

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **038255**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2021.07.30**

**(51)** Int. Cl. *A61K 35/742* (2015.01)  
*C12N 1/20* (2006.01)

**(21)** Номер заявки  
**201892305**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2016.06.30**

---

**(54) BACILLUS COAGULANS МТСС 5856 ДЛЯ КОНТРОЛЯ ТЕЧЕНИЯ БОЛЬШОГО ДЕПРЕССИВНОГО РАССТРОЙСТВА**

---

**(43)** **2019.06.28**

**(86)** **PCT/US2016/040290**

**(87)** **WO 2018/004586 2018.01.04**

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**САМИ ЛАБС ЛИМИТЕД (IN)**

**(72)** Изобретатель:  
**Маджид Мухаммед, Нагабхушанам  
Кальянам (US), Арумугам Сивакумар,  
Али Фуркан (IN)**

**(74)** Представитель:  
**Харин А.В., Стойко Г.В., Буре Н.Н.  
(RU)**

**(56)** (KUMAR, V et al.) To assess the effectiveness of study medication LactoSporein comparison with Placebo i.e. a substance with no effect in patients suffering from Major Depressive Disorder in Inflammatory Bowel Syndrome. 10 July 2015 [Retrieved on 19 August 2016], Clinical Trials Registry - India, REF/2015/04/008805; Retrieved from the Internet: <URL: <http://ctri.nic.in/Clinicaltrial/s/showallp.php?mid1=11417&EncHid=&userName=CTRI/2015/05/005754>>; pages 1, 3, 5

(FITZPATRICK, LR et al.) Bacillus coagulans GBI-30, 6086 limits the recurrence of Clostridium difficile-Induced colitis following vancomycin withdrawal in mice. Gut Pathogens. 22 October 2012, Vol. 4, No. 1; pages 1-9; DOI: 10.1186/1757-4749-4-13  
US-A1-20150202238  
US-A1-20150173374

---

**(57)** В настоящем изобретении раскрыто применение пробиотиков для терапии большого депрессивного расстройства (БДР). В частности, в изобретении раскрыт способ терапии БДР у млекопитающих с синдромом раздраженного кишечника с использованием пробиотического штамма *Bacillus coagulans* МТСС 5856.

---

**B1**

**038255**

**038255 B1**

### Область техники

Изобретение в целом относится к пробиотикам и их терапевтическому потенциалу. Более конкретно настоящее изобретение относится к *Bacillus coagulans* MTCC 5856 для лечения большого депрессивного расстройства.

### Описание уровня техники

Большое депрессивное расстройство (БДР) характеризуется повышенной заболеваемостью, смертностью, функциональными нарушениями, снижением качества жизни, значительными расходами на медицинское обслуживание и повышенным риском самоубийства, потерей интереса или удовольствия, нарушением сна или аппетита, упадком сил и чувствами вины или низкой самооценки (Greden et al., *J Clin Psychiat.* 2001, 62: 26-31; Tranter et al., *J Psychiat Neurosci.* 2002, 27:241-247; Uher et al, *Depress Anxiety.* 2014, 31: 459-471). БДР является одним из наиболее распространенных психических расстройств во всем мире, с распространенностью в течение жизни, составляющей 16,2%, и распространенностью за 12 месяцев, составляющей 6,6% в развитых странах (Trivedi et al., *CNS Spectr.* 2007, 12: 1-27). По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ, 2010 г.), БДР чаще всего приводит к недееспособности по сравнению со всеми психическими и поведенческими расстройствами. Результаты Национального исследования по употреблению наркотиков и здоровью в 2014 г. (NSDUH) показали, что в 2014 году 11,4% молодых людей в возрасте от 12 до 17 лет (2,8 млн подростков) за прошлый год имели большой депрессивный эпизод (БДЭ) ("Центр по статистике и качеству поведенческого здоровья", 2015 год). Молодые люди в возрасте от 12 до 17 лет в 2014 г., имевшие БДЭ за прошлый год, с большей вероятностью использовали какие-либо незаконные наркотические средства, чем те, у которых за прошлый год не было БДЭ (33,0% против 15,2%). Nierenberg и DeCesso пришли к выводу, что, хотя изначально терапия антидепрессантами облегчает симптомы депрессии у пациентов, только 50-60% пациентов с большим депрессивным расстройством отвечают на терапию (Nierenberg and DeCesso, *J Clin Psychiat.* 2001, 62: 5-9). Кроме того, у 30-40% пациентов, страдающих от БДР, не удается добиться исчезновения симптомов при проведении стандартного лечения антидепрессантами (Amsterdam and HornigRohan, *Psychiatr Clin North Am.* 1996, 19:371-386.; Nierenberg and Amsterdam, *J Clin Psychiat.* 1990, 51:39-47). Связь между БДР и нарушенной микрофлорой кишечника позиционируется в рамках концепции двунаправленной передачи сигналов между мозгом и микрофлорой кишечника и ее роли в гомеостазе организма. Считается, что стабильная микрофлора кишечника необходима для нормальной физиологии кишечника и, как полагают, она способствует надлежащей передаче сигналов по каналу мозг-кишечник, обеспечивая здоровый статус индивидуума. В свою очередь, дисбактериоз кишечника может неблагоприятно влиять на физиологию кишечника, приводя к некорректной передаче сигналов между кишечником и мозгом и связанным с этим пагубным последствиям для нормального функционирования ЦНС (центральной нервной системы) у индивидуумов. (Sue Grenham et al., *Front Physiol.* 2011, 2: 1-15). Хотя в целом можно понять, что "пробиотики" представляют собой организмы или вещества на их основе, вносящие вклад в баланс микрофлоры кишечника, тем самым принося пользу здоровью хозяина (ФАО (Продовольственная и сельскохозяйственная организация ООН)/ВОЗ, 2002 в комбинации с Fuller R, *Gut* 1991, 32 (4): 439-442), и что модификация микробной экологии с помощью пробиотической терапии может быть использована терапевтически для лечения стрессовых реакций и симптомов тревоги и депрессии (Krabbe et al., *Brain Behav Immun.* 2005, 19: 453-460; Ait-Belgnaoui et al., *Psychoneuroendocrinology.* 2012, 37:1885-95; De Palma et al., *J Physiol.* 2014, 592: 2989-2997), для создания эффективного пробиотика необходимо установить специфичность микробов, ответственных за это действие, у совершенно стандартного лабораторного животного (Fuller R, *Gut* 1991, 32 (4): 439-442). Скорее, необходимо полностью охарактеризовать и изучить конкретный пробиотический микроб, его способность выполнять роль защитной микрофлоры кишечника и, кроме того, его способность приносить конкретную, связанную пользу здоровью животного. Vasiljevic et al., *Int. Dairy J.* 2008, 18: 714-728 указали, что польза пробиотиков для здоровья очень штамм-специфична, и не существует одного универсального штамма, который обеспечивал бы все предлагаемые преимущества, и не все штаммы одного и того же вида могут эффективно использоваться для лечения определенного нарушения здоровья. Индивидуальные штаммы необходимо тестировать в отношении каждого свойства, поскольку свойства пробиотиков обычно штамм-специфичны (Verdenelli et al., *Eur J Nutr.* 2009, 48 (6): 355-63). Сообщается, что действие пробиотиков в отношении производства биоактивных добавок для специфичных иммуномодулирующих или неврологических действий (Hyland & Stanton. Editor(s): *The Gut-Brain Axis*, (2016) 1st Edition: *Dietary, Probiotic, and Prebiotic Interventions on the Microbiota*), контроля массы тела (Million et al., *Microb Pathog.* 2013; 55: 52-54.) является вид- и штамм-специфичным.

Отсутствие полноценных доказательств защитного действия и конкретных преимуществ для здоровья каждого потенциального пробиотического штамма является технической проблемой в области терапии пробиотиками. Настоящее изобретение решает одну из таких технических проблем путем представления доказательств *in vivo* защитного действия *Bacillus coagulans* MTCC 5856 при большом депрессивном расстройстве (БДР), связанном с синдромом раздраженного кишечника (СРК). Таким образом, основной задачей настоящего изобретения является раскрытие эффективности *Bacillus coagulans* MTCC 5856 в облегчении симптомов большого депрессивного расстройства (БДР) у пациентов с синдромом

раздраженного кишечника (СРК). Хотя в данном случае БДР, связанное с СРК, представлено в качестве иллюстративного примера, изобретение также охватывает терапевтическое действие *Bacillus coagulans* МТСС 5856 в терапии БДР в целом.

