(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202000139 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.08.31

(22) Дата подачи заявки
2020.02.11

(51) Int. Cl. *C12N 1/20* (2006.01)
C12R 1/23 (2006.01)

(54) ШТАММ LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS N.V. EP 317/402 "НАРИНЭ" AAAA, ПРЕДНАЗНАЧЕННЫЙ ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ НОРМАЛЬНОЙ ГОРМОНАЛЬНОЙ РЕГУЛЯЦИИ И МИКРОФЛОРЫ КИШЕЧНИКА, А ТАКЖЕ ПОВЫШЕНИЯ ИММУНИТЕТА ОРГАНИЗМА

(96) **2020000015 (RU) 2020.02.11**

(71) Заявитель:
КУСТОВА ТАИСИЯ ИВАНОВНА (RU)

(57) Изобретение относится к биотехнологии и касается штамма Lactobacillus acidophilus n.v. EP 317/402 "Наринэ" AAAA, депонированного в ФГУН ГНЦ ВБ "Вектор" под номером B-1321 и во Всероссийскую коллекцию микроорганизмов ИБФМ им. Г.К. Скрябина РАН под номером B-3468D. Штамм предназначен для восстановления нормальной гормональной регуляции и микрофлоры кишечника, а также повышения иммунитета организма. Штамм может быть использован для приготовления продуктов, в том числе кисломолочных.

202000139 A1

202000139 A1

A23C 9/12 (2000.01)
A61K 35/74 (2000.01)
C12N 1/20 (2000.01)

Штамм LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS N.V. EP 317/402 "НАРИНЭ" АААА, предназначенный для восстановления нормальной гормональной регуляции и микрофлоры кишечника, а также повышения иммунитета организма.

Изобретение относится к биотехнологии и касается штамма лактобацилл, обладающего способностью продуцировать интерферон в одноклеточных клетках человека, влиять на физиологические и иммунологические процессы в организме. Штамм может быть использован для приготовления продуктов, в том числе кисломолочных, предназначенных для снижения последствий дисбактериоза и восстановления нормальной микрофлоры кишечника.

Причины, вызывающие дисбактериоз известны: это - различные инфекционные заболевания, прием антибиотиков, химио-, гормоно- и лучевая терапия, психоэмоциональные стрессы и неблагоприятная экологическая обстановка, социальные факторы, алкоголизм и другие.

Они прямо или опосредованно способствуют дисбалансу микробиоценоза организма, и, в первую очередь, кишечной микрофлоры организма человека с повышением активности относительно широкого спектра условно-патогенных микроорганизмов 3-4 групп патогенности.

В связи с этим, актуальной задачей является выявление новых штаммов лактобактерий и разработка препаратов и продуктов питания на их основе для снижения последствий дисбактериоза и восстановления нормальной микрофлоры кишечника человека.

/Кусмова Т.И/

Известен штамм Lactobacillus acidophilus n.v. 317/402 "Наринэ" ИНМИ-9602. Штамм продуцирует значительное количество безвредных для детей и взрослых антибиотических веществ, подавляющих рост и развитие как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий возбудителей острых форм желудочно-кишечных заболеваний (SU 163357, кл. C 12 N 1/20, 1964). Однако, штамм обладает медленной кислотообразующей способностью и отсутствием фаголизиса у штамма L. acidophilus n.v. 317/402 "Наринэ". Цельномолочный продукт готовят заквашиванием цельного молока при 28-40°С. 1 мас.% штамма. Свертывание наступает через 5-8 ч, кислотность продукта 60-90°Т. Указанный продукт пригоден в качестве закваски, а также лечебно-профилактического средства при заболеваниях желудочно-кишечного тракта. Продукт может быть использован в медицинской и ветеринарной практике. Вместе с тем, продукт, получаемый с использованием штамма L. acidophilus n.v. 317/402 "Наринэ" кислотностью не выше 90°Т не обеспечивает получение человеком всего комплекса аминокислот, витаминов необходимых для коррекции дисбактериозов и различных желудочно-кишечных заболеваний.

Наиболее близким является штамм бактерий Lactobacillus acidophilus n.v. EP 317/402 "Наринэ" ААА ВКПМ В-7747, используемый при приготовлении препаратов, диетических и лечебно-профилактических продуктов для лечения дисбактериоза и его последствий (SU 2146454, кл. C 12 N 1/20, 2000). Штамм проявляет высокую кислотообразующую активность и выраженные антагонистические свойства по отношению к условно-патогенным и патогенным микроорганизмам, обладающего высокой витаминообразующей способностью, повышенной производительностью α и γ-интерферона в одноклеточных клетках человека как факторов, играющих определяющую роль в противовирусной и противораковой защите, влияющего на физиологические процессы в организме.

[signature] /Кустова Т.И/.

Вместе с тем, данный штамм не является достаточно активным в отношении ряда условно-патогенных микроорганизмов 3-4 групп патогенности.

В связи с этим заявленное изобретение направлено на получение нового штамма лактобацил, в котором положительные свойства ближайшего аналога были бы дополнены его активностью в отношении таких штаммов, вызывающих дисбактериоз, как: Proteus mirabilis 160205, коллекционный номер B1267, Bacillus cereus ATCC 10702, коллекционный номер B-1367, Streptococcus faecalis 555, B-330, Salmonella abony 103/39, коллекционный номер B-1364, Staphylococcus epidermidis ATCC 14990 коллекционный номер B-1363 , Staphylococcus haemolyticus MRS коллекционный номер B-1348 , Pseudomonas aeruginosa коллекционный номер B-1295, Shigella sonnei 32 коллекционный номер B-582, Staphylococcus aureus ATCC 6538, коллекционный номер B-1266, Enterococcus faecium ATCC 19434, коллекционный номер B-1268, Shigella sonnei 5063, коллекционный номер B-1335 Staphylococcus aureus 1850 MRSA, коллекционный номер B-1352 Salmonella interica 441 №14, коллекционный номер B-1337,Candida albicans 620, коллекционный номер Y-583.

Также изобретение направлено на повышение активности в отношении таких штаммов, вызывающих дисбактериоз, как: Staphylococcus aureus 1721 (ATCC 43300) MRSA, коллекционный номер B-1349, Staphylococcus epidermidis 1827 MRSE, коллекционный номер B-1350, Staphylococcus epidermidis 1833 MRSE, коллекционный номер B-1351, Bacillus subtilis ATCC 6633, коллекционный номер B-654, Escherichia coli 6645 ATCC 25922, коллекционный номер B-655, Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027, коллекционный номер B-656, Mycobacterium smegmatis GK, коллекционный номер B-836, Klebsiella pneumonia 378, коллекционный номер B-378, Salmonella typhimurium 2606, коллекционный номер B-581, Serratia marcescens d, коллекционный номер B-1, Bacillus cereus , коллекционный номер B-277.

/Кустова Т.И/.

Штамм Lactobacillus acidophilus n.v. EP 317/402 "Наринэ" АААА, депонированный в ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» под номером В-1321 и во Всероссийской коллекции микроорганизмов ИБФМ им. Г.К.Скрябина РАН под номером В-3468D, получен путем селекции исходной культуры Lactobacillus acidophilus n.v. EP 317/402 "Наринэ" ААА ВКПМ В-7747 (патент на изобретение РФ 2146454, кл. С 12 N 1/20, 2000) и направленного отбора по показателям: повышенной антибиотической активности к возбудителям желудочно-кишечных заболеваний, антибиотикорезистентности, динамики размножения бактериальной популяции в питательной среде, витаминообразующей способности и количеству жизнеспособных бактерий.

