

УДК 579:579.26:574.2

**«КОРОЛЬ ПРОБИОТИКОВ» *BACILLUS COAGULANS* В СОВРЕМЕННОМ КОМБИНИРОВАННОМ ПРОБИОТИЧЕСКОМ ПРЕПАРАТЕ ЛАКТОВИТ ФОРТЕ (ПОЛНЫЙ ОБЗОР)**

**Бомко Т. В., Мартынов А. В.,  
Носальская Т. Н., Каблучко Т. В.**

**ДУ «Інститут мікробіології та імунології  
ім. І. І. Мечникова НАМН України»**

**Введение**

Одним из наиболее перспективных пробиотических микроорганизмов является спорообразующая лактобактерия *Bacillus coagulans*. В форме спор она хорошо переносит технологические процессы и хранение, не разрушается под влиянием желудочного сока и желчи. Попадая в двенадцатиперстную кишку, споры *Bacillus coagulans* могут прорасти в вегетирующие бактерии в просвете кишечника человека и оказывать свои пробиотические эффекты [1].

*Bacillus coagulans* входит не только в состав биодобавок. В последнее время на основе этой бактерии на мировом фармацевтическом рынке появился ряд препаратов с доказанной клинической эффективностью [2].

Эта бактерия задепонирована в американской коллекции клеточных культур (ATCC, Rockville, MD): *Bacillus coagulans Hammer NRS 727* (ATCC No. 1 1014), *Bacillus coagulans Hammer strain C* (ATCCNo 11369); *Bacillus coagulans Hammer* (ATCCNo 31284), *Bacillus coagulans Hammer NCA 4259* (ATCC No 15949), *Bacillus coagulans* штамм ATCC 7050. Очищенные бактерии *Bacillus coagulans* также доступны в коллекциях Deutsche Sarumlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig, Germany) со следующими номерами классификатора: *Bacillus coagulans Hammer 1915* (DSMNo 2356), *Bacillus coagulans Hammer 1915* (DSMNo 2383, аналогична с ATCCNo 1 1014), *Bacillus coagulans Hammer* (DSMNo 2384, аналогична ATCCNo 11369), и *Bacillus*

*coagulans Hammer* (DSMNo 2385, аналогична ATCCNo 15949). *Bacillus coagulans* также производится в промышленных масштабах такими производителями, как Sabins aCorporation (Piscataway, NJ) или KK Fermentation (Kyoto, Japan) [3].

Оригинальное название этого микроорганизма – *Lactobacillus sporogenes* [4]. Это название также широко применяется в научной литературе, поскольку оно представлено бюллетене ВОЗ, в котором различные классификации бактерий в пробиотиках приведены к единой системе стандартизации [5,6]. Однако в последнем издании каталога Bergey этот микроорганизм снова был отнесен к роду *Bacillus*, поскольку анализ ДНК показал его наибольшую близость именно к этому роду.

На рисунке 1 показана микрофотография *Bacillus coagulans* [7].

**Биологические свойства *Bacillus coagulans***

**Общие биологические свойства**

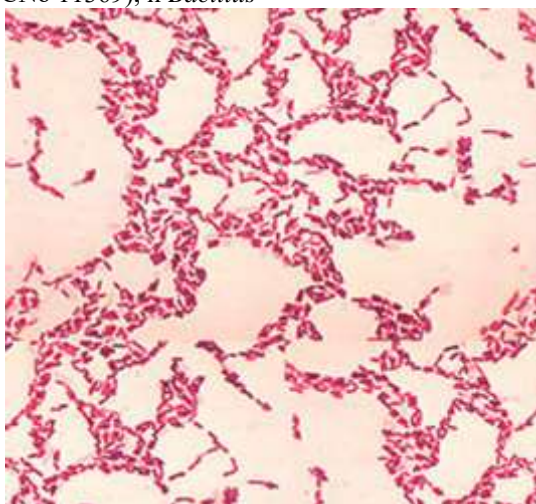
*Bacillus coagulans* – грам-положительный эндоспороформирующий непатогенный, нетоксигенный микроорганизм. Оптимальный рост бактерии наблюдается при 35-50°C и pH в пределах от 5.5 до 6.2.

Это факультативный анаэроб. *Bacillus coagulans* является микроаэрофильным микроорганизмом, т.е. для его роста, в отличие от других анаэробов, требуется наличие небольших количеств кислорода.

Пик накопления бактериальной массы наблюдается через 18 часов. Особенностью данной бактерии является её кислотостойкость [8].

Бактерия имеет удлинённую форму (0,3-0,8 мкм), иногда изогнутую, с закруглёнными концами.

Спора *B. coagulans* располагается на одном из полюсов клетки и имеет форму эллипса, устойчива к нагреванию и другим неблагоприятным условиям внешней среды и способна прорасти из разбавленных растворов соляной кислоты и гидроксида натрия. Образует колонии около 2,5 мм в диаметре, которые имеют выпуклую форму, блестящие, не выделяющие каких-либо пигментов.



**Рисунок 1. Микрофотография *Bacillus coagulans* при небольшом увеличении**

Отмечается слабовыраженная подвижность – с помощью круглоресничных жгутиков.

По биологическим свойствам занимает промежуточное положение между двумя родами - *Bacillus* и *Lactobacillus*. Являясь спорообразующей бактерией, она одновременно производит молочную кислоту, не способна восстанавливать нитраты и не содержит оксидазы [9].

Ряд свойств объединяют *Bacillus coagulans* с представителями рода *Bacillus*. Это, прежде всего, способность образовывать споры и колонии. Для своего роста микроорганизм использует такие вещества как углеводы, пептоны, мясо и дрожжевой экстракт. Производит кислоты из таких субстратов как арабиноза, ксилоза, глюкоза, галактоза, манноза, фруктоза, мальтоза, сахароза и трегалоза. Не гидролизует крахмал, казеин, желатин. Не производит сероводород и индол.

Однако имеются и характеристики, отличающие *Bacillus coagulans* от рода *Bacillus*. Так, бактерия *Bacillus coagulans* имеет преимущественно изогнутую форму, и молочнокислые бактерии – изогнутые. Как и *Bacillus coagulans*, молочнокислые бактерии проявляют очень слабую подвижность. У *Bacillus coagulans* и у молочнокислых бактерий споры расположены в терминальном участке клетки, а не в центре, как у *Bacillus*. Они дают отрицательный оксидазный тест. Продуцирует правовращающую молочную кислоту из глюкозы, фруктозы, сахарозы и трегалозы. В отличие от большинства *Bacillus*, не восстанавливает нитраты до нитритов. В ДНК *Bacillus* молярный процент пары гуанин-цитозин достигает 69%, а у *Lactobacillus* – не превышает 53%.

В таблице 1 представлены основные свойства *Bacillus coagulans*, объединяющие его с бактериями родов *Bacillus* или *Lactobacillus*.

Таблица 1. – Основные характеристики *Bacillus coagulans* в сравнении с родами *Bacillus* и *Lactobacillus*

Свойства	<i>L. sporogenes</i> ( <i>B. Coagulans</i> )	<i>Bacillus</i>	<i>Lactobacillus</i>
Каталаза	+	+	-
Оксидаза	-	+	-
Восстановление нитратов	-	+	-
Споры	+	+	-
Подвижность	+	+	-/+
Продукция молочной кислоты	+	-	+
Мезо-диаминопимеловая кислота	+	+	-/+

Примечание: «-» - отсутствие свойства; «+» - наличие свойства; «-/+» - наличие для одних видов и штаммов и отсутствие для других в рамках рода

#### Антибиотикорезистентность

Анализ антибиотикочувствительности *Bacillus coagulans subsp. Hammer* (ATCC- 31284) был проведен с применением метода Kirby-Bauer (подсчет колоний на пластинах) и метода Vitek (определение оптической плотности в культуре). Методология включала тестирование чувствительности данного микроорганизма к специфическим противомикробным компонентам, которые могут быть эффективными как для элиминации, так и для ограничения колонизации *Bacillus coagulans*. Вегетирующая форма бактерии при использовании метода Kirby-Bauer была чувствительна к ампициллину, цирофлоксацину, триметаприм-сульфаметоксазолу, эритромицину, цифампину, ванкомицину, гентамицину, оксациллину и различным производным тетрациклина. С использованием методики Vitek была установлена чувствительность *Bacillus coagulans* к пенициллину, ванкомицину, гентамицину (500 мкг/мл), стрептомицину (2000 мкг/мл), нитрофурантоину, норфлоксацину, хлорамфениколу, а к тетрациклину *Bacillus coagulans* в данном эксперименте был устойчив. Дополнительно было показано, что инкубация *Bacillus coagulans* с нитроцефином приводит к индукции синтеза низких концентраций β-лактамазы [10]. Следовательно, в случае непредвиденного и/или нежелательного роста

и размножения бактерии в кишечнике, ее можно быстро инактивировать.

В то же время споры *Bacillus coagulans* устойчивы к действию антибиотиков. Благодаря этому пробиотик можно применять вместе со стандартной химиотерапией, без риска подавления его активности [11].

#### Устойчивость к агрессивным факторам организма

*Bacillus coagulans* в вегетирующей форме, по данным опытов in vitro, не выдерживает пребывания в среде с pH ≤ 3 [12], хотя показано, что штамм *Bacillus coagulans* CNCMI-1061, используемый в качестве пробиотика у цыплят, сохраняет до 50% живых форм в кислой среде желудка.

Для спор *Bacillus coagulans* кислотная активность не описана. Отмечается, что споры минуют желудок и прорастают только в двенадцатиперстной кишке [13].

Таким образом, тот факт, что *Bacillus coagulans* применяется в форме спор, обеспечивает его устойчивость к кислому содержимому желудка.

Устойчивость к желчи сильно варьирует у разных штаммов кишечных бактерий. Так, из 38 пробиотических штаммов *Lactobacillus* (в основном *L. rhamnosus*) 3 были классифицированы как резистентные к действию желчи, 5 – толерантные, 3 – с низкой толерантностью, 11 – чувствительные [14]. Подобная

вариабельность была получена при сравнительных исследованиях 47 штаммов *Lactobacillus* [15], *Propionibacterium* [16], *Bifidobacterium* [17]. Среди бифидобактерий наибольшей толерантностью к желчи обладает штамм *B. longum* [18].

Для *Bacillus coagulans*, даже не в споровой форме, показана достаточно высокая устойчивость к действию желчи. Было проведено сравнительное исследование 13 видов спорообразующих молочнокислых бактерий, используемых в качестве пробиотиков, на предмет их устойчивости к действию желчи. В данном исследовании изучены следующие штаммы бактерий: *B. racemilacticus* DSM445 и DSM2309, *Sporolactobacillus inulinus* CIP103279, DSM30348, NCFB1389, *Sp. laevus* IAM12384, *Sp. racemicus* IAM12395, *Bacillus laevolacaticus* DSM442, DSM6475, DSM6477, *B. racemilacticus* DSM445, DSM2309, *B. coagulans* CIP5264, CIP6625, BC14. Образцы инкубировали при 37°C в течение 24 часов с 0,3% раствором желчи и без нее. Каждый час оценивали оптическую плотность суспензий. Определяли значения МИК желчи по отношению к каждой из культур и оценивали время (d, мин), необходимое для достижения различия в оптической плотности 0,3 ед. по отношению к контролю (по методу Chateau). Было установлено, что только 5 из изученных бактерий прорастали при наличии желчи. Это были штаммы *Bacillus coagulans* и *Bacillus racemilacticus*. Эти штаммы были толерантны к желчи ( $15 < d < 40$  мин). Приведем полученные в данном исследовании значения МИК желчи:

**Таблица 2. МИК желчи по отношению к пробиотическим штаммам**

Штамм бактерий	МИК желчи, %
<i>Bacillus coagulans</i> CIP5264	>1
<i>Bacillus coagulans</i> CIP6625	>1
<i>Bacillus coagulans</i> BC14	>1
<i>Bacillus racemilacticus</i> DSM445	0,7
<i>Bacillus racemilacticus</i> DSM2309	0,7
<i>Sporolactobacillus inulinus</i> CIP103279	0,2
<i>Sporolactobacillus inulinus</i> DSM30348	0,2
<i>Sporolactobacillus inulinus</i> NCFB1389	0,2
<i>Sporolactobacillus laevus</i> IAM12384	0,2
<i>Sporolactobacillus racemicus</i> IAM12395	0,2
<i>Bacillus laevolacaticus</i> DSM442	0,1
<i>Bacillus laevolacaticus</i> DSM6475	0,1
<i>Bacillus laevolacaticus</i> DSM6477	0,1

Таким образом, в данном исследовании *in vitro* была доказана высокая, в сравнении с другими микроорганизмами-пробиотиками, устойчивость *Bacillus coagulans* к действию желчи. Дальнейший пассаж *Bacillus coagulans* по тонкому и, далее, по толстому кишечнику, уменьшает вероятность инактивации желчью в связи с уменьшением ее концентрации.

Однако следующим неблагоприятным фактором является снижение в процессе продвижения по кишечнику содержания кислорода и переход к анаэробным условиям [19]. Если *Bacillus coagulans* достаточно устойчив к действию первых двух факторов (кислоты и желчи), то возникновение анаэробных условий (при том, что он не является облигатным анаэробом) или, возможно, какие-либо другие неблагоприятные факторы (например, дефицит глюкозы, как это отмечено в опытах *in vitro* [20]), приводят к тому, что этот микроорганизм в дистальных отделах кишечника подвергается респоруляции, и в значительной степени именно в этой форме покидает организм человека.

### Взаимодействие с содержимым и стенками кишечника

Способность бактерий к адгезии к слизистой оболочке кишечника является важной характеристикой и параметром отбора пробиотиков, поскольку указывает на ее жизнестойкость. Стабильное прикрепление бактерии к стенке кишечника ассоциируется с более короткими сроками диареи, иммуноотропным действием, конкурентным исключением и др. Исследования *in vitro* относительно адгезивных свойств *Bacillus coagulans* в литературе не выявлены.

Между тем установлено, что бактерии рода *Bacillus* обладают некоторыми адгезивными свойствами по отношению к кишечному эпителию. Степень адгезии различна, на что указывает различное время транзита желудочно-кишечного тракта. Предполагается, что она зависит от способности бактерии образовывать пленки, которые присоединяются к поверхности частиц пищи или к слизистой оболочке кишечника [21]. Бактерии рода *Bacillus* способны образовывать многоклеточные структуры – колонии и биопленки [22]. Способностью образовывать колонии обладает и *Bacillus coagulans* [23,24]. Отмечена сильная адгезия *B. coagulans* к эпителиоцитам кишечника, намного более выраженная, чем у *B. subtilis* JT143 и *L. acidophilus* LY24, выделенных соответственно из пробиотиков BioPlus2B и FloraFIT. Активность адгезии достигает  $44,5 \pm 3,2$ ,  $48,9 \pm 2,6$ ,  $42,6 \pm 3,3$  и  $37,6 \pm 2,4\%$  соответственно к тощей кишке, подвздошной кишке, ободочной кишке и сигмовидной кишке.