Настоящее изобретение решает вышеупомянутую задачу и обеспечивает дополнительные связанные преимущества.

#### **Краткое описание изобретения**

В настоящем изобретении раскрыто применение *Bacillus coagulans* МТСС 5856 для терапии большого депрессивного расстройства (БДР). В частности, в изобретении раскрыт способ терапевтического контроля БДР у млекопитающих с синдромом раздраженного кишечника с использованием *Bacillus coagulans* МТСС 5856.

Другие признаки и преимущества настоящего изобретения будут очевидны из нижеследующего более подробного описания изобретения, рассматриваемого в сочетании с сопроводительными графическими материалами, иллюстрирующими в качестве примера принцип изобретения.

#### **Краткое описание графических материалов**

На фиг. 1 показана блок-схема последовательности операций, проводимых в исследовании.

На фиг. 2a показана оценка депрессии по шкале Гамильтона (HAM-D) для групп лечения (*B. coagulans* МТСС 5856) и плацебо по шкале от 0 до 20. Все значения выражены как среднее  $\pm$ S.E. (стандартная ошибка среднего). \* указывают на статистическую значимость ( $p < 0,01$ ) разницы между группами плацебо и лечения, а также между исходным уровнем, 60-м и 90-м днями исследования.

На фиг. 2b показана оценка депрессии по шкале Монгтомери-Асберг для групп лечения (*B. coagulans* МТСС 5856) и плацебо по шкале от 0 до 20. Все значения выражены как среднее  $\pm$ S.E. \* указывают на статистическую значимость ( $p < 0,01$ ) разницы между группами плацебо и лечения, а также между исходным уровнем, 60-м и 90-м днями исследования.

На фиг. 2c показана оценка депрессии по шкале Центра эпидемиологических исследований для групп лечения (*B. coagulans* МТСС 5856) и плацебо по шкале от 0 до 30. Все значения выражены как среднее  $\pm$ S.E. \* указывают на статистическую значимость ( $p < 0,01$ ) разницы между группами плацебо и лечения, а также между исходным уровнем, 60-м и 90-м днями исследования.

На фиг. 2d показана оценка согласно "Опроснику для оценки качества жизни (КЖ)" пациента с СРК, для групп лечения (*B. coagulans* МТСС 5856) и плацебо по шкале до 150. Высокое значение КЖ указывает на низкое качество жизни. Все значения выражены как среднее  $\pm$ S.E. \* указывают на статистическую значимость ( $p < 0,01$ ) разницы между группами плацебо и лечения, а также между исходным уровнем, 60-м и 90-м днями исследования.

На фиг. 3a показана оценка по "Шкале общего клинического впечатления" - степень улучшения для групп лечения (*B. coagulans* МТСС 5856) и плацебо по шкале от 0 до 5. Все значения выражены как среднее  $\pm$ S.E. \* указывают на статистическую значимость ( $p < 0,01$ ) разницы между группами плацебо и лечения, а также между исходным уровнем, 60-м и 90-м днями исследования.

На фиг. 3b показана оценка по "Шкале общего клинического впечатления" - степень тяжести заболевания для групп лечения (*B. coagulans* МТСС 5856) и плацебо по шкале от 0 до 5. Все значения выражены как среднее  $\pm$ S.E. \* указывают на статистическую значимость ( $p < 0,01$ ) разницы между группами плацебо и лечения, а также между исходным уровнем, 60-м и 90-м днями исследования.

На фиг. 3c показана общая оценка частоты возникновения симптомов деменции для групп лечения (*B. coagulans* МТСС 5856) и плацебо по шкале от 0 до 100. Все значения выражены как среднее  $\pm$ S.E.

На фиг. 3d показана общая оценка реакции на деменцию для групп лечения (*B. coagulans* МТСС 5856) и плацебо по шкале от 0 до 100. Все значения выражены как среднее  $\pm$ S.E.

На фиг. 3e показана оценка согласно "Опроснику для оценки дискомфорта со стороны желудочно-кишечного тракта" для групп лечения (*B. coagulans* МТСС 5856) и плацебо по шкале от 0 до 40. Низкое значение указывает на меньший дискомфорт со стороны ЖКТ. Все значения выражены как среднее  $\pm$ S.E. \* указывают на статистическую значимость ( $p < 0,01$ ) разницы между группами плацебо и лечения, а также между исходным уровнем, 60-м и 90-м днями исследования.

На фиг. 3f показана оценка по "Модифицированной шкале оценки сонливости Эпворта" для групп лечения (*B. coagulans* МТСС 5856) и плацебо по шкале от 0 до 15. Все значения выражены как среднее  $\pm$ S.E. \* указывают на статистическую значимость ( $p < 0,01$ ) разницы между группами плацебо и лечения, а также между исходным уровнем, 60-м и 90-м днями исследования.

На фиг. 4 показано действие приема добавки *B. coagulans* МТСС 5856 на активность миелопероксидазы в сыворотке. На фигуре также показана активность миелопероксидазы в сыворотке на исходном уровне и в конце исследования (на 90-й день) как для группы лечения, так и для группы плацебо. Значения выражены как среднее  $\pm$ S.E. \* указывают на статистическую значимость ( $p < 0,01$ ) разницы между группами, а также между исходным уровнем и значением в конце исследования (на 90-й день).

#### **Описание наиболее предпочтительных вариантов осуществления**

В одном из наиболее предпочтительных вариантов осуществления настоящее изобретение относится к способу терапевтического контроля большого депрессивного расстройства у млекопитающих, вклю-

чающему стадию введения эффективной дозы *Bacillus coagulans* МТСС 5856 млекопитающим, испытывающим симптомы большого депрессивного расстройства. В предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к применению *Bacillus coagulans* МТСС 5856 для терапии симптомов большого депрессивного расстройства, связанного с синдромом раздраженного кишечника (СРК). В еще одном предпочтительном варианте осуществления *Bacillus coagulans* МТСС 5856 вводят в дозе  $2 \times 10^9$  КОЕ (спор)/сут. В еще одном предпочтительном варианте осуществления млекопитающее представляет собой человека. В других предпочтительных вариантах осуществления симптомы большого депрессивного расстройства представляют собой симптом, выбранный из группы, состоящей из расстройства сна и деменции.

В альтернативном наиболее предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу снижения уровней миелопероксидазы в сыворотке у млекопитающих, испытывающих симптомы большого депрессивного расстройства, включающему стадию введения эффективной дозы *Bacillus coagulans* МТСС 5856 млекопитающим, испытывающим симптомы большого депрессивного расстройства. В предпочтительных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к применению *Bacillus coagulans* МТСС 5856 для снижения уровней миелопероксидазы в сыворотке у млекопитающих, испытывающих симптомы большого депрессивного расстройства, связанного с синдромом раздраженного кишечника (СРК). В еще одном предпочтительном варианте осуществления *Bacillus coagulans* МТСС 5856 вводят в дозе  $2 \times 10^9$  КОЕ (спор)/сут. В еще одном предпочтительном варианте осуществления млекопитающее представляет собой человека.

Конкретные примеры, приведенные ниже в настоящем документе, иллюстрируют наиболее предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения.

Пример 1.

#### Материалы и методы Описание продукта

Таблетки *B. coagulans* МТСС 5856 (600 мг) содержали 2 млрд спор (333,33 мг), микрокристаллическую целлюлозу, крахмал, натрия крахмал гликолят и стеарат магния. Таблетки плацебо содержали гидроортофосфат кальция, микрокристаллическую целлюлозу, крахмал и стеарат магния. Никакие различия в цвете, вкусе, фактуре или упаковке между двумя продуктами не могли быть выявлены. Таблетки были запечатаны в одинаково выглядящие флаконы из полиэтилена высокой плотности с осушителем. Число жизнеспособных спор *B. coagulans* МТСС 5856 определяли следующим методом глубокого посева, описанным ранее (Majeed et al., Nutr J. 2016, 15:21). Анализ проводили дважды с тремя параллельными измерениями. Средние значения числа жизнеспособных спор выражали в КОЕ/г.

