

(19) **KG** (11) **488** (13) **C1**

ГОСУДАРСТВЕННОЕ АГЕНТСТВО ПО НАУКЕ И (51)⁷ **A61P 1/00, 43/00**
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ ПРИ
ПРАВИТЕЛЬСТВЕ КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ (КЫРГЫЗПАТЕНТ)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

к предварительному патенту Кыргызской Республики

(21) 20010051.1

(22) 01.08.2001

(46) 31.12.2001, Бюл. №12

(71)(73) Эгембердиев Т.Б., Эгембердиев Ж.Б., Кыштобаева С.Т. (KG)

(72) Эгембердиев Т.Б., Эгембердиев Ж.Б., Кыштобаева С.Т., Мамырбаева Т.Т., Черикчиева А.Б. (KG)

(56) Предварительный патент KG №74, кл. A23C 23/00, 1994

(54) **Регулятор кишечного микробиоценоза**

(57) Изобретение относится к медицине и может быть использовано в гастроэнтерологии для профилактики и лечения кишечных инфекций. Изобретение позволяет расширить арсенал терапевтических средств за счет использования безалкогольного тонизирующего напитка по патенту KG №184 в качестве регулятора кишечного микробиоценоза. Представлены новые свойства напитка в виде антибиотической активности по отношению к патогенной и условно-патогенной кишечной микрофлоре, симбиотичности и стимулирующей активности по отношению к полезной микрофлоре, а также модулирующее влияние на pH среды кишечного микробиоценоза. Показан минеральный и аминокислотный состав напитка. 5 табл., 3 пр.

Изобретение относится к медицине, в частности к гастроэнтерологии.

Известны фармацевтические препараты, регулирующие равновесие кишечной микрофлоры на основе живых микроорганизмов и продуктов их жизнедеятельности. Они подразделяются на 6 обобщенных подгрупп препаратов, содержащих: монокультуры живых микроорганизмов, комплекс живых микроорганизмов, препараты-стимуляторы роста полезной микрофлоры, препараты-стимуляторы приживления полезной микрофлоры, препараты с генно-инженерными штаммами микроорганизмов с заданными характеристиками, препараты, влияющие на функции клеток органов и тканей человека (Спасов А.А., Ивахненко И.В. Эубиотики // Новые лекарства и новости фармакотерапии, №4, 1999; Энциклопедия лекарств. - М.: "РЛС-2000", 1999. - 1070 с.).

Использование этих препаратов ограничивается строгими предписаниями врача, что не позволяет их отнести к продуктам широкого спроса.

В медицине также известно использование пищевых продуктов в лечебно-диетических целях, таких как кефир, йогурты, простокваша Мечникова, содержащих

микроорганизмы *Lactobacillus bulgaricus* и *Streptococcus thermophilus*, которые оказывают благоприятный эффект на работу кишечника. Промежуточную нишу между фармацевтическими препаратами и лечебно-диетическими пищевыми продуктами занимает молочно-кислый продукт "Лактобальзам" (предварительный патент KG №74, кл. A23C 23/00; 1996). Продукт готовится на основе обезжиренного коровьего молока путем его тепловой обработки, охлаждения и закваски биологически активной монокультурой штамма *Lactobacillus bulgaricus*. Лактобальзам по предварительному патенту №74 обладает антибиотической направленностью на патогенные и условно-патогенные микроорганизмы кишечного биоценоза, то есть функционально он имеет частично сходные признаки с изобретением, но технологии их получения несопоставимы.

Недостатком перечисленных молочнокислых продуктов, используемых в лечебно-диетических целях, является ограниченность воздействия на кишечный микробиоценоз и транзиторность их полезной микрофлоры, которая в силу биологических свойств не способна приживаться в кишечнике и действует только в период его прохождения.

Задачей изобретения является расширение ассортимента лечебных средств за счет натуральных пищевых продуктов, способных регуляторно воздействовать на кишечный микробиоценоз.

Задача решается путем использования широко распространенного пищевого продукта - безалкогольного тонизирующего напитка по патенту KG №184 в новом для него качестве регулятора кишечного микробиоценоза (далее по тексту - напиток). О напитке известно лишь то, что он является продуктом ежедневного спроса как питательный, утоляющий жажду, безалкогольный тонизирующий напиток с содержанием витаминов В₁, В₂, С и РР. Его лечебные свойства обнаружены впервые.