Сравнительные данные по антагонистической активности предлагаемого и известного штаммов приведены в таблице 1.

Краткая характеристика штаммов, представленных в таблице 1.

Штамм Escherichia coli (4 группа) (В-655), типовой штамм, используется в качестве тест-культуры при определении антимикробного действия препаратов и для определения пригодности питательных сред. Кишечные палочки могут быть причиной эшерихиозов — различных инфекционных заболеваний, протекающих с интоксикацией, лихорадкой, обычно с поражением желудочно-кишечного тракта, реже — мочевыводящих, желчевыводящих путей, других органов или с развитием сепсиса.

Штамм рода Klebsiella 378 (4 группа) (В-378), факультативный анаэроб, хорошо растет при температуре 37°С на простых питательных средах. У человека клебсиеллы способны вызывать различные воспалительные процессы (септицемию, менингит, пиемию и др.) Патогенность клебсиелл связана с наличием капсулы.

Штамм Mycobacterium smegmatis (4 группа) (В-836). Штаммы этой группы представляют собой грамположительные, кислотоустойчивые, полиморфные клетки: возможно слабое ветвление, образование нитей, кокковых

Т.Кастова - /Кустова Т.И./

форм. Колонии могут иметь желтый пигмент. Сапрофиты, способные образовывать промежуточные формы, вызывающие заболевания. Рост замедленный, аэробный, температура роста для разных штаммов составляет от 30 до 40°С.

Штаммы рода Proteus (4 группа) (P.mirabilis B-1267), грамотрицательные полиморфные палочки, факультативные анаэробы, хорошо растут при температуре 37°С на простых питательных средах. Протей обитает в кишечнике человека, выделяется при пищевых интоксикациях, диспепсии, отитах и других заболеваниях.

Штаммы Pseudomonas aeruginosa № B-656, B-1295 (4 группа) (синегнойная палочка). патогенный грамотрицательный штамм является облигатным аэробом, возбудителем синегнойной инфекции; оптимальная температура роста 37°С, продуцирует пигмент пиоцианин, растет на простых, питательных средах. Является одним из наиболее частых возбудителей нозокомиальных инфекций, причем инфекции, вызванные этим микроорганизмом, характеризуются тяжелым течением и ассоциируются с высокой летальностью.

Штаммы рода Salmonella (3 группа) (B-581, B-1364,B-1337) включает в себя около 2000 сероваров. Многие из них паразитируют в организме человека, домашних и диких животных, вызывая заболевания кишечного тракта. Сальмонеллы - большая группа энтеробактерий, среди которых различные серотипы - возбудители брюшного тифа, паратифов А, В и С и наиболее распространенных пищевых токсикоинфекций - сальмонеллезов.

Штаммы рода Serratia (4 группа) (B-1) представлены продуцентами ферментов и тест-штаммами; условия культивирования: LB, РПА, 37°С; факультативные анаэробы, грамотрицательные. Бактерии рода Serratia часто являются причиной гнойно- воспалительных, урологических, гинекологических и кишечных заболеваний. Также инфекционные процессы, вызванные этими бактериями, нередко развиваются у детей раннего возраста, онкологических больных, и являются причиной внутрибольничных инфекций.

/Кусенова Т.И/

Штаммы рода Staphylococcus (4 группа) представлены в работе 7 штаммами (табл. 1); являются факультативными анаэробами, грамположительны. Стафилококки являются пиогенными бактериями, способны вызывать различные воспалительные процессы. Продуцируют энтеротоксин, способный вызывать тяжёлые пищевые отравления и лейкоцидин - токсин, разрушающий лейкоциты и приводящий к образованию гнойников.

Штаммы Streptococcus faecalis, (4 группа) (В-330) являются обитателями кишечника человека и теплокровных, представляет собою округлые грамположительные клетки, расположенные попарно или в коротких цепочках, выделяются также при заболеваниях желчного пузыря, мочевыводящих путей, являются факультативными анаэробами, хорошо растущими при температуре 37°С на простых питательных средах. Фекальный энтерококк может являться возбудителем различных инфекций: мочевыводящих путей, интраабдоминальных, органов малого таза, раневых, эндокардита. Фекальные энтерококки являются наиболее патогенными видами среди энтерококков, они составляют 80–90% от всех выделенных в клиническом материале человека энтерококков. Фекальные энтерококки часто бывают причиной внутрибольничных инфекций.

Штамм Shigella sonnei (3 группа) (В-1335, В-582)– факультативный анаэроб, имеющиеся штаммы используется в качестве тест-культур при определении антимикробного действия препаратов и для тестирования питательных сред. Представлены грамотрицательными неподвижными палочками без капсул, хорошо растущими при температуре 37°С на простых питательных средах. Микроорганизмы этого вида являются возбудителями кишечных инфекций приматов и человека. Все виды шигелл могут являться возбудителями инфекционного заболевания — бактериальной дизентерии (называемой также шигеллезом), протекающего с явлениями интоксикации.

Штамм Bacillus cereus (4 группа) (В-277, В-1367) – грамположительные палочки, образующие эндоспоры, растущие при диапазоне температур 35-45°С

/Кусибова Т.И/.

на простых питательных средах, гидролизуют крахмал и казеин, расщепляют тирозин, способны к росту в анаэробных условиях, восстанавливают нитраты. Микроорганизмы этого вида могут вызвать пищевые токсикоинфекции.

Штаммы рода Candida (4 группа) (C.albicans № Y-583, Candida sp. Ft-5), дрожжеподобные грибы, размножающиеся почкованием, образующие псевдомицелий, при неблагоприятных условиях вызывают кандидозы кожи, слизистых оболочек и внутренних органов. Имеющийся в коллекции штамм используется в качестве тест-культуры при определении антимикробного действия препаратов и для определения пригодности питательных сред.

Штаммы рода грибы рода *Aspergillus* (4 группа) (F-1366, F-1319) представляют собой широко распространенный сапрофитные плесневые грибы, способные вызвать заболевание аспергиллез, имеющее различные клинические проявления: инвазивный аспергиллез, легочная аспергиллема и аллергический бронхолегочный аспергиллез. Прогрессирующее течение заболевания и его устойчивость к лечению частично объясняется способностью возбудителя к быстрому росту и инвазии кровеносных сосудов. Имеются сообщения о возникновении аспергиллеза гортани, трахеи и бронхов у пациентов с нарушениями иммунитета, СПИДе, трансплантации солидных органов, длительной терапии кортикостероидами. Могут присутствовать в аэрозолях воздуха.

Штаммы сапрофитных грибов рода Trichoderma (4группа) (F-899) распространены повсеместно, способны вызывать у людей аллергические заболевания верхних дыхательных путей, ассоциированы с перитонитами и инфекциями иммуновосприимчивых пациентов с гематологической злокачественной опухолью или при трансплантации органов. Наибольшую опасность плесневые грибы, к которым относятся и грибы рода Trichoderma, представляют в городской черте, сырость в помещениях является значимым фактором риска для респираторных и других заболеваний.