#### Этические аспекты и информированное согласие

Данное исследование было проведено в соответствии с руководящими принципами проведения клинических исследований, установленными "Законом о лекарственных препаратах и косметической продукции" от 1940 г. в Индии, "Правилами в отношении лекарственных препаратов и косметической продукции" от 1945 г. в Индии, "Этическими принципами проведения биомедицинских исследований на людях" от 2006 г. Индийского совета по медицинским исследованиям (ICMR) в Индии, принципами, провозглашенными в Хельсинкской декларации (Эдинбург, 2000 г.), и ICH - "Согласованным трехсторонним руководством по надлежащей клинической практике" (GCP). Всем субъектам была предоставлена письменная и устная информация об исследовании на языке, понятном субъекту. Данное исследование было зарегистрировано в Реестре клинических исследований в Индии ([www.ctri.nic.in](http://www.ctri.nic.in)) 6 мая 2015 г. под идентификационным номером CTRI/2015/05/005754. После начала исследования не было сделано никаких изменений в методах или планируемых конечных точках.

#### Участники

Субъекты были включены в исследование, если во всех критериях включения было указано "Да" и "Нет" во всех критериях исключения.

Критерии включения. (1) Субъекты мужского и/или женского пола в возрасте от 20 до 65 лет. (2) Удовлетворение Римским диагностическим критериям III (Drossman, Gastroenterology. 2006, 130:1377-1390) функционального СРК (функциональной диареи). Критерий, удовлетворенный в течение последних 3 месяцев, с появлением симптомов по меньшей мере за 6 месяцев до постановки диагноза: (а) периодическая боль или дискомфорт в области живота (неприятное ощущение, не описываемое как боль) по меньшей мере 3 дня в месяц в течение последних 3 месяцев, связанные с двумя или более из следующего: (I) улучшение дефекации; (II) начало, связанное с изменением частоты дефекации; (III) начало, связанное с изменением формы (внешнего вида) стула; (б) повторяющееся ощущение вздутия живота или видимого растяжения по меньшей мере 3 дня в месяц в течение последних 3 месяцев; (с) понос (мягкий стул) или водянистый стул без боли, составляющий по меньшей мере 75% всех случаев дефекации. (3) Готовность следовать требованиям протокола, что подтверждено письменным информированным согласием. (4) Пациенты с впервые диагностированным СРК со степенью тяжести от легкой до умеренной, с возможными сопутствующими расстройствами сна, болью и деменцией. (5) Готовность заполнять дневники субъектов и опросники исследования. (6) Согласие не использовать никакие лекарственные

средства (рецептурные и нерепечтурные), включая витамины и минералы, в ходе данного исследования. (7) Согласие не употреблять никакие йогурты в ходе данного исследования. (8) Субъекты, параметры биохимического анализа которых находятся в пределах нормы или не считаются клинически значимыми, если выходят за пределы нормы. (9) Гарантии от субъекта, что он (она) не принимал антибиотики или другие добавки, основное место действия которых находится в ЖКТ, в течение вплоть до 1 месяца до начала исследования. (10) Готовность приходить для регулярных последующих наблюдений.

Критерии исключения. (1) Наличие любого клинически значимого медицинского анамнеза, медицинского заключения или продолжающегося медицинского или психиатрического состояния, которое, по мнению исследователя, может поставить под угрозу безопасность субъекта, повлиять на достоверность результатов исследования или помешать завершению исследования в соответствии с протоколом. (2) Значительные отклонения от нормы, выявленные на основании исходного анамнеза, физикального осмотра, показателей жизненно важных функций (артериальное давление, частота пульса, частота дыхания), общего анализа крови, биохимического анализа крови, анализа мочи. (3) История или наличие значительного алкоголизма или злоупотребления добавками/наркотиками за последний год. (4) Любые медицинские или хирургические состояния, которые могут значительно влиять на работу желудочно-кишечного тракта, печени, почек и/или кровеносных органов. (5) Наличие сердечно-сосудистого заболевания, заболевания почек, печени, астмы, глаукомы, заболевания легких, неврологического, метаболического или психиатрического заболевания в анамнезе. (6) Участие в клинических исследованиях за последние 90 дней. (7) Наличие злокачественного новообразования или другого серьезного заболевания в анамнезе. (8) Любое противопоказание к взятию крови. (9) Курение или потребление табачных изделий. (10) Донорство крови или препаратов крови за последние 30 дней до начала введения исследуемой добавки. (11) Беременные субъекты женского пола и кормящие женщины. (12) Ранее проведенное хирургическое лечение ожирения. (13) Пациенты, использующие йогурт в своем ежедневном питании.

#### Дизайн исследования

Распределение участников исследования показано на фиг. 1. Данное рандомизированное, многоцентровое, двойное слепое, плацебо-контролируемое, параллельное групповое клиническое исследование было проведено в 40 амбулаторных клиниках и больницах в Индии в период с апреля 2015 г. по октябрь 2015 г. Данное клиническое исследование было проведено в трех различных местах: (I) Life Care Hospital, Бангалор, Индия; (II) больница им. Шри Венкатешвары, Бангалор, Индия; (III) Институт медицинских наук и исследовательский центр Саптагири, Бангалор, Индия). Объем выборки исследования составлял 40 субъектов, при этом по 20 субъектов было случайным образом распределено в каждую из двух групп исследования двойным слепым способом в соотношении 1:1. Субъекты были "ослеплены" и получали дозы препарата в соответствии с рандомизационным кодом, независимо предоставляемым в каждом месте проведения исследования уполномоченным лицом. Соблюдение режима приема исследуемой добавки проверялось при каждом посещении. Контроль осуществляли путем проверки возвращенной добавки. Вся отчетность включалась в файл исследователя. История любых одновременно принимаемых лекарственных средств выявлялась и документировалась. Регулярно осуществляли последующее наблюдение субъектов в отношении всех одновременно принимаемых лекарственных средств с момента проведения скрининга до тех пор, пока последующее посещение не было зафиксировано и записано. Пациентам сообщали о запрете употреблять какие-либо йогурты в ходе исследования. Ежедневный прием пищи пациентов регистрировался в дневниках пациентов, предоставленных им во время 1 посещения (0 день). Дневники контролировались и проверялись исследователями при последующих посещениях. Исследование состояло из 90-дневного периода вмешательства. Субъекты встречались с исследовательской группой для скрининга, исходного посещения/рандомизации, на 30 день, 60 день, 90 день и 105 день. Описание 1, 2, 3 и 4 посещений с графиком событий представлено в табл. 1.

Таблица 1. График событий

Процедура	Скрининг	1 визит	2 визит	3 визит	4 визит	Последующий визит (через по меньшей мере 15 дней с последнего посещения)
		(0 день) Исходный	(30 день)	(60 день)	(90 день) Окончательный визит	
Информированное согласие	X					
Анамнез	X					
Физикальный осмотр	X	X	X	X	X	
Анкетные данные <sup>a</sup>	X	X	X	X	X	
Показатели жизненно важных функций	X	X	X	X	X	
Общий анализ крови	X				X	
Биохимический анализ крови	X				X	
Миелопероксидаза <sup>b</sup>		X			X	
Тест мочи на беременность <sup>c</sup>	X					
Рандомизация		X				

Выдача и дозирование исследуемого продукта	X	X	X		
Опросник для оценки дискомфорта со стороны желудочно-кишечного тракта	X	X	X	X	
Опросник для оценки качества жизни пациента с синдромом раздражённого кишечника	X	X	X	X	
Шкала HAM-D	X	X	X	X	
MADRS	X	X	X	X	
CGI-I и CGI-S	X	X	X	X	
CES-D	X	X	X	X	
Тест на деменцию	X	X	X	X	
Возврат неиспользованного исследуемого продукта		X	X	X	
Нежелательные явления	X	X	X	X	X
Одновременно принимаемые лекарственные препараты	X	X	X	X	X

<sup>a</sup> Возраст только на момент скрининга

<sup>b</sup> Только для субъектов, распределенных в группы

<sup>c</sup> Тест мочи на беременность при скрининге и в случае досрочного прекращения участия в исследовании, если оно происходит

Определенный для исследования препарат *B. coagulans* MTCC 5856 (LactoSpore®) применяли в соответствии с двойным слепым методом, т.е. ни субъекты, ни исследовательский персонал не знали, кто из субъектов находится в группе лечения, до завершения исследования. Двойное ослепление осуществлялось путем независимого ослепления флаконов с дозами препарата.