Важный аспект действия пробиотиков, а также их безопасности – способность проникать через стенку кишечника и поступать в системный кровоток или в лимфоток. Для бактерий рода *Bacillus* показано только проникновение в лимфатическую систему через пейеровы бляшки кишечника. Так, указывается на то, что после 5-дневного введения мышам спор *B. subtilis* в дозе  $10^9$  на животное бактерии (преимущественно в виде спор) обнаруживали в пейеровых бляшках и лимфатических узлах. Между тем, во внутренних органах (печени и почках) они не выявлялись, поэтому на основании этих данных нельзя говорить о системном всасывании спор [25]. В исследовании на инбредных (Balb/c) и аутбредных мышах также было показано, что споры *Bacillus subtilis* не проникли через слизистую кишечника [26]. Это является позитивным фактором, поскольку указывает на безопасность пробиотиков.

Клинический опыт применения пробиотиков на основе *Bacillus coagulans* также указывает на то, что они безопасны, и их фармакологическая активность определяется только местным действием в просвете кишечника или иммунологическими механизмами, в том числе опосредованными попаданием бактерий или их спор в лимфатическую систему.

Важными аспектами в действии пробиотиков на основе спор микроорганизмов является установление факта прорастания спор и формирования вегетирующих форм, относительное количество вегетирующих форм, степень пролиферации, а также вопрос, какие формы проявляют биологическую активность – споры, вегетирующие микроорганизмы или их элементы (метаболиты, клеточная стенка).

Приведем выявленные в открытой печати данные о кинетике *Bacillus coagulans* в кишечнике человека. Данные литературы свидетельствуют о том, что в среднем время между приемом *Bacillus coagulans* и прорастанием спор составляет 4 часа. Пик накопления бактериальной массы наблюдается через 18 часов.

*Bacillus coagulans* выделяется из организма медленно — после последнего приема пробиотика споры в фекалиях обнаруживают в течение 7 дней. Этот феномен расценивают как большое клиническое преимущество, поскольку после последнего приема препарата его действие продолжается еще целую неделю, что позволяет быстро, в полном объеме, без риска осложнений и рецидивов, восстановить функцию желудочно-кишечного тракта после перенесенного заболевания. Вместе с тем большое значение имеет тот факт, что *Bacillus coagulans*, в конце концов, покидают организм человека — это способствует восстановлению собственной, родной для человека, микрофлоры, без риска внедрения в нее генетически чужеродных штаммов. Таким образом, *Bacillus coagulans* относится к полурезидентным лактобактериям - выполнив в организме человека функцию пробиотика, он покидает организм.

### Механизмы пробиотических эффектов

*Bacillus coagulans* улучшает микробиологический состав кишечника, увеличивая количество облигатных микроорганизмов и вытесняя патогенную флору. Так, в исследованиях на лабораторных животных с экспериментальным бактериальным дисбиозом после введения *Bacillus coagulans* наблюдался эффект подавления роста патогенных микроорганизмов и возобновление функционирования, в т.ч. за счет восстановления ферментобразования, а также нормализация количества микробных клеток нормальной микрофлоры кишечника. Искусственно вызванные у животных патогенными микроорганизмами острые патологии кишечника также быстро устранялись применением *Bacillus coagulans* [27]. При введении *Bacillus coagulans* CNCMI-1061 в качестве пробиотика пороссятам до введения и на 1, 4 и 10 неделе введения оценивалось содержание в каловых массах различных бактерий: лактобактерий, лактококков, энтерококков, аэробных и анаэробных кокков, общих и фекальных колибактерий, клостридий, бактероидов, бифидобак-

терий. Было выявлено снижение числа энтерококков и колибактерий, причем эффект был более выраженный, чем при действии антибиотиков [28].

Исследование на мышах с ванкомицин-резистентными энтерококками показало, что применение *Bacillus coagulans* приводит к статистически достоверному уменьшению количества этих энтерококков в сравнении с нелечеными мышами. В этом опыте бактерии вводили в дозе  $10^7$  КОЕ на животное (или солевой раствор в контроле) один раз в день в течение 4 дней. В опытной группе количество ванкомицин-резистентных энтерококков после терапии *Bacillus coagulans* уменьшилось на 35% против 0% в контроле ( $P=0,03$ ). Опыт показал перспективность *Bacillus coagulans* для подавления колонизации кишечника мультирезистентными бактериями, и в перспективе – как средства терапии мультирезистентных колитов [29].

В отношении патогенной микрофлоры пробиотики в целом могут оказывать следующие эффекты:

1. Прямое антагонистическое, подавляющее, действие на определенные группы микроорганизмов. Механизмы – продукция веществ с антибактериальным действием; конкуренция за пищевые субстраты; конкуренция за места связывания.

2. Изменение метаболизма микроорганизмов – повышение или подавление ферментативных активностей.

3. Стимуляция иммунитета – повышение уровня антител, активности макрофагов.

Рассмотрим, какие из этих механизмов действия свойственны *Bacillus coagulans* и какие, возможно, являются наиболее важными в осуществлении его пробиотических эффектов.

### Выработка молочной кислоты

Вегетирующие формы *Bacillus coagulans* могут оказывать подавляющее действие на другие микроорганизмы за счет выделения основного продукта своей жизнедеятельности - молочной кислоты. *Bacillus coagulans* вырабатывает молочную кислоту из лактозы и других углеводных субстратов [2].

Высокая секреция пробиотиками молочной кислоты повышает кислотность в просвете кишечника до 4-5 и тем самым подавляет рост гнилостной флоры и *E. coli*, оптимум pH которых составляет 6-7. Однако, поскольку *Bacillus coagulans* не обладает свойством колонизации кишечника, этот механизм действия (путем изменения pH кишечника) вряд ли является значимым в его пробиотических эффектах.

Установлено, что молочная кислота может оказывать антибактериальное действие и за счет метаболического эффекта - в недиссоциированной форме она проникает через мембраны бактерий, снижает внутриклеточный pH, влияет на окислительное фосфорилирование в клетках.

### Синтез бактериоцинов

Считают, что ингибиторная активность *Bacillus coagulans* в отношении гнилостных бактерий частично определяется выделяемыми им бактериоцинами.

Этот микроорганизм продуцирует коагулин – бактериоцин, относящийся к семейству педиоцинов [30]. Он является пептидом, состоящим из 44 аминокислотных остатков, последовательность которых сходна с таковой педиоцинов. Коагулин и педиоцин различаются только по одной аминокислоте в С-терминальном участке. Его молекулярная масса находится в пределах 3-4 кДа. Этот бактериоцин кодируется приблизительно 14 кБ фрагментом в плазмиде pI4. Последняя довольно стабильно и независимо экспрессирует данный бактериоцин. [31]. Установлено подавляющее действие коагулина в отношении кишечных бактерий родов *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Listeria* и *Pediococcus*. При этом пробиотик может проявлять как бактериостатическое, так и бактерицидное действие. Коагулин стабилен при температуре до 60°C, pH в интервале 4-8, не расщепляется под действием  $\alpha$ -амилазы, липазы или органических растворителей. Будучи пептидом, инактивируется протеазами.

Другой хорошо изученный бактериоцин из этого микроорганизма – лактоспорин [32] - выделяется бактерией в меньшей концентрации, и только при наличии в питательной среде или в кишечнике болезнетворной бактерии-мишени [33]. Антимикробная активность лактоспорина была показана в отношении *Micrococcus luteus* ATCC 10420 методом диффузии в агар. Протеиновая природа лактоспорина подтверждена путем его инактивации протеолитическими ферментами. Хотя активность лактоспорина зависела от pH, он был стабилен к нагреванию. Изоэлектрическая точка лактоспорина находилась в пределах 3.5-4.0.

В целом отмечается, что бактериоцины *Bacillus coagulans* ингибируют как грам-положительную, так и грам-отрицательную флору, и некоторые гнилостные грибы рода *Fusarium* [34].

#### Воздействие на нормофлору кишечника

В исследовании на цыплятах-бройлерах было показано, что *Bacillus coagulans* позитивно влияет на состав микрофлоры кишечника, причем этот эффект является дозозависимым. Цыплята (192 особи) были рандомизированы на 4 группы, в которых животные в течение 42 дней вместе со стандартным кормом получали пробиотик *Bacillus coagulans* в дозах 0 (контроль); 0,005; 0,02 и 0,04% от общей массы корма. Пробиотик во всех дозах (0,005-0,04%) увеличивал прирост массы тела цыплят в сравнении с контролем на 21-42 дни исследования. При этом в группах животных, получавших *Bacillus coagulans* в дозах 0,02 и 0,04%, отмечено значительное увеличение в кишечнике числа бактерий рода *Lactobacillus* и снижение - *E. coli*. На основании этих данных авторами исследования был сделан вывод о том, что *Bacillus coagulans* является наилучшим микроорганизмом-пробиотиком, модулирующим состав кишечной микрофлоры цыплят [35].

В ряде клинических исследований показано, что пробиотики на основе *Bacillus coagulans* не только не подавляют нормальную флору кишечника, но и

способствуют ее восстановлению при подавлении антибиотиками или в пожилом возрасте. Так, в исследовании (см. разд. Клинический опыт) с участием пожилых пациентов со сниженным содержанием бифидобактерий и ослабленной иммунной защитой, после применения *Bacillus coagulans* достоверно увеличились, в сравнении с исходными показателями, популяции *Faecalibacterium imiproutsii* и бактерий рода *Bacillus*. Следует отметить, что этот вид действия сопровождался иммуностимулирующим и противовоспалительным действием пробиотика, что, по-видимому, и определяло его позитивное влияние на нормоценоз [36].

Как отмечалось выше, *Bacillus coagulans* не остается в организме человека навсегда, а покидает его через 7 дней после последнего приема. Следовательно, он не нарушает природный микробиоценоз кишечника, который формировался в течение всей жизни конкретного человека [37].

#### Воздействие на иммунитет

В слизистой оболочке кишечника человека сосредоточено около 80% всех иммунологически активных клеток организма. Поэтому, несмотря на присутствие в кишечнике достаточного количества количества патогенов, инфицирование происходит редко.

Пероральное воздействие антигена (в том числе микробов и их токсинов) обычно создает местную IgA-защиту (секреторный иммунитет) и клеточно-опосредованную реакцию. Молекулы IgA окружают бактерию и не дают ей присоединиться к стене кишечника или проникнуть в сосуды.

Имуноглобулины образуют комплексы с антигенами, нейтрализуют токсины, препятствуют контакту микроорганизмов с клетками-«мишенями» макроорганизма, способствуют быстрому выведению микроорганизмов из ЖКТ благодаря агглютинации.

Для *Bacillus coagulans*, также как и для других сапрофитных бактерий рода *Bacillus*, установлено иммуномодулирующее действие. Оно было доказано в ряде экспериментальных и клинических исследований.

Имуномодулирующие свойства *Bacillus coagulans* были изучены в экспериментах на мышах и крысах. Так, было установлено [38], что введение в течение 14 дней порошка бактерий крысам массой тела около 200 г в дозе 1 г на животное вызывало достоверное повышение уровня лейкоцитов в крови в сравнении с группой контроля. При этом повышался процент нейтрофилов и лимфоцитов (табл.3). После введения пробиотика у крыс также повышалась адгезия нейтрофилов к нейлоновым волокнам, что коррелировало с повышением числа нейтрофилов.

Была выявлена способность *Bacillus coagulans* влиять на гуморальный иммунитет - вызывать повышение уровня антител в крови.

Таблица 3. Влияние введения *Bacillus coagulans* на состав лейкоцитов крови крыс

Лейкоциты, %	Группы животных	
	Интактный контроль	Введение <i>Bacillus coagulans</i>
Нейтрофилы	48.5 ± 5.39	67.8 ± 2.95*
Лимфоциты	35.83 ± 5.67	53.4 ± 2.19*
Моноциты	7.67 ± 1.36	2.8 ± 1.30
Базофилы	3.17 ± 0.98	2.4 ± 0.89
Эозинофилы	4.84 ± 1.16	3.6 ± 1.51

\* - достоверность различия по отношению к показателям интактного контроля (P<0.05)

Стимулирующее действие пробиотика на клеточный иммунитет установлено у крыс и у мышей в ответ на воздействие Т-зависимого антигена. Предварительное введение пробиотика вызывало уменьшение толщины стопы крыс в динамике после введения вакцины ВСГ.

Выявлено достоверное повышение индекса фагоцитарной активности у мышей, что указывает на стимулирующее влияние *Bacillus coagulans* на неспецифическую иммунную реакцию.

Полученные данные указывают на то, что *Bacillus coagulans* обладает стимулирующим действием в отношении как клеточного, так и гуморального иммунитета.

В научной литературе обсуждается вопрос о том, за счет чего в большей степени пробиотики оказывают свое действие – благодаря активным компонентам клеточной стенки или метаболитам, выделяемым живыми бактериями [39]. И тот, и другой механизмы в настоящее время экспериментально подтверждены. Приводятся данные исследования воздействия *Bacillus coagulans* на иммунную систему и на свободнорадикальные процессы в опытах *in vitro*, причем было оценено влияние, как метаболитов живых бактерий (супернатанта), так и изолированной клеточной стенки [40]. Споры *Bacillus coagulans* активировали нагреванием до 70°C в течение 30 минут и инкубировали в течение 2 суток при 37°C в питательной среде RPMI-1640. Путем центрифугирования получали супернатант живых бактерий, а для получения фрагментов клеточной стенки бактерии разрушали путем замораживания–оттаивания, затем центрифугировали и ресуспендировали осадок. Проведено изучение влияния бактерии на периферические кровяные мононуклеарные и на полиморфноядерные клетки.

Было установлено, что супернатант и клеточная стенка бактерий ингибировали спонтанное образование реактивных метаболитов кислорода в полиморфноядерных лейкоцитах человека. Клеточная стенка оказывала дозозависимое действие, а супернатант проявлял выраженное противовоспалительное действие в низких концентрациях. Присутствие супернатанта в соотношении 1:1000 уменьшало образование реактивных метаболитов кислорода на 20% ( $p < 0.004$ ), а клеточная стенка вызывала подобный эффект (уменьшение на 30%) при соотношении 1:10. Предва-

рительная инкубация полиморфноядерных клеток с супернатантом и клеточными стенками до воспроизведения оксидативного стресса ингибировала образование H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-индуцированного реактивного кислорода. Эффективными были разведения 1:10 и 1:100.