Т.Кустова Т.И.

Штаммы Penicillium sp. (4 группа) (F-1320) относятся к плéсневым грибам, повсеместно распространенным во внешней среде, участвующим в биокоррозии и биодеградации различных материалов, прежде всего растительного происхождения. Представители рода Penicillium являются одним из наиболее частых лабораторных контаминантов, способны вызвать эндокардиты, посттравматический эндофтальмит. Грибы рода Penicillium часто ассоциируются с аллергическими заболеваниями и могут вызывать клиническую симптоматику у сенсибилизированных лиц.

Определение антимикробной активности селектированного штамма *L. acidophilus* N.V. EP 317/402 "Наринэ" AAAA, депонированный в ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» под номером B-1321 и во Всероссийской коллекции микроорганизмов ИБФМ им. Г.К.Скрябина РАН под номером B-3468D и контрольного штамма *L.acidophilus* n.v. EP 317/402 "Наринэ" AAA, депонированный в ВКПМ под номером B-7747 проводили **диффузионным методом отсроченного антагонизма.** Исследуемые штаммы нарабатывают на молочной среде, бифидо-среде или другого состава в течение 2-х суток, затем наносят в виде штриха на поверхность питательной среды в чашке Петри, выдерживают в термостате в течение 48 часов, при температуре 37°С. Далее к штриху исследуемых штаммов перпендикулярными штрихами подсевают суспензии штаммов патогенов. Засеянные таким образом чашки помещают в термостат и инкубируют при температуре 37°С, в течение 24-48 часов. Для контроля роста тест-штаммы высевают на чашки без штриха исследуемых штаммов и культивируют аналогичным образом. Положительный результат учитывают по наличию зоны угнетения роста тест-штаммов патогенных микроорганизмов в зоне диффузии метаболитов исследуемых штаммов.

Полученные данные свидетельствуют о высокой антимикробной активности селектированного штамма Lactobacillus acidophilus N.V. EP 317/402 "Наринэ" AAAA, депонированный в ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» под номером B-1321

/Кусенова Т.И./

и во Всероссийской коллекции микроорганизмов ИБФМ им. Г.К.Скрябина РАН под номером В-3468D по отношению к грамположительным и грамотрицательным патогенным бактериям.

Под влиянием метаболитов заявленного штамма в условиях проведенных опытов наблюдалось ингибирование роста всех испытанных 25 патогенных грамположительных и грамотрицательных бактериальных тест-штаммов, выраженное в разной степени.

Из числа исследованных 7 тест-штаммов были наиболее восприимчивыми к антибиотическому действию селектированного штамма Lactobacillus acidophilus N.V. EP 317/402 "Наринэ" AAAA, депонированный в ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» под номером В-1321 и во Всероссийской коллекции микроорганизмов ИБФМ им. Г.К.Скрябина РАН под номером В-3468D (Staphylococcus aureus 1721 (ATCC 43300) MRSA, Escherichia coli 6645 ATCC 25922, Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027, Bacillus cereus, Klebsiella pneumonia 378, Salmonella typhimurium 2606, Serratia marcescens d), зоны угнетения роста для них составляли 17-34 мм.

Для 12 тест штаммов (Staphylococcus epidermidis 1827 MRSE, Staphylococcus epidermidis 1833 MRSE, Bacillus subtilis ATCC 6633, Bacillus cereus ATCC 10702, Mycobacterium smegmatis GK, Staphylococcus haemolyticus MRS, Shigella sonnei 32, Staphylococcus aureus ATCC 6538, Enterococcus faecium ATCC 19434, Shigella sonnei 5063, Staphylococcus aureus 1850 MRSA, Salmonella interica 441 №14) зоны угнетения роста были несколько меньше, составляли 15-29 мм, что также является достаточно эффективным действием.

Остальные пять штаммов бактерий к воздействию метаболитов, заявленного селектированного штамма, были более устойчивыми, зоны угнетения роста составляли 10-14 мм.

При исследовании антифунгальной активности, заявленного селектированного штамма, в условиях проведенного опыта обнаружено незначительное

/ Кусикова Т.И /

угнетение его метаболитами роста штаммов дрожжей C. albicans 620, которое на 3-и сутки культивирования становилось незаметным, далее в опыте и контроле формировались сходные типовые колонии грибов.

Вместе с тем, проведенное исследование показало возможность ингибирования заявленным двенадцати патогенных грамположительных и грамотрицательных бактериальных тест-штаммов, таких как: Proteus mirabilis 160205, Bacillus cereus ATCC 10702, Streptococcus faecalis 555, Salmonella abony 103/39, Staphylococcus epidermidis ATCC 14990, Staphylococcus haemolyticus MRS, Pseudomonas aeruginosa , Shigella sonnei 32, Staphylococcus aureus ATCC 6538, Enterococcus faecium ATCC 19434, Shigella sonnei 5063, Staphylococcus aureus 1850 MRSA, Salmonella interica 441 №14, Candida albicans 620, выраженное в разной степени, в отличии от известного штамма исходной культуры Lactobacillus acidophilus n.v. EP 317/402 "Наринэ" AAA ВКПМ B-7747.

Таким образом, можно сделать вывод о высокой активности штамма Lactobacillus acidophilus n.v. EP 317/402 "Наринэ" AAAA, депонированного в ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» под номером B-1321 и во Всероссийской коллекции микроорганизмов ИБФМ им. Г.К.Скрябина РАН под номером B-3468D по отношению к указанным выше представителям энтеропатогенной кишечной микрофлоры.

При сбраживании углеводов штаммом Lactobacillus acidophilus n.v. EP 317/402 "Наринэ" AAAA, депонированного в ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» под номером B-1321 и во Всероссийской коллекции микроорганизмов ИБФМ им. Г.К.Скрябина РАН под номером B-3468D, в основном образуется молочная кислота и незначительное количество летучих кислот, не превышающих 5-6% общего количество титруемых веществ. Штамм сбраживает молоко в течении 5-12 часов при температуре 38-40°C. Штамм гомофермативный, способный к образованию флапротеиновых протеаз. Синтезирует витамины групп B и C, фолиевую кислоту, тиамин, рибофлавин, обладает целлюлозоактивностью.

[signature] - /Кустова Т.И/

Способ, условия и состав сред для длительного хранения штамма осуществляется: в пробирках в агаризованной среде MRS с однократным пересевом в течении 1 месяца; в жидком азоте при температуре -193°С; в лиофильно-высушенном состоянии культура может храниться до 2-х лет.

Способ, условия и состав сред для размножения: агаризованная среда MRS, 37-40 °С, в течении 24-72 часов.

Условия и состав среды для ферментации: ферментация осуществляется в цельном молоке.

Генетические особенности штамма (ауксотрофность, устойчивость к антибиотикам, фагам и т.п.): штамм устойчив к широкому спектру антибиотиков, для данного вида штамма фаги не известны.