#### Вмешательство

В исследование включали пациентов с впервые диагностированным заболеванием, не получавших какого-либо другого лечения от большой депрессии с СРК в течение последних 3 месяцев. Всех включенных в исследование субъектов просили самостоятельно принимать одну таблетку в день (*Bacillus coagulans* MTCC 5856 или плацебо) по меньшей мере за 30 мин до принятия пищи, с утра, в качестве биологически активной добавки в течение 90 дней.

#### Эффективность клинических результатов

Основным результатом данного исследования было среднее изменение в симптомах депрессии и СРК за 90 дней согласно шкале Гамильтона по оценке депрессии (HAM-D) (Friedrich et al., Clin Ther. 2010, 32: 1221-1233), шкале Монтгомери-Асберг по оценке депрессии (MADRS) Bravo et al., Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108: 16050-16055; Kim et al., Aliment Pharmacol Ther. 2003, 17: 895-904), качеству сна и тяжести симптомов депрессии, определенных с помощью шкалы "Центра эпидемиологических исследований депрессии" (CES-D), содержащей 11 позиций (Kim et al., Neurogastroenterol Motil. 2005, 17: 687-696), и "Опроснику для оценки качества жизни пациента с синдромом раздраженного кишечника" (IBS-QOL) (Tsuchiya et al., Chin J Dig Dis. 2004, 5:169-174). Кроме того, вторичные оценки эффективности

включали изменение в оценке по "Шкале общего клинического впечатления-улучшения" (CGI-I) (Baron, Postgrad Med. 2009, 121: 114-118), "Шкале общего клинического впечатления о тяжести заболевания" (CGI-S) (Baron, Postgrad Med. 2009, 121: 114-118), "Пересмотренного теста на деменцию и проблемы с памятью и поведением" (RMBPC) (Jensen et al., BMC Immunol. 2010,11:15), "Опроснику для оценки дискомфорта со стороны желудочно-кишечного тракта" (GI-DQ) (O'Mahony, 2005) и "Модифицированной шкале оценки сонливости Эпворта" (mESS) (Johns, Sleep. 1991, 14: 540-545) между исходным уровнем и концом исследования в качестве субъективного теста.

#### Биологические анализы

Наряду с субъективными оценками (опросниками) также проводили анализ миелопероксидазы в сыворотке (биомаркера воспаления) для обеих групп (В. Coagulans МТСС 5856 и плацебо) на исходном уровне и в конце исследования. Уровни миелопероксидазы в сыворотке в образцах крови измеряли путем проведения иммуноферментного анализа (ИФА) в соответствии с указаниями производителя. (Набор для проведения ИФА на миелопероксидазу человека, код продукта 585001, Cayman Chemicals Company, Мичиган, США).

#### Результаты по безопасности

Безопасность исследования оценивали с учетом частоты возникновения нежелательных явлений, параметров крови, свидетельствующих о безопасности, и последующего наблюдения за показателями жизненно важных функций (артериальным давлением и частотой сердечных сокращений). Лабораторные данные были обобщены путем представления сводной статистики необработанных данных и изменения между исходными значениями и значениями в конце исследования в данных лабораторных анализов относительно контрольных пределов нормальных диапазонов значений. Для оценки безопасности проводили описательный физикальный осмотр, такой как осмотр живота, конечностей, общего вида, головы, ушей, носа, горла, сердца, легких и определение неврологического статуса на скрининге в 0, 30, 60, 90 и 120 день. Спонтанно сообщаемые или наблюдаемые нежелательные явления (НЯ) оценивали на всех посещениях после скрининга. Нежелательные явления оценивали с точки зрения интенсивности (слабовыраженные, умеренные или тяжелые) и возможной связи с исследуемым продуктом.

#### Отчетность и обработка данных

Все данные сообщались в соответствующих больничных записях, которые затем переносили в индивидуальные регистрационные карты (ИРК). Все представленные данные сначала были рассмотрены соответствующими исследователями, присутствующими в трех местах проведения исследования, а затем были введены в ИРК координаторами клинического исследования. Эти данные, введенные в ИРК, вновь проверялись исследователями. Проверяли совпадение исходных данных с данными, введенными в ИРК, согласно руководящим принципам GCP по проверке исходных данных. Сбор данных во время данного клинического исследования и подготовка данных для анализа проводились отдельными и независимыми функциональными группами. С помощью стандартных процедур гарантировали, что все ИРК отслеживаются и правильно распределяются. Было задокументировано обучение всех конечных пользователей и сотрудников, работающих с клиническими данными, процедуре ввода и проверки базы данных. Оператор ввода данных переписывал данные из бумажной ИРК в базу данных. Администратором базы данных проводилась проверка данных. Базу данных блокировали после сверки всех данных. Заблокированную базу данных предоставляли специалисту по статистике, работа которого была независима от исследовательской группы. Затем проводили статистический анализ данных.

#### Статистический анализ

Для анализа данных в данном исследовании использовали программное обеспечение Statistical Analysis Software (SAS) версии 9.2. Для соответствующих переменных набора данных использовали парный t-критерий Стьюдента, ковариационный анализ (ANCOVA) и критерий Уилкоксона для связанных выборок, чтобы получить наилучшее возможное статистическое заключение о разнице между группами, получавшими В. coagulans МТСС 5856 и плацебо. Базовые дескрипторы были обобщены как средние и среднеквадратические отклонения для непрерывных переменных и как частоты и проценты для категориальных переменных. Для оценки эффективности субъектов, данные которых не были доступны при последнем/заключительном, использовали метод переноса вперед данных последнего наблюдения (LOCF). Формального расчета объема выборки не проводилось.

#### Результаты

##### Распределение и характеристики пациентов

В общей сложности 42 субъекта прошли скрининг и 40 были включены в исследование. В данном исследовании не было прекращения участия или выбытия пациентов. Из 42 субъектов, прошедших скрининг, 40 были включены в исследование и случайным образом распределены в группы в В. coagulans МТСС 5856 и плацебо в соотношении 1:1. Соблюдение режима лечения при различных посещениях и общее соблюдение режима лечения для всего исследования показывает, что 24 (60%) пациента соблюдали режим лечения на 100% к 4 посещению (90 день), а в среднем 66,7% соблюдали режим лечения на 100% в течение всего периода исследования. При исходном посещении (0 день) не наблюдалось существенной разницы между двумя группами лечения в анкетных данных субъектов (табл. 2). В день скрининга средний возраст всех субъектов, включенных в исследование, составлял  $35,8 \pm 10,91$ , средняя масса

тела составляла  $64,9 \pm 11,20$  кг, а средний рост -  $158,8 \pm 8,24$  см. Средний ИМТ (индекс массы тела) составлял  $25,6 \pm 4,42$  кг/м<sup>2</sup>, при этом в исследование было включено 6 мужчин (15%) и 34 женщины (85%). В то время как один субъект не являлся потребителем табака или табачных изделий, при этом имея историю употребления алкогольных напитков, 37 субъектов (92,50%) не были ни потребителями табака, ни алкогольных напитков. Остальные субъекты курили и употребляли алкогольные напитки от случая к случаю. Ни у одного из субъектов, включенных в исследование, не было патологий в анамнезе, за исключением расстройств желудочно-кишечного тракта. Около 3 субъектов (7,50%) имели ранее выявленные расстройства, связанные с ЖКТ, в анамнезе, никак не влиявшие на СРК. Наблюдалось статистически значимое изменение ( $p < 0,058$ ) массы тела в группе, получавшей *V. coagulans* МТСС 5856, по сравнению с группой, получавшей плацебо. Однако никаких существенных изменений в их соответствующих значениях ИМТ не наблюдалось в обеих группах.

