

КОРРЕКЦИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ДИСБИОЗА ПРЕПАРАТАМИ ПРОБИОТИКОВ, ИММОБИЛИЗОВАННЫХ НА ЭНТЕРОСОРБЕНТАХ, ПОСЛЕ ИХ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО ХРАНЕНИЯ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (г. Харьков)

Представленное исследование является фрагментом научно-исследовательской работы ИПК и К НАН Украины 2.2.6.54 «Исследование механизмов криоповреждений и криозащиты иммобилизованных клеток с целью повышения их сохранности при криоконсервировании и лиофилизации», номер гос. регистрации 0110U000404.

Вступление. Микробиоценоз желудочно-кишечного тракта человека является сложным симбиозом нескольких сотен видов бактерий, играющим важную роль в процессах пищеварения и обмена веществ, а также в иммунных реакциях организма. В частности, микрофлора различных отделов кишечника выполняет следующие основные функции:

- участие в процессе пищеварения (ферментативное расщепление углеводов, белков, жиров, повышение всасывания питательных веществ, формирование каловых масс и др.);
- синтез витаминов и ферментов;
- участие в реакциях иммунной системы (колониционная резистентность, активация иммунной системы, формирование иммунной толерантности к пищевым и микробным антигенам), выполнение роли иммунного барьера;
- регуляция моторики желудочно-кишечного тракта;
- детоксикация [3].

Под влиянием различных эндогенных и экзогенных факторов [6] у человека может развиваться дисбиоз кишечника – клинко-лабораторный синдром, связанный с изменением качественного и/или количественного состава нормальной микрофлоры определенного биотопа, транслокацией различных ее представителей в несвойственные ей биотопы, метаболическими и иммунными нарушениями, сопровождающимися у части пациентов клиническими симптомами [11]. В зарубежной литературе применяется термин «Bacterial overgrowth syndrome» [19]. В комплексной терапии дисбиоза используют препараты пробиотиков и энтеросорбенты [10, 13, 21]. Пробиотические препараты используются также в ветеринарии и животноводстве [16]. Пробиотические препараты разделяют на 3 группы: про-, пре- и синбиотики [20]. В настоящее время условно выделяют 4 поколения пробиотиков – I поколение – монокомпонентные препараты, II поколение – самоэлиминирующиеся антагонисты, III поколение – поликомпонентные препараты и синбиотики, IV

поколение – иммобилизованные на сорбентах или в гелях пробиотики [18].

В настоящее время большое внимание уделяют разработке пробиотических препаратов IV поколения – иммобилизованных пробиотиков. Появились первые коммерческие медицинские и ветеринарные препараты бактерий, иммобилизованных на сорбентах – углях, цеолитах, кремнеземах [7, 14, 15, 17]. Для хранения существующих препаратов используют, преимущественно, лиофилизацию. В микробиологической практике для долгосрочного хранения микроорганизмов используют также низкие температуры. Интегральным показателем терапевтического действия пробиотических препаратов является восстановление пристеночной микрофлоры и функций желудочно-кишечного тракта. Терапевтическое действие пробиотиков, иммобилизованных на сорбентах, после низкотемпературного хранения не изучали.

На основании сказанного выше **целью исследования** явилось изучение терапевтического действия препаратов иммобилизованных на энтеросорбентах пробиотиков на лабораторных животных с экспериментальным дисбиозом.

Объект и методы исследований. Объектами исследования являлись дрожжи *Saccharomyces boulardii*, выделенные из коммерческого препарата «Энтерол»® (Bioscodex, France), промышленные штаммы пробиотиков *Lactobacillus bulgaricus* 1Z03501 и *Bifidobacterium bifidum* ЛВА-3 (Российская коллекция промышленных микроорганизмов, ГНИИ «Генетика»). Микробные клетки иммобилизовали на энтеросорбентах «СУМС-1» и «Сорбекс» в соответствии с описанием, данным в [2].

Свободные и иммобилизованные микроорганизмы-пробиотики суспендировали в 5% растворе сахарозы и в физиологическом растворе. Часть образцов замораживали со скоростью 1 град/мин до -40° и погружали в жидкий азот. Вторую часть образцов помещали в низкотемпературную камеру («Jouan» Vx 380, France) с температурой на полках -80°. Образцы хранили в течение 1 года при температуре -80±4° и -196°. Статистический анализ проводили с использованием пакета статистических программ SPSS версии 15. 0. Порог статистической погрешности был установлен на уровне 5%. Для сравнения данных использовали t-тест (Стьюдента).