Культурально–морфологические особенности селектированного штамма L. acidophilus n.v. EP 317/402 «НАРИНЭ» АААА, депонированный в ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» под номером В-1321 и во Всероссийской коллекции микроорганизмов ИБФМ им. Г.К.Скрябина РАН под номером В-3468D: гомоферментативные неподвижные грам-положительные микроаэрофильные палочки удлиненные клетки величиной от 2 до 20х0,8мк., обладают высокой фенолорезистивностью до 0,4-0,5%, фталазолы до 1%, синтомициноустойчивостью до 0,003%, способны продуцировать значительное количество безвредных антибиотических веществ, подавляющих рост и развитие многих как грам-положительных, так и грам-отрицательных патогенных бактерий, включая возбудителей дизентерии.

Штамм не продуцирует каталазу, не редуцирует нитраты, не образует индол и скатол, желатин не разжижает, гемолитической способностью не обладает; сбраживает без образования газа лактозу, глюкозу, сахарозу, фруктозу, маннозу,

/Кустова Т.И/

левулезу, галактозу, мальтозу, рафинозу, крахмал, декстрин, сорбит, манит, дульцит.

Штамм обладает медленной кислотообразующей способностью; минимальная активность 90°Т, оптимальная активность 120-160°Т, максимальная активность до 360°Т.; количество жизнеспособных лактобактерий в 1 мл. штамма 150-250 млн. живых клеток лактобактерий. Определение активности штамма осуществляется по методу Мак- Креди.

Штамм не является зоопатогенным, фитопатогенным и не представляет опасность по другим причинам.

Рекомендуемые условия хранения: лиофилизация, низкотемпературное замораживание в криопротекторе.

В таблице 1 представлены сравнительные данные антимикробной активности селектированного штамма Lactobacillus acidophilus N.V. EP 317/402 "Наринэ" АААА, депонированный в ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» под номером В-1321 и во Всероссийской коллекции микроорганизмов ИБФМ им. Г.К.Скрябина РАН под номером В-3468D и штамма Lactobacillus acidophilus N.V. EP 317/402 "Наринэ" ААА, В-7747 (патент № 2146454), исследованные диффузионным методом отсроченного антагонизма.

Таблица 1

Сравнительная таблица антимикробной активности селектированного штамма Lactobacillus acidophilus N.V. EP 317/402 "Наринэ" АААА, депонированный в ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» под номером В-1321 и во Всероссийской коллекции микроорганизмов ИБФМ им. Г.К.Скрябина РАН под номером В-3468D и штамма Lactobacillus acidophilus N.V. EP 317/402 "Наринэ" ААА, В-7747 (патент № 2146454), исследованная диффузионным методом отсроченного антагонизма.

Штамм Lactobacillus acidophilus N.V. EP 317/402 "Наринэ"	Штамм Lactobacillus aci-

/Кудешова Т.И/

АААА, депонированный в ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» под номером В-1321 и во Всероссийской коллекции микроорганизмов ИБФМ им. Г.К.Скрябина РАН под номером В-3468D					dophilus N.V. EP 317/402 "Наринэ" ААА, В-7747 (патент РФ № 2146454)
№ п/п	Колл.№ тест-штамма	Наименование тест-штамма	Зона подавления роста штриха патогена (мм)	Среда наработки	Зона подавления роста штриха патогена (мм)
1	В-1349	Staphylococcus aureus 1721 (ATCC 43300) MRSA	34	Среда на молоке	28-32
2	В-1350	Staphylococcus epidermidis 1827 MRSE	18	Среда на молоке	15
3	В-1351	Staphylococcus epidermidis 1833 MRSE	20	Среда на молоке	18
4	В-654	Bacillus subtilis ATCC 6633	17	Среда на молоке	13
5	В-655	Escherichia coli 6645 ATCC 25922	32	Среда на молоке	26-30
6	В-656	Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027	34	Среда на молоке	27-32
7	В-1267	Proteus mirabilis	12	Среда на	отсутствует

Т.Кустова – /Кустова Т.И./

		160205		молоке	
8	B-277	Bacillus cereus	31	Среда на молоке	27-29
9	B-1367	Bacillus cereus ATCC 10702	16	Среда на молоке	отсутствует
10	B-836	Mycobacterium smegmatis GK	20	Среда на молоке	2
11	B-330	Streptococcus faecalis 555	10	Среда на молоке	отсутствует
12	B-1364	Salmonella abony 103/39	11	Среда на молоке	отсутствует
13	B-1363	Staphylococcus epidermidis ATCC 14990	10	Среда на молоке	отсутствует
14	B-1348	Staphylococcus haemolyticus MRS	20	Среда на молоке	отсутствует
15	B-1295	Pseudomonas aeruginosa	12	Среда на молоке	отсутствует
16	B-582	Shigella sonnei 32	23	Среда на молоке	отсутствует
17	B-378	Klebsiella pneumonia 378	31	Среда на молоке	26-28
18	B-1266	Staphylococcus aureus ATCC 6538	22	Среда на молоке	отсутствует
19	B-1268	Enterococcus faecium ATCC 19434	25	Среда на молоке	отсутствует
20	B-581	Salmonella typhimurium 2606	30	Среда на молоке	24-27

/Кустова Т.И/

21	B-1335	Shigella sonnei 5063	23	Среда на молоке	отсутствует
22	B-1	Serratia marcescens d	33	Среда на молоке	27-30
23	B-1352	Staphylococcus aureus 1850 MRSA	20	Среда на молоке	отсутствует
24	B-1337	Salmonella interica 441 №14	18	Среда на молоке	отсутствует
25	Y-583	Candida albicans 620	5	Среда на молоке	отсутствует

Штамм Lactobacillus acidophilus n.v. Ep 317/402 Наринэ АААА использован для производства опытной партии продукта «Наринэ Радужный». Это высушенная в вакууме биомасса ацидофильных лактобактерий Lactobacillus acidophilus n.v. Ep 317/402 Наринэ АААА.

Проведены эксперименты по влиянию бакпродукта «Наринэ Радужный», произведенный на основе штамма Lactobacillus acidophilus n.v. Ep 317/402 "Наринэ АААА, депонированного в ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» под номером B-1321 и во Всероссийской коллекции микроорганизмов ИБФМ им. Г.К.Скрябина РАН под номером B-3468D, на течение аллоксанового диабета у экспериментальных животных.

Работу проводили на базе лаборатории эндокринологии ГУ НЦКЭМ СО РАМН и лаборатории ультраструктурных исследований ГУ НИИ КЭЛ СО РАМН (январь–март 2019).

Эксперименты были проведены на половозрелых крысах-самцах Вистар, полученных из питомника Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск). Содержание, уход за животными и выведение их из эксперимента осуществляли в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием

Т.Кестова - /Кустова Т.И/

экспериментальных животных» (Приложение к приказу МЗ СССР от 12.08.1977 г. №755). Животных содержали в индивидуальных клетках на стандартном рационе вивария при свободном доступе к воде. Крысы получали корм в 14 - 16 часов ежедневно.

Было сформировано 4 группы экспериментальных животных:

- интактные животные, не подвергавшиеся воздействиям (n=3);

- крысы, получавшие в течение 3 недель ежедневно в утреннее время per os по 0,5 мл бакпродукта (n = 6), группа "Наринэ Радужный";

- крысы с аллоксановым диабетом (n = 4), группа "Ал";

- крысы с аллоксановым диабетом, получавшие со следующего после введения аллоксана дня в течение 3 недель бакпродукт по вышеуказанной схеме (n = 9), группа "Ал+Наринэ Радужный".

