L2** – *L. bulgaricus* – Sorbex (10 days later the therapy); **L3** – *L. bulgaricus* – SCMS-1 (day 12 of therapy); **L4** – *L. bulgaricus* – SCMS-1 (10 days later the therapy);  $\times 400$ .

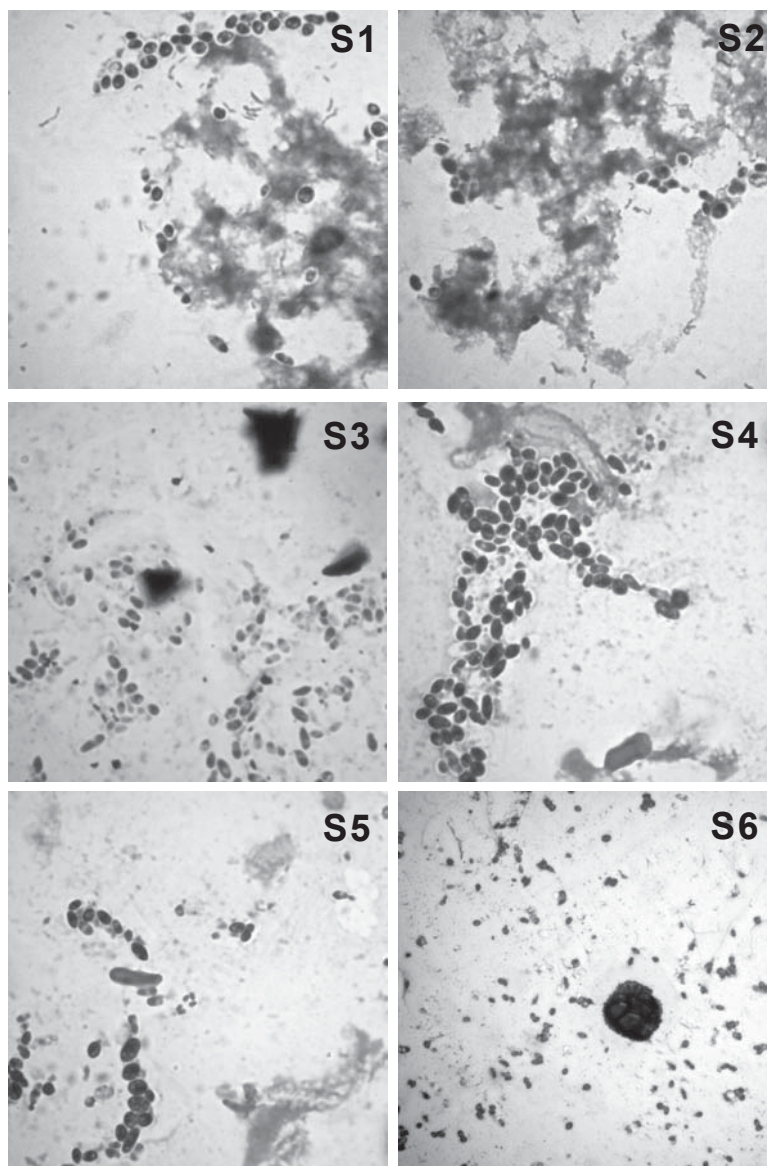
и других видов этих бактерий, которые сохранились в кишечнике после индукции дисбиоза. Существует другой более вероятный вариант, поскольку ценобионты (представители аутомикрофлоры) имеют больше преимуществ при установлении симбиотических отношений с организмом хозяина [10, 21, 22].

Дрожжи *S. cerevisiae* не относятся к микробиоте теплокровных животных и не способны адгезиро-

relationships are established with other eubiotic members of intestinal microbiocenosis. With the release of immobilized cells of probiotics the enterosorbent could realize its detoxification function as well, by adsorbing toxins from the intestines. All these processes contribute to the restoration of cenobiont populations. Nevertheless, there is no selective populating of mucin with the strains of probiotics which were







**Рис. 5.** Муцин толстой кишки мышей с дисбиозом после терапии препаратами *S. boulardii*, иммобилизованных на энтеросорбентах после хранения при  $-80^{\circ}\text{C}$ : **S1** – *S. boulardii* – «Сорбекс» (12-е сутки терапии); **S2** – *S. boulardii* – «Сорбекс» (через 5 суток после окончания терапии); **S3** – *S. boulardii* – «Сорбекс» (через 10 суток после окончания терапии); **S4** – *S. boulardii* – «СУМС-1» (12-е сутки терапии); **S5** – *S. boulardii* – «СУМС-1» (через 5 суток после окончания терапии); **S6** – *S. boulardii* – «СУМС-1» (через 10 суток после окончания терапии);  $\times 400$ .