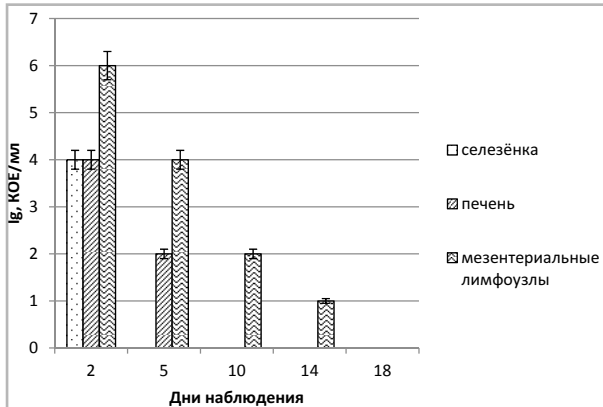


Рис. 1. Микробная обсемененность внутренних органов после иммуносупрессии. Контрольная подгруппа.

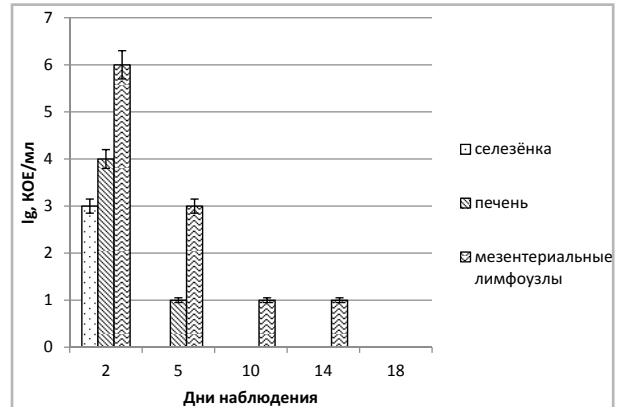


Рис. 2. Микробная обсемененность внутренних органов после иммуносупрессии. Подгруппа 1.

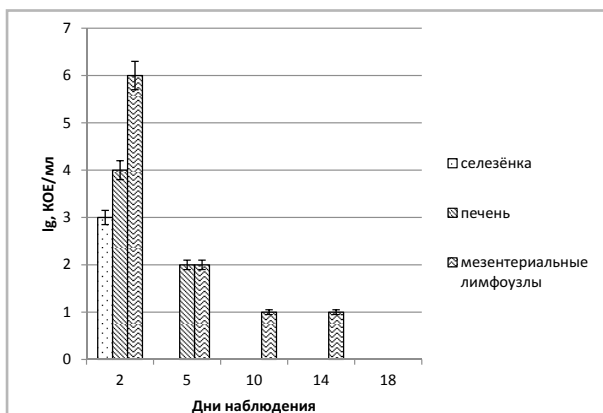


Рис. 3. Микробная обсемененность внутренних органов после иммуносупрессии. Подгруппа 2.

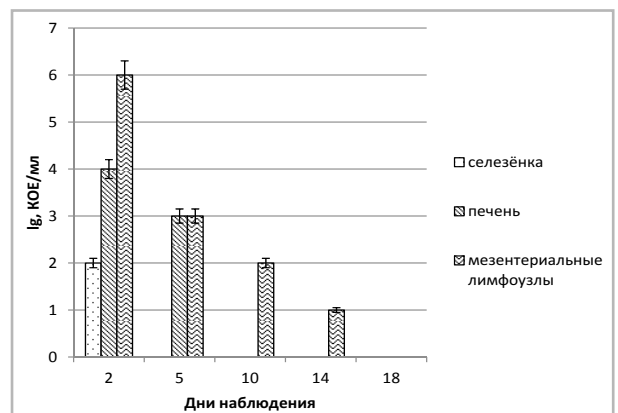


Рис. 4. Микробная обсемененность внутренних органов после иммуносупрессии. Подгруппа 3.

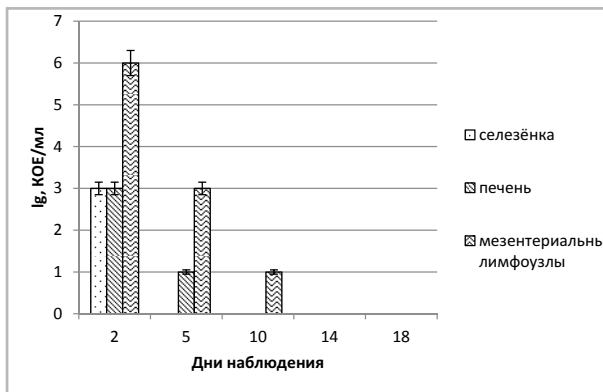


Рис. 5. Микробная обсемененность внутренних органов после иммуносупрессии. Подгруппа 4.

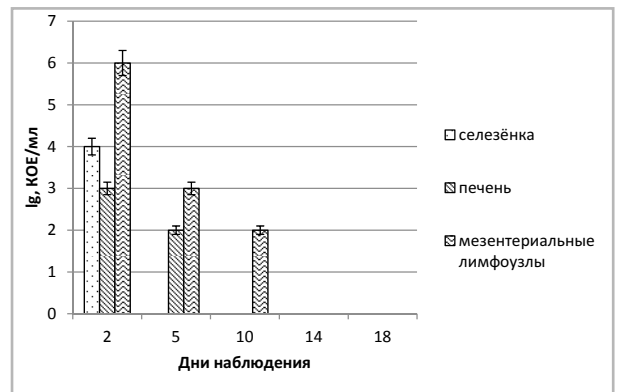


Рис. 6. Микробная обсемененность внутренних органов после иммуносупрессии. Подгруппа 5.