Напиток в соответствии с технологией по патенту KG №184 получают путем закваски пекарскими дрожжами проваренной в воде и остуженной смеси круп обжаренных злаков с добавлением жира. Исходная крупяная смесь содержит в определенных пропорциях ячмень, кукурузу, овес и обжаренную на жире пшеничную муку. После 12-16 часов брожения напиток готов к употреблению и поступает в розничную торговлю в бутылированной таре или в бочковом виде.

Лечебные свойства безалкогольного тонизирующего напитка обусловлены его влиянием на кишечный микробиоценоз.

Кишечный микробиоценоз является сложной внутренней микрэкосистемой, представляющей собой совокупность популяций живых микроорганизмов из облигатной (защитной, полезной) микрофлоры, которая гармонично сосуществует с факультативной (условно-патогенной) микрофлорой, выполняя многочисленные функции по жизнеобеспечению макроорганизма хозяина.

В норме главными свойствами кишечного микробиоценоза являются сохранение стабильности баланса облигатной и факультативной микрофлоры, наличие колонизационной резистентности (то есть антагонизма) по отношению к патогенным микроорганизмам, обеспечение комфортной внутренней среды (рН) для полноценного развития и функционирования защитной микрофлоры.

При сохранении перечисленных свойств в норме кишечный микробиоценоз выполняет ряд функций, имеющих важное значение для жизнедеятельности человека. Кишечный микробиоценоз способствует процессам ферментативной трансформации белков, липидов, высокомолекулярных углеводов, нуклеиновых кислот, клетчатки; участвует в широком спектре процессов синтеза витаминов, аминокислот, в обменных процессах; регулирует процессы метаболизма желчных кислот, холестерина; участвует в детоксикации экзогенных и эндогенных субстратов; синтезирует вещества с антибактериальной активностью; повышает иммунную реактивность организма, способствуя уничтожению атипичных клеток и укреплению общего иммунитета (Спасов А.А., Ивахненко И.В. Эубиотики // Новые лекарства и новости фармакотерапии, №4, 1999. - С. 30-31).

Проведен стандартный анализ на обсемененность патогенной микрофлорой напитка и анализ его микробиологического состава. Анализ на патогенную микрофлору подтвердил ее отсутствие. При анализе результата посева на среду Лактобакагар по морфологическим, культуральным, физиологическим и биохимическим признакам были идентифицированы *Lactobacillus plantarum* (10^6 в 1 мл) и *Candida tropicalis* (10^5 в 1 мл). Эти микроорганизмы являются симбионтами и существуют во взаимосооперации. *Lactobacillus plantarum* относится к облигатной (защитной) микрофлоре кишечного микробиоценоза и ее полезные свойства широко известны (Бондаренко В.М. и соавт. Иммуностимулирующее действие лактобактерий, используемых в качестве основы препаратов пробиотиков // Микробиология, 1998. - №5. - С. 107-112; Костюк О.П. и соавт. Физиологические и терапевтические свойства лактобактерий // Педиатрия, 1998. - №1. - С. 71-76; Enan G. et al. // Int. J. Food Microbiol., 1996, V. 30, P. 189-215).

Популяции *Lactobacillus plantarum* в кооперации с наиболее значимыми микроорганизменными популяциями (*Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum*), составляющими основу облигатной микрофлоры кишечника, имеют резко выраженную антагонистическую активность в первую очередь - к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам, изменяют pH и содержание кислорода, тем самым снижая их уровень до состояния, когда патогенная микрофлора погибает. Лактобактерий препятствуют повреждению слизистой оболочки кишечника патогенами и продуцируют антимикробные факторы. Кроме этого, лактобактерий синтезируют широкий спектр веществ, которые участвуют в процессах биорегуляции микробиоценоза. К этим веществам относятся конечные продукты метаболизма, такие как органические кислоты (молочная, уксусная), перекись водорода и соединения, известные как бактериоцины, свойственные метаболическим характеристикам *Lactobacillus plantarum*. Установлено (Klaenhamer T.R., 1998), что бактериоцины при несколько меньшем спектре активности, нежели фармакологические антибиотики, обладают более направленным антибиотическим действием по отношению к условно-патогенным и патогенным микроорганизмам кишечника. Обнаружено, что антимикробная активность лактобактерий связана с регуляторной стимуляцией иммунной системы (Perdigon G. et al., 1995). *Lactobacillus plantarum* устойчивы к фармакологическим антибиотикам (Красик А.А., 1998), что важно для сохранения лактопопуляций кишечного микробиоценоза при проведении антибиотикотерапии.