**Fig. 5.** Colon mucin of mice with dysbiosis after therapy with *S. boulardii* preparations, immobilized on enterosorbents after storage at  $-80^{\circ}\text{C}$ : **S1** – *S. boulardii* – Sorbex (day 12 of therapy); **S2** – *S. boulardii* – Sorbex (5 days later the therapy end); **S3** – *S. boulardii* – Sorbex (10 days later the therapy end); **S4** – *S. boulardii* – SCMS-1 (day 12 of therapy); **S5** – *S. boulardii* – SCMS-1 (5 days later the therapy end); **S6** – *S. boulardii* – SCMS-1 (10 days later the therapy end);  $\times 400$ .

вать к слизистой кишечника [26, 27, 31], однако клиническая эффективность их применения для лечения ряда патологий взрослых и острых гастроэнтеритов, а также предотвращения антибиотик-связанной диареи у детей описана в ряде исследований и метаанализах [25, 26, 30]. Применение *S. cerevisiae* рекомендовано Европейским обществом детской гастроэнтерологии, гепатологии и питания (ESPGHAN) и Европейским обществом детских инфекций [31].

В данной работе показано, что введение животным с экспериментальным дисбиозом свободных клеток *S. boulardii*, смесей свободных клеток с энтеросорбентами и клеток, иммобилизованных на энтеросорбентах, способствовало повышению в муцине количества бифидо- и лактобактерий (см. табл. 4). При этом на 22-е сутки наблюдения концентрация бифидо- или лактобактерий была близка к значениям до формирования дисбиоза.

introduced into the intestine. In the experiments with *B. bifidum* and *L. bulgaricus* probiotics (see Table 1 and 2) we had no technical possibilities to identify the species and strains of bifidobacteria or lactobacilli in the mucosal biopsies of the animals 10 days later the end of therapy. The populations of *Bifidobacterium spp.* and *Lactobacillus spp.* could recover both due to the strains introduced and as well as other types of bacteria surviving in the gut after dysbiosis induction. The second option is more likely because cenobionts (automicroflora representatives) have more advantages in establishing a symbiotic relationship with the host body [14, 15, 17].

*S. cerevisiae* yeasts are not referred to microbiota of homoiothermal animals and are not able to adhere to intestinal mucosa [12, 13, 27], but their clinical efficacy during treatment of several pathologies in adults, as well as acute gastroenterites and prevention of antibiotic-associated diarrhea in children is described



В работе также отмечена роль комплексов «носитель-клетки» как депо «транзиторного» пробиотика, который элиминирует из кишечника через определенное время после введения. Комплексы адгезируют к муцину слизистой оболочки поверхностью носителя. В этом локусе микроколония дрожжевых клеток, иммобилизованных на носителе, благодаря своим специфическим свойствам [29] подавляет условно-патогенную и патогенную микрофлору, создает условия для заселения слизистой бифидо- или лактобактериями и их дальнейшей репродукции. Под действием продвигающегося по просвету кишечника химуса происходит десорбция дрожжевых клеток с носителей и последующая их элиминация. Об этом свидетельствует снижение концентрации дрожжевых клеток через 10 суток после окончания курса терапии на  $2,8-3,1 \lg \text{КОЕ/г}$  в муцине животных групп 10–15.

Хранение препаратов при температурных режимах  $-80$  и  $-196^\circ\text{C}$  не влияет на колонизационные свойства бифидо-, лактобактерий и способность носителей-энтеросорбентов адгезировать к слизистой кишечника. В отличие от препаратов свободных клеток пробиотиков и частиц или гранул энтеросорбентов комплексы «носитель-клетки» представляют собой качественно новый препарат, имеющий преимущества при введении в ЖКТ. Данные исследования могут быть использованы в разработке новых классов коммерческих препаратов пробиотиков.