Оценку способности препаратов иммобилизованных пробиотиков к восстановлению микробиоценоза кишечника проводили на двух моделях экспериментального дисбиоза. Дисбиоз, сопровождающийся транслокацией кишечной микрофлоры во внутренние органы, воспроизводили у лабораторных мышей, иммуносупрессированных путем внутримышечного введения 4-5 мг гидрокортизона ацетата с последующим пероральным приемом в течение 3 дней 5 мг ампициллина и 5 мг метронидазола [5, 9]. Вторую модель дисбиоза воспроизводили

на лабораторных крысах пероральным введением в течение 3 дней 15 мг ампициллина и 10 мг метронидазола [4].

Посев образцов муцинового слоя толстого кишечника и тканей внутренних органов, индикацию и идентификацию выделенной микрофлоры проводили по стандартным методам [1, 12, 8].

Все эксперименты на животных проводили согласно «Общим принципам экспериментов на животных», одобренных III Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, Украина, 2007) и

согласованных с положением «Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, которые используются для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, Франция, 1986).

В первой серии экспериментов изучали терапевтическое действие иммобилизованных на энтеросорбентах пробиотиков на иммуносупрессированных мышцах с экспериментальным химиотерапевтическим дисбиозом, сопровождавшимся транслокацией кишечной микрофлоры во внутренние органы (мезентериальные лимфоузлы, селезенку, печень). Среди выделенной из внутренних органов микрофлоры

преобладали бактерии родов *Enterobacter*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Clostridium* и *Escherichia coli*.

Животные были разделены на 3 группы. В первой группе исследовали 18 подгрупп. Контрольную группу составили животные с дисбиозом, которым не вводили пробиотики и энтеросорбенты. В 1-17 подгруппах 1-ой группы животным вводили следующие препараты: 1) нативные свободные клетки *S. boulardii*; 2) свободные клетки *S. boulardii* после хранения при -196° ; 3) свободные клетки *S. boulardii* после хранения при -80° ; 4) смесь свободных нативных клеток *S. boulardii* и сорбента «СУМС-1»;

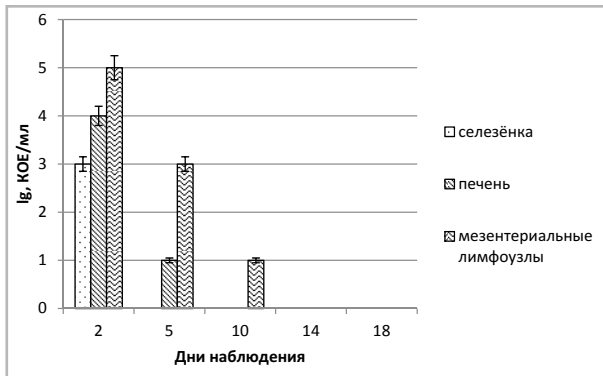


Рис. 7. Микробная обсемененность внутренних органов после иммуносупрессии. Подгруппа 6.

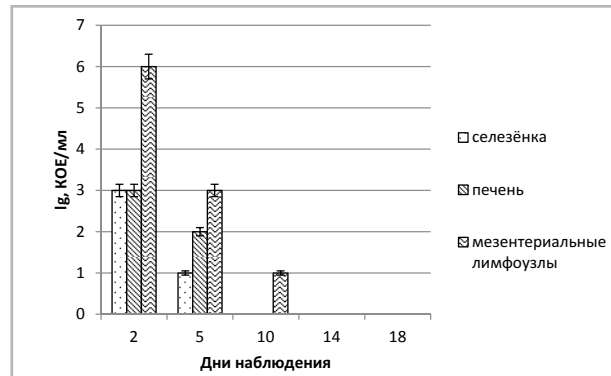


Рис. 8. Микробная обсемененность внутренних органов после иммуносупрессии. Подгруппа 7.

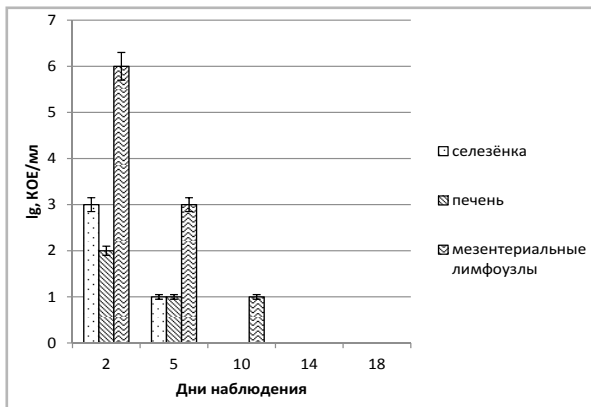


Рис. 9. Микробная обсемененность внутренних органов после иммуносупрессии. Подгруппа 8.