Обнаруженные в микробиологическом составе напитка *Lactobacillus plantarum* в достаточно высоком титре вносят, по-видимому, свой вклад в его антибиотическую активность, обнаруженная в напитке молочная кислота усиливает его антибиотические свойства.

Антибиотическая активность напитка по отношению к наиболее распространенным возбудителям кишечных заболеваний и условно-патогенной микрофлоре кишечника была исследована *in vitro*. Тест-культурами служили патогенные и условно-патогенные микроорганизмы, выделенные из испражнений больных инфекционной больницы, то есть клинические изоляты, обладающие определенной полирезистентностью. Напиток для исследований брали из торговой сети. Условия эксперимента были намеренно смоделированы с учетом реальных ситуаций. Процесс исследования приведен в примере 1. В таблице 1 приведены результаты эксперимента.

Таблица 1

Биологическая активность напитка по средним показателям устойчивости патогенных и условно-патогенных бактерий

Бактерии	Количество во исследова	Рост тест-культур (n=образцов) после контакта с цельным напитком и его разведениями
		Титр разведения напитка

	ний	Цельный	1:5	1:10	1:15	1:20
I. Патогенные бактерии						
Salmonella typhi murium	50	Нет роста	Нет роста	2	9	50
Salmonella enteritidis	50	Нет роста	Нет роста	1	2	50
Salmonella typhi	50	Нет роста	Нет роста	Нет роста	Нет роста	50
Staphylococcus aureus	50	Нет роста	Нет роста	1	1	50
Shigella Flexneri	50	Нет роста	Нет роста	Нет роста	2	50
II. Условно-патогенные бактерии						
Proteus mirabilis	50	Нет роста	Нет роста	Нет роста	Нет роста	50
Citrobacter	50	Нет роста	Нет роста	Нет роста	1	50
Klebsiella	50	Нет роста	Нет роста	Нет роста	2	50

Как показал эксперимент, напиток проявляет четкий антагонизм (антибиотическую активность) по отношению к экзогенным патогенным микроорганизмам, представляющим наибольшую опасность заражения, а также по отношению к эндогенным условно-патогенным микроорганизмам, способным при изменении равновесия кишечного биоценоза стать патогенными.

Установлено влияние напитка на полезную микрофлору кишечника. В качестве тест-культур полезной микрофлоры были взяты музейные микроорганизмы, представляющие наиболее распространенные популяции облигатной микрофлоры кишечника и имеющие наибольшее значение для поддержания нормосостояния микробиоценоза и выполнения перечисленных в начале описания его функций. Подробно - в примере 2 данного описания.

Таблица 2 иллюстрирует характер положительного взаимодействия цельного напитка с типичными представителями облигатной микрофлоры кишечного микробиоценоза. В таблице приведены конечные данные пересева на чистые среды в чашках Петри после взаимодействия микробной взвеси с физраствором (контрольные образцы) и напитком (опытные образцы) в условиях инкубации.

Таблица 2

Исследование биологической активности напитка по отношению к полезной микрофлоре кишечного микробиоценоза

Культура бактерий	Контрольные образцы (интактные)		Опытные образцы после контакта с напитком	
	Количество исследований	Количество колоний, ед., тест-культур	Количество исследований	Количество колоний, ед., тест-культур
Бифидобактерии (B-1, B-379, B-791)	10	50	10	Сплошной рост

Лактобактерии (<i>L.acidophilus</i> -630)	10	100	10	Сплошной рост
Колибактерии (М-17)	10	35	10	50

Как видно из таблицы 2, цельный напиток при взаимодействии с типичными представителями полезной микрофлоры кишечного биоценоза проявил не только свойство симбиотичности, но и свойства активного стимулятора их роста. Стимулирующий эффект менее выражен при взаимодействии с колибактериями, но четко выражен по отношению к лакто- и бифидобактериям.