### Выводы

Препараты пробиотиков, иммобилизованных на энтеросорбентах, обеспечивают более быстрое и полное восстановление популяций ценобионтов *Bifidobacterium spp.* и *Lactobacillus spp.* у животных с экспериментальным дисбиозом кишечника по сравнению с препаратами свободных клеток и смесей свободных клеток с энтеросорбентами. Выраженный терапевтический эффект иммобилизованных на энтеросорбентах пробиотиков связан с тем, что они представляют собой конгломераты, в которых на поверхности носителя находится репродуктивная доза клеток. Комплексы «носитель-клетки» адгезируют к муцину слизистой, а сформировавшиеся в этих локусах микроколонии пробиотиков создают условия, необходимые для восстановления популяций ценобионтов.

Хранение при температуре  $-80$ ,  $-196^\circ\text{C}$  в течение года не влияло на колонизационные свойства бактерий *B. bifidum*, *L. bulgaricus* и на способность дрожжей *S. boulardii* к персистенции в муцине слизистой. Данные температурные режимы можно использовать для долгосрочного хранения жидких форм пробиотических препаратов, иммобилизованных на сорбентах.

in several studies and meta-analyzes [10, 12, 21]. Application of *S. cerevisiae* is recommended by the European Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) and the European Society for Paediatric Infectious Diseases [27].

This study demonstrates that the animals with experimental dysbiosis treated with free *S. boulardii* cells, mixtures of free cells with enterosorbents and the ones immobilized on enterosorbents had an increased amount of bifidobacteria and lactobacilli in mucin (see Table 4). The concentration of bifidobacteria or lactobacilli to observation day 22 was close to the values prior to the dysbiosis formation. The carrier-cells complexes served also as a depot of 'transient' probiotic, leaving the intestine in a certain time after introduction. The complexes adhered to the mucous membrane mucin by the carrier surface. Due to its specific properties [19] the microcolony of yeast cells immobilized on a carrier, suppressed opportunistic pathogenic and pathogenic microflora, provided the conditions for populating mucosa with bifidobacteria or lactobacilli and their subsequent reproduction. Under the influence of chyme advancing through the intestine lumen there was a desorption of yeast cells from the carriers and their following elimination. This was evidenced by a reduced concentration of yeast cells 10 days later the therapy end by  $2.8-3.1 \lg \text{CFU/g}$  in mucin of the animals of groups 10–15.

Storage of the products at temperatures of  $-80$  and  $-196^\circ\text{C}$  did not affect the colonization properties of bifidobacteria, lactobacilli and the ability of the carriers-entersorbents to adhere to intestinal mucosa. Unlike the preparations of free cells of probiotics and particles or granules of enterosorbents the carrier-cells complexes are a novel medical product providing the benefits when administered into a digestive tract. These studies can be used when developing new classes of probiotic commercial products.

### Conclusions

The preparations of probiotics immobilized on enterosorbents provide a rapid and complete recovery of *Bifidobacterium spp.* and *Lactobacillus spp.* cenobiont populations in animals with experimental intestinal dysbiosis compared to the preparations of free cells and the mixtures of free cells with enterosorbents. A significant therapeutic effects of enterosorbent-immobilized probiotics is due to the fact that they are conglomerates representing a carrier with a reproductive dose of cells on its surface. The carrier-cells complexes adhere to mucosal mucin and the microcolonies of probiotics formed in these loci provide the conditions which are necessary for the recovery of cenobiont populations.

Storage at  $-80$ ,  $-196^\circ\text{C}$  for one year did not affect the colonizing properties of *B. bifidum*, *L. bulgaricus*