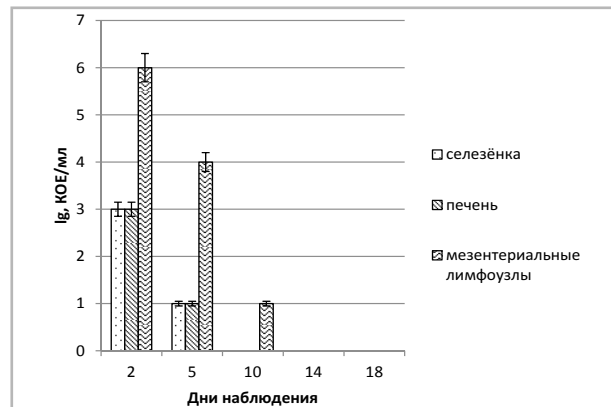


Рис. 10. Микробная обсемененность внутренних органов после иммуносупрессии. Подгруппа 9.

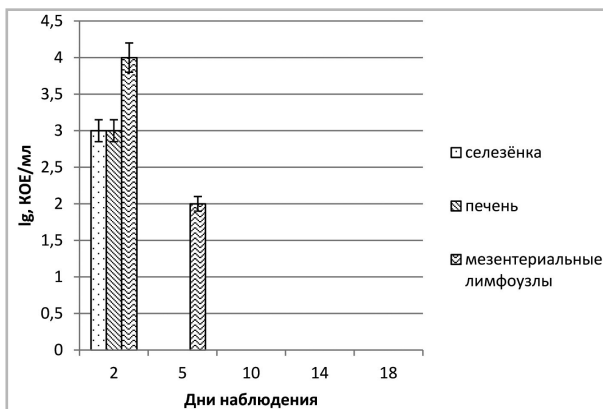


Рис. 11. Микробная обсемененность внутренних органов после иммуносупрессии. Подгруппа 10.

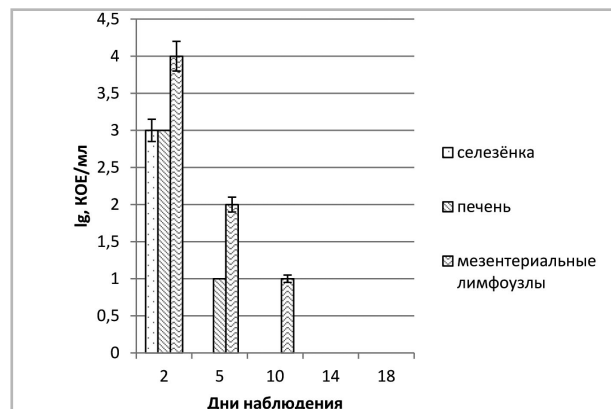


Рис. 12. Микробная обсемененность внутренних органов после иммуносупрессии. Подгруппа 11.

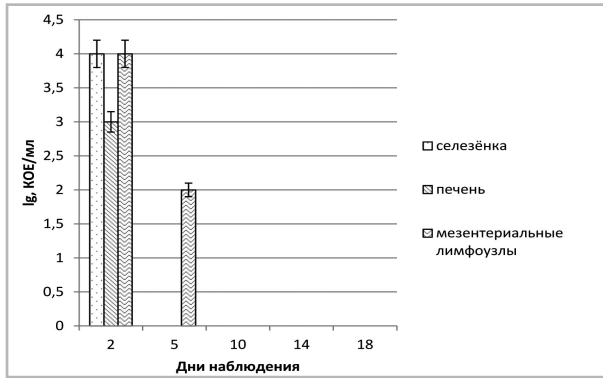


Рис. 13. Микробная обсемененность внутренних органов после иммуносупрессии. Подгруппа 12.

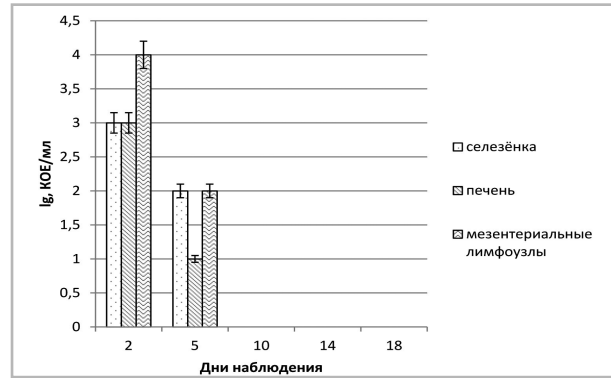


Рис. 14. Микробная обсемененность внутренних органов после иммуносупрессии. Подгруппа 13.