Экспериментальный сахарный диабет вызывали однократным внутрибрюшинным введением диабетогенной дозы аллоксана - 17 мг/100 г массы тела.

В динамике развития сахарного диабета измеряли массу тела, объем выпитой воды, диурез, глюкозурию. В конце эксперимента у всех животных измеряли массу тела и внутренних органов; уровни глюкозы, холестерина, триглицеридов, иммунореактивного инсулина (ИРИ); активность ферментов – аспартатаминотрансаминазы (АСТ) и аланинаминотрансаминазы (АЛТ) в сыворотке крови; проводили морфометрическое исследование поджелудочной железы и слизистой оболочки тонкой и толстой кишок.

Определение концентрации глюкозы, холестерина, триглицеридов в сыворотке крови проводили с использованием наборов «FLUTEST GLU», «FLUTEST CHOL», «Biosub TG» (Biocon, Германия), активности ферментов в печени - с использованием наборов Biozyme (Biocon, Германия). Содержание иммунореак-

Т.Кусто - /Кустова Т.И/

тивного инсулина (ИРИ) в сыворотке крови измеряли радиоиммунным методом с использованием набора рио-ИНС-ПГ-125J ХОПИБОХ (Беларусь), рассчитывали глюкозо-инсулиновый индекс как отношение концентрации глюкозы в ммоль/л к концентрации ИРИ в пкмоль/л.

Поджелудочную железу фиксировали в жидкости Буэна 24 часа при температуре +4 °С, обезвоживали в серии спиртов возрастающей концентрации, заливали в гистопласт. Срезы толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Проводили морфометрическое исследование эндокринной части поджелудочной железы: подсчитывали количество островков Лангерганса на стандартной площади 10мм2, методом точечного счета определяли их индивидуальные размеры (площадь, мм2), суммарный относительный объем (Vv%).

Образцы подвздошной и толстой кишки фиксировали в 1% растворе OsO4 на фосфатном буфере (pH=7,4), дегидратировали в этиловом спирте возрастающей концентрации и заключали в эпон. Из полученных блоков готовили полутонкие срезы толщиной 1 мкм, окрашивали толуидиновым голубым и изучали под световым микроскопом. Определяли количество бокаловидных клеток, межэпителиальных лимфоцитов и глобулярных лейкоцитов в расчете на 100 энтероцитов в эпителиальной выстилке слизистой оболочки кишечной ворсинки подвздошной кишки. В эпителии толстой кишки изучали число бокаловидных клеток и межэпителиальных лимфоцитов в расчете на 100 колоноцитов. Определяли процентное соотношение фибробластов, макрофагов, эозинофилов, тучных клеток, плазмоцитов и лимфоцитов в собственной пластинке подвздошной и толстой кишок.

Статистическую обработку материала осуществляли с использованием пакета программ Statistica 6 ("StatSoft" США). Проводили однофакторный дисперсионный анализ, затем post hoc сравнение с использованием критерия

Т.Кешиф -/Кустова Т.И/

Ньюмена-Кейлса или непараметрического критерия Манна-Уитни. Вероятность справедливости нулевой гипотезы принимали при 5 % уровне значимости.

Данные в таблицах и тексте представлены в виде среднего арифметического и стандартной ошибки среднего (M±m).

Результаты исследований.

Прижизненные показатели, значения гормонально-метаболических параметров крови и массовые индексы внутренних органов экспериментальных животных.

В таблице 2 представлены результаты измерения прижизненных показателей у экспериментальных животных.

Значения прижизненных показателей у крыс, получавших бакпродукт, не отличались от таковых у интактных животных. У крыс группы "Ал+Наринэ Радужный" статистически значимых отличий по прижизненным показателям от животных группы "Ал" также не было выявлено, хотя можно отметить тенденцию к большему приросту массы тела, меньшему объему потребляемой воды и диуреза, меньшим значениям глюкозурии, что в общем позволяет говорить о более легком течении заболевания у животных, принимавших бакпродукт.

В таблице 3 представлены данные по измерению уровней метаболитов, гормонов и активности ферментов в сыворотке крови крыс в конце эксперимента. У крыс, получавших бакпродукт, в сыворотке крови снизились содержание холестерина (на 14,5%) и активность сывороточной АЛТ (в 2 раза) по сравнению с интактными животными. В этой же группе животных отмечена тенденция к уменьшению концентрации триглицеридов (см. табл. 3). У крыс с диабетом, также как и у здоровых животных, на фоне приема бакпродукта отмечали уменьшение содержания триглицеридов, холестерина в сыворотке крови и снижение активности АЛТ (см. табл. 3).

/Кусова Т.И/

Таблица 2.

Значения прижизненных показателей у экспериментальных животных

	Интактные	Наринэ Радужный	Ал	Ал+Наринэ Радужный
Прирост массы тела за 3 недели, г	65±16	77±13	22±16*+	25±16 *+
Прирост массы тела за 3 недели, %	30,8±10,3	36,3±6,6	10,8±9,2 *+	13,3±7,4 *+
Суточное потребление воды через 1 и 2 недели после начала эксперимента, мл/сут	6±1 (среднее по двум срокам)	8±1 (среднее по двум срокам)	130±25* 120±35*	90±20*+ 90±20*+
Суточный диурез через 1 и 2 недели после начала эксперимента, мл/сут	6±2 (среднее по двум срокам)	6±2 (среднее по двум срокам)	92±28* 92±23*	66±14*+ 66±12*+
Глюкозурия через 1 и 2 недели после начала эксперимента, г/сут	0,002±0,001 (среднее по двум срокам)	0,005±0,002 (среднее по двум срокам)	5,2±2,4* 7,8±2,7*	4,1±0,6*+ 5,6±1,3*+
Концентрация глюкозы в моче через 1 и 2 недели после начала эксперимента, ммоль/л	3,0±1,4 (среднее по двум срокам)	5,0±0,8 (среднее по двум срокам)	458±34* 324±40*	390±70*+ 249±63*+

Примечание. Отличия статистически значимы (p<0,05): * - от интактных животных; + - от группы "Наринэ Радужный".

/Кусова Т.И/

Таблица 3.

Содержание метаболитов, ИРИ и активность ферментов в сыворотке крови экспериментальных животных

Показатель	Интактные	Наринэ Радужный	Ал	Ал+Наринэ Радужный
Глюкоза, ммоль/л	6,8±0,9	7,2±0,2	25,9±2,4 *	20,4±2,0 *+
Триглицериды, ммоль/л	3,68±0,68	2,65±0,33	4,52±0,58	2,78±0,23 #
Холестерин, ммоль/л	2,82±0,12	2,41±0,11*	3,52±0,35	3,22±0,20 +
АСТ, Ед/л	94,8±6,13	83,7±10,0	116,4±30,1	126,5±25,2
АЛТ, Ед/л	59,4±11,8	28,3±1,2 *	57,6±2,8	41,5±1,8 *+#
ИРИ, пкмоль/л	165,7±13,0	161,5±25,7	79,1±3,6 *	101,3±8,1 *+
Глюкоза/ИРИ	0,042±0,008	0,048±0,006	0,326±0,015 *	0,219±0,031 *+#

Примечание. Отличия статистически значимы ($p<0,05$): * - от интактных животных; + - от группы "Наринэ Радужный"; # - от группы "Аллоксан".