Антагонизм (антибиотическая активность) по отношению к патогенной и условно-патогенной микрофлоре и агонизм (симбиотичность) напитка к полезной облигатной микрофлоре, подтвержденные исследованиями *in vitro*, доказывают его биорегуляторные возможности, полезные для таких свойств кишечного микробиоценоза, как сохранение стабильности баланса облигатной и факультативной микрофлоры и для повышения колонизационной резистентности по отношению к патогенным микроорганизмам.

Поскольку pH является метаболическим маркером нормосостояния кишечного микробиоценоза - свойства, обеспечивающего полноценное развитие и функционирование защитной, полезной микрофлоры, были определены параметры кислотности самого напитка и влияние напитка на pH желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), причем кислотность самого напитка колеблется в лимитах от 3.6 до 6.9 см³ NaOH. Подробно - в примере 3 данного описания. Как показали результаты исследования, при использовании в течение 5-6 дней по 400 мл цельного напитка уровень pH ЖКТ добровольцев, участвующих в эксперименте, изменялся в сторону нормализации, то есть исходно заниженные показатели повышались, а повышенные - снижались до уровня нормопоказателей. Это говорит о модулирующем эффекте воздействия на показатели pH ЖКТ. Известно, что при низких показателях pH ЖКТ происходит закисление его внутренней среды, а высокие показатели способствуют ее ощелачиванию - неблагоприятному фактору для кишечного микробиоценоза, особенно для бифидо- и лактобактерий, которые исчезают в первую очередь. Выявленное модулирующее свойство по отношению к pH ЖКТ полезно для кишечного микробиоценоза при предотвращении ощелачивания среды кишечника, а, следовательно, для сохранения комфортных условий для роста и деятельности облигатной микрофлоры.

Биологическая полиактивность напитка обеспечивается, по-видимому, сложными биохимическими трансформациями в процессе созревания напитка при взаимодействии его ингредиентных составляющих. Можно предположить, что важную роль при этом играет наличие в его микробиологическом составе *Lactobacillus plantarum* (10⁶ в 1 мл) в симбиозе с *Candida tropicalis* (10⁵ в 1 мл) и их метаболитов, а также аминокислотного состава и минеральных субстратов напитка.

Определен аминокислотный и минеральный состав напитка. Всего проведено 96 анализов, в том числе 11 - качественных и 85 - количественных, из них 46 - контрольных.

Йод (I), фосфор (P), углерод (C), водород (H), азот (N), хлор (Cl), определяли микрометодом (Климова В.А. Основные микрометоды анализа органических соединений. - М., 1975. - С. 21-39, 170-186), магний (Mg⁺⁺) -колориметрическим титрованием в биохимическом автоанализаторе SYNCHEN CXY (USA), кальций (Ca⁺⁺), цинк (Zn⁺⁺), марганец (Mn), железо (Fe⁺⁺⁺), кобальт (Co⁺⁺), медь (Cu⁺⁺), хром (Cr) -трилонометрическим (Трилон Б.) методом титрования (Пришибл Р. Комплексоны в химическом анализе. - М.: ИЛ, 1960. - С. 63), калий (K⁺), натрий (Na⁺) - на газоэлектролитном анализаторе 11-1650 (Италия).

В результате качественного анализа из смесей катионов обнаружены катионы I, II, III группы. Кобальт (Co⁺⁺) не обнаружен.

По определению углерода (C), водорода (H), фосфора (P), галогенов и зольности

осуществлено 37 анализов, азота - 10, катионов - 32 и проявлены 6 хроматограмм: 2 бумажные и 4 тонкослойные. Результаты исследования представлены в таблицах 3 и 4.

Таблица 3

Минеральный состав и зольность напитка

Химические элементы	Содержание (мг) в 100 мл напитка
Йод (I)	0.00738
Фосфор (P)	0.218
Азот (N)	2226.0
Хлор (Cl)	162.7
Магний (Mg ⁺⁺)	5.52
Кальций (Ca ⁺⁺)	79.86
Цинк (Zn ⁺⁺)	0.425
Марганец (Mn)	0.1921
Железо (Fe ⁺⁺⁺)	0.5584
Медь (Cu ⁺⁺)	0.0952
Хром (Cr)	Следы
Калий (K ⁺)	1.5
Натрий (Na ⁺)	18.7

Аминокислотный состав напитка установлен с применением бумажной и тонкослойной хроматографии. Для проявления хроматограммы использованы полярные растворители, насыщенные водой: бутанол-уксусная кислота и проявитель (4:1:1) - спиртовый раствор нингидрина.