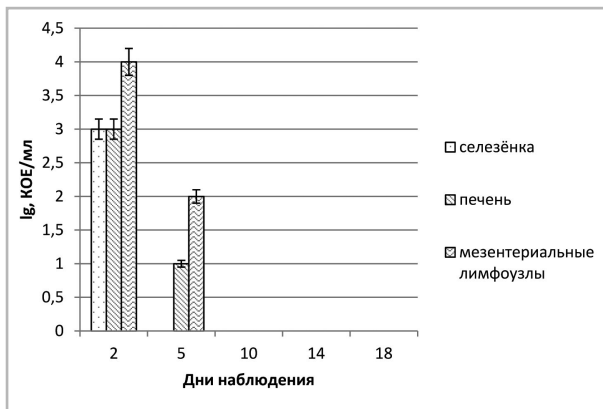


Рис. 15. Микробная обсемененность внутренних органов после иммуносупрессии. Подгруппа 14.

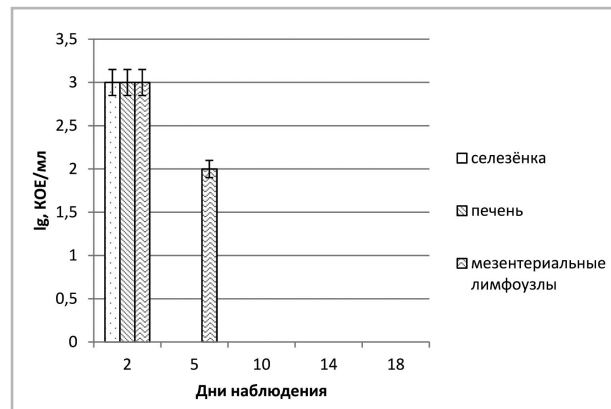


Рис. 16. Микробная обсемененность внутренних органов после иммуносупрессии. Подгруппа 15.

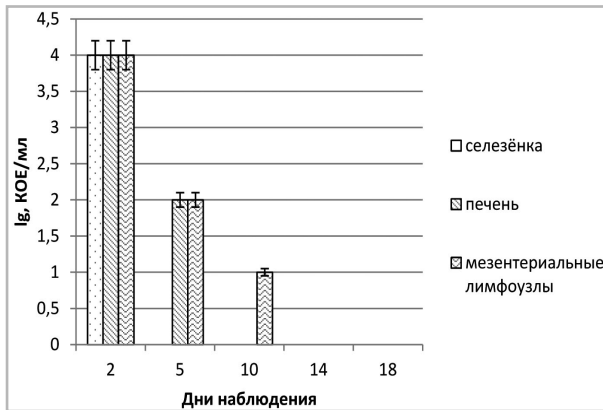


Рис. 17. Микробная обсемененность внутренних органов после иммуносупрессии. Подгруппа 16.

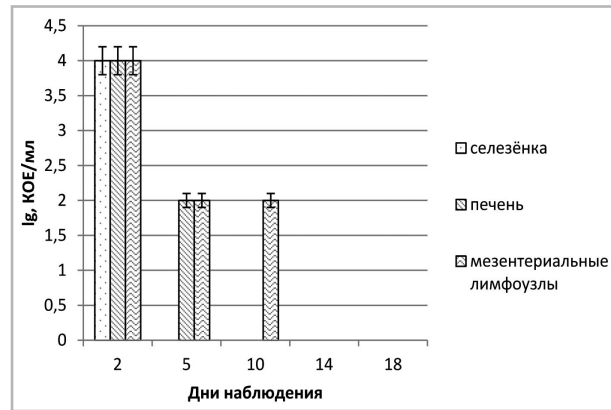


Рис. 18. Микробная обсемененность внутренних органов после иммуносупрессии. Подгруппа 17.

5) смесь свободных клеток *S. boulardii*, хранившихся при -196° и сорбента «Сорбекс»; 6) смесь свободных клеток *S. boulardii*, хранившихся при -80° и сорбента «СУМС-1»; 7) смесь свободных нативных клеток *S. boulardii* и сорбента «Сорбекс»; 8) смесь свободных клеток *S. boulardii*, хранившихся при -196° и сорбента «Сорбекс»; 9) смесь свободных клеток *S. boulardii*, хранившихся при -80° , и сорбента «Сорбекс»; 10) нативные комплексы клеток *S. boulardii*, иммобилизованных на сорбенте «СУМС-1»; 11) комплексы иммобилизованных на

сорбенте «СУМС-1» клеток *S. boulardii*, хранившихся при -196° ; 12) комплексы иммобилизованных на сорбенте «СУМС-1» клеток *S. boulardii*, хранившихся при -80° ; 13) нативные комплексы клеток *S. boulardii*, иммобилизованных на сорбенте «Сорбекс»; 14) комплексы иммобилизованных на сорбенте «Сорбекс» клеток *S. boulardii*, хранившихся при -196° ; 15) комплексы иммобилизованных на сорбенте «Сорбекс» клеток *S. boulardii*, хранившихся при -80° ; 16) энтеросорбент «СУМС-1»; 17) энтеросорбент «Сорбекс».