Изучение влияния на фагоцитоз проводилось иммунофлуоресцентным методом. Экспозиция полиморфноядерных лейкоцитов с супернатантом в разведении 1:10 достоверно увеличивала фагоцитоз на 40%, а с клеточными стенками в том же разведении – на 25%. Инкубация с супернатантом и клеточными стенками в этой концентрации увеличивала популяцию полиморфноядерных лейкоцитов в целом, причем ряд клеток в ней были фагоцитирующими, остальные – нет. Дальнейшее разведение приводило к снижению числа фагоцитирующих клеток.

Супернатант оказывал выраженное дозозависимое влияние на миграцию полиморфноядерных лейкоцитов, причем на оба типа миграции – спонтанную и направленную (вызванную хемотаксисом). Направленная миграция вызывалась тремя агентами – бактериальным пептидом f-MLP, провоспалительным интерлейкином IL-8 и лейкотриеном LTB-4. При разведении супернатанта 1:10 спонтанная миграция повышалась на 300%, клеточные стенки вызывали более слабое повышение – на 25%. Миграцию, вызванную пептидом, супернатант в разведении 1:10 повышал на 200%, клеточные стенки – на 25%. Миграция, вызванная интерлейкином-8, подавлялась клеточными стенками на 60%, а супернатантом – в несколько меньшей степени. Выраженной дозозависимости эффекта не наблюдалось. Миграция лейкоцитов под действием лейкотриена В-4 также достоверно, на 60%, подавлялась клеточными стенками бактерий при разведении 1:1000, а супернатант оказывал менее выраженное действие.

Отмечалось выраженное дозозависимое индуцирующее действие супернатанта и клеточных стенок на экспрессию клеточных киллеров. Достоверное увеличение отмечено при разведениях 1:400, 1:1600 и 1:6400. Повышение содержания маркера CD69 на 32% отмечалось при разведении супернатанта 1:400, и на 36% - при том же разведении клеточных стенок.

Влияния на пролиферацию Т- и В-лимфоцитов не было установлено при 5-дневной инкубации. Это указывает на отсутствие у бактерии митогенного потенциала.

Изучение влияния *Bacillus coagulans* на продукцию цитокинов показало, что оба продукта вызывали подавление выработки IL-2, усиление продукции IL-4, IL-10 и особенно IL-6, незначительное увеличение продукции TNF- $\alpha$ , достоверное увеличение INF- $\gamma$ .

Следовательно, *Bacillus coagulans* оказывает выраженное противовоспалительное действие, поддерживает основные механизмы природного иммунитета. Активность в опытах *in vitro* проявляют, как клеточная стенка бактерии, так и ее метаболиты. Проявление выявленных видов активности полезно не только с точки зрения защиты кишечника от болезнетворных микроорганизмов, но и в плане противовоспалительного действия, поддержания целостности эпителия и нормального пищеварения. Еще одним

доказательством иммуномодулирующего действия *Bacillus coagulans* является его клинически выраженный эффект при артритах у животных и людей. Детально результаты контролируемого клинического исследования эффективности данного пробиотика при артритах представлены ниже (в разделе клинических исследований). Однако, учитывая ведущую роль иммунных механизмов в развитии артрита, можно сделать вывод о проявлении *Bacillus coagulans* системных противовоспалительных и иммуномодулирующих свойств [41].

В последние годы (2011 г.) был установлен иммуномодулирующий эффект *Bacillus coagulans* в условиях анитибиотикоассоциированной диареи, связанной с *Clostridium difficile* [42]. Данное заболевание - одно из осложнений, встречающееся у пациентов, принимающих антибиотики. В литературе имеется ряд доказательств эффективности при этом заболевании применения пробиотиков *Lactobacillus spp.* и *Saccharomyces boulardii* [43].

*Bacillus coagulans* в экспериментальных исследованиях проявлял эффективность на модели колита у мышей, вызванного *Clostridium difficile*. *Bacillus coagulans* (или физиологический раствор) вводили мышам внутрь по  $2 \times 10^9$  КОЕ в течение 15 дней. Патологию вызывали путем введения смеси антибиотиков с 5 по 8 дни, клиндамицина на 10 день и культуры *C. difficile* по  $10^4$  КОЕ на 11 день эксперимента. Исследование показало, что в условиях введения *Bacillus coagulans* не происходило гибели мышей, а в группе контроля погибло 2 животных. На 12 день было выявлено достоверное ( $p = 0.0002$ ) различие между группами по числу мышей с нормальным стулом – 66,7% против 13,0% в контроле. На 16 день этот показатель составил соответственно 23% и 0%. Микроскопия кишечника показала, что введение мышам *Bacillus coagulans* существенно снижало выраженность патологических изменений в толстом кишечнике – повреждения крипт, отека, лейкоцитарной инфильтрации. Отмечено также уменьшение связывания ядерного фактора NF- $\kappa$ B и снижение содержания хемокина MIP-2 до 16,3 против 24,6 пг/2 см [44].

Подобные результаты были получены и в аналогичной постановке эксперимента при введении на 6-10 дни ванкомицина в дозе 50 мг/кг. Под действием *Bacillus coagulans* значительно лучшей была консистенция стула мышей. На 17 день он был нормальным у 88,9% животных опытной группы и ни у одного в контроле патологии. Значительно снижалась активность миелопероксидазы (маркера воспалительного процесса в кишечнике) – с 4,3 до 2,6 ЕД/2 см. Значительно лучшими были и показатели гистологических исследований, а также уровень хемокина кератиноцитов [45].

Механизм терапевтического эффекта *Bacillus coagulans* при данной патологии заключался в подавлении под его действием высвобождения хемокинов, ослаблении притока нейтрофилов и уменьшении воспалительного процесса в толстой кишке. *Bacillus coagulans* снижал экспрессию ЦОГ-2 в толстой кишке мышей с колитом, вызванным *Clostridium difficile* [46].

Следует отметить, что в экспериментальных исследованиях на моделях колита, вызванного *C. difficile* у животных, была доказана эффективность и других пробиотиков: *Saccharomyces boulardii* у хомячков [47,48], *Saccharomyces boulardii* у мышей [49], *Saccharomyces cerevisiae* 905 у мышей [50], *Lactobacillus rhamnosus* у хомячков [51], *Lactobacillus acidophilus* у мышей [52] и *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086 у мышей. Однако в обзоре ведущего специалиста в этой области (Fitzpatrick L.R., 2013) указывается на то, что наилучшие результаты дает *Bacillus coagulans*, поскольку он оказывает действие и на начальную стадию колита, и на процесс выздоровления после введения ванкомицина.

Это же мнение нашло подтверждение и в клинических исследованиях. Результаты Кокрановского обзора 2008 года указывают на то, что в клинических условиях рекомендованные для лечения анитибиотикоассоциированной диареи, связанной с *Clostridium difficile*, традиционные пробиотики на основе *Saccharomyces boulardii* и *Lactobacillus spp.*, были недостаточно эффективны [53]. В этой связи составители обзора считают более перспективным доказательство клинической эффективности при этом заболевании нового пробиотика – *Bacillus coagulans*. В настоящее время клинические данные об опыте его применения в этой области отсутствуют.

Эффекты *Bacillus coagulans* на иммунную систему при воздействии на Т-клетки аденовирусом и вирусом гриппа А были изучены на 10 здоровых добровольцах (средний возраст 44 года). Испытуемые принимали пробиотик в виде капсул 1 раз в сутки в дозе  $2 \times 10^6$  КОЕ в течение 30 дней. До приема пробиотика и по его окончании отбирали пробы крови добровольцев и в условиях *in vitro* определяли уровень цитокинов после предварительной экспозиции Т-клеток с аденовирусом и вирусом гриппа А. Было выявлено существенное увеличение выработки фактора некроза опухоли TNF- $\alpha$  в ответ на воздействие аденовируса и вируса гриппа А – на 250% и 709% соответственно в сравнении с исходными показателями. Это указывает на иммуномодулирующие свойства *Bacillus coagulans* – повышение Т-клеточного ответа при вирусных инфекциях [54].

В клиническом исследовании показана способность *Bacillus coagulans* значительно увеличивать выработку иммунологических маркеров. В контролируемом исследовании 10 здоровых добровольцев получали в течение 28 дней *Bacillus coagulans* (GanedenBC30) по одной капсуле, содержащей 500 млн КОЕ, в сутки, после чего оценивали содержание в сыворотке крови различных иммунологических маркеров. Было выявлено статистически достоверное повышение в сравнении с исходным уровнем CD3-CD69+ клеток, интерлейкинов IL-6 и IL-8,  $\gamma$ -интерферона и TNF- $\alpha$  в ответ на экспозицию с аденовирусом AdenoVI и вирусом гриппа FluTex. Увеличивалось также содержание IL-1 $\beta$  в ответ на воздействие аденовируса, но снижалось при действии вируса гриппа [55].

В цитируемом выше исследовании с участием пожилых пациентов со сниженным содержанием

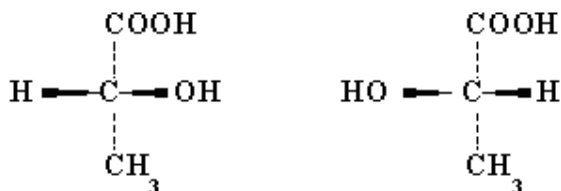
бифидобактерий и ослабленной иммунной защитой применение *Bacillus coagulans* повышало количество представителей нормальной флоры кишечника, причем этот эффект сопровождался иммуностимулирующим и противовоспалительным действием, что, по мнению авторов, и определяло его позитивное влияние на нормоценоз.

### Другие виды активности

*Bacillus coagulans* улучшает пищеварение. При этом рассматриваются следующие механизмы действия. Бактерия выделяет протеиназы, расщепляющие белки до полипептидов; полипептидазы, расщепляющие полипептиды до аминокислот; липазы, расщепляющие триглицериды до жирных кислот. Расщепление белков и липидов до более простых компонентов делает пищу более легко усваиваемой, что особенно полезно для новорожденных, реконвалесцентов и пожилых людей, *Bacillus coagulans* способен расщеплять лактозу, что делает его полезным у лиц с врожденной или приобретенной лактазной недостаточностью. В опытах *in vitro* *Bacillus coagulans* увеличивает активность  $\beta$ -галактозидазы (лактазы) и лактатдегидрогеназы – ферментов, превращающих лактозу в молочную кислоту и осуществляющих ее дальнейший метаболизм, т.е. улучшает перевариваемость лактозы [56].

Это свойство лактобактерий - превращать лактозу в молочную кислоту - широко используется у пациентов с непереносимостью лактозы.

Как известно, молочная кислота (или лактат) существует в виде двух изоформ D(-) и L(+) – левовращающая и правовращающая:



D (-) левовращающая  
молочная кислота

L (+) правовращающая  
молочная кислота

*Bacillus coagulans* секретирует преимущественно L(+) правовращающую молочную кислоту. В желудочно-кишечном тракте человека абсорбируются обе формы. Однако далее L(+)-форма быстро и эффективно метаболизируется, превращаясь в гликоген, а D(-)-форма метаболизируется слабо и в значительной степени экскретируется с мочой в неизменном виде. Слабая метаболизация D(-)-лактата может привести к развитию метаболического ацидоза у детей. Именно эта форма молочной кислоты вырабатывается микрофлорой кишечника, а именно бактериями *Bacteroides fragilis*, некоторыми грамотрицательными кишечными аэробами, такими как *Escherichia coli*, а также *L. acidophilus*, применяемым в качестве пробиотика. В этом плане предпочтительным является *Bacillus coagulans*, который продуцирует хорошо усваиваемую L(+)-молочную кислоту.

*Bacillus coagulans* удаляет реактивный кислород, который образуется в кишечнике в результате различных метаболических реакций, проявляет антиоксидантную активность. Этот вид действия отмечается в период экспоненциального роста и в стационарной фазе развития микроорганизма при выращивании в среде, содержащей глюкозу и минеральные соли. Антиоксидантная активность *Bacillus coagulans* и его способность гасить свободные радикалы показана в различных экспериментах, причем в ряде исследований она была сопоставимой с активностью таких антиоксидантов как витамины С и Е. Было установлено, что выраженное антиоксидантное и антирадикальное действие *Bacillus coagulans* осуществляется за счет выделяемых бактерией гетерополимеров, содержащих 4 моносахарида [57].

Было установлено системное противовоспалительное действие *Bacillus coagulans* на модели каррагенанового отека стопы у крыс. Показано достоверное значительное уменьшение воспалительной реакции. В данной работе приведены результаты исследования двух пробиотических микроорганизмов - *Bacillus coagulans* и *B. bifidum*, как в капсулах, так и в виде порошка при пероральном введении. Диклофенак натрия использовали в качестве стандартного препарата в дозе 150 мг/кг массы тела животных. Отек был вызван введением 1% каррагенана через 30 минут после применения препаратов. Степень отека определяли через 1,2,4 и 24 часа. Критериями эффективности служили толщина лапы и степень подвижности сустава. Как капсулированные пробиотики *Bacillus coagulans* и *B. bifidum*, так и некапсулированные, показали статистически достоверное ( $P < 0.05$ ) уменьшение отека в опытной группе животных. Степень ингибирования отека (толщина лапы) некапсулированных и капсулированных пробиотиков несколько отличалась и составила  $37 \pm 3\%$  и  $43 \pm 2\%$  после 24 часов лечения. В обеих группах значительно усилилась подвижность животных - подъемы по лестнице и общая подвижность. Эти результаты свидетельствуют о наличии у *Bacillus coagulans* выраженной противовоспалительной активности и перспективе его использования в комплексной терапии воспалительных патологий опорно-двигательной системы [58].

*Bacillus coagulans* выделяет короткоцепочечные жирные кислоты, кроме того, поглощает (включает в свои клеточные структуры) холестерин и нарушает энтерогепатическую циркуляцию желчных кислот вследствие деконъюгации желчных солей, что влияет на уровень холестерина крови человека. Еще один механизм гипохолестеринемического действия пробиотика - ингибирование холестеринсинтезирующего фермента 3-гидрокси-3-метилглутарин-коэнзим-редуктазы. Гипохолестеринемическое действие *Bacillus coagulans* показано в исследованиях на кроликах [59] и у человека [60].

### Эффекты комбинации с витаминами

Пробиотики традиционно сочетают с витаминами группы В. Имеется ряд клинических исследова-



ний, доказывающих эффективность таких комбинаций, в частности, приведенное ниже, в разд. Клиническая эффективность, исследование комбинации на основе трех пробиотиков, в том числе *Bacillus coagulans*, и витаминов PP и группы В при синдроме раздраженной толстой кишки.