Аминокислотный состав представлен в таблице 4.

Таблица 4

Аминокислотный состав напитка

Аминокислоты	Содержание (мг) аминокислот в 100 мл напитка
Глицин	85.0
Аланин	98.0
Валин	129.0
Лейцин	145.0
Серин	116.0
Цистеин	134.0
Аргинин	192.0
Аспарагиновая кислота	147.0
Глутаминовая кислота	162.0

Данные таблицы 3 демонстрируют, что напиток обладает богатым минеральным составом, большинство элементов которого относятся к эссенциальным. К эссенциальным макроэлементам относятся кальций, магний, натрий, хлор, а к микроэлементам - железо, йод, цинк, медь. Отнесение элементов, фигурирующих в таблице 3, к разряду эссенциальных правомерно с позиций их необходимого присутствия в органах, тканях, связках и скелете человека, а также их участия во многих процессах макроорганизма и

при реализации многих функций кишечного микробиоценоза, упомянутых в начале описания изобретения. Участие в регуляции обменных процессов (фосфор, цинк, натрий, хлор, йод, калий), в ферментативных преобразованиях и активации ферментов (хлор, марганец, магний, кальций, натрий), в гормонообразующих процессах (йод), в процессах трансформации углеводов, белков, жиров, в электролитном обмене и т.д., то есть фактически во всех процессах расщепления, синтеза и трансформации (Тутельян В.А. и соавт. Биологически активные добавки в питании человека. - Томск, 1999. - С. 25-75). Роль минеральных элементов для жизнедеятельности макроорганизма и осуществления функций, в частности, кишечного микробиоценоза широко известна, но необходимо отметить особо роль дивалентного катиона кальция (Ca^{++}) для биорегуляции кишечного микробиоценоза. Его наличие, выявленное впервые в составе, важно для повышения колонизационной резистентности кишечного микробиоценоза. Дивалентный катион кальция через трансмембранные коммуникации клетки способствует адгезии лактобактерий к кишечной стенке. Это является одним из главных условий приживаемости и роста популяций лактобактерий в кишечнике. Нормовеличина pH ЖКТ значительно способствует этому процессу (Костюк О.П. и соавт. Физиологические и терапевтические свойства лактобактерий // Педиатрия, 1998. - №1. - С. 71-76).

Организм использует белки только в виде их дериватов - аминокислот, образуемых в результате расщепления белков. Как видно из таблицы 4, в составе напитка присутствуют незаменимые аминокислоты - лейцин, валин, аргинин. Последняя незаменима для детского организма. Аргинин называют "веществом молодости", так как именно эта аминокислота заведует синтезом многих гормонов и без нее организм быстро стареет. Такие аминокислоты, как аспарагиновая и серии, образуют в свою очередь незаменимые аминокислоты - метионин, треонин и лизин. Метионин участвует в реализации многих важных трансформационных и иммунных функций. Аргинин, аспарагиновая кислота, глицин, серии, цистеин, выполняют также иммунные функции, участвуя в образовании антител. Метионин, аргинин, цистеин обеспечивают детоксикационные процессы и антиоксидантные функции. Все аминокислоты напитка способствуют регуляторным функциям кишечного микробиоценоза, активному метаболизму, биосинтетическим процессам, процессам расщепления холестерина, трансформации белков, жиров, углеводов и экскрекции шлаковых продуктов. Такие аминокислоты, как аланин и лизин участвуют в регуляции уровня сахара в крови (функции аминокислот по кн. Остапенко Л.А. Аминокислоты - строительный материал жизни. - ЕАМ, 1996).

Короткий перечень аминокислотного содержания напитка и анализа их активности по литературным данным показывает степень важности напитка в выполнении функций, свойственных кишечному микробиоценозу и жизнеобеспечивающим функциям макроорганизма.