Доза сорбентов, вводимая одному животному, составляла 10 мг, доза комплексов иммунобиологизованных на сорбентах клеток $5 \cdot 10^7$ КОЕ.

Во 2-ой группе 2 – 16-ой подгруппам животных вводили аналогичные комбинации *B. bifidum*, в 3-й группе – аналогичные комбинации *L. bulgaricus*.

Результаты исследований и их обсуждение.

Было установлено, что у иммуносупрессированных мышей с дисбиозом транслокация бактерий из кишечника во внутренние органы происходила через 1-2 суток после иммуносупрессии. В контрольной подгруппе летальность животных составляла 30%. Животные погибали на 3-5 сутки. Транслоцировавшуюся микрофлору выделяли из селезенки в течение 2 суток, из печени – 5 суток, а из мезентериальных лимфоузлов – до 14 суток. К 18-тым суткам микрофлора в мезентериальных лимфоузлах отсутствовала. Концентрация микроорганизмов на 1 г ткани в этой подгруппе была наиболее высокой (рис. 1). Во всех остальных подгруппах животных летальность отсутствовала. В подгруппах 1, 2, 3, элиминация кишечной микрофлоры из внутренних органов происходила, соответственно, через 2, 5, 14 суток (рис. 2-4). В подгруппах 16 и 17 элиминация микрофлоры из внутренних органов происходила в те же сроки, что и в предыдущих подгруппах (рис. 17, 18). В подгруппах 4 – 9 элиминация микрофлоры из селезенки происходила через 2 суток, печени – 5 суток, из мезентериальных лимфоузлов – через 10. Микробная обсемененность в конечные сроки выделения во всех перечисленных подгруппах была ниже, чем в контрольной (рис. 5-10). В подгруппах 10-15 элиминация микрофлоры из селезенки и печени происходила через 2 суток, из мезентериальных лимфоузлов – через 5 суток, а микробная обсемененность тканей лимфоузлов была наиболее низкой (рис. 11-16). Достоверные различия между показателями динамики и интенсивности элиминации после приема нативных препаратов и препаратов, хранившихся при низких температурах, отсутствовали.

Восстановление пристеночной кишечной микрофлоры у иммуносупрессированных животных было наиболее полным и быстрым в подгруппах 11-16 (рис. 19). Пробиотик *S. boulardii* в этих группах выделяли в течение 10 – 14 дней после окончания приема препарата. На втором месте по срокам и полноте восстановления кишечной микрофлоры были животные, получавшие смесь пробиотиков и энтеросорбентов. В подгруппах животных, которые получали только пробиотики или только энтеросорбенты, кишечная микрофлора восстанавливалась достоверно позже. Пробиотик *S. boulardii* выделяли в подгруппах 2-10 в течение 2-5 суток. Достоверные различия между показателями восстановления микрофлоры кишечника после приема нативных и криоконсервированных препаратов отсутствовали.

Аналогичные результаты были получены во 2 и 3 группах животных, которым вводили различные комбинации препаратов *B. bifidum* и *L. bulgaricus* и энтеросорбенты. У всех животных, получавших