В препарате Лактовит Форте *Bacillus coagulans* находится в комбинации с витаминами В<sub>9</sub> (фолиевой кислотой) и В<sub>12</sub> (цианокобаламином). При оценке целесообразности этого сочетания следует учитывать следующие аспекты.

Сама по себе культура *Bacillus coagulans* в процессе своей жизнедеятельности способна в некоторой степени синтезировать эти витамины. В целом синтез и секрецию витаминов группы В, в том числе и витаминов В<sub>9</sub> и В<sub>12</sub>, осуществляют бактерии, заселяющие кишечник человека. Однако, как известно, это не покрывает потребность организма в данных витаминах, и остается потребность в их поступлении с пищей.

Приводятся результаты исследований, в которых были выявлены штаммы *Bacillus coagulans* – 406 и 416, наиболее интенсивно секретирующие витамин В<sub>12</sub>. Изучение секреции витамина показало, что этот процесс происходит наиболее интенсивно при культивировании бактерии в среде с рН 6-7,5 при использовании синтетических и несинтетических сред, обязательно содержащих минеральные соли, микроэлементы, аминокислоты, витамины (биотин, рибофлавин, пиридоксин, пантотеновая кислота и ниацин). Необходимыми условиями для эффективной выработки витамина В<sub>12</sub> является температура не менее 37°C и наличие аэробных условий. При оптимальных условиях культивирования выработка витамина В<sub>12</sub> штаммами *Bacillus coagulans* 406 и 416 составляет соответственно 2-3 и 3-6 мг/л среды. Однако в медицине используются другие, менее продуктивные, штаммы бактерии, и условия для ее роста в кишечнике не являются оптимальными. По этим причинам, а также вследствие того, что *Bacillus coagulans* в организме значительную часть времени находится в виде спор, нам представляется, что синтез витаминов В<sub>9</sub> и В<sub>12</sub> этим пробиотиком не имеет клинического значения.

С другой стороны, для большинства микроорганизмов фолиевая кислота и цианокобаламин являются факторами роста. Витамин В<sub>12</sub> необходим для культивирования бактерий рода *Bacillus* в промышленных масштабах, он способствует их росту и интенсивной экскреции ферментов [61]. В одном из ранних исследований, с использованием 20 штаммов *Bacillus coagulans*, показано, что для роста бактерий всех этих штаммов требуется наличие в питательной среде фолиевой кислоты [62]. В другом исследовании также подтвердили усиление роста колоний бактерий *Bacillus coagulans* в присутствии фолиевой кислоты, а также других компонентов: основных аминокислот, тиамин (витамина В<sub>1</sub>) и биотина (витамина В<sub>7</sub>) [63]. Прямые данные по оценке влияния витаминов В<sub>9</sub> и В<sub>12</sub> на культуральные и секреторные свойства *Bacillus coagulans* не выявлены. Однако их вносят как необходимые компоненты в среды для культивирования данного микроорганизма. Следовательно, введение

этих витаминов в состав препарата Лактовит Форте является благоприятным фактором роста и развития *Bacillus coagulans*.

Витамины В<sub>12</sub> и В<sub>9</sub> являются необходимыми компонентами для скорейшей вегетации спор в толстом кишечнике. Феномен стимуляции этими витаминами проклёвывания спор был подтвержден в эксперименте, а в клинике показано ускорение на 1-2 суток начальных проявлений клинических эффектов *Bacillus coagulans*, что довольно критично при острых диареях микробного происхождения, абдоминальных болях и спазмах.

Рассмотрим целесообразность введения в состав препарата витаминов В<sub>9</sub> и В<sub>12</sub> с точки зрения их собственных клинических эффектов.

Цианокобаламин обладает высокой биологической активностью. Он активизирует жировой, белковый и углеводный обмен, участвует в биосинтезе нуклеиновых кислот. Он повышает регенерацию тканей, нормализует кроветворение, функции печени и нервной системы, активизирует свертывающую систему крови, понижает содержание холестерина в крови (при атеросклерозе). В организме (преимущественно в печени) превращается в кофактор — кобамид, входящий в состав многочисленных ферментов-редуктаз. Кобамид участвует в переносе метильных и других одноуглеродистых фрагментов и поэтому необходим для образования дезоксирибозы и ДНК, креатина, метионина — донора метильных групп, в синтезе липотропного фактора — холина, для превращения метилмалоновой кислоты в янтарную, входящую в состав миеллина, для утилизации пропионовой кислоты. Способствует накоплению в эритроцитах соединений, содержащих сульфгидрильные группы, чем объясняется увеличение их толерантности к гемолизу.

Фолиевая кислота является незаменимым компонентом для синтеза нуклеиновых кислот и белков [64]. В организме человека она восстанавливается до коэнзима – тетрагидрофолиевой кислоты. Этот коэнзим необходим для многих важных метаболических процессов. Он участвует в образовании пуринов, пиримидинов, нуклеиновых кислот и аминокислот, необходим для эритро- и лейкопоэза, для обмена холина. Фолиевая кислота необходима для клеточного роста и репликации, поэтому она обладает репаративными свойствами, способствуя восстановлению поврежденных эпителия.

Между витаминами В<sub>9</sub> и В<sub>12</sub> имеется синергизм, поскольку цианокобаламин в составе фермента редуктазы восстанавливает фолиевую кислоту в активную тетрагидрофолиевую. В синергизме с витамином В<sub>12</sub> фолиевая кислота стимулирует кроветворение - дифференциацию и созревание мегалобластов, принимает участие в эритропоэзе. Взаимодействие этих витаминов заключается также в том, что при длительном применении фолиевой кислоты возможно снижение концентрации в крови витамина В<sub>12</sub>. Поэтому длительное применение фолиевой кислоты рекомендуется комбинировать с приемом витамина В<sub>12</sub>.

Важным аспектом биологического действия витаминов В<sub>9</sub> и В<sub>12</sub> является их влияние на иммунную систему.

Витамин В<sub>12</sub> обладает иммуотропным действием, сходным с дибазолом, - повышает неспецифическую сопротивляемость бактериальным инфекциям, что, по-видимому, является следствием активации всей совокупности механизмов, определяющих антиинфекционную резистентность организма. Введение витамина В<sub>12</sub> приводит к повышению бактерицидной и опсонизирующей активности сыворотки крови, увеличению продукции нормальных и иммунных антител, усилению фагоцитарной активности лейкоцитов и ретикулоэндотелиальной системы. Стимуляция фагоцитоза проявляется и в условиях антибиотикотерапии. В действии витамина В<sub>12</sub> значительный интерес вызывает его способность стимулировать образование интерферона и проявлять некоторое защитное действие при вирусных инфекциях при отсутствии непосредственного влияния на вирусы. Под действием витамина В<sub>12</sub> отмечено повышение резистентности к различного рода неблагоприятным воздействиям, в том числе инфекционным, при этом адаптогенное действие витамина отчетливо проявляется лишь при профилактическом применении.

Витамин В<sub>9</sub> также оказывает действие на иммунную систему. При дефиците этого витамина отмечено подавление активности CD8- и NK-клеток, что ассоциировано с уменьшением резистентности к инфекциям [65]. Фолатный рецептор (или рецептор витамина В<sub>9</sub>) интенсивно экспрессируется на поверхности Т-регуляторных клеток [66] и выполняет специфическую регуляторную функцию подавления апоптоза в этих клетках. В отсутствие витамина В<sub>9</sub> нативные Т-клетки могут дифференцироваться в Т-регуляторные клетки, но дифференцированные Т-регуляторные клетки не выживают вследствие подавления экспрессии антиапоптозных молекул (в т.ч. Bcl-2). Как результат, у мышей с дефицитом витамина В<sub>9</sub> отмечается значительно меньшее количество кишечных Т-регуляторных клеток, чем у мышей с достаточным уровнем этого витамина [67]. При дефиците фолиевой кислоты наблюдается ослабленная выживаемость Т-регуляторных клеток, что приводит к повышению чувствительности кишечника к воспалительным процессам инфекционного и аутоиммунного характера [68]. Витамины группы В осуществляют контроль иммунного ответа через мукозоассоциированный инвариант Т-клеток (MAIT). Клетки MAIT это неспециализированные Т-клетки, экспрессирующие полу-инвариантные αβ-Т-клеточные рецепторы и ограниченные молекулами MR1 комплекса гистосовместимости MHC-1; эти клетки в больших количествах обнаруживаются в кишечнике [69]. Клетки MAIT могут мгновенно реагировать на бактериальные инфекции (в т.ч., *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis*). Для иммунного ответа достаточно, чтобы антигены этих бактерий были представлены на MR1. Индуцируемые бактериями метаболиты витаминов В<sub>9</sub> и В<sub>2</sub> связываются с молекулами MR1 и бактериальными антигенами на поверхности клеток MAIT и совместно запускают иммунный ответ [70]. Данные этих исследований свидетельствуют о том, что витамины группы В являются обязательным компонентом устране-

ния иммунного дисбаланса – восстановлению иммунитета при иммунодефиците и при аллергических реакциях, и являются обязательными для проявления нормальной иммунной реакции на появление бактерий в кишечнике.

Таким образом, витамины В<sub>9</sub> и В<sub>12</sub> необходимы для процесса кроветворения, препятствуют развитию анемии, обладают репаративными и иммуностимулирующими свойствами. Поэтому совместное применение этих витаминов целесообразно при анемиях, а также при состояниях, связанных с недостаточностью функции кишечника (при нарушениях всасывания), в восстановительный период после перенесенных инфекционных заболеваний, операций, ожогов и травм, лучевой и химиотерапии, как средства профилактики инфекционных заболеваний.

Комбинированное применение *Bacillus coagulans* и витаминов В<sub>9</sub> и В<sub>12</sub> является обоснованным, как с точки зрения стимуляции витаминами роста и размножения бактерии, так и с целью оказания системных, в том числе иммуотропных, эффектов. Сочетание витаминов В<sub>9</sub> и В<sub>12</sub> с *Bacillus coagulans* позволяет нормализовать функцию кишечника, восстановить процессы пищеварения и всасывания при колитах. Является целесообразным также применение этой комбинации при нарушениях баланса микрофлоры вследствие антимикробной терапии, кишечных инфекций или других причин.

### Клиническая эффективность

Для пробиотиков на основе *Bacillus coagulans* существует достаточная доказательная база их клинической эффективности. Большинство исследований было проведено по современному дизайну – как рандомизированные двойные-слепые плацебо контролируемые исследования.

Одно из первых исследований (2003 г.) было проведено в Италии. Это было многоцентровое рандомизированное двойное-слепое плацебоконтролируемое исследование, в котором *B. coagulans* изучали в сочетании с фрукто-олигосахаридами. Пробиотик проявил свою эффективность как средство предотвращения антибиотик-ассоциированной диареи у детей. В исследовании приняли участие 120 детей, которые получали лечение (или плацебо) в течение 10 дней. Было установлено, что в условиях лечения диарея вообще не возникла у 71% детей, а в группе плацебо-контроля – только у 38%. Уменьшалась и длительность диареи. В опытной группе она составляла в среднем 0,7 дня, в группе плацебо-контроля – 1,6 дня, различие достоверно [71].

Клинические испытания разных стадий проводились в Японии, Индии и Китае с 2008 года. Результаты этих исследований представлены в обзоре 2012 г. [72].

В многоцентровом (19 независимых клинических центров Японии) двойном-слепом рандомизированном исследовании участвовали 567 пациентов с различными заболеваниями желудочно-кишечного тракта - с острой диареей, вызванной хроническим гастроэнтеритом, малдигестией (недостаточностью

пищеварительной функции), с антибиотик-ассоциированной диареей новорожденных и с запором. Применение пробиотика проводили в течение различных периодов времени – от 2 до 20 дней, в дозах до 750 x 10<sup>6</sup> КОЕ в сутки. Было установлено, что при диарее, вызванной гастроэнтеритом, статистически достоверный эффект составил 93,7% в сравнении с контрольной группой, находившейся на стандартной массивной антибиотикотерапии. При этом уменьшение клинических проявлений заболевания наблюдалось уже на 2 день, тогда как первые клинические проявления лечебных эффектов антибиотиков начинали проявляться только на 10 день. Аналогичное действие отмечалось у пациентов с нарушением переваривания пищи (ферментопатией) и диареей – 85,9% эффекта, а также с диареей новорожденных – 87,9%. При запоре эффект составил 65,4% [73]. Результаты данного клинического испытания представлены в таблице 4.

Другое плацебоконтролируемое исследование показало статистически достоверное снижение количества эпизодов диареи новорожденных. В этом исследовании принимали участие 112 новорожденных из Индии, которые были рандомизированы на две группы - получавших внутрь *B. coagulans* в дозе 100 млн. бактерий, и группу плацебо, в которой в случае возникновения диареи применяли стандартную химиотерапию. Наблюдение проводили в течение одного года. Возникновение патологии оценивали 1 раз в неделю. В 94 случаев диарея имела ротавирусную природу. Было установлено, что в условиях применения пробиотика среднее число случаев возникновения диареи за год составило 3,4 против 8,6 в группе плацебо-контроля. Выздоровление наступало раньше – на 13 день против 35 в контроле. Эпизоды диареи имели меньшую продолжительность – 3,6 дня против 6,8 в контроле. Следовательно, профилактическое применение *B. coagulans* предотвращало возникновение ротавирусной диареи и уменьшало ее длительность [74].

В более позднем исследовании оценивалось непосредственное лечебное воздействие *B. coagulans* при развившейся острой ротавирусной диарее. В рандомизированном двойном-слепом плацебоконтролируемом исследовании *B. coagulans* изучали у 148 детей возрастом 6-24 месяца при острой дегидратирующей ротавирусной диарее. Дети получали пробиотик (или плацебо) в сочетании с солевым раствором. Оценивали частоту стула, объем испражнений и потребность в приеме оральных регидратационных солей.

**Таблица 4. Данные клинических испытаний пробиотика на основе *Bacillus coagulans* в Японии**

Патология (состояние), при котором применялся пробиотик на основе <i>B. coagulans</i>	% случаев, клинического улучшения	Количество пациентов, у которых наблюдалось клиническое улучшение
Диарея как следствие острого или хронического	93,7	118/126

гастроэнтерита		
Несварение, вызванное диареей	85,9	79/92
Диарея новорожденных	87,9	58/66
Запор	65,4	17/26

При данной патологии пробиотик в качестве лечебного (не профилактического) средства был недостаточно неэффективен, поскольку достоверные различия по отношению к показателям плацебо-контроля отсутствовали [75].