## Литература

1. Ардатская М.Д. Пре- и пробиотики в коррекции микробиологических нарушений кишечника // Фарматека. – 2011. – Т. 225, №12. – С. 62–68.
2. Бабинец О.М. Коррекция экспериментального дисбиоза препаратами пробиотиков, иммобилизованными на энтеросорбентах, после их низкотемпературного хранения // Вісник проблем біології і медицини. – 2012. – Вип. 4, Т. 1, Ч. 2. – С. 72–78.
3. Бабинец О.М. Оценка свойств пробиотиков, иммобилизованных на энтеросорбентах, после низкотемпературного хранения // Вісник проблем біології і медицини. – 2012. – Вип. 3, Ч. 2. – С. 48–53.
4. Бондаренко А.В. Корекція дисбіотичних станів і стабілізація мікробіоти // Проблеми безперервної мед. освіти та науки. – 2014. – №2. – С. 77–80.
5. Бондаренко В.М. Обоснование и тактика назначения в медицинской практике различных форм пробиотических препаратов // Фарматека. – 2012. – Т. 246, №13. – С. 77–87.
6. Волков М.Ю. Эффективные формы пробиотиков, иммобилизованных на природных адсорбентах // Пищевые ингредиенты. Сырье и добавки. – 2007. – №1. – С. 48–51.
7. Воробьев А.А., Несвижский Ю.В., Буданова Е.В., Зуденков А.Е. Сравнительное изучение пристеночной и просветной микрофлоры толстой кишки в эксперименте на мышах // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2001. – №1. – С. 62–67.
8. Высеканцев И.П., Бабинец О.М., Марценюк В.Ф., Шатилова Л.Е. Сравнительное изучение адсорбции стандартных маркеров и пробиотиков *Saccharomyces boulardii* и *Bifidobacterium bifidum* на энтеросорбентах // Вісник проблем біології і медицини. – 2011. – Вип. 1. – С. 58–62.
9. Григорьев А.В. Общие принципы формирования кишечного микробиоценоза человека // Мед. всевіт. – 2002. – №1–2. – С. 168–173.
10. Дисбиоз кишечника. Руководство по диагностике и лечению. – 2-е изд., испр. и доп. / Под ред. Е.И. Ткаченко, А.Н. Суворова. – СПб: Информ Мед, 2009. – 276 с.
11. Дранник Г.Н., Курченко А.И., Дранник А.Г. Иммунная система слизистых, физиологическая микрофлора и пробиотики. – К.: Полиграф Плюс, 2009. – 143 с.
12. Ермоленко Е.И., Донец В.Н., Дмитриева Ю.В. и др. Влияние пробиотических энтерококков на функциональные характеристики кишечника крыс при дисбиозе, индуцированном антибиотиками // Вестник Санкт-Петербург. ун-та. – 2009. – Сер. 11: Медицина, №1. – С. 157–167.
13. Западнюк И.П., Западнюк В.И., Захария Е.А., Западнюк Б.В. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте. – 3-е изд., перераб. и доп. – К.: Вища шк., 1983. – 383 с.
14. Клинические аспекты диагностики и лечения дисбиоза кишечника в общетерапевтической практике: Учеб.-метод. пособие / Под ред. В.И. Симаненко. – СПб, 2003. – 36 с.
15. Луста К.А., Фихте Б.А. Методы определения жизнеспособности микроорганизмов. – Пушино: ОНТИ НЦБИ АН СССР, 1990. – 186 с.
16. Медицинская микробиология. Ч. 1 / Под ред. А.М. Королюка, В.Б. Сбойчакова. – СПб: ЭЛБИ–СПб, 2002. – 267 с.
17. Морозов И.А. Проблемы морфологической диагностики *Helicobacter pylori* в желудке // Рос. журнал гастроэнтерологии. – 1999. – №2. – С. 46–48.
18. Поляк М.С., Сухаревич В.И., Сухаревич М.Э. Питательные среды для медицинской микробиологии. – СПб, 2008. – С. 53–56.
19. Соловьева И.В., Точилина А.Г., Белова И.В. и др. Конструирование иммобилизованной формы жидкого пробиотика // Вестник Нижегород. ун-та им. Н.И. Лобачевского: Микробиология и эпидемиология. – 2012. – №2, Ч. 3. – С. 85–92.
20. Lusta K.A., Fichte B.A. Methods for determining the viability of bacteria and the ability of the *S. boulardii* yeast to persistence in the mucosa mucin. These temperature conditions can be used for long-term storage of liquid forms of sorbent-immobilized probiotic preparations.