Пример 1. Проведено исследование устойчивости патогенной и условно-патогенной микрофлоры по отношению к цельному напитку *in vitro* методом последовательных разведений напитка и методом посева на питательные среды (Федотов П.В. Определение антибиотической активности кисло-молочных продуктов. - Фрунзе. 1976). Для кишечной группы бактерий посев проводился на среду Эндо и висмут-сульфитный агар, для стафилококковой группы использовался желточно-солевой агар.

Патогенные и условно-патогенные культуры выделены из испражнений больных, госпитализированных в инфекционную больницу. Выделение и идентификация тест-культур проводились согласно Приказу №535 от 22.04.85 "Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений. - М., 1985)". Для исследования взяты наиболее распространенные вирулентные (патогенные) культуры: 2 штамма сальмонелл (*Salmonella typhi murium*, *Salmonella enteritidis*), брюшного тифа (*Salmonella typhi*), дизентерии (*Shigella Flexneri*), золотистого

стафилококка (*Staphylococcus aureus*). Условно-патогенными тест-культурами были: протей (*Proteus mirabilis*), цитробактер (*Citrobacter*), клебсиеллы (*Klebsiella*). Анализ характера биологического влияния напитка на перечисленные патогенные и условно-патогенные культуры осуществлен при его взаимодействии в цельном виде и при разведении физиологическим раствором натрия хлорида в 5, 10, 15 и 20 раз.

Культуры, выделенные из фекальных масс больных, идентифицировались после посева и инкубации при температуре 37°C в течение 24 часов. Идентификация проводилась реакцией агглютинации со стандартизованными специфическими диагностикумами для каждой патогенной культуры. После процедуры идентификации изготавливали взвесь микробной культуры по стандарту мутности до 5 ед. добавлением в пробирку физиологического раствора натрия хлорида. Сразу после этого в пробирки с цельным и титрованным напитком добавляли по 0.5 мл взвеси микробных культур каждого вида отдельно.

Таким образом, на каждую культуру готовилось 5 опытных образцов. Содержимое пробирок взбалтывалось, и пробирки выставлялись на инкубацию при температуре 37°C. После 24 часов инкубации из каждой пробирки проводился стерильной петлей отбор и посев тестируемых культур на чашки Петри с адекватной средой для каждой культуры. Пересейанные культуры подвергались повторной инкубации в комфортных для роста бактерий условиях, т.е. при температуре 37°C в течение 24 часов. Этот этап необходим для выявления жизнеспособности тестируемых культур после их контакта с напитком в его цельном виде и разведениях 1:5, 1:10, 1:15 и 1:20.

Контроль посева после контакта тест-культур с цельным и титрованным напитком проводился путем визуального подсчета выросших на поверхности сред в чашках Петри после инкубации колоний каждой исследуемой культуры. Идентификация выросших культур проводилась путем анализа их ферментативной активности по отношению к лактозе, глюкозе, манниту и сахарозе.

Верификация достоверности и характера биологического влияния напитка на каждую из перечисленных патогенных и условно-патогенных культур проводилась по указанному алгоритму 10-кратно.

По результатам 10-кратного исследования влияния напитка на жизнеспособность патогенных тест-культур отмечено отсутствие роста патогенных культур при воздействии на них цельного напитка и его разведении до 5 раз. При разведении в 10 раз отмечаются единичные случаи роста патогенных микроорганизмов и только при разведении в 20 раз напиток остается нейтральным по отношению к исследуемым патогенам.

Таким образом, многократное повторение анализа биологической активности напитка подтвердило его резкий антагонизм по отношению к вирулентным возбудителям кишечных заболеваний. Антибиотические свойства напитка при воздействии на патогенные микроорганизмы кишечного микробиоценоза сохраняются до его разведения в 5 раз.

При визуальном контроле результатов роста условно-патогенных культур после их посева и инкубации смеси (напиток + живые культуры суточного посева) отмечено отсутствие роста условно-патогенных культур во всех исследуемых образцах до лимитов разведения напитка в 10 раз. Единичные случаи роста условных патогенов отмечены при разведении напитка в 15 раз и отсутствие влияния напитка на исследуемые культуры - при его разведении в 20 раз.

Таким образом, характер биологической активности напитка при контакте с патогенными и условно-патогенными микроорганизмами реализуется через его резкий антагонизм к патогенной микрофлоре до лимитов разведения напитка в 5 раз, а к условно-патогенной микрофлоре кишечника - до лимитов разведения напитка в 10 раз, т.е. напиток имеет характерные антибиотические свойства по отношению к патогенным и условно-патогенным популяциям кишечного микробиоценоза.