Представлены данные об эффективности *B. coagulans* при некротизирующем энтероколите у недоношенных детей (гестационный возраст < 33 недель или масса тела при рождении < 1500 г). После иницирования энтерального питания этих детей делили на две группы: одна из них получала пробиотик в дозе 350 x 10<sup>6</sup> КОЕ в день в дополнение к грудному молоку или молочной смеси с первого дня кормления до выписки; в другой (контрольной) группе к питанию споры *B. coagulans* не добавляли. В результате было обнаружено, что *B. coagulans* не влияет на выживаемость недоношенных новорожденных с некротизирующим энтероколитом, однако значительно снижает непереносимость пищи (в группе с пробиотиком 44,5 % (n = 49), в контрольной группе 63,1 % (n = 70), p = 0,006) [76].

В рандомизированном двойном-слепом исследовании (Китай) проведено сравнительное изучение двух пробиотиков – *B. coagulans* и *Bifidobacterium longium*. В исследование были включены 103 пациента с острой и хронической диареей (51 и 52 соответственно) в качестве опытной группы, и 101 пациент – в контрольную группу (51 и 50). В опытной группе пациенты получали *B. coagulans* в форме таблеток в дозе 108 КОЕ по 3 раза в день в течение 3-7 дней при острой диарее и в течение 14-21 дня - при хронической. В контрольной группе пробиотик *Bifidobacterium longium* (таблетки “GoldenBifid”) пациенты принимали в том же режиме и в тех же дозах. Было установлено, что несколько более высокую активность проявлял *B. coagulans*. При его применении в условиях острой диареи эффект составил 78%, общая эффективность – 98%. Пробиотик сравнения был эффективен соответственно в 70 и 92% случаев. При хронической диарее показатели *B. coagulans* составили 48 и 90%, *Bifidobacterium longium* – 37 и 80%. Между тем, достоверного различия между действием пробиотиков выявлено не было. Под действием обоих пробиотиков отмечалось значительное увеличение количества бифидобактерий и лактобактерий в кишечнике. Побочных эффектов терапии не наблюдалось. Следовательно, *B. coagulans* при острой и хронической диарее оказывает, по крайней мере, не меньший эффект, чем пробиотик на основе *Bifidobacterium longium* [77].

Указывается на возможность применения *Bacillus coagulans* при лечении синдрома раздраженной толстой кишки. Абдоминальные боли при этом заболевании носят хронический характер и не имеют

какой-либо органической причины. В проведенном в США пилотном рандомизированном двойном-слепом плацебоконтролируемом исследовании с параллельными группами применяли *B. coagulans* GBI-30 6086 или плацебо 1 раз в день в течение 8 недель. У 44 пациентов оценивали выраженность абдоминальных болей и вздутия живота ежедневно на протяжении всего курса лечения. Сравнения проводили между группами и по отношению к базовому уровню. В опытной группе было выявлено достоверное ( $P < 0.01$ ) уменьшение абдоминальных болей и вздутия живота по отношению к исходным показателям в течение всех 7 недель применения пробиотика. В группе плацебо-контроля отмечалось только уменьшение болей на 6-8 неделях. Никаких связанных с лечением побочных эффектов не наблюдалось. Данное исследование позволило сделать вывод о высокой эффективности и безопасности *Bacillus coagulans* как средства уменьшения проявлений синдрома раздраженного кишечника [78].

Приводятся данные подобного исследования, проведенного в другом клиническом центре, в котором также изучалось применение *Bacillus coagulans* при синдроме раздраженной толстой кишки. В рандомизированном двойном-слепом плацебоконтролируемом исследовании участвовали 52 пациента с синдромом раздраженного кишечника с преобладанием диареи. Пробиотик пациенты получали в течение 8 недель. Оценивалась частота и консистенция стула, выраженность симптомов заболевания и необходимость применения лекарственных препаратов. Было установлено, что у пациентов, применявших пробиотик, достоверно ( $P = 0.042$ ) уменьшалась частота стула по отношению к плацебо-контролю. Отмечено уменьшение выраженности болевого синдрома и вздутия живота, однако, в связи со значительными колебаниями исходных данных достоверного различия не выявлено. Таким образом, на основании данного пилотного исследования *Bacillus coagulans* был признан эффективным средством для снижения частоты стула у пациентов с синдромом раздраженного кишечника с преобладанием диареи [79].

Контролируемое исследование эффективности *Bacillus coagulans* при синдроме раздраженной толстой кишки было проведено и в 2014 году. В исследовании принимали участие 85 пациентов, которые были рандомизированы на группы, из которых одна получала *Bacillus coagulans*, а другая служила плацебо-контролем в течение 12 недель. Оценка частоты и интенсивности симптоматики заболевания включала показатели интенсивности абдоминальных болей (по шкале от 1 до 7 баллов), диареи и запора (от 1 до 5). Оценку проводили до начала эксперимента и в течение 9 месяцев наблюдения после него. Эксперимент был успешно завершен для 23 пациентов в основной группе и у 33 пациентов плацебо-группы (средний возраст 39.8 лет, 78.6% женщин). Наиболее выраженным отличием основной группы от плацебо-контроля было подавление абдоминальной боли в основной группе (снижение боли в баллах на  $4.2 \pm 1.8$  против  $1.9 \pm 1.5$  в плацебо-группе,  $P < 0,001$ ). Статистически достоверное снижение частоты запоров наблюдалось

в основной группе (снижение частоты в баллах  $0,9 \pm 1,2$  против  $0,8 \pm 1,1$  в группе плацебо,  $p = 0,561$ ). После девяти месяцев наблюдения частота абдоминальных болей в основной группе уменьшилась ( $P = 0,016$ ), частота запоров была выше ( $P < 0,001$ ), а частота появления диареи осталась неизменной ( $P = 1.000$ ). В группе плацебо абдоминальные боли увеличилась ( $p < 0,001$ ), частота запоров осталась неизменной ( $P = 0,553$ ), и частота диареи была выше ( $P < 0,001$ ). Таким образом, пробиотик *Bacillus coagulans* способен редуцировать абдоминальные боли и диарею у больных с синдромом раздраженной толстой кишки [80].

Эффективность *Bacillus coagulans* при болезни Крона была доказана в рандомизированном двойном-слепом плацебоконтролируемом исследовании с участием 35 пациентов с данным заболеванием. 11 из них прервали исследование по причинам, не связанным с приемом пробиотика. У пациентов, завершивших исследование, выявлено стойкое уменьшение индекса болезни Крона и частоты стула [81].

Было показано гиполипидемическое действие *B. coagulans* в открытом клиническом исследовании с участием 17 пациентов с гиперлипидемией II типа. Пробиотик применяли в течение 3 месяцев в виде таблеток, содержащих по  $3.6 \times 10^8$  спор бактерий, по 3 таблетки 2 раза в день. Было установлено достоверное снижение в сравнении с исходными данными содержания в сыворотке крови следующих показателей: общего холестерина – с 330 до 226 мг/дл, липопротеидов низкой плотности – с 267 до 173 мг/дл. Повышалось содержание липопротеидов высокой плотности – с 43,6 до 46,8. Соответственно снижалось соотношение содержания липопротеидов высокой плотности/низкой плотности. Уровень триглицеридов не изменился [82].

Еще одно интересное исследование было опубликовано в 2010 году. Оно базировалось на том факте, что бактерии-продуценты молочной кислоты проявляют противовоспалительные и иммуномодулирующие свойства и способность ослаблять симптомы артритов у животных и людей. Это было пилотное рандомизированное двойное-слепое, плацебоконтролируемое исследование, в котором оценивали эффекты *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086 на симптомы и проявления ревматоидного артрита у пациентов в комплексной терапии с препаратами классического протокола лечения этой патологии. В исследовании участвовали 45 мужчин и женщин с симптомами ревматоидного артрита, которые получали указанный пробиотик либо плацебо один раз в день в течение 60 дней. Проявления артрита определяли клинически, на основе критериев выраженности артритов ACR, индекса HAQ-DI, лабораторных тестов СОЭ и С-реактивного белка. В результате исследований было установлено, что у пациентов, получавших пробиотик на основе *Bacillus coagulans*, болевая симптоматика ревматоидного артрита была статистически значительно менее выражена, чем в группе плацебо. Важной особенностью было также отсутствие в опытной группе пациентов, прекративших лечение из-за побочных эффектов. Исследование показало эффективность и безопасность применения пробиотиков на

основе *Bacillus coagulans* в качестве вспомогательной терапии ревматоидного артрита.

Контролируемое клиническое исследование комбинированного применения *Bacillus coagulans* вместе с изофлавонами выявило целесообразность их совместного применения в качестве анксиолитического средства в коррекции негативных эффектов менопаузы [83]. Более того, было показано, что применение *Bacillus coagulans* улучшало всасывание изофлавонов сои и, следовательно, увеличивало их биодоступность и эффективность [84]. В проспективном многоцентровом исследовании определяли эффективность и переносимость женщинами соевых экстрактов в комбинации с пробиотиком и витамином D на симптомы климакса. В общей сложности в исследовании принимали участие 2044 женщины в возрасте 40-65 лет, которые были набраны в случайном порядке 198 испанскими гинекологами. Женщины получали смесь экстракта сои (30 мг генистеина и 30 мг даидзеина) с пробиотиком (500 млн спор *Bacillus coagulans*), кальция (141 мг) и витамина D (5 мкг). Пациентки составляли самоотчет в начале и после 6-месячного применения смеси. В анкету были включены 15 пунктов оценки состояния здоровья в период менопаузы и четыре пункта - сексуальности по шкале Сервантеса. Пациентки и гинекологи завершили оценку клинических данных. После 6 месяцев применения смеси уменьшилась выраженность климактерических симптомов и повысилась сексуальность. Как пациентки, так и гинекологи, были удовлетворены результатами лечения [85].

Отдельно следует обратить внимание на исследование пробиотического потенциала *Bacillus coagulans* в сравнении с бифидобактериями и лактобактериями, которые наиболее часто используются в качестве пробиотиков для коррекции дисбиозов. Было показано, что применение *B. coagulans* было более эффективным в сравнении с применением традиционных пробиотиков *L. acidophilus* и различных штаммов бифидобактерий отдельно, как по времени наступления клинического улучшения, так и по проценту позитивных клинических откликов в ответ на терапию - на 20% и 30% соответственно [86].

Применение *Bacillus coagulans* в дозе 120 млн. КОЕ - по 2 таблетки один раз в сутки сублингвально, приводило к заживлению афтозных стоматитов уже на 3 день лечения [87,88].

Другой позитивный результат был получен при использовании *B. coagulans* в предотвращении и лечении кариеса. Кариес зубов у детей вызывается частично бактерией *Streptococcus mutans* и является актуальной проблемой стран третьего мира. Лиофилизированный порошок *Bacillus coagulans* (КОЕ не определяли), разведенный в 20 мл воды, давали 50 детям в течение 14 дней для полоскания полости рта. Другая группа из 50 детей получала аналогичный

препарат, но содержащий *L. rhamnosus* и бифидобактерии. Плацебо-группа состояла из 50 детей. Образцы слюны собирали на 1 и 14 дни и культивировали с целью определить наличие и установить количество *S. mutans*. Через 14 дней статистически значимое подавление количества *S. mutans* ( $p < 0.001$ ) было обнаружено в обеих группах пробиотиков. Авторы исследования сделали вывод о том, что *Bacillus coagulans* может быть эффективным средством предотвращения кариеса зубов у детей [89].

Установлена эффективность *Bacillus coagulans* при неспецифических вагинитах. Этот вид активности связывают со способностью данного пробиотика выделять L(+)-молочную кислоту и тем самым смещать pH влагалища в кислую сторону, что приводит к гибели патогенов. В данном случае необходимо применение пробиотика в неспортивной форме. Изучение вагинальных таблеток *Bacillus coagulans* (оригинальное название Миконип) было проведено с участием 44 женщин с неспецифическими вагинитами. Препарат применяли дважды в день в течение 14 дней. Общее количество КОЕ в таблетке не приводилось. Субъекты с трихомонозом или вагинитами, вызванными кандидой, были исключены из исследования. Полное прекращение болей и зуда и выздоровление наблюдалось у 91% пациенток, частичный эффект был отмечен у 9% пациенток. Эти результаты были следствием резкого изменения вагинальной кислотности под действием молочной кислоты, продуцируемой *Bacillus coagulans*. У пациенток в постменопаузе улучшение было не так ярко выражено, но проявлялось так же в достаточной степени. Все полученные различия были статистически достоверны [90].

Пробиотики на основе *Bacillus coagulans* интенсивно исследуются и в настоящее время. В 2013-2015 г.г. появился ряд работ, в которых выявляются новые области их применения. Так, современное клиническое исследование (2015 г.) посвящено применению *Bacillus coagulans* в пожилом возрасте, когда в кишечнике снижается содержание бифидобактерий и ослабляется иммунная защита. В рандомизированном двойном-слепом плацебоконтролируемом перекрестном исследовании было изучено применение у 36 добровольцев возрастом 65-80 лет пробиотика на основе *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086. Оценивалась его способность улучшать иммунитет и пищеварительную функцию кишечника. Было установлено, что в условиях применения пробиотика в мононуклеарах крови повышалось содержание цитокинов на 0,2 нг/мл за счет противовоспалительного интерлейкина IL-10, а в группе плацебо-контроля такого повышения не наблюдалось. Эффективность *Bacillus coagulans* при аллергических заболеваниях в настоящее время изучается. Результаты клинических исследований пробиотиков на основе *Bacillus coagulans* представлены в табл. 5.