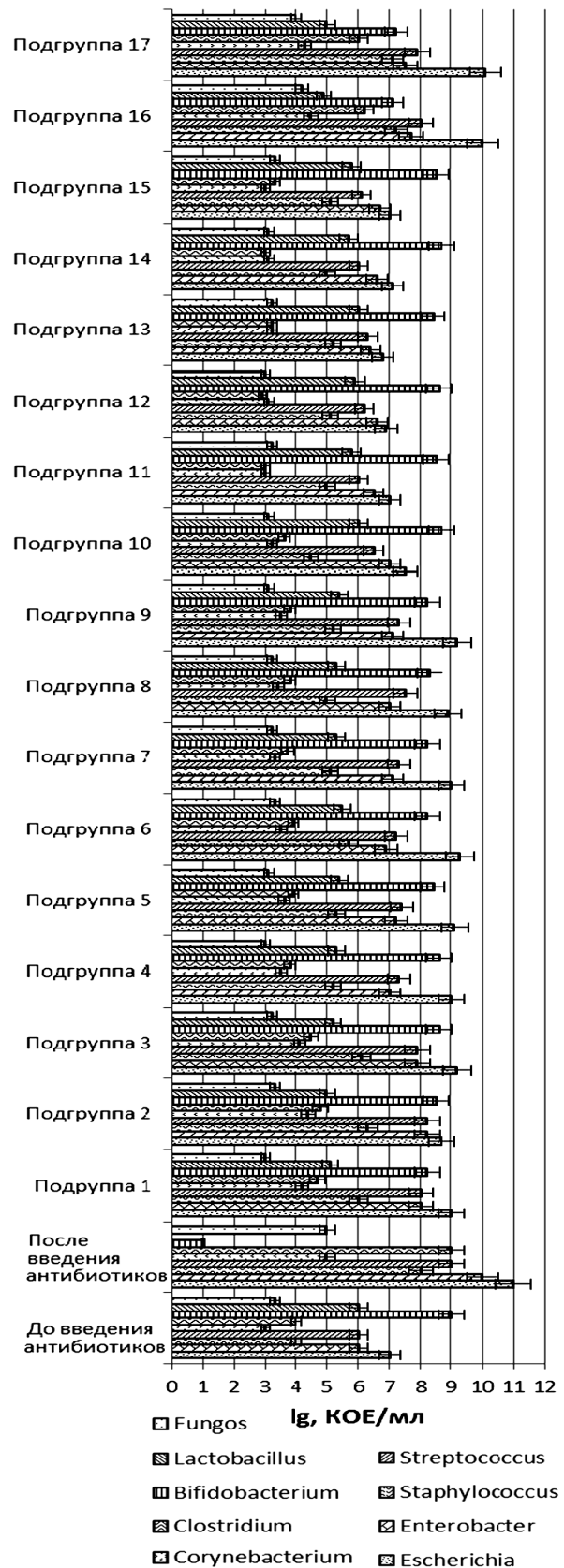


Рис. 19. Восстановление пристеночной кишечной микрофлоры у иммуносупрессированных мышей с химиотерапевтическим дисбиозом.

препараты *B. bifidum* и *L. bulgaricus*, наблюдали колонизацию кишечника этими бактериями, при этом после приема препаратов иммобилизованных бактерий колонизация наступала раньше. Так же, как и в группе 1, элиминацию патогенной микрофлоры из внутренних органов и восстановление кишечной микрофлоры наблюдали в наиболее ранние сроки и в полном объеме после приема препаратов иммобилизованных пробиотиков.

В экспериментах на модели химиотерапевтического дисбиоза, воспроизведенном у беспородных лабораторных крыс, животных, как и в вышеописанной серии экспериментов, разделили на три группы, а каждую группу на 18 аналогичных подгрупп.

Было установлено, что восстановление микрофлоры кишечника животных наиболее быстро и в полном объеме наступало в подгруппах 11-16 каждой группы. Животные этих подгрупп получали терапию нативными и хранившимися при низких температурах препаратами иммобилизованных пробиотиков. Сроки восстановления кишечной микрофлоры у животных остальных подгрупп были аналогичными результатам, полученным в первой серии экспериментов. Достоверные различия в терапевтической эффективности комбинаций препаратов нативной и хранившихся при низких температурах клеток отсутствовали. В связи с ограниченным объемом статьи иллюстративный материал по второй серии экспериментов не приведен.

Полученные результаты показывают, что применение при экспериментальном дисбиозе пробиотиков, иммобилизованных на энтеросорбентах, имеет ряд преимуществ перед монотерапией свободными клетками пробиотиков, энтеросорбентами и их комбинациями. Более высокий терапевтический эффект, наиболее вероятно, обусловлен тем, что комплексы «носитель-микробные клетки» более прочно прикрепляются в муциновом слое. В последующем микробные клетки постепенно десорбируются с носителя и колонизируют кишечник, а в случае с *S. boulardii* – персистируют в нем. Программы, применявшиеся для охлаждения образцов свободных и иммобилизованных микроорганизмов, и процесс хранения при температурах -80° и -196°

обеспечивали сохранность биологических свойств, что способствовало высокому терапевтическому эффекту. Следует отметить, что иммобилизация транзитного пробиотика *S. boulardii* позволила ему более длительно персистировать в кишечнике животных. Это, по-видимому, может разрешить сократить длительность курсов терапии препаратами этого пробиотика в инфекционной патологии и гастроэнтерологии.

Выводы

1. Установлено, что препараты микроорганизмов-пробиотиков, иммобилизованных на энтеросорбентах, оказывают выраженное терапевтическое действие при коррекции экспериментального дисбиоза у лабораторных животных. Динамика восстановления пристеночной микрофлоры кишечника после введения препаратов иммобилизованных пробиотиков более выражена по сравнению с препаратами свободных клеток, энтеросорбентов и их смесей.

2. Хранение при температурах -80° и -196° в течение 1 года (срок наблюдения) не влияет на способность свободных и иммобилизованных пробиотиков к колонизации слизистой кишечника бактериями *B. bifidum* и *L. bulgaricus* или персистенцию в нем *S. boulardii*.

3. Применение нативного и хранившегося при низких температурах иммобилизованного транзитного пробиотика *S. boulardii* пролонгирует его персистенцию в кишечнике животных после терапии дисбиоза.

4. Препараты нативных и хранившихся при низких температурах пробиотиков, иммобилизованных на энтеросорбентах, обеспечивают наиболее быструю элиминацию кишечной микрофлоры, которая транслоцировалась во внутренние органы иммуносупрессированных животных с экспериментальным дисбиозом.

Перспективы дальнейших исследований.