Пример 2. Проведено определение свойства симбиотичности тонизирующего

напитка по отношению к полезной (облигатной) микрофлоре кишечника.

Полезная микрофлора была представлена музейными культурами наиболее распространенных микроорганизмов - типичных представителей облигатной микрофлоры кишечного микробиоценоза в виде смешанных биотипов: бифидобактерий (В-1, В-379, В-791), колибактерий (М-17), лактобактерий (*L. acidophilus*-630).

Исследование проводилось по ГОСТу Р 104444.11-89 (Пищевые продукты. Методы определения молочнокислых микроорганизмов. - М., 1999) с использованием контрольных посевов.

Для анализа совместимости (симбиотичности) напитка с полезной (облигатной) микрофлорой желудочно-кишечного тракта использовались искусственные питательные среды, адекватные каждой исследуемой тест-культуре: тиоглюколевая среда - для бифидобактерий, среда Эндо - колибактерий, лактоагар - лактобактерий.

Анализ проводился путем сравнения активности роста исследуемой тест-культуры после взаимодействия с напитком (опытные образцы) и без контакта с напитком (контрольные образцы). Для этого после стандартной идентификации тест-культур их пересекали на пробирочный "косяк" и инкубировали. Затем готовили микробную взвесь путем капельного добавления в пробирку с "косяком" физиологического раствора натрия хлорида до стандарта мутности 5 единиц, что соответствует количеству микробных тел 10^5 в 1 мл. Микробную взвесь переливали в стерильную пробирку и затем из нее отбирали по 0.5 мл для подготовки контрольных и опытных образцов. В опытные образцы добавляли по 1 мл цельного напитка для обеспечения взаимодействия последнего с тестируемой культурой. Контрольные интактные образцы (0.5 мл микробной взвеси) и опытные образцы (0.5 мл микробной взвеси + 1 мл напитка) помещали в термостат на 24 часа при температуре 37°C.

После тепловой экспозиции проводили штрих-методом пересев тестируемых культур на питательные искусственные среды в чашках Петри. Посев повторно инкубировали при тех же режимных условиях. Учет результатов посева проводили визуально по интенсивности роста колоний тест-культур на поверхности сред или по подсчету колоний в единицах. Достоверность результатов исследований проверялась 10-кратным воспроизведением анализов.

Анализ последствий цельного напитка на типичных представителях полезной микрофлоры микробиоценоза кишечника *in vitro* показал не только его - симбиотичность по отношению ко всем исследуемым тест-культурам полезной микрофлоры, но и его стимулирующий эффект. Стимулирующий эффект был менее выражен по отношению к колибактериям и четко выражен по отношению к бифидо- и лактобактериям. Сравнительный анализ результатов роста пересеянных бифидо- и лактобактерий в интактных и опытных образцах показал, что в интактных образцах количество колоний находилось в пределах 50 ед. (бифидобактерий) и 100 ед. (лактобактерий), в то время как в опытных образцах после воздействия напитка на тест-культуры бифидо- и лактобактерий наблюдался сплошной рост тестируемых культур на поверхности сред. Это подтверждает, что напиток проявляет кроме симбиотичности еще и стимулирующие свойства по отношению к полезной микрофлоре.

Пример 3. Исследование влияния цельного напитка на pH желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) проводилось на 10 добровольцах-больных, госпитализированных в отделение гематологии КНИИА и П по поводу функциональных расстройств ЖКТ. В качестве добровольцев выступали дети, и хотя напиток является широко потребляемым сертифицированным напитком, исследование проводилось с письменного согласия родителей. Пациентам было предписано употребление 400 мл в сутки цельного напитка взятого из торговой сети.

Определение pH фекалий проводилось колориметрическим способом при помощи универсальной индикаторной бумажки с колебаниями pH от 1 до 10 (Тодоров И. Клинические лабораторные исследования в педиатрии. - София, 1963. - С. 220.).

В нижеприводимой таблице 5 показана динамика изменения рН ЖКТ, измеряемой в испражнениях больных в течение проводимого исследования.