Через 3 недели после введения аллоксана у крыс была выявлена явная форма экспериментального сахарного диабета, которая характеризовалась трехкратным увеличением уровня глюкозы в крови по сравнению со здоровыми животными, причем у крыс из группы "Ал+Наринэ Радужный" была отмечена тенденция к меньшим значениям этого показателя по сравнению с животными из группы "Ал". Содержание ИРИ в крови крыс из групп "Ал" и "Ал+Наринэ Радужный" было достоверно ниже, чем у здоровых животных, однако у крыс, получавших бакпродукт, уровень гормона имел тенденцию к увеличению, а среднее значение глюкозо-инсулинового индекса было достоверно ниже по сравнению с животными из группы "Ал" (см. табл. 3). Полученные данные позволяют предполагать, что у крыс из группы "Ал+Наринэ Радужный по сравнению с жи-

/Кусепова Т.Ц/

вотными их группы "Ал" выявляются более выраженные признаки начала процесса восстановления нарушений в гормональной регуляции углеводного обмена.

Из таблицы 4, в которой представлены данные по массовым индексам внутренних органов, следует, что относительная масса жировых депо у крыс, получавших бакпродукт, на 27% меньше, чем у интактных животных. Усилению диуреза и снижению массы тела у крыс с аллоксановым диабетом (см. табл. 2) соответствуют данные об увеличении массового индекса почек и снижении относительной массы жировых депо (см. табл. 4). Разницы в средних значениях этих показателей в группах "Ал" и "Ал+Наринэ Радужный" отмечено не было.

Таблица 4.

Массовые индексы внутренних органов экспериментальных животных

Показатель	Интактные	Наринэ Радужный	Ал	Ал+Наринэ Радужный
Сердце, г/100г массы тела	0,29±0,01	0,31±0,01	0,34±0,02	0,33±0,02
Почка, г/100г массы тела (1)	0,61±0,05	0,64±0,01	1,20±0,25 *	0,97±0,06 *+
Селезенка, г/100г массы тела	0,52±0,04	0,62±0,07	0,62±0,06	0,57±0,05
Жировые депо: эпидидимальный и забрюшинный белый жир, г/100г массы тела	3,33±0,33	2,42±0,15 *	1,05±0,42 *	1,27±0,28 *+
Тимус, г/100г массы тела	0,15±0,03	0,13±0,01	0,06±0,01 *	0,09±0,01 *+
Надпочечники, мг/100г массы тела	12,29±0,52	13,32±1,26	26,24±2,38 *	20,05±1,21 *+#

/Кустова Т.И/

Щитовидная железа, мг/100г массы тела	5,56±1,12	4,44±0,44	5,94±0,36	4,78±0,22

Примечание. Отличия статистически значимы (p<0,05): * - от интактных животных; + - от группы "Наринэ Радужный"; # - от группы "Аллоксан".

У крыс с диабетом относительная масса тимуса снижалась почти вдвое, а относительная масса НП – увеличивалась на 63 – 113% по сравнению с интактными животными. При этом массовый индекс НП у крыс из группы "Ал+Наринэ Радужный" был достоверно ниже, чем у крыс из группы "Ал" (см. табл. 4).

Таким образом, восстановление нарушенной гормональной регуляции углеводного обмена у крыс с диабетом на фоне приема бакпродукта происходило быстрее. Об этом свидетельствуют данные о содержании ИРИ в сыворотке крови и значения глюкозо-инсулинового индекса. Полученные результаты также позволяют предпологать, что прием бакпродукта способствует усилению липидного обмена в организме экспериментальных животных.

Морфометрическое исследование поджелудочной железы.

В таблице 5 приведены результаты морфометрического исследования островкового аппарата поджелудочной железы крыс, в таблице 6 – данные по количеству островков разного размера на стандартной площади среза.

Таблица 5

Результаты морфометрического исследования поджелудочной железы экспериментальных животных

Показатели	Интактные	Наринэ Радужный	Ал	Ал+Наринэ Радужный
Количество островков	12,34±0,68	10,64±0,83	4,70±0,76	5,72±0,85*+

/Кусова Т.И/

(N/10мм^2)			*	
Относительный объем островков (Vv%)	1,25±0,10	0,94±0,10 *	0,30±0,05 *	0,41±0,07 *+

Примечание. Отличия статистически значимы (P<0,05): * - от интактных животных; + - от группы "Наринэ Радужный"

У крыс, получавших бакпродукт, отмечена тенденция к уменьшению численной плотности островков Лангерганса в поджелудочной железе и достоверное снижение их суммарного относительного объема (см. табл. 5). Анализ индивидуальных размеров островков на стандартной площади показал, что у этих животных уменьшилось количество крупных функционально более активных островков на стандартной площади среза (см. табл. 6).

У животных с аллоксановым диабетом были достоверно снижены как численная плотность, так и суммарный относительный объем панкреатических островков, при этом многие островки были с признаками деструкции. Наибольшее снижение количества отмечено для крупных островков.

У животных из группы "Ал+Наринэ Радужный" численность и относительный объем островков Лангерганса были меньше, чем у животных из группы "Наринэ Радужный", однако по сравнению с группой "Ал" было отмечено в два раза большее количество крупных островков (см. табл. 5).

Таблица 6

Количество островков разных размеров на стандартной площади среза поджелудочной железы экспериментальных животных

Размер островков, мм^2	Интактные	Наринэ Радужный	Ал	Ал+Наринэ Радужный

/Кусмова Т.И/

$2*10^{-3}$ (мелкие)	2,62±0,65	2,81±0,52	1,29±0,39	1,59±0,37
$4*10^{-3}$ (средние)	2,50±0,60	2,42±0,19	1,03±0,24 *	0,85±0,14 *+
$5*10^{-3}$ (средние)	2,95±0,69	2,71±0,26	1,75±0,37	2,14±0,33
$>10*10^{-3}$ (крупные)	4,28±0,84	2,70±0,46*	0,64±0,17 *	1,27±0,31 *+

Примечание. Отличия статистически значимы (P<0,05): * - от интактных животных; + - от группы "Наринэ Радужный".

Таким образом, прием бакпродукта здоровыми животными сопровождался уменьшением объема эндокринной части поджелудочной железы. У крыс с аллоксановым диабетом бакпродукт не оказывал выраженного влияния на восстановление численности и объема панкреатических островков. Отмеченная тенденция к увеличению доли активно функционирующих крупных островков в поджелудочной железе согласуется с данными о более высоком уровне ИРИ в крови крыс из группы "Ал+Наринэ Радужный" по сравнению с животными из группы "Ал".

Морфометрическое исследование слизистой оболочки тонкого и толстого кишечника экспериментальных животных

В таблицах 7 и 8 приведены результаты морфометрического исследования эпителия ворсинок и собственной пластинки слизистой оболочки подвздошной кишки крыс.

У крыс, получавших бакпродукт, отмечали возрастание числа бокаловидных клеток на 27%, содержание межэпителиальных лимфоцитов уменьшилось на 35%. В эпителии кишечных ворсинок подвздошной кишки кроме межэпителиальных лимфоцитов наблюдали глобулярные лейкоциты – небольшие клетки, расположенные около базальной мембраны, имеющие небольшое число крупных гранул, интенсивно окрашивающихся толуидиновым синим. Их количество

/Кустова Т.И./

было одинаковым у крыс из всех экспериментальных групп.