Таблица 5. Резюме результатов клинических исследований пробиотиков на основе *B. coagulans* (цитируется по [91])

Автор	Год	Использованный материал	Заболевание	Размер выборки	Суточная доза	Результаты
La Rosa	2003	<i>B. coagulans</i> с	Антибиотик-	98 детей	Не стандарт-	Повышение числа полного

et al.		фруктозо-олигосахаридами (упоминается как <i>L. sporogenes</i> )	ассоциированная диарея		зована	выздоровления - 71% против 38% в группе плацебо; значительное сокращение времени протекания заболевания
Dolin BJ et al	2009	<i>B. coagulans</i> GBI-30, 6086	Синдром раздраженной толстой кишки	52 взрослых пациента	2 млрд. КОЕ	Уменьшение перистальтики; нет статистически достоверных отличий по другим симптомам от плацебо
Hun L.	2009	<i>B. coagulans</i> GBI-30, 6086	Синдром раздраженной толстой кишки	44 взрослых пациента	800 млн. КОЕ	Статистически значимое уменьшение абдоминальных болей и моторики
Chandra RK	2002	<i>B. coagulans</i>	Острая рота-вирусная диарея	112 новорожденных	100 млн. КОЕ	Статистически достоверное уменьшение частоты и продолжительности диареи
Sari FN et al.	2011	<i>B. coagulans</i> (упоминается как <i>L. sporogenes</i> )	Некротизирующий энтероколит	221 недоношенных новорожденных	350 млн. КОЕ	Не влияет на смертность недоношенных с NEC-синдромом; значительно уменьшает толерантность к питанию
Dutta P et al	2011	<i>B. coagulans</i> (упоминается как <i>L. sporogenes</i> )	Диарея с дегидратацией смешанной этиологии	148 новорожденных (6-24 месяца)	Не определена	Нет эффекта в терапии острой дегидратирующей диареи смешанной этиологии у детей
Kalman DS et al	2009	<i>B. coagulans</i> GBI-30, 6086	Боли в кишечнике, метеоризм, избыточная моторика кишечника	61 взрослый пациент	2 млрд. КОЕ	Значительное подавление образования газов в кишечнике и абдоминальных болей, тенденция к улучшению растяжимости кишечника и восстановление качества жизни

Следует отметить, что ни в одном из имеющихся в открытой печати клиническом исследовании не выявлено изучения зависимости эффектов пробиотика от применяемой дозы. В основном они применялись в интервале суточных доз 100-800 млн. спор, причем каждое исследование проводилось с использованием только одной дозы пробиотика. С учетом указанного диапазона эффективных доз, можно сделать вывод о том, что применяемая в препарате Лактовиг Форте доза спор в одной капсуле – 120 млн. КОЕ, при условии приема от 1 до 3 капсул в сутки, – является достаточной для оказания пробиотических эффектов при приеме внутрь. Она дает возможность дозировать препарат (в интервале приведенных выше доз, изученных в клинических испытаниях) путем варьирования числа капсул, принимаемых в сутки, в соответствии с возрастом пациента, показаниями и индивидуальными особенностями. Эта доза не является также завышенной, во-первых, в связи с описанным выше свойством бактерии ограниченно заселять кишечник, персистировать и подвергаться споруляции в его нижних отделах, а затем выводиться из организма, во-вторых, в связи с высокой безопасностью и отсутствием побочных эффектов данного пробиотика (см. ниже).

Дозы витаминов В<sub>9</sub> и В<sub>12</sub> в препарате Лактовиг Форте – соответственно 1,5 мг и 15 мкг, соответствуют приблизительно 5-кратной суточной потребности человека в этих витаминах. Это стандартные дозы витаминов В<sub>9</sub> и В<sub>12</sub>, используемые в препаратах, предназначенных для приема внутрь. Эти витамины безопасны при приеме внутрь в указанных дозах.

### Токсические свойства и побочные эффекты

Данные изучения токсикологической безопасности биопрепаратов на основе *Bacillus coagulans* показывают отсутствие у них мутагенных, генотоксических и кластогенных эффектов. Результаты изучения острой и 90-дневной субхронической токсичности при введении внутрь крысам свидетельствует о том, что его полностью безопасная доза (NOEL) превышает 1000 мг/кг в день, или, в пересчете микробной нагрузки на человека – более 95,2 x 10<sup>11</sup> КОЕ, что в 100 000 раз превышает рекомендованные дозы пробиотика [92].

Было проведено 7 исследований токсичности *Bacillus coagulans* (в виде препарата GanedenBC30™). Это острая и субхроническая токсичность при введении внутрь крысам, изучение мутагенности у крыс, местнораздражающего действия у кроликов.

Изучение острой токсичности проводили с использованием дозы 50 x 10<sup>11</sup> КОЕ/кг массы тела крыс, что по дозе лекарственной формы препарата составляло 5 г/кг. Наблюдение за животными в течение 14 дней не выявило каких-либо изменений в их состоянии и поведении, прирост массы тела не изменялся, гистологические исследования не выявили патологических изменений во внутренних органах. На основании данного исследования не было выявлено какого-либо токсического воздействия на организм крыс.

В 13-недельном исследовании субхронической токсичности у крыс с использованием доз 100, 300 и 1000 мг/кг не было выявлено токсических эффектов ни одной из доз препарата. Следовательно, максимальная полностью безопасная доза превышает 1000 мг/кг или, в пересчете микробной нагрузки на челове-

ка – более  $95,2 \times 10^{11}$  КОЕ, что в 100 000 раз превышает рекомендованные дозы пробиотика

Препарат GanedenBC не проявлял местнораздражающего действия в отношении глаз и кожи кроликов. Отмечалось лишь небольшое преходящее раздражение конъюнктивы.

*Bacillus coagulans* не проявляет мутагенных свойств в тесте Эймса, в микроядерном тесте у мышей и в исследовании хромосомных aberrаций in vitro [93].

Примененная в клинических испытаниях терапевтическая доза *B. coagulans* для человека колебалась от  $100 \times 10^6$  (100 млн) до  $3 \times 10^9$  (3 млрд.) КОЕ в сутки, в данном диапазоне доз пробиотик был безопасным. Эти данные являются репрезентативными, и разброс фактора безопасности колеблется от 3173 до 95200 по времени приема рекомендованной суточной дозы. У человека побочные эффекты в доступной литературе не упоминаются.

### Преимущества *Bacillus coagulans*

Согласно литературным данным, идеальный пробиотик должен быть устойчив к технологическим процессам его приготовления и к хранению при комнатной температуре, не разрушаться при воздействии желудочного сока и желчи, обладать способностью к быстрому размножению и не проявлять патогенные свойства в организме человека. Кроме того, высоко ценится способность пробиотиков быть полезными и при лечении других заболеваний — гинекологических, аллергических, сердечно-сосудистых и пр. По мнению экспертов, перечисленным требованиям максимально удовлетворяет пробиотик на основе *Bacillus coagulans*.

Пробиотик на основе *Bacillus coagulans*, прежде всего, вместо вегетативных клеток содержит споры, которые хорошо переносят не только технологические процессы, но и воздействие желудочного сока и желчных солей [94,95].

При исследовании параметров безопасности (доклинические и клинические исследования) установлено отсутствие потенциальной токсичности *B. coagulans* [96,97,98].

Это выгодно отличает *Bacillus coagulans* от других споровых микроорганизмов и некоторых лактобацилл, входящих в состав пробиотиков. Так, имеются сообщения о септицимии, вызванной штаммом *B. subtilis*, который давали в составе пробиотика пациентам с ослабленным иммунитетом. Также описаны два случая инфекций от пробиотических штаммов *Bacillus*. В первом случае инфицирующий агент был обнаружен у пациента во Франции (1996 г.) при воспалении желчного пузыря, во втором – в Италии (1998 г.) при септицимии. Оба агента не отличались от штамма *Bacillus clausii* [99].

Другой споровый микроорганизм – *Bacillus licheniformis*, считается оппортунистическим патогеном, заражая, главным образом, или лиц с серьезно ослабленным иммунитетом, или послеоперационных больных [100,101]. С 1966 г. в литературе описано 20

случаев заражения человека *B. licheniformis*, в основном пациентов с ослабленным иммунитетом.

Кроме того, в редких случаях, в основном у лиц с вторичными иммунодефицитами, локальные и генерализованные инфекции способны вызывать также и лактобациллы индигенной микрофлоры. Представители рода *Lactobacillus* могут служить причиной развития гнойно-воспалительных процессов, эндокардитов, септицемии, пневмонии, менингита, уроинфекций. В качестве этиологических факторов зарегистрированы *L. casei sp. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. lactis*, *L. fermentum*, *L. acidophilus*, *L. salivarius*, изолированные при различных патологических состояниях, часто локальных [102].

Таким образом, отсутствие патогенности выгодно отличает *Bacillus coagulans* от других споровых микроорганизмов и некоторых лактобацилл, входящих в состав пробиотиков.

В экспериментальных исследованиях установлено, что споры *B. coagulans* активизируются в слепой кишке, что приводит к росту количества вегетативных клеток в дистальных отделах кишечника.

Выживаемость *B. coagulans* была снижена только на 20% при 4-часовой экспозиции в 0,9% растворе солей желчных кислот, при этом споровые формы были полностью устойчивы к рН 2 в течение 2 ч с  $90,1 \pm 3,5\%$  выживанием, а вегетативная форма при этом была восприимчива к 15 антибиотикам, обычно используемым в медицине и ветеринарии. *Bacillus coagulans* проявляет выраженную противомикробную активность в отношении *Escherichia coli* O8, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica subsp. enterica serovar enteritidis*, *Streptococcus suis*, *Listeria monocytogenes* и *Pasteurella multocida*.

Способность восстанавливать экологический баланс кишечной микрофлоры связана с тем обстоятельством, что *B. coagulans* подавляет размножение патогенной микрофлоры: *Salmonella typhosa*, *Salmonella schottmuelleri*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella paradysenteriae*, *Clostridium difficile*, *Streptococcus faecalis* и др. В основе подобного антагонизма лежит несколько механизмов. *B. coagulans* выделяет бактериоцины – вещества, повреждающие мембраны, нарушающие синтез белков и ДНК в патогенных бактериях. *B. coagulans* выделяет также перекись водорода, которая окисляет щелочные белки в патогенных бактериях. Кроме того, *B. coagulans* выделяет L(+) молочную кислоту (левовращающий изомер), которая в недиссоциированной (т.е. нейтральной) форме свободно проникает через мембраны и снижает внутриклеточное значение рН в патогенах. Это, в свою очередь, ведет к нарушению метаболических процессов, таких как окислительное фосфорилирование, и к гибели патогенов.

Эффективность пробиотиков, содержащих споры *Bacillus coagulans*, подтверждена методами доказательной медицины. Пробиотик эффективен при лечении диареи различного происхождения, в том числе связанной с приемом антибиотиков, при энтероколите и синдроме раздраженного кишечника. Прием *Bacillus coagulans* сокращает длительность диареи,

уменьшает выраженность абдоминальных болей, нормализует состав микрофлоры кишечника.

Выявлена эффективность *Bacillus coagulans* и в качестве гипохолестеринемического средства, как средства противовоспалительного действия в комбинированной терапии артритов, в сочетании с экстрактами сои для уменьшения симптомов климакса, при местном применении он был эффективен при вагинитах, стоматитах и кариесе.

## Выводы

*Bacillus coagulans* обладает преимуществами по отношению к большинству других бактерий, применяемых в качестве пробиотиков. Она занимает промежуточное положение между родами *Bacillus* и *Lactobacillus*, являясь спорообразующей бактерией, продуцирующей молочную кислоту.

Эта бактерия в виде спор хорошо переносит технологические процессы, хорошо хранится, устойчива к действию антибиотиков и антисептиков, в отличие от большинства применяемых пробиотиков, не разрушается под влиянием желудочного сока и желчи. Попадая в двенадцатиперстную кишку, споры прорастают в вегетирующие формы и начинают размножаться, оказывая пробиотические эффекты.

*Bacillus coagulans* относится к полурезидентным бактериям - выполнив в организме человека функцию пробиотика, она проходит фазу споруляции и медленно покидает организм, выделяясь с фекалиями в виде спор. Таким образом, она не нарушает индивидуальный состав микрофлоры кишечника.

Пробиотик *Bacillus coagulans* улучшает микробиологический состав кишечника, увеличивая количество облигатных микроорганизмов и вытесняя патогенную флору. Механизмы этого вида действия – продукция молочной кислоты и индивидуальных бактериоцинов, а также иммуномодулирующее действие - стимуляция клеточного и гуморального иммунитета. Иммуномодулирующим действием обладают метаболиты, выделяемые бактерией, ее клеточная стенка и споры.

На основании имеющихся в литературе данных можно сделать вывод о том, что, по-видимому, именно иммуномодулирующие свойства *Bacillus coagulans* играют решающую роль в его фармакологических эффектах. На это указывают: важность иммунной системы в патогенезе многих заболеваний, достаточность даже небольших количеств стимулятора для оказания эффекта (без необходимости интенсивного размножения бактерии и колонизации кишечника), наличие экспериментальных доказательств проникновения бактерий и их спор в лимфатическую систему и взаимодействия с иммунокомпетентными клетками, а также местные и системные иммуностропные эффекты пробиотика.

Помимо этого основного вида действия, *Bacillus coagulans* способствует перевариванию лактозы, обладает противовоспалительной и антиоксидантной активностью, а также гипохолестеринемическим действием.

Эффективность пробиотиков, содержащих споры *Bacillus coagulans*, подтверждена методами доказательной медицины. Пробиотик эффективен при лечении диареи различного происхождения, в том числе связанной с приемом антибиотиков, при энтероколите и синдроме раздраженного кишечника. Прием *Bacillus coagulans* сокращает длительность диареи, уменьшает выраженность абдоминальных болей, нормализует состав микрофлоры кишечника.

Выявлена эффективность *Bacillus coagulans* и в качестве гипохолестеринемического средства, как средства противовоспалительного действия в комбинированной терапии артритов, в сочетании с экстрактами сои для уменьшения симптомов климакса, при местном применении он был эффективен при вагинитах, стоматитах и кариесе.

В клинических исследованиях доказана высокая безопасность пробиотика.

В Украине официально зарегистрирован и присутствует на фармацевтическом рынке лекарственный препарат с гарантированным качеством Лактовит Форте® на основе спор *Bacillus coagulans*. В состав препарата входят также витамины В<sub>9</sub> и В<sub>12</sub>, которые необходимы для скорейшей вегетации спор в кишечнике. Комбинированное применение *Bacillus coagulans* и витаминов В<sub>9</sub> и В<sub>12</sub> является обоснованным и с точки зрения их системных, в том числе иммуностропных, эффектов. Комбинация обеспечивает повышение резистентности к инфекциям, способствует нормализации функции кишечника при колитах, восстановлению нарушенного баланса микрофлоры вследствие антимикробной терапии, кишечных инфекций или других причин.

## «KING OF PROBIOTICS» BACILLUS COAGULANS IN MODERN COMBINED PROBIOTIC PREPARATIONS LAKTOVIT FORTE (FULL REVIEW)

Bomko T.V., Martynov A.V.,  
Nosalska T.N., Kabluchko T.V.