Таблица 5

Влияние цельного напитка на рН ЖКТ добровольцев (n=10)

№ п/п	Больные (n=10)	Показатели рН в динамике (дни)					
		Возраст, лет	Исходный показатель	2-ой день	3-ий день	5-ый день	6-ой день
1	Ш. А.	10	6.0	6.0	6.0	7.0	7.0
2	А. Н.	2	6.0	6.0	7.0	7.0	7.0
3	И. Н.	9	6.0	6.0	6.0	7.0	7.0
4	Ж. А.	9	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0
5	К. Н.	2	8.0	8.0	7.0	7.0	7.0
6	Б. К.	10	7.0	7.0	7.0	6.0	7.0
7	Д. Э.	3	6.0	6.0	6.0	6.0	7.0
8	А. Ф.	7	7.0	7.0	7.0	6.0	7.0
9	А. Р.	6	8.0	8.0	7.0	7.0	6.0
10	Ш. Б.	13	7.0	7.0	7.0	7.0	6.0

Примечание. Усредненные нормопоказатели рН ЖКТ в зависимости от возраста: у детей до 2 лет - 6.5-7.5, старше 2 лет - 7.0. При броидильной диспепсии отмечаются колебания рН 5.5-6.5, тогда как при гнилостных процессах наблюдается ошелачивание - 7.0-8.0 (Тодоров И. Клинические лабораторные исследования в педиатрии. - София, 1963. - С. 220).

Как видно из представленных данных, напиток оказывает модулирующее воздействие на кишечную среду *in vivo*, то есть исходно завышенные параметры рН к концу наблюдения на 5-6 день приближаются к нормопоказателям, снижая стартовые показатели (больные под № 5, 9). У больных с исходно низкими значениями рН к концу наблюдения рН приближается к нормопоказателям (больные под № 1, 2, 3, 7). При исходных нормопоказателях рН (больные №№ 4, 6, 8, 10) или не вызывает сдвигов рН, или происходит незначительный сдвиг в сторону окисления.

Цельный напиток при его воздействии на рН ЖКТ *in vivo* проявляет модулирующее свойство, снижая или повышая рН ЖКТ до нормопоказателей, то есть проявляет свойства регулятора рН ЖКТ.

Таким образом, представленные данные доказывают новые свойства безалкогольного тонизирующего напитка по патенту № 184 в виде регуляторных свойств по отношению к кишечному микробиоценозу. Напиток, обладая антибиотической активностью по отношению к широкому спектру патогенной и условно-патогенной микрофлоры, может способствовать колонизационной резистентности кишечного микробиоценоза. Обладая свойством симбиотичности по отношению к облигатной полезной микрофлоре кишечного микробиоценоза, стимулирует рост ее наиболее важных популяций. Напиток позволяет модулировать рН внутренней среды, а продукты метаболизма лактобактерий в микробиологическом составе напитка способствуют созданию комфортной среды для полезной микрофлоры кишечного микробиоценоза. Дивалентный катион кальция в минеральном составе напитка обеспечивает адгезию популяций лактобактерий к кишечной стенке, что является важным для приживания не только *Lactobacillus plantarum*, обнаруженных в составе, но и полезной микрофлоры в кишечном микробиоценозе. Минеральный и аминокислотный состав напитка способствует выполнению основных функций, свойственных кишечному

микробиоценозу.

Безалкогольный тонизирующий напиток по патенту KG № 184 с учетом выявленных лечебных свойств может использоваться при профилактике и лечении кишечных заболеваний. При использовании в клинической практике необходимо разработать адекватность его дозирования и приемы его потребления, а также сочетание с другими терапевтическими средствами. Уже сейчас можно проводить широкую пропаганду напитка в его новом качестве регулятора кишечного микробиоценоза для профилактики кишечных дисфункций с учетом того, что пик его потребления населением падает на летний период, когда существует наибольшая опасность распространения кишечных инфекций.

Формула изобретения

Применение безалкогольного тонизирующего напитка по патенту KG №184 в качестве регулятора кишечного микробиоценоза.

Составитель описания

Никифорова М.Д.

Ответственный за выпуск

Арипов С.К.

Кыргызпатент, 720021, г. Бишкек, ул. Московская, 62, тел.: (312) 68 08 19, 68 16 41, факс: (312) 68 17 03