Таблица 2. Анкетные данные и исходные клинические характеристики

	Плацебо (n=20)		<i>V. coagulans</i> МТСС 5856 (n=20)	
Пол, n (%)				
Женщины	17	(85)	17	(85)
Мужчины	3	(15)	3	(15)
Возраст (лет), среднее (СКО)	$43,88 \pm 9,85$		$40,36 \pm 10,28$	
Рост (см), среднее (СКО)	$157,39 \pm 8,49$		$160,1 \pm 7,87$	
Индекс массы тела (кг/м <sup>2</sup> )	$25,9 \pm 4,49$		$25,4 \pm 4,46$	
Курильщики, n (%)				
Бывший курильщик	18	(90)	19	(95)
Некурящий	1	(5)	0	
Курильщик	1	(5)	1	(5)
Раса, n (%)				
Центральноамериканская	0		0	
Восточноазиатская	0		0	
Южноазиатская	20	(100)	20	(100)
Южноамериканская	0		0	
Юговосточноазиатская	0		0	
Западноевропейская	0		0	
Белая	0		0	
Потребление алкоголя				
Непьющий	1	(5)	0	
Бывший алкоголик	18	(90)	19	(95)
Периодически пьющий	1	(5)	1	(5)
Алкоголик	0		0	
Исходные данные, среднее (СКО)				
IBS-QOL	$102,6 \pm 21,11$		$106,4 \pm 23,44$	
CGI-I	$3,8 \pm 1,01$		$3,7 \pm 0,87$	
CGI-S	$3,7 \pm 0,92$		$3,4 \pm 0,96$	
HAM-D	$14,5 \pm 3,41$		$13,6 \pm 4,41$	
MADRS	$17,1 \pm 4,63$		$16,3 \pm 5,40$	
CES-D	$20,7 \pm 4,86$		$19,1 \pm 5,25$	
Общая оценка частоты возникновения симптомов деменции	$61,3 \pm 19,11$		$62,3 \pm 17,08$	
Общая оценка реакции на деменцию	$61,0 \pm 19,83$		$63,8 \pm 17,57$	
mESS	$10,9 \pm 2,99$		$10,3 \pm 2,43$	
GI-DQ	$32,5 \pm 13,88$		$30,1 \pm 15,07$	

CES-D, шкала Центра эпидемиологических исследований для оценки депрессии

CGI-I, шкала общего клинического впечатления - степень улучшения

CGI-S, шкала общего клинического впечатления - степень тяжести заболевания

CI, доверительный интервал

GI-DQ, опросник для оценки дискомфорта со стороны желудочно-кишечного тракта

HAM-D, шкала Гамильтона для оценки депрессии

IBS-QOL, опросник для оценки качества жизни пациента с синдромом раздраженного ки-

щечника

MADRS, шкала Монтгомери-Асберг для оценки депрессии  
mESS, модифицированная шкала оценки сонливости Эпворта  
значения выражены как среднее  $\pm$ S.D

#### Оценка эффективности

Поскольку симптомы СРК тесно связаны с клиническими симптомами депрессии, изменения симптомов депрессии и качества жизни пациентов с СРК анализировали на протяжении всего периода исследования как первичные показатели эффективности. Значение "p" указывает на то, что между группами, получавшими плацебо и В. coagulans МТСС 5856, наблюдалось статистически значимое изменение этих симптомов от исходного уровня до заключительного посещения. При исходном посещении (0 день) между двумя группами лечения не наблюдалось существенной разницы в клинических характеристиках (показателях эффективности) (табл. 2). Статистический анализ с помощью ковариационного анализа (ANCOVA) показал, что разница в первичных показателях эффективности оказалась статистически значимой ( $p < 0,01$ ) между группами В. coagulans МТСС 5856 и плацебо (табл. 3). Это было в значительной степени обусловлено положительным действием, заключающимся в облегчении симптомов депрессии и качества жизни пациентов с СРК. Значимое изменение в оценках HAM-D, MADRS, CES-D и IBS-QOL является наиболее актуальными параметрами для оценки клинической значимости депрессии и СРК (Friedrich et al., Clin Ther. 2010, 32: 1221-1233; Bravo et al., Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108: 16050-16055; Kim et al., Aliment Pharmacol Ther. 2003, 17:895-904; Kim et al., Neurogastroenterol Motil. 2005, 17: 687-696; Tsuchiya et al, Chin J Dig Dis. 2004, 5:169-174). Аналогичным образом все вторичные параметры эффективности также, как оказалось, различались статистически значимым образом между группами В. coagulans МТСС 5856 и плацебо, за исключением "Общей оценки реакции на деменцию" (табл. 3).

Таблица 3 Сводка клинических результатов, служащих показателями эффективности, в конце исследования, на 90 день: анализ с полной выборкой, перенос вперед данных последнего наблюдения, модель ANCOVA, 95% CI.

Показатели эффективности	Плацебо (n = 20)	В, coagulans МТСС 5856 (n = 20)	p-значение
<b>Первичные клинические исходы</b>			
HAM-D	12,5 $\pm$ 8,70	5,9 $\pm$ 4,88	0,007*
MADRS	12,6 $\pm$ 8,00	6,0 $\pm$ 5,79	0,007*
CES-D	16,7 $\pm$ 13,03	8,0 $\pm$ 6,17	0,013*
IBS-QOL	84,1 $\pm$ 34,67	56,1 $\pm$ 31,26	0,0109*
<b>Вторичные клинические исходы</b>			
CGI-I	3,2 $\pm$ 1,09	2,3 $\pm$ 0,92	0,01*
CGI-S	3,1 $\pm$ 1,05	2,3 $\pm$ 0,92	0,022*
Общая оценка частоты возникновения симптомов деменции	64,0 $\pm$ 28,26	45,9 $\pm$ 26,42	0,012*
Общая оценка реакции на деменцию	61,8 $\pm$ 29,94	51,6 $\pm$ 28,19	0,118
GI-DQ	22,9 $\pm$ 14,55	11,4 $\pm$ 18,23	0,045*
mESS	8,9 $\pm$ 6,24	4,2 $\pm$ 3,92	0,01*

ANCOVA, ковариационный анализ

CES-D, шкала Центра эпидемиологических исследований для оценки депрессии

CGI-I, шкала общего клинического впечатления - степень улучшения

CGI-S, шкала общего клинического впечатления - степень тяжести заболевания

CI, доверительный интервал

GI-DQ, опросник для оценки дискомфорта со стороны желудочно-кишечного тракта

HAM-D, шкала Гамильтона для оценки депрессии

IBS-QOL, опросник для оценки качества жизни пациента с синдромом раздраженного кишечника  
MADRS, шкала Монтгомери-Асберг для оценки депрессии  
mESS, модифицированная шкала оценки сонливости Эпворта  
значимое \*р-значение ( $<0,05$ )

значения выражены как среднее  $\pm$ S.D

Кроме того, представлены сравнительные средние значения оценок эффективности для групп *V. coagulans* МТСС 5856 и плацебо при разных посещениях (исходное, 30, 60 и 90 день) для первичных показателей эффективности (фиг. 2a,b,c,d) и вторичных показателей эффективности (фиг. 3a, b, c, d, e, f). Пациенты, получавшие *V. coagulans* МТСС 5856, имели статистически значимое различие в показателях эффективности на 60 день, которое сохранялось до конца исследования, по сравнению с плацебо (фиг. 2 и 3). Было также установлено, что *V. coagulans* МТСС 5856 очень благоприятно воздействовала на бессонницу и в меньшей степени деменцию у текущей выборки пациентов (табл. 3 и фиг. 3c,d,f).