## References

1. Ardatskaya M.D. Prebiotics and probiotics in correction of microecological violations of intestinal tract. Pharmateca 2011; 225(12): 62–68.
2. Babinets O.M. Correction of dysbiosis by preparations of probiotics immobilized on enterosorbents after their low-temperature storage. Visnyk Problem Biologii i Meditsyny 2012; Issue 4, 1 (96): 72–78.
3. Babinets O.M. Estimation of properties of probiotics immobilized on enterosorbents after low-temperature storage. Visnyk Problem Biologii i Meditsyny 2012; (3, Part 2): 48–53.
4. Bondarenko A.V. Correction of dysbiotic states and stabilizing of microbiota. Problemy Bezpererovnoyi Med Osvity ta Nauky 2014; (2): 77–80.
5. Bondarenko V.M. Substantiation and tactics of administration of different forms of probiotic preparations in medical practice. Pharmateca. 2012; 246 (13): 77–87.
6. Collins M.D., Gibson G.R. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. Am J Clin Nutr 1999; 69 (5): 1052S–1057S.
7. Ding W.K., Shah N.P. Effect of various encapsulating materials on the stability of probiotic bacteria. J Food Sci 2009; 74(2):100–107.
8. Dranik G.N., Kurchenko A.I., Dranik A.G. Mucosal immune system, the physiological microflora and probiotics. Kiev: Poligraf plus; 2009.
9. Ermolenko E.I., Donets V.N., Dmitrieva Yu.V. et al. Effect of probiotic enterococci on the functional characteristics of the rat intestinal dysbiosis when induced by antibiotics. Vestnik of St. Petersburg University, Ser. 11: Medicine 2009; (1): 157–167.
10. Floch M.H. Recommendations for probiotic use in humans – A 2014 update. Pharmaceuticals 2014; 7 (10): 999–1007.
11. Grigoryev A.V. General principles of the human intestinal microbiota. Med Vsesvit 2002; (1–2): 168–173.
12. Guarner F., Khan A.G., Garisch J. et al. World Gastroenterology Organisation Global Guidelines: probiotics and prebiotics, october 2011. J Clin Gastroenterol 2012; 46 (6): 468–481.
13. Guidelines for the evaluation of probiotics in food: Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canada; 2002.
14. Intestinal dysbiosis. Guidelines for the diagnosis and treatment. St. Petersburg: InformMed; 2009.
15. Jankowski D.S. Microbial ecology of man: contemporary possibilities of its maintenance and recovery. Kiev: Expert LTD; 2005.
16. Kailasapathy K. Microencapsulation of Probiotic Bacteria: Technology and potential applications. Curr Issues Intest Microbiology 2002; 3 (2): 39–48.
17. Kharchenko N.V., Chernenko V.V., Yankovsky D.S., Dyment G.S. Role of the intestinal microflora in the development of chronic diseases of the gastrointestinal tract. Zhurnal Praktychnogo Likarya 2003; (4): 20–27.
18. Korolyuk A.M., Sboychakov V.B., editors. Medical microbiology. Part 1. St.-Petersburg: Meditsyna; 2002.
19. Krasowska A., Murzyn A., Dyjankiewicz A. et al. The antagonistic effect of *Saccharomyces boulardii* on *Candida albicans* filamentation, adhesion and biofilm formation. FEMS Yeast Research 2009; 9(8): 1312–1321.
20. Lusta K.A., Fichte B.A. Methods for determining the viability of microorganisms. Pushchino; 1990.