*Bacillus coagulans* has an advantage over most other bacteria used as probiotics. It occupies an intermediate position between the genera *Bacillus* and *Lactobacillus*, is a spore-forming bacteria that produce lactic acid. This bacteria in the spores form can tolerate well technology processes, resistant to antibiotics and antiseptics, does not collapse under the influence of gastric juice and bile. Getting into the duodenum, the spores germinate into vegetative forms and begin vegetation and growth, providing probiotic effects. *Bacillus coagulans* refers to semi-residential bacteria - performing in the human probiotic function, it passes the sporulation phase and slowly leaves the body, standing out in the faeces in the spores form. Thus, it does not violate the personal composition of intestinal microflora. Probiotic *Bacillus coagulans* enhances the microbiological composition of the intestine, increasing the number of obligate microorganisms and displacing pathogenic flora. Mechanisms of this action based on the lactic acid production and some bacteriocins synthesis, also on the immunomodulatory effect - stimulation of cellular and humoral immunity. The bacterial cell



wall and spores are the main immunomodulatory compounds of the *Bacillus coagulans*. Apparently, namely *Bacillus coagulans* immunomodulatory properties play a crucial role in the pharmacological effects. It is now well known about the important role of immune system in the pathogenesis of many diseases; it has the clinical effect without the need for intensive growth of bacteria and intestinal colonization; even small amounts of spores are sufficient for pharmacological effect; many experimental evidences of the spore penetration into the lymphatic system and interaction with immunocompetent cells, as well as local and systemic immune effects of probiotic. In addition to this main action, *Bacillus coagulans* helps to digest lactose, possesses anti-inflammatory and antioxidant activity, as well as the cholesterol-lowering effect. The effectiveness of probiotics, containing spores of *Bacillus coagulans*, was confirmed by evidence-based medicine. Probiotic effect in the treatment of various diarrheas, including those related to antibiotic treatment, enterocolitis and irritable bowel syndrome. *Bacillus coagulans* application reduces the duration of diarrhea, reduces the severity of abdominal pain, and normalizes the composition of intestinal microflora. *Bacillus coagulans* efficiency is identified also as hypocholesterolemic agents, as a means of anti-inflammatory effect in the combination therapy of arthritis, in combination with soya extracts for reducing menopause symptoms; by topical application it was effective in vaginitis, stomatitis and dental caries. In clinical studies proved the high safety of probiotics. Except spores *Bacillus coagulans*, as part of the "Laktovit Forte" there are also present B<sub>9</sub> and B<sub>12</sub> vitamins in high doses, which are an essential component for the early spore's vegetation in the large intestine. These vitamins stimulation phenomenon vegetation dispute has been confirmed experimentally, as shown in the clinic acceleration by 1-2 days of initial clinical manifestations of the effects of *Bacillus coagulans*, which is quite critical in acute diarrhea microbial origin, abdominal pain and cramps.

**Keywords:** *Bacillus coagulans*, pharmacology, biological properties, biological activity, bacteriocins, review

## References

- 1 Casula G. Bacillus probiotics: spore germination in the gastrointestinal tract [Text] / G. Casula, S. M. Cutting // Appl Environ Microbiol.- 2002.- Vol.68, N 5.- P.2344-2352.
- 2 Adami, A. Biomass production, preservation and characteristics of a strain of *Bacillus coagulans* as probiotic [Text] / A. Adami, V. Cavazzoni // Microbiologie Aliments Nutrition.-1993.- Vol. 11.- P. 93-100.
- 3 Snetah P H A, Mair N S, Sharpe M E, Holt J G (EDS). Genus *Bacillus* Cohn 1872. [Text] // Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Baltimore: Williams and Wilkins).- 1986.-1105 - Claus D, Berkeley R C W 39
- 4 Claus, D. and Berkeley, R.C.W. (1986). Genus *Bacillus* Cohn 1872. In Snetah, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt, J.G. (EDS), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Baltimore: Williams and Wilkins) [Text] // pp.1105-1139.
- 5 FAO/WHO. Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria [Text] // Report 2001. FAO/WHO; Cordoba, Argentina: 2001
- 6 Nakamura L K. Phylogeny of *Bacillus sphaericus* - like organisms [Text] / L. K. Nakamura // International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology.- 2000.-Vol.50.-P.1715-1722.
- 7 EverPup. Режим доступа: <http://www.everpup.co.uk/ingredients/probiotics-from-lactobacillus-sporogenes/>
- 8 Weese J.S. Microbiologic evaluation of commercial products [Text] / J. S. Weese // Journal of the American Veterinary Medical Association.- 2002.-Vol. 220.- P. 794-797.
- 9 De Vecchi E. Lactobacillus sporogenes or *Bacillus coagulans*: misidentification or mislabelling? [Text] / E. De Vecchi, L. Drago // International Journal of Probiotics and Prebiotics.- 2006.- Vol.1, N.1.- P.3-10.
- 10 Pat. US8697055 B2 US, Probiotic, lactic acid-producing bacteria / Farmer Sean (Miami, FL); FARMER SEAN [US]; GANEDEN BIOTECH INC [US]. - US 13/423,852; Filed: March 19, 2012; Date of Patent Apr. 15, 2014.
- 11 Abdhul K. Bacteriocinogenic potential of a probiotic strain *Bacillus coagulans* [BDU3] from Ngari [Text] / Abdhul K., M. Ganesh, S. Shanmughapriya, et al. // IntJBiolMacromol.- 2015.-Vol. 79.-P.: 800-806.
- 12 Hyronimus B. Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria [Text] / B. Hyronimus, C. Le Marrec, A. H. Sassi, A. Deschamps // International Journal of Food Microbiology.- 2000.-Vol.61, N 1-2.-P.193-197.
- 13 Lactobacillus sporogenes improves gastrointestinal ecology // Alternative Medicine Review, August, 2002. Режим доступа: <http://forums.prohealth.com/forums/index.php?threads/lactobacillus-sporogenes-improves-gastrointestinal-ecology.131865/>
- 14 Chateau N. Heterogeneity of bile salts resistance in the *Lactobacillus* isolates of a probiotic consortium [Text] / N. Chateau, A.M. Deschamps, A. Hadj Sassi // Letts Appl Microbiol.-1994.-Vol.18.-P.42-44.
- 15 Jacobsen C.N. Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans [Text] / C.N. Jacobsen, Rosenfeldt Nielsen V., A.E. Hayford, et al. // Appl Environ Microbiol.-1999.-Vol. 65.-P. 4949-4956.
- 16 Zarate G. Effect of bile on the  $\beta$ -galactosidase activity of dairy propionibacteria [Text] / G. Zarate, S. Gonzalez, A.P. Chaia, G. Oliver // Lait.-2000.-Vol.80.- P.267-276.
- 17 Ibrahim S.A. Survival of bifidobacteria in the presence of bile salt [Text] / S.A. Ibrahim, A. Bezhorovainy // J Sci Food Agric.-1993.-Vol. 62.-P.351-354.

- 18 Clark P.A., Martin J.H. Selection of bifidobacteria for use as dietary adjuncts in cultured dairy foods. III. Tolerance to simulated bile concentrations of human small intestines [Text] / P.A. Clark, J.H. Martin // *Cult Dairy Prod J.*-1994.-Vol.29.- P.18–21.
- 19 Hong H. A. The use of bacterial spore formers as probiotics [Text] / H. A. Hong, L.H. Duc, S. M. Cutting // *FEMS Microbiology Reviews.*- 2005.- Vol.29, N.4.- P.813-835.
- 20 Amaha M., Ordal Z.J., Toubia A. Sporulation requirements of *Bacillus coagulans* var. *Thermoacidurans* in complex media / M. Amaha, Z.J. Ordal, A. Toubia // *J Bacteriol.*- 1956.- Vol.72, N1.- P.34–41.
- 21 Palestrant D. Microbial biofilms in the gut: visualization by electron microscopy and by acridine orange staining [Text] / D. Palestrant, Z. E. Holzknecht, B. H. Collins, et al. // *Ultrastruct Pathol.*-2004.-Vol.28.- P.23–27.
- 22 Mendelson N.H. *Bacillus subtilis* macrofibres, colonies and bioconvection patterns use different strategies to achieve multicellular organization [Text] / N.H. Mendelson // *Environ Microbiol.*-1999. -Vol.1.-P.471–477.
- 23 Rajagopalan S. Modeling substrate particle degradation by *Bacillus coagulans* biofilm [Text] / S. Rajagopalan, D. A. Rockstraw, S. Munson-McGee // *Biore-source Technol.*-1997. -Vol.61, N.3.-P.175-183
- 24 Quintelas C. Biosorption of Cr(VI) by a *Bacillus coagulans* biofilm supported on granular activated carbon (GAC) [Text] / C. Quintelas, B. D. Fernandes, J. Castro, et al. // *Chemical Engineering Journal.*- 2008. -Vol.136, N 2-3.-P.195-203.
- 25 Duc L.H. Bacterial spores as vaccine vehicles [Text] / L.H. Duc, H.A. Hong, N. Fairweather, et al. // *Infect Immunol.*- 2003. -Vol.71.-P.2810–2818.
- 26 Hoa T.T. Fate and dissemination of *Bacillus subtilis* spores in a murine model [Text] / T.T. Hoa, L.H. Duc, R. Istitato, et al. // *Appl Environ Microbiol.*-2001. -Vol. 67.- N 9.- P.3819-3823.
- 27 Smirnov V.V. The effect of the complex probiotic Sporolact on the intestinal microbiocenosis of warm-blooded animals [Text] / V.V. Smirnov, S.R. Reznik, V.A. Viunitskaia, et al. // *MikrobiolZ.*-1995.- Vol.57.- P.42-49.
- 28 Adami A. Occurrence of selected bacteria groups in the faeces of piglets fed with *Bacillus coagulans* as probiotic [Text] / A. Adami, V. Cavazzoni // *J Basic Microbiol.*-1999.-Vol.39.-P.3-9.
- 29 Donskey C.J. Effect of oral *Bacillus coagulans* administration on the density of vancomycin-resistant enterococci in the stool of colonized mice [Text] / C.J. Donskey, C.K. Huyen, S.M. Das, et al. // *Letters in Applied Microbiology.*-2001.-Vol.33.-P. 84-88.
- 30 Hyronimus B. Coagulin, a bacteriocin - like inhibitory substance produced by *Bacillus coagulans* I4 [Text] / B. Hyronimus, C. Le Marrec, M.C. Urdaci // *J Appl Microbiol.*- 1998.-Vol.-85, N 1.- P.42-50.
- 31 Le Marrec C. Biochemical and genetic characterization of coagulin, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins, produced by *Bacillus coagulans* I(4) [Text] / C. Le Marrec, B. Hyronimus, P. Bressollier et al. // *Appl Environ Microbiol.*- 2000. -Vol.-66, N 12. - P.5213-5220.
- 32 Riazi S. Mode of action and safety of lactosporin, a novel antimicrobial protein produced by *Bacillus coagulans* ATCC 7050 [Text] / S. Riazi, S. E. Dover, M. L. Chikindas. // *J Appl Microbiol.*- 2012.-Vol. 113, N 3.- P.714-722.
- 33 Riazi S. Characterization of lactosporin, a novel antimicrobial protein produced by *Bacillus coagulans* ATCC 7050. [Text] / Riazi S., R. E. Wirawan, V. Badmaev, et al. // *J Appl Microbiol.*- 2009.-Vol. 106, N 4.- P.1370-1377.
- 34 Czaczyk K. Antifungal activity of *Bacillus coagulans* against *Fusarium* sp. [Text] / K. Czaczyk, K. Trojanowska, A. Mueller. // *Acta Microbiol Pol.*- 2002.-Vol. 51, N 3 - P.275-283.
- 35 Lin S.Y. Effects of supplement with different level of *Bacillus coagulans* as probiotics on growth performance and intestinal microflora populations of broiler chickens [Text] / S.Y. Lin, A.T.Y. Hung, J.J. Lu // *Journal of Animal and Veterinary Advances.*- 2011.-Vol. 10, N 1.- P.111-114
- 36 Nyangale E.P. *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086 Modulates *Faecalibacterium prausnitzii* in Older Men and Women [Text] / E.P. Nyangale, S. Farmer, H.A. Cash et al. // *J Nutr.*- 2015. -Vol.-145, N 7.-P.1446-1452.
- 37 Drago L. Should *Lactobacillus sporogenes* and *Bacillus coagulans* have a future? [Text] / L. Drago, E. De Vecchi. // *J Chemother.*- 2009.-Vol. 21, N 4 - P. 371-377.
- 38 Babar V. Immunomodulatory activity of *Lactobacillus sporogenes* [Text] / V. Babar, R. Thomas, M. Bhaskar // *International Journal of Therapeutic Applications.*- 2012. -Vol.3.- P.32–38.
- 39 Ostad S.N. Live and heat-inactivated lactobacilli from feces inhibit *Salmonella typhi* and *Escherichia coli* adherence to Caco-2 cells [Text] / S.N. Ostad, A.A. Salarian, M.H. Ghahramani, et al. // *Folia Microbiol (Praha).*- 2009.- Vol.54.- P.157-160.
- 40 Jensen G.S. Gandeden BC30 cell wall and metabolites: anti-inflammatory and immune modulating effects in vitro [Text] / G.S. Jensen, K.F. Benson, S.G. Carter, J.R. Endres // *BMC Immunol.*- 2010.- Vol.11, N. 15., P.1-14.
- 41 Mandel D.R. *Bacillus coagulans*: a viable adjunct therapy for relieving symptoms of rheumatoid arthritis according to a randomized, controlled trial BMC [Text] / D.R. Mandel, K. Eichas, J. Holmes // *Complementary and Alternative Medicine.*- 2010.-Vol.10.-P.1-12.
- 42 Fitzpatrick L.R. Probiotics for the treatment of *Clostridium difficile* associated disease [Text] / L.R. Fitzpatrick // *World J Gastrointest Pathophysiol.*-2013. -Vol.4, N 3.- P.47-52.
- 43 Surawicz C.M. The search for a better treatment for recurrent *Clostridium difficile* disease: use of high-dose vancomycin combined with *Saccharomyces boulardii* [Text] / C.M. Surawicz, L.V. McFarland, R.N. Greenberg, et al. // *Clin Infect Dis.*- 2000.-Vol.31.-P.1012–1017.