#### Биологический анализ

Уровень миелопероксидазы в сыворотке был значительно снижен в конце исследования (90 день) по сравнению с исходным уровнем у пациентов, получавших *V. coagulans* МТСС 5856 в дозе  $2 \times 10^9$  спор (КОЕ)/сут ( $p < 0,01$ ) (фиг. 4). Однако значительного изменения уровня миелопероксидазы в сыворотке не наблюдалось в группе плацебо ( $p > 0,05$ ) между исходным уровнем и концом исследования (90 день) (фиг. 4).

#### Оценки безопасности

Для оценки безопасности учитывали показатели жизненно важных функций, такие как артериальное давление, частота дыхания, частота пульса и любые отклоняющиеся от нормы параметры лабораторных/диагностических анализов. В ходе описательного физикального осмотра не было зарегистрировано никаких клинически значимых изменений в обеих группах (группах *V. coagulans* МТСС 5856 и плацебо). Кроме того, не было выявлено никаких клинически значимых отклонений от нормы значений параметров лабораторных анализов (биохимия и общий анализ крови), и между исходным уровнем и заключительным посещением не наблюдалось никаких статистически значимых изменений в показателях жизненно важных функций (табл. 4 и 5). В данном исследовании не было отмечено серьезных нежелательных явлений или значительных нежелательных явлений. Сообщалось об одном нежелательном явлении, связанном с жаром и слабостью. Исследователь в месте проведения исследования классифицировал это нежелательное явление как легкое, никак не связанное продуктом, и было сообщено, что нежелательное явление разрешилось без необходимости одновременного применения каких-либо лекарственных препаратов. Раскрытие сведений о коде исследуемого продукта в конце исследования показало, что пациент с нежелательным явлением относился к группе плацебо.

Таблица 4. Сравнение значений параметров биохимии и общего анализа крови у двух групп лечения

Параметр лабораторного анализа (единицы измерения)	Посещение	V. coagulans МТСС		Нормальный диапазон
		Плацебо (n=20)	5856 (n=20)	
	Скрининг	22,6 ± 8,19	27,1 ± 15,30	от 0 до 41
Аланинаминотрансфераза (МЕ/л)	Заключительное посещение	26,9 ± 26,87	31,0 ± 25,18	
	Скрининг	4,5 ± 0,33	4,6 ± 0,32	от 3,5 до 5,2
Альбумин (г/дл)	Заключительное посещение	4,4 ± 0,32	4,3 ± 1,01	
	Скрининг	206,2 ± 84,44	210,1 ± 97,16	от 53 до 128
Щелочная фосфатаза (Е/л)	Заключительное посещение	196,1 ± 72,90	214,3 ± 75,42	
	Скрининг	25,1 ± 5,95	26,4 ± 7,00	от 0 до 40
Аспаратаминотрансфераза (МЕ/л)	Заключительное посещение	27,1 ± 16,69	27,3 ± 13,79	
	Скрининг	12,9 ± 3,00	13,0 ± 5,87	от 5,0 до 24

	Заключительное посещение	11,5 ± 2,75	11,4 ± 2,38	
Уровень сахара крови натощак (мг/дл)	Скрининг	104,5 ± 51,03	114,1 ± 69,14	от 70 до 110
	Заключительное посещение	105,9 ± 56,70	117,2 ± 78,78	
Холестерин ЛПНП (мг/дл)	Скрининг	121,6 ± 24,67	127,2 ± 42,56	до 140
	Заключительное посещение	123,0 ± 31,43	121,1 ± 44,51	
Калий (мэкв/л)	Скрининг	4,8 ± 0,41	4,7 ± 0,45	от 3,5 до 5,2
	Заключительное посещение	5,7 ± 1,76	7,3 ± 7,44	
Креатинин сыворотки (мг %)	Скрининг	0,8 ± 0,12	1,2 ± 1,84	от 0,6 до 1,4
	Заключительное посещение	1,2 ± 2,07	0,8 ± 0,12	
Натрий (мэкв/л)	Скрининг	140,8 ± 2,63	133,2 ± 30,13	от 136 до 145
	Заключительное посещение	138,5 ± 2,89	132,6 ± 21,55	
Общий билирубин (мг/дл)	Скрининг	1,1 ± 0,44	1,4 ± 0,72	от 0,1 до 1,2
	Заключительное посещение	1,3 ± 0,57	1,6 ± 1,14	

	Скрининг	$7,6 \pm 0,53$	$7,6 \pm 0,44$	от 6,22 до 8,0
Общий белок (г/дл)	Заключительное посещение	$7,4 \pm 0,46$	$7,4 \pm 0,56$	
	Скрининг	$4,4 \pm 0,61$	$4,6 \pm 0,53$	от 4,0 до 6,5
Число эритроцитов ( $\times 10^6$ клеток)	Заключительное посещение	$4,6 \pm 0,65$	$4,6 \pm 0,39$	
	Скрининг	$37,9 \pm 5,37$	$41,5 \pm 3,60$	от 40 до 50
Гематокритное число (%)	Заключительное посещение	$37,0 \pm 5,63$	$38,1 \pm 8,72$	
	Скрининг	$11,9 \pm 2,00$	$13,2 \pm 1,52$	от 11 до 16
Гемоглобин (г%)	Заключительное посещение	$11,7 \pm 2,06$	$12,5 \pm 2,15$	
	Скрининг	$8562,5 \pm 1930,07$	$9233,3 \pm 2369,35$	от 4000 до 11000
Число лейкоцитов (клеток на $\text{мм}^3$ )	Заключительное посещение	$8575,0 \pm 2879,49$	$8157,5 \pm 2413,95$	
	Скрининг	$2,7 \pm 0,97$	$2,8 \pm 0,80$	от 1,5 до 4,5
Число тромбоцитов ( $\times 10^5$ на $\text{мм}^3$ )	Заключительное посещение	$2,4 \pm 0,91$	$2,3 \pm 0,70$	

Значения выражены как среднее  $\pm$ S.D

Таблица 5. Изменение средних показателей жизненно важных функций между исходным уровнем и концом исследования (90 дней)

Показатели жизненно важных функций	Добавки	Исходный уровень	90 день		р-значение
			(конец исследования)	Изменение	
Систолическое артериальное давление (мм. рт. ст.)	V. coagulans МТСС 5856	122,5	121,0	-1,50	0,2674
	Плацебо	123,5	120,0	-3,50	0,0308
Диастолическое артериальное давление (мм. рт. ст.)	V. coagulans МТСС 5856	77,0	79,5	2,50	0,1713
	Плацебо	80,5	80,0	-0,50	0,7157
Частота пульса (ударов в минуту)	V. coagulans МТСС 5856	74,6	74,6	0,00	1,0000
	Плацебо	76,1	74,5	-1,55	0,0841
Частота сердечных сокращений (ударов в минуту)	V. coagulans МТСС 5856	74,7	74,8	0,10	0,8660
	Плацебо	75,8	74,8	-1,00	0,1467
Частота дыхания (дыхательных движений в минуту)	V. coagulans МТСС 5856	21,1	21,1	0,00	1,0000
	Плацебо	21,4	20,8	-0,60	0,1240
Масса тела (кг)	V. coagulans МТСС 5856	65,7	66,7	1,04	0,0589*
	Плацебо	63,1	64,0	0,91	0,0785
Индекс массы тела (кг/м <sup>2</sup> )	V. coagulans МТСС 5856	25,6	25,7	0,01	0,8956
	Плацебо	25,7	25,8	0,01	0,8969

\* р-значение рассчитано из парного t-критерия Стьюдента,  $p < 0,05$  считается значимым

#### Вывод

Клиническое исследование показало, что *Bacillus coagulans* МТСС 5856 в дозе  $2 \times 10^9$  спор (КОЕ) в сутки демонстрирует эффективность в лечении пациентов, испытывающих симптомы СРК вместе с большим депрессивным расстройством. Кроме того, прием добавки *Bacillus coagulans* МТСС 5856 облегчил симптомы депрессии и СРК, которые также были клинически значимыми. В результате анализа данных, полученных в исследовании, пришли к выводу, что *Bacillus coagulans* МТСС 5856 может представлять собой альтернативный подход для терапии большого депрессивного расстройства у пациентов с СРК, хотя для выяснения механизма действия потребуется дополнительное исследование.