20. Тутченко Л.І., Отт В.Д., Марушко Т.Л. та ін. Особливості формування системи мікробіоценозу у новонароджених та немовлят та шляхи його оптимізації // Журнал практичного лікаря. – 2003. – №5. – С. 24–30.
21. Харченко Н.В., Черненко В.В., Янковский Д.С., Дымент Г.С. Роль кишечной микрофлоры в развитии хронических заболеваний желудочно-кишечного тракта // Журнал практичного лікаря. – 2003. – №4. – С. 20–27.
22. Янковский Д.С. Микробная экология человека: современные возможности ее поддержания и восстановления. – К.: Эксперт ЛТД, 2005. – 362 с.
23. Collins M.D., Gibson G.R. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut // *Am. J. Clin. Nutr.* – 1999. – Vol. 69, №5. – P. 1052S–1057S.
24. Ding W.K., Shah N.P. Effect of various encapsulating materials on the stability of probiotic bacteria // *J. Food Sci.* – 2009. – Vol. 74, №2. – P. 100–107.
25. Floch M.H. Recommendations for probiotic use in humans – A 2014 Update // *Pharmaceuticals.* – 2014. – Vol. 7, №10. – P. 999–1007.
26. Guarner F., Khan A.G., Garisch J. et al. World Gastroenterology Organisation Global Guidelines: probiotics and prebiotics, October 2011 // *J. Clin. Gastroenterol.* – 2012. – Vol. 46, №6. – P. 468–481.
27. Guidelines for the evaluation of probiotics in food: Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. – London, Ontario, Canada, 2002. – 11 p.
28. Kailasapathy K. Microencapsulation of probiotic bacteria: technology and potential applications // *Curr. Issues Intest. Microbiology.* – 2002. – Vol. 3, №2. – P. 39–48.
29. Krasowska A., Murzyn A., Dyankiewicz A. et al. The antagonistic effect of *Saccharomyces boulardii* on *Candida albicans* filamentation, adhesion and biofilm formation // *FEMS Yeast Research.* – 2009. – Vol. 9, №8. – P. 1312–1321.
30. Micklefield G. *Saccharomyces boulardii* in the treatment and prevention of antibiotic-associated diarrhea // *MMW Fortschr. Med.* – 2014. – Vol. 156, №13. – P. 61.
31. Vandenplas Y., Brunser O., Szajewska H. *Saccharomyces boulardii* in childhood // *Eur. J. Pediatr.* – 2009. – Vol. 168, №3. – P. 253–265.
32. Williams N.T. Probiotics // *Am. J. Health Sys. Pharm.* – 2010. – Vol. 67, №6. – P. 449–458.
33. Micklefield G. *Saccharomyces boulardii* in the treatment and prevention of antibiotic-associated diarrhea. *MMW Fortschr. Med.* 2014; 156 (13): 61.
34. Morozov I.A. Problems of *Helicobacter pylori* morphological diagnosis in the stomach. *Russian Journal of Gastroenterology* 1999; (2): 46–48.
35. Polyak M.S., Sukharevich M.E., Sukharevich V.I. Culture media for medical microbiology. SPb; 2008: 53–56.
36. Simanenko V.I., editor. Clinical aspects of diagnosis and treatment of intestinal dysbiosis in general therapeutic practice. St. Petersburg; 2003.
37. Solovyeva I.V., Tochilina A.G., Belova I.V. et al. Construction of an immobilized form of the liquid probiotic. *Vestnik of Nizhny Novgorod University named after N.I. Lobachevsky: Microbiology and Epidemiology* 2012; (2, part 3): 85–92.
38. Tutchenko L.I., Ott V.D., Marushko T.L. et al. Peculiarities of microbiocenosis formation process in infants and newborns and the ways of its optimization. *Zhurnal Praktychnogo Likarya* 2003; (5): 24–30.
39. Vandenplas Y., Brunser O., Szajewska H. *Saccharomyces boulardii* in childhood. *Eur J Pediatr* 2009; 168 (3): 253–265.
40. Volkov M.Yu. Effective forms of probiotics immobilized on natural adsorbents. *Pischevye Ingredienty. Syrio i Dobavki* 2007; (1): 48–51.
41. Vorob'ev A.A., Nesvizhskii Iu.V., Zudenkov A.E., Budanova E.V. Comparative study of parietal and lumen microflora in the large intestine in experiments on mice. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunologii* 2001 Jan–Feb; (1): 62–67.
42. Vysekantsev I.P., Babinets O.M., Martsenyuk V.P., Shatilova L.E. Comparative study of adsorption of standard markers and *Saccharomyces boulardii*, *Bifidobacterium bifidum* probiotics on enterosorbents. *Visnyk Problem Biologii i Meditsyny* 2011; Issue 1: 58–62.
43. Williams N.T. Probiotics. *Am J Health Sys Pharm* 2010; 67(6): 449–458.
44. Zapadnyuk I.P., Zapadnyuk V.I., Zacharias E.A., Zapadnyuk B.V. Laboratory animals. Breeding, keeping and use in experiment. Kiev: Vyshcha shkola, 1983: 383.