- 44 Fitzpatrick L.R. *Bacillus Coagulans* GBI-30 (BC30) improves indices of *Clostridium difficile*-Induced colitis in mice [Text] / L.R. Fitzpatrick, J.S. Small, W.H. Greene, et al. // Gut Pathogens.-2011.-Vol.3.-P.16-19.
- 45 Flahaut S. Comparison of bile salts and sodium doceyl sulfate stress responses in *Enterococcus faecalis* [Text] / S. Flahaut, J. Frere, P. Boutibonnes, Y. Auffray // Appl Environ Microbiol.-1996.-Vol. 62.-P.2416–2420.
- 46 Fitzpatrick L.R. *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086 limits the recurrence of *Clostridium difficile*-Induced colitis following vancomycin withdrawal in mice/ L.R. Fitzpatrick, J.S. Small, W.H. Greene, et al. // Gut Pathog.-2012.-Vol. 4,N 1.- P.13-16.
- 47 Massot J. Bacterio-pharmacological activity of *Saccharomyces boulardii* in clindamycin-induced colitis in the hamster [Text] / J. Massot, O. Sanchez, R. Couchy, J. Astoin, A.L. Parodi // Arzneimittelforschung.-1984.-Vol.34.-P.794–797
- 48 Toothaker R.D. Prevention of clindamycin-induced mortality in hamsters by *Saccharomyces boulardii* [Text] / R.D. Toothaker, G.W. Elmer // Antimicrob Agents Chemother.- 1984.-Vol. 26.-P.552–556.
- 49 Corthier G. Prevention of *Clostridium difficile* induced mortality in gnotobiotic mice by *Saccharomyces boulardii* [Text] / G. Corthier, F. Dubos, R. Ducluzeau // Can J Microbiol.- 1986. -Vol.32.-P.894–896.
- 50 Martins F.S. Screening of yeasts as probiotic based on capacities to colonize the gastrointestinal tract and to protect against enteropathogen challenge in mice [Text] / F.S. Martins, R.M. Nardi, R.M. Arantes et al. // J Gen Appl Microbiol.- 2005. -Vol.51.- P.83–92.
- 51 Naaber P. Bacterial translocation, intestinal microflora and morphological changes of intestinal mucosa in experimental models of *Clostridium difficile* infection [Text] / P. Naaber, R.H. Mikelsaar, S. Salminen, M. Mikelsaar // J Med Microbiol.-1998 -Vol.47.- P.591–598.
- 52 Kaur S. Effect of *Lactobacillus acidophilus* & amp; epidermal growth factor on experimentally induced *Clostridium difficile* infection [Text] / Kaur S., C. Vaishnavi, K.K. Prasad, et al. // Indian J Med Res.- 2011 -Vol.133.- P.434–441.
- 53 Pillai A. Probiotics for treatment of *Clostridium difficile*-associated colitis in adults [Text] /A. Pillai, R. Nelson // Cochrane Database Syst Rev.- 2008.- Vol.23:CD004611.
- 54 Baron M. Apatented strain of *Bacillus coagulans* increased immune response to viral challenge / M. Baron // Postgrad Med.-2009. -Vol.121.- P.114-118.
- 55 Kimmel M. A controlled clinical trial to evaluate the effect of Ganeden BC30 on immunological markers [Text]/ M. Kimmel, D. Keller, S. Farmer, D. E. Warrino // Methods and Findings in Experimental Clinical Pharmacology.-2010. -Vol.32.- P.129-132.
- 56 Lactospore. Режим доступа: <http://www.lactospore.com/about/background-info/>
- 57 Kodali V.P. Antioxidant and free radical scavenging activities of an exopolysaccharide from a probiotic bacterium/ V.P. Kodali, R. Sen // Biotechnol J.- 2008.-Vol.3.- P. 245-251.
- 58 Solanki H.K. Evaluation of anti-inflammatory activity of probiotic on carrageenan-induced paw edema in Wistar rats [Text]/ H.K. Solanki // Int J Biol Macromol.- 2015 -Vol.72.- P.1277-1282.
- 59 Kumar O.R.M. Feeding of *L. sporogenes* to rabbits/ O.R.M. Kumar, K.J. Christopher // Ind. Vet. J.- 1989. - Vol.66.- P.896-898.
- 60 Mohan J.C. Short term hypolipidemic effects of oral *Lactobacillus sporogenes* therapy in patients with primary dyslipidemias [Text] / J.C. Mohan, R. Arora, M. Khalilullah // Indian Heart Journal.- 1990. -Vol.42.- P.361-364.
- 61 Kashyap D. R. Enhanced production of pectinase by *Bacillus sp.* DT7 using solid state fermentation [Text] / D. R.Kashyap, S. K. Soni,R. Tewari // Bioresour Technol.-2003.-Vol. 88,N. 3.- P.251-254.
- 62 Campbell L. L. Folic acid requirement of *Bacillus coagulans*[Text] / L. L.Campbell,E. E. Sniff. // J Bacteriol.- 1959.-Vol. 78.- P.267-271.
- 63 Marshall R. Growth of *Bacillus coagulans* in chemically defined media [Text] / R.Marshall,R. J. Beers. // J Bacteriol.- 1967.-Vol. 94,N.3.-P. 517-521.
- 64 Stover P.I. Physiology of folate and vitamin B12 in health and disease / P.I. Stover // Nutr Bcv.-2004. -Vol. 626(Pt 2).- P.53-55.
- 65 Troen A.M. Un metabolized folic acid in plasma is associated with reduced natural killer cell cytotoxicity among postmenopausal women [Text] / A.M. Troen, B. Mitchell, B. Sorensen, et al. // J. Nutr.-2006.-Vol. 1361.- P.189-94.
- 66 Yamaguchi T. Control of immune responses by antigen-specific regulatory T cells expressing the folate receptor/T. Yamaguchi, K.Hirota, K. Nagahama, et al.// Immunity.-2007. -Vol. 271.- P.145-159.
- 67 Kunisawa E.A pivotal role of vitamin B9 in the maintenance of regulatory T cells in vitro and in vivo [Electronic source] / E.Kunisawa, E. Hashimoto, I.Ishikawa, H.Kiyono // PLoS ONE.- 2012.- Vol.72:e32094. doi:10.1371/journal.pone.0032094
- 68 Kinoshita M.Dietary folic acid promotes survival of Foxp3T regulatory T cells in the colon [Text] / M.Kinoshita, H.Kayama, T. Kusu et al. // Immunol.-2012. -Vol.1896.-P.2869-2878.
- 69 Le Bourhis L.Mucosal-associated invariant T cells: unconventional development and function [Text]/L.Le Bourhis, L. Guerri, M.Dusseaux, et al. // Trends Immunol.- 2011.-Vol.325.-P.212-218.
- 70 Kjer-Nielsen L. MRI presents microbial vitamin B metabolites to MAIT cells [Electronic source]/L. Kjer-Nielsen, O.Patel, A.I. Corbett, et al. // Nature.-2012.-Vol. 4917426.-P. 717-723. doi:10.1038/nature11605
- 71 La Rosa M. Prevention of antibiotic-associated diarrhoea with *Lactobacillus sporogenes* and fructooligosaccharides in children. A multicenter double-blind vs. placebo study [Text] / M. La Rosa, G. Bottaro, N. Gulino et al.// Minerva Pediatrica.-2003.-Vol.55.- P.447-452.

- 72 Majeed M. *Bacillus coagulans* – probiotic of choice [Text] / M. Majeed, R. Kamarei // Prebiotics/Probiotics.- 2012.- P.19-21.
- 73 Abstracts of papers on the clinical study of Sporlac, compiled by the Sankyo Co., Ltd. Japan
- 74 Chandra R. K. Effect of Lactobacillus on the incidence and severity of acute rotavirus diarrhoea in infants. A prospective placebo-controlled double-blind study [Text] / R.K. Chandra // Nutritional Research.-2002.- Vol.22, N 1.- P.65-69.
- 75 Dutta P. Randomised controlled clinical trial of Lactobacillus sporogenes (*Bacillus coagulans*), used as probiotic in clinical practice, on acute watery diarrhoea in children [Text] / P. Dutta, U. Mitra, S. Dutta, et al. // Tropical Medicine and International Health.- 2011.- Vol.16, N 5.- P.555-561.
- 76 Sari F.N. Oral probiotics: Lactobacillus sporogenes for prevention of necrotizing enterocolitis in very low-birth weight infants: a randomized, controlled trial [Text] / F.N. Sari, E.A. Dizdar, S. Oguz, et al. // European Journal of Clinical Nutrition. – 2011. – T. 65. – №. 4. – C.434-439.
- 77 Cui Y.L. Efficacy of *Bacillus coagulans* tablets in the treatment of acute and chronic diarrhea [Text] / Y.L. Cui, F.C. Wan, D.L. Tang, S.H. Wu // Int J Immunotherapy.- 2004.- Vol.20, N 1.- P.17-22.
- 78 Hun L. *Bacillus coagulans* significantly improved abdominal pain and bloating in patients with IBS [Text] / L. Hun // Postgrad Med.-2009.- Vol.121.- P. 119-24
- 79 Dolin B.J. Effects of a proprietary *Bacillus coagulans* preparation on symptoms of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome/ B. J. Dolin // Methods Find Exp Clin Pharmacol.- 2009.- Vol.31, N 10.-P.655-659
- 80 Rogha M. The efficacy of a symbiotic containing *Bacillus Coagulans* in treatment of irritable bowel syndrome: a randomized placebo-controlled trial [Text] / M. Rogha, M. Z. Esfahani, A. H. Zargarzadeh // Gastroenterology and hepatology from bed to bench.- 2014.-Vol.7, N3- P.-156-163.
- 81 Keller D. *Bacillus coagulans* as a probiotic [Text] / D. Keller, S. Farmer, A. McCartney, G. Gibson // Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods.- 2010.- Vol.7, N 7.- P.103–109.
- 82 Mohan J.C. Preliminary observations on effect of Lactobacillus sporogenes on serum lipid levels in hypercholesterolemic patients [Text] / J.C. Mohan, R. Arora, M. Khalilullah // Indian Journal of Medical Research.- 1990.-Vol.92.- P.431-432
- 83 Agosta C., Atlante M., Benvenuti C. Randomized controlled study on clinical efficacy of isoflavones plus Lactobacillus sporogenes, associated or not with a natural anxiolytic agent in menopause/ C. Agosta, M. Atlante, C. Benvenuti // Minerva Ginecol.- 2011.- Vol.63, N 1.- P.11-17
- 84 Benvenuti C., Setnikar I. Effect of Lactobacillus sporogenes on oral isoflavones bioavailability: single dose pharmacokinetic study in menopausal women [Text] / C. Benvenuti, I. Setnikar // Arzneimittel-forschung.-2011.- Vol.61, N 11.- P.605-609
- 85 Palacios S. Women's perception of the efficacy of a soy extract with probiotic: the M3 study [Text] / S.Palacios, I. A. Rojo, M. J. Cancelo, et al. // Gynecol Endocrinol.- 2008.-Vol. 24, N4.- P.-178-183
- 86 Voichishina L.G. The use of sporulating bacteria in treating patients with dysbacteriosis [Text] / L.G. Voichishina, V.A. Chaplinskii, V.A.V'iunitskaia // Vrach Delo- 1991.- Vol.12.- P. 73-75.
- 87 Mathur S.N. Sporlac therapy in treatment of aphthous stomatitis [Text] / S.N. Mathur // Uttar Pradesh State Dent J.- 1970.-Vol. 11.- P. 7-12.
- 88 Sharma J.K. Clinical trial of Sporlac in the treatment of recurrent aphthous ulceration [Text] / J.K. Sharma, K.K. Kapoor, R.D. Mukhija // Uttar Pradesh State Dent J.- 1980.-Vol.11.- P.7-12.
- 89 Jindal G. A comparative evaluation of probiotics on salivary mutans streptococci counts in Indian children [Text] / G. Jindal, R.K. Pandey, J. Agarwal, M. Singh // Eur Arch Paediatr Dent.- 2011.-Vol. 12.- P.211-215.
- 90 Shirodkar N.V. Multi-centre clinical assessment of Myconip vaginal tablets in non-specific vaginitis [Text] / N.V. Shirodkar, P.C. Sankholkar, S. Ghosh, S.M. Nulkar // Indian Pract.- 1980.-Vol.33.- P.207-210.
- 91 Sanders M.E. Sporeformers as Human Probiotics: *Bacillus*, *Sporolactobacillus*, and *Brevibacillus* [Text] / M.E. Sanders, L. Morelli, T.A. Tompkins // Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.- 2003.- Vol.2, N.3.- P.101
- 92 Mandel D.R., Eichas K., Holmes J. *Bacillus coagulans*: a viable adjunct therapy for relieving symptoms of rheumatoid arthritis according to a randomized, controlled trial [Text] / D.R. Mandel, K. Eichas, J. Holmes // BMC Complement Altern Aferf.-2010.-Vol.10.- P. 1.
- 93 Endres, J. R. Safety assessment of a proprietary preparation of a novel probiotic, *Bacillus coagulans*, as a food ingredient [Text] / J. R. Endres, A. Clewell, K. A. Jade, et al. // Food Chemistry and Toxicology.-2009. - Vol. 47, N 6.-P.1231- 1238.
- 94 Abhari Kh. The effects of probiotic, prebiotic and synbiotic diets containing *Bacillus coagulans* and inulin on rat intestinal microbiota [Text] / Abhari Kh., Shekarforoush S.S., Sajedianfard J., Hosseinzadeh S., Nazifi S. // IJVR. – 2015. – 16, N3. – P. 267-273.
- 95 Gu Sh.B. Potential probiotic attributes of a new strain of *Bacillus coagulans* CGMCC 9951 isolated from healthy piglet feces [Text] / Sh.B.Gu, L.N.Zhao, Y.Wu, et al. // World J. Microbiol. Biotechnol. – 2015. – 31, N6. – P.851-863.
- 96 Ratna Sudha M. Clinical Study of *Bacillus coagulans* Unique IS-2 (ATCC PTA-11748) in the Treatment of Patients with Bacterial Vaginosis [Text] / M.Ratna Sudha, K.A.Yelikar, S. Deshpande // Indian J Microbiol. – 2012. – 52, N3. – P.396-399.
- 97 Dutta Ph. Randomised controlled clinical trial of *Lactobacillus sporogenes* (*Bacillus coagulans*), used as probiotic in clinical practice, on acute watery diarrhoea in children [Text] / Dutta Ph., Mitra U., Dutta Sh., et al. // Trop. Med. Int. Health. – 2011. – 16, N5. – P.555-561.

- 
- 98 Cano Roca C.L. Characterization of Commercial Probiotics: Antibiotic Resistance, Acid and Bile Resistance, and Prebiotic Utilization [Text] / C.L. Cano Roca // Dissertations & Theses in Food Science and Technology. – 2014. – 46 p.
- 99 Spinosa M.R. The trouble in tracing opportunistic pathogens: cholangitis due to *Bacillus* in a French hospital caused by a strain related to an Italian probiotic? [Text] / M.R. Spinosa, F. Wallet, R.J. Courcol, M.R. Oggioni // Microbial Ecology in Health and Disease. – 2000. – Vol. 12. – P.99-101.
- 100 De Clerck E. Genotypic diversity among *Bacillus licheniformis* strains from various sources [Text] / E. De Clerck, P. De Vos // FEMS Microbiol Lett. – 2004. – Vol. 231. – P.91-98.
- 101 Attachment I final risk assessment of *Bacillus licheniformis* // Режим доступа:  
<http://www.epa.gov/sites/production/files/2015-09/documents/fra005.pdf>. - 1997.
- 102 Glushanova N.A. Biological properties of lactobacilles [Text] / N.A. Glushanova // Bull. sib med – 2003. – N4. – P.50-58.