Хотя изобретение было описано со ссылкой на предпочтительный вариант осуществления, специалистам в данной области должно быть понятно, что изобретение им не ограничено. Скорее, объем изобретения следует толковать только в связке с прилагаемой формулой изобретения. В частности, можно отметить, что, хотя в данном изобретении в качестве иллюстративного примера представлено БДР, связанное с СРК, изобретение также охватывает терапевтическое действие *Bacillus coagulans* МТСС 5856 в терапии БДР в целом.

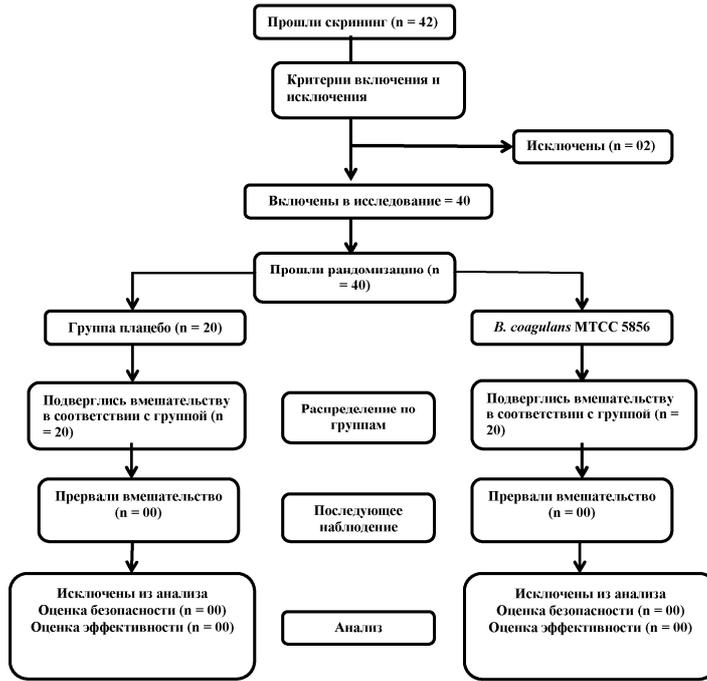
#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ облегчения симптомов большого депрессивного расстройства, связанного с синдромом раздраженного кишечника, у субъекта, включающий введение субъекту эффективной дозы *Bacillus coagulans* МТСС 5856, причем симптомы выбраны из депрессии, расстройства сна и деменции.

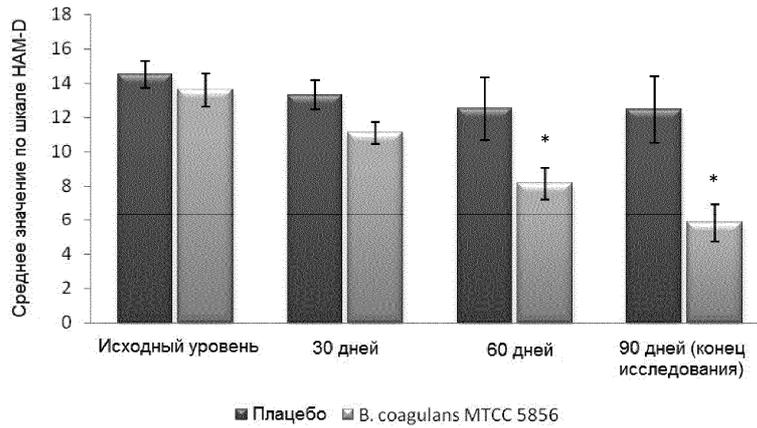
2. Способ по п.1, отличающийся тем, что *Bacillus coagulans* МТСС 5856 вводят в дозе  $2 \times 10^9$  КОЕ (спор)/сут.

3. Способ снижения уровней миелопероксидазы в сыворотке крови субъекта с синдромом раздраженного кишечника, испытывающего симптомы большого депрессивного расстройства, выбранные из депрессии, расстройства сна и деменции, включающий введение субъекту эффективной дозы *Bacillus coagulans* МТСС 5856.

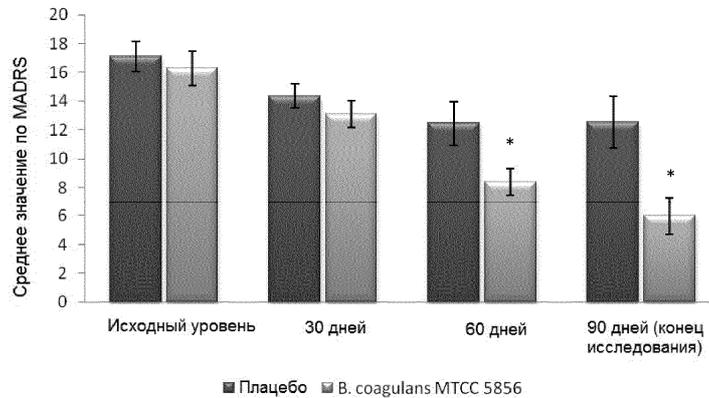
4. Способ по п.3, отличающийся тем, что *Bacillus coagulans* МТСС 5856 вводят в дозе  $2 \times 10^9$  КОЕ (спор)/сут.