Таблица 7

Результаты морфометрического исследования эпителия ворсинок подвздошной кишки экспериментальных животных

Показатель	Интактные	Наринэ Радужный	Аллоксан	Аллоксан + Наринэ Радужный
Бокаловидные клетки	14,82±1,04	18,86±1,31*	17,58±0,90*	15,30±0,96
Межэпителиальные лимфоциты	25,14±1,77	16,24±1,89*	26,73±1,97	18,13±1,63*#
Глобулярные лейкоциты	5,29±0,75	5,96±0,72	6,53±0,73	5,17±0,91

Примечания. Количество бокаловидных клеток, межэпителиальных лимфоцитов и глобулярных лейкоцитов рассчитано на 100 энтероцитов. Отличия статистически значимы (P<0,05): * - от интактных животных; # - от группы "Аллоксан".

Таблица 8.

Результаты морфометрического исследования собственной пластинки слизистой оболочки подвздошной кишки экспериментальных животных

Показатель	Интактные	Наринэ Радужный	Ал	Ал+Наринэ Радужный
Фибробласты (%)	20,76±0,93	29,84±1,42*	21,43±0,99	20,91±1,64
Фиброциты (%)	2,98±0,53	2,44±0,50	4,37±0,68	5,26±0,78*

/Кедрова Т.И/

Макрофаги (%)	18,91±1,16	19,94±1,12	19,93±0,85	16,30±1,44#
Эозинофилы (%)	8,10±0,83	9,74±0,88	6,98±0,69	7,52±1,28
Тучные клетки (%)	1,82±0,30	2,26±0,39	2,42±0,34	2,03±0,44
Плазмоциты (%)	7,96±0,98	7,33±0,92	12,31±0,84*	9,56±1,98
Лимфоциты (%)	39,12±1,81	27,42±1,71*	32,08±1,33*	38,27±2,08#

Примечания. Рассчитана доля каждого типа клеток в процентах. Отличия статистически значимы (P<0,05): * - от интактных животных; # - от группы "Аллоксан".

В собственной пластинке слизистой оболочки кишечных ворсинок наблюдали фибробласты, различающиеся по форме в зависимости от степени зрелости. Выделяли фибробласты и фиброциты (дефинитивные формы фибробластов). Отмечали макрофаги, плазматические клетки, лимфоциты, эозинофилы и тучные клетки. Нейтрофилы и глобулярные лейкоциты встречались единично. Кровеносные капилляры имели небольшие просветы. Лимфатические капилляры располагались в центре кишечных ворсинок и имели широкие просветы.

У крыс, получавших бакпродукт, в собственной пластинке слизистой оболочки тонкой кишки возростало содержание фибробластов на 44%. Просветы кровеносных и лимфатических капилляров были расширены. Так же, как и в эпителиальной выстилке, в собственной пластинке слизистой оболочки уменьшалось количество лимфоцитов (на 30%).

Увеличение содержания бокаловидных клеток, вырабатывающих слизь, может говорить о повышении эффективности процесса пищеварения и усилении барьерных свойств эпителия ворсинок у крыс, получавших Наринэ Радужный.

У крыс с аллоксановым диабетом на 18,6% увеличилось количество бокаловидных клеток в эпителии кишечных ворсинок и была отмечена тенденция к

/Кусова Т.И/

повышению содержания глобулярных лейкоцитов (см. табл. 7). В собственной пластинке на 54,6% увеличилось количество плазмоцитов и на 18% уменьшилось количества лимфоцитов, что может свидетельствовать об активации гуморального иммунитета. Соотношение других клеток собственной пластинки слизистой оболочки кишечной ворсинки тонкой кишки у крыс с аллоксановым диабетом достоверно не отличалось от соответствующих значений в контроле (см. табл. 8).

У крыс с аллоксановым диабетом, получавших бакпродукт, содержание бокаловидных клеток в эпителии ворсинок было несколько ниже, чем в группе "Ал" и достоверно не отличалось от соответствующего значения в контроле. Содержание межэпителиальных лимфоцитов было ниже контрольного значения на 28% и меньше, чем у крыс с аллоксановым диабетом на 33% (см. табл. 7).

В собственной пластинке слизистой оболочки подвздошной кишки крыс из группы "Ал+Наринэ Радужный" было отмечено повышение количества фиброцитов. Такую же тенденцию отмечали и у крыс из группы "Ал". Содержание лимфоцитов в собственной пластинке соответствовало значению в контроле (см. табл. 8). Сопоставление этих данных со снижением количества межэпителиальных лимфоцитов говорит о меньшем напряжении иммунного гомеостаза у крыс из группы "Ал+Наринэ Радужный", чем у крыс из группы "Ал". Возможно, по этой же причине на 18% уменьшилось количество макрофагов.

Таким образом, использование бакпродукта способствовало снижению содержания лимфоцитов в эпителии и собственной пластинке слизистой оболочки тонкой кишки. При этом происходило возрастание числа бокаловидных клеток в эпителии и фибробластов в собственной пластинке слизистой оболочки тонкой кишки, как следствие возрастания барьерных свойств органа. Применение бакпродукта на фоне аллоксанового диабета оказывало некоторое корригирующее действие на структуру слизистой оболочки тонкой кишки.

Т.Кусто – /Кустова Т.Ч/

В таблице 9 приведены результаты морфометрического исследования слизистой оболочки толстой кишки крыс.

Таблица 9

Результаты морфометрического анализа состояния слизистой оболочки толстой кишки экспериментальных животных

Показатели	Интактные	Наринэ Радужный	Ал	Ал + Наринэ Радужный
Бокаловидные клетки (N)	163,2 ± 32,12	319,9 ± 51,88*	163,3 ± 24,19	163,6 ± 14,75
Межэпителиальные лимфоциты (N)	6,0 ± 2,29	5,0 ± 2,12	9,1 ± 1,88	6,1 ± 1,41
Макрофаги (%)	28,0 ± 2,59	23,4 ± 2,04	14,2 ± 2,09*	10,0 ± 1,63*
Плазматические клетки (%)	9,3 ± 2,41	12,9 ± 1,28	14,6 ± 1,81	7,8 ± 2,19#
Лимфоциты (%)	15,3 ± 2,66	8,1 ± 1,10*	9,9 ± 1,27	16,9 ± 4,08
Тучные клетки (%)	1,36 ± 0,64	3,2 ± 0,65*	3,02 ± 0,65	2,3 ± 0,78
Фибробласты (%)	37,5 ± 3,42	42,4 ± 2,72	50,0 ± 3,45*	56,8 ± 4,41*
Эозинофилы (%)	8,5 ± 2,42	9,9 ± 0,90	7,4 ± 1,37	6,2 ± 1,03

Примечания. Количество бокаловидных клеток и межэпителиальных лимфоцитов рассчитано на 100 энтероцитов; количество клеток каждого вида в собственной пластинке слизистой оболочки рассчитано как доля (%) от общего числа клеток в тестовой площади. Отличия статистически значимы (P<0,05): * - от интактных животных; # - от группы "Аллоксан".

У животных, получавших бакпродукт, отмечали увеличение в 2 раза количества бокаловидных клеток в эпителии слизистой оболочки толстой кишки.