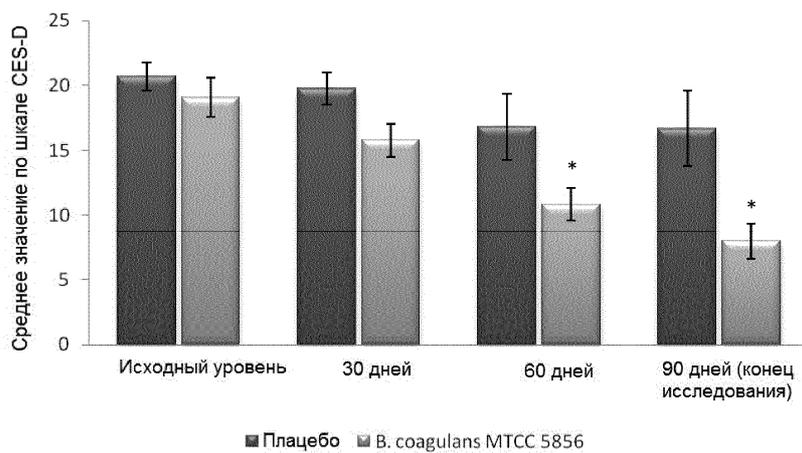
Фиг. 1



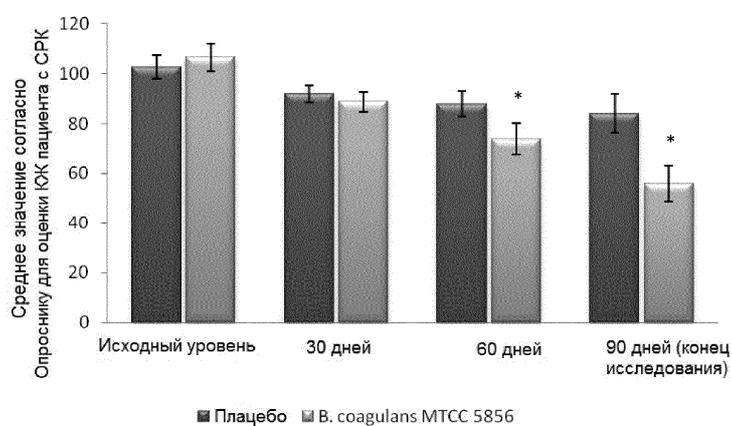
Фиг. 2а



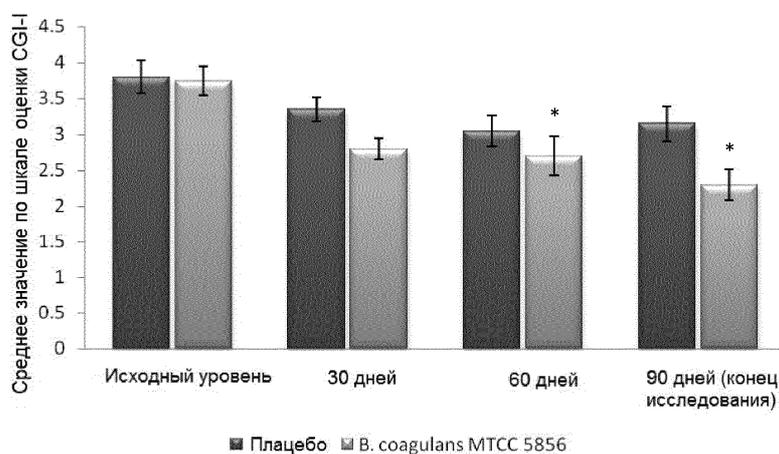
Фиг. 2б



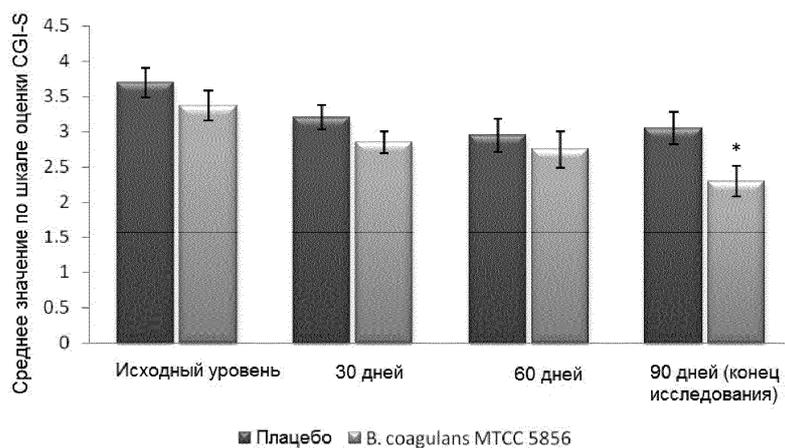
Фиг. 2с



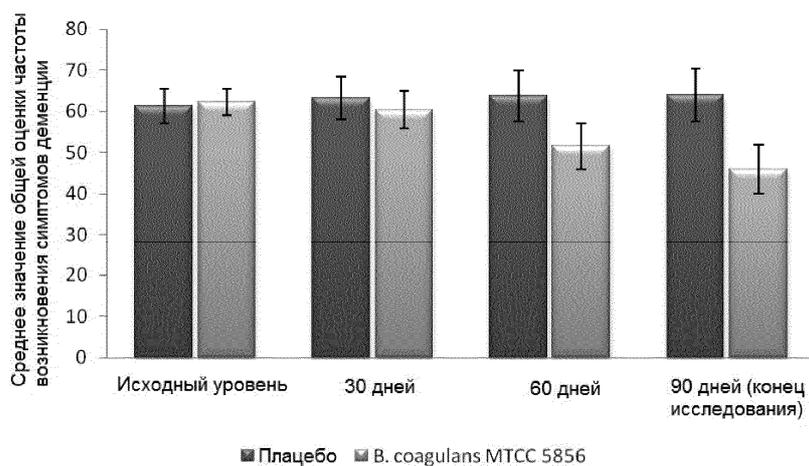
Фиг. 2d



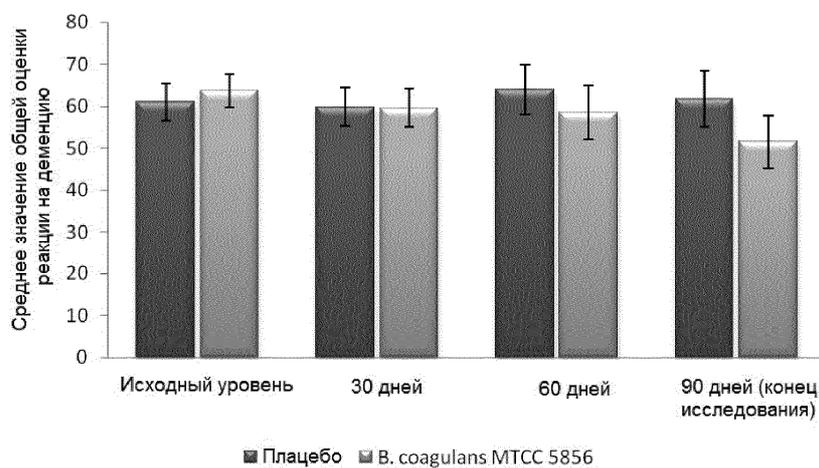
Фиг. 3а



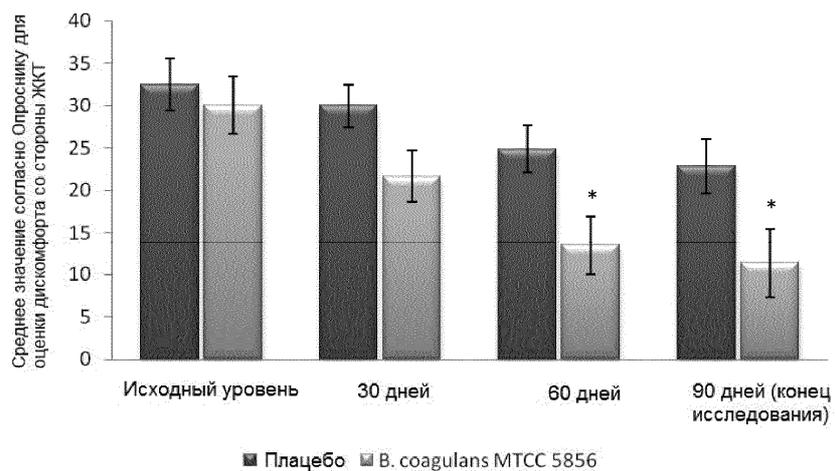
Фиг. 3b



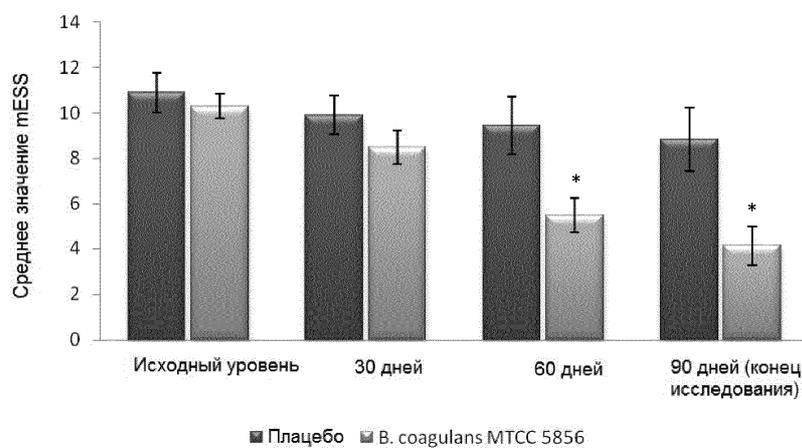
Фиг. 3c



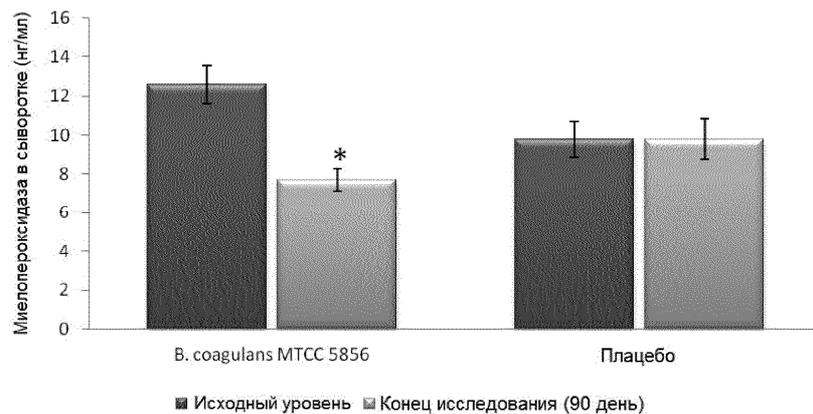
Фиг. 3d



Фиг. 3е



Фиг. 3f



Фиг. 4