[signature] – /Кустова Т.И/

При этом содержание межэпителиальных лимфоцитов оставалось на уровне контрольных показателей.

В собственной пластинке слизистой оболочки толстой кишки наблюдали увеличение в 2 раза количества тучных клеток и уменьшение числа лимфоцитов на 47%.

При исследовании слизистой оболочки толстой кишки крыс с аллоксановым диабетом не наблюдали достоверных различий в соотношении клеток в эпителиальной выстилке. Однако в собственной пластинке слизистой оболочки отмечали отек интерстиция, снижение содержания макрофагов на 49% и возрастание количества фибробластов на 33% по сравнению с соответствующими показателями у интактных крыс. Структура кровеносных сосудов мало отличались от сосудов толстой кишки у интактных крыс, но при этом было отмечено появление бактерий в просвете капилляров как слизистого так и подслизистого слоев. В лимфатических сосудах наблюдали скопления лимфоцитов.

При исследовании слизистой оболочки толстой кишки у крыс с аллоксановым диабетом, получавших «Наринэ Радужный», не наблюдали достоверных отличий в соотношении клеток в эпителиальной выстилке. В собственной пластинке толстой кишки этих животных наблюдали уменьшение количества макрофагов на 64% и возрастание фибробластов на 51% по сравнению с интактными животными. В собственной пластинке отмечали уменьшение количества плазматических клеток на 47% по сравнению с животными из группы "Ал". В просветах сосудов подслизистого слоя наблюдали бактерии, также как и у животных с аллоксановым диабетом.

Таким образом, при профилактическом применении «Наринэ Радужный» происходило возрастание содержания бокаловидных клеток в эпителии слизистой оболочки толстой кишки, не изменялось количество межэпителиальных

/Кусова Т.И/

лимфоцитов. В собственной пластинке слизистой оболочки толстой кишки наблюдали увеличение количества тучных клеток и уменьшение числа лимфоцитов. У крыс с аллоксановым диабетом, получавших «Наринэ Радужный», в собственной пластинке слизистой оболочки имело место уменьшение количества макрофагов и плазматических клеток, возрастало число фибробластов. Полученные данные указывают на выраженное влияние приема бакпродукта на структуру слизистой оболочки кишечника здоровых и больных крыс.

Пример приготовления рабочей закваски для получения кисломолочного продукта на основе штамма НАРИНЭ АААА

Для приготовления рабочей закваски стерилизованное или пастеризованное козье молоко заквашивают при температуре 38-40 °С культурой Lactobacillus acidophilus n.v. Ep 317/402 Наринэ АААА из расчёта 2-3% от общего количества молока. Смесь инкубируют в течении 5-8 часов. Сквашенную закваску охлаждают до 6 °С, выдерживают при этой же температуре 5 часов. Кислотность сгустка 160 °Т. Количество живых клеток в 1 мл жидкой закваски до 260 млн. клеток.

Полученная рабочая закваска может быть использована в качестве бактериального препарата с высокими селекционными свойствами для получения диетических, оздоравливающих продуктов питания. Продукт в виде сухой закваски используют как диетическое, функциональное питание в любом возрасте, особенно, для грудных детей при отсутствии материнского грудного молока, а также в качестве прикорма детей. Продукт эффективен для оздоровления животных.

Пример приготовления кисломолочного продукта на основе на основе штамма НАРИНЭ АААА

Для приготовления кисломолочного продукта используется охлаждённое до 38-40 °С цельное козье молоко, куда вносится 2-3% рабочей закваски штамма

Кусова Т.И.

Lactobacillus acidophilus n.v. Ep 317/402 Наринэ АААА. Смесь перемешивают и выдерживают при температуре 38-40 °С в течение 5-8 часов до образования сгустка кислотностью 80-90 °Т, затем помещают в холодильник на 2-3 часа для созревания. Качество приготовленного напитка сохраняется в течении 7-10 дней при температуре +4-6 °С.

Продукт, полученный на основе штамма Lactobacillus acidophilus n.v. Ep 317/402 Наринэ АААА, имеет питательную ценность до 900 кал. Кислотность готового продукта составляет 130 °Т, азот % 8,7, аминный азот мг% - 23.

/Кусикова Т.И/

Формула изобретения

Штамм бактерий Lactobacillus acidophilus n.v. EP 317/402 "Наринэ" AAAA, депонирован в ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» под номером B-1321 и во Всероссийской коллекции микроорганизмов ИБФМ им. Г.К.Скрябина РАН под номером B-3468D, предназначенный для восстановления нормальной гормональной регуляции и микрофлоры кишечника, а также повышения иммунитета организма.

/Кустова Т.И/

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ

(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

202000139

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:

C12N 1/20 *(2006.01)*
C12R 1/23 *(2006.01)*

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)

C12N 1/20; C12R 1/23

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)

ЕАПАТИС, ESPACENET, GOOGLE, YANDEX, EMBASE; Lactobacillus acidophilus, Нарине, селекция, микрофлора кишечника, иммунитет, гормоны, диабет, metabolism, immunological processes

В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
Y	RU 2176668 C1 (ФГУП НПО «Вирион»), 10.12.2001, реферат, описание: стр.6, колонка 1, строки 38-49, колонка 2, строки 20-34.	1
Y	RU 2203946 C1 (ХАЧАТРЯН АШОТ ПАПИКОВИЧ; ХАЧАТРЯН РОБЕРТ ГРИШАЕВИЧ, ХАЧАТРЯН НАДЕЖДА АЛЕКСЕЕВНА), 10.05.2003, реферат.	1
Y	UA 56726 U (МУДРИК ОЛЕГ АЛЕКСАНДРОВИЧ, СОКУРЕНКО СЕРГЕЙ ВЛАДИМИРОВИЧ, СОКУРЕНКО ТАТЬЯНА АНАТОЛЬЕВНА), 25.01.2011, описание: стр.1, строки 48-53.	1
Y	AM 1473 A2 (ФЛОРА ТХРУНИ), 06.07.2004, реферат.	1
A	RU 2013103867 A (ФГБОУ ВПО «НОВОСИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ПЕДАГОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»), 10.08.2014, п.7 формулы.	1
A	RU 2353094 C2 (АРАКЕЛЯН РАИСА АРАМОВНА, АБОВЯН ЖОРА СЕДРАКОВИЧ), 27.04.2009, стр.3 строка 53 – стр.4, строки 1-4.	1
A	KR 20140144496 A (KOREA YAKULT CO LTD), 19.12.2014, реферат.	1
A	ИРКИТОВА А.Н., МАЦЮРА А.В. и др. Эколого-биологическая характеристика Lactobacillus acidophilus. Ukrainian Journal of Ecology, 2017, т.7, № 4, стр.214–230 (стр.218-223, 225-227), doi: 10.15421/2017_109.	1

☐ последующие документы указаны в продолжении

* Особые категории ссылочных документов:
«A» - документ, определяющий общий уровень техники
«D» - документ, приведенный в евразийской заявке
«E» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее
«O» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.
"P" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«T» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения
«X» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности
«Y» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории
«&» - документ, являющийся патентом-аналогом
«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: **05/10/2020**

Уполномоченное лицо:
Заместитель начальника Управления экспертизы
Начальник отдела химии и медицины

А.В.Чебан