Полученные результаты и дальнейшие исследования в данной области позволят разработать для практического здравоохранения и ветеринарии эффективные препараты синбиотиков нового поколения.

Список литературы

1. Воробьев А. А. Исследование пристеночной микрофлоры кишечника крыс / А. А. Воробьев, Ю. В. Несвижский, Е. А. Богданова [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2005. – № 3. – С. 61-65.
2. Высеканцев И. П. Сравнительное изучение адсорбции стандартных маркеров и пробиотиков *Saccharomyces boulardii* и *Bifidobacterium bifidum* на энтеросорбентах / И. П. Высеканцев, О. М. Бабинцев, В. Ф. Марценюк [и др.] // Вісник проблем біології і медицини. – 2011. – Вип. 1. – С. 58-62.
3. Дисбиоз кишечника. Руководство по диагностике и лечению. – 2-е изд., испр. и доп. / под ред. Е. И. Ткаченко, А. Н. Суворова. – СПб.: Информ Мед, 2009. – 267 с., ил.
4. Ермоленко Е. И. Влияние пробиотических энтерококков на функциональные характеристики кишечника крыс при дисбиозе, индуцированном антибиотиками / Е. И. Ермоленко, В. Н. Донец, Ю. В. Дмитриева [и др.] // Вестник Санкт-Петербургского университета. – Сер. 11. – 2009. – Вып. 1. – С. 157-167.
5. Ермоленко Е. И. Использование индигенных энтерококков при коррекции экспериментального дисбиоза кишечника у крыс / Е. И. Ермоленко, В. И. Донец, В. В. Колоджиева [и др.] // Материалы 13-го Международного Славяно-Балтийского научного форума «Санкт-Петербург – Гастро-2011».
6. Имунная система слизистых, физиологическая микрофлора и пробиотики / Г. Н. Дранник, А. И. Курченко, А. Г. Дранник. – Киев: «Полиграф плюс», 2009. – 143 с.

7. Клименко В. В. Применение пробиотиков в ветеринарии // Биотехнология, экология, медицина: материалы III-IV Международных научных семинаров 2001–2002 гг.; под ред. А. Ф. Труфанова. – М. -Киров: ЭКСПРЕСС, 2002. – С. 32-34.
8. Лясковский Т. М. Оценка пробиотиков, согласно рекомендациям международных организаций (FAO/WHO) / Т. М. Лясковский, В. С. Подгорский // Микробиол. журн. – 2005. – 67, №6. – С. 104-112.
9. Мед. микробиология, вирусология и иммунология / Под ред. А. А. Воробьева. – М.: Медицинское информационное агентство, 2004. – 691 с.
10. Николаев В. Г. Современные энтеросорбенты и механизмы их действия / В. Г. Николаев, С. В. Михайловский, Н. М. Гуркина // Эфферентная терапия. – 2005. – № 4. – С. 3-17.
11. Отраслевой стандарт «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника». ОСТ91500.11.0004-2003, приказ МЗ РФ № 231 от 09.06.2003 г.
12. Приказ Минздрава СССР ОТ 22. 04. 85 N 535 «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинично-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений».
13. Решетников В. И. Оценка адсорбционной способности энтеросорбентов и их лекарственных форм / В. И. Решетников // Химико-фармацевтический журнал. – 2003. – Т. 37, №5. – С. 28-32.
14. РФ, патент 2118535 С1, МПК А61К35/74, С12N11/14. Заявл. 1997.03.20., опубл. 1998.09.10. Бородин Ю. И., Бурмистров В. А., Гуськов А. А., Рачковская Л. Н., Репина В. В., Репин В. Е., Саранина И. В. «Комплексный бактериальный препарат».
15. РФ, патент 2164801 С1, МПК7 А61К35/74, А23С9/12, С12N1/08, заявл. 1999. 06. 12., опубл. 2001.04.10. Молокеев А. В., Никулин Л. Г., Ильина Р. М., Криницкий Э. В., Карих Т. Л., Молокеева Н. В., Байбаков В. И., Андреева М. А., Соболева Н. В. «Препарат – пробиотик в сухой иммобилизованной форме».
16. Ушакова Н. А. Новое поколение пробиотических препаратов кормового назначения / Н. А. Ушакова, Р. В. Некрасов, В. Г. Правдин [и др.] // Fundamental research. – 2012. – №1. – С. 184-192.
17. Ушкалова Е. А. Роль пробиотиков в гастроэнтерологии / Е. А. Ушкалова // Фарматека. – 2007. – № 6. – С. 16-23.
18. Шендеров Б. А. Функциональное питание и его роль в профилактике метаболического синдрома. – М.: Дели принт, 2008. – 320 с.
19. Bures J. Small intestinal bacterial overgrowth syndrome / J. Bures, J. Cyrany, D. Kohoutova [et al.] // World J Gastroenterol. – 2010. – Vol. 16, № 24. – P. 2978-90.
20. Collins M. D. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut / M. D. Collins, G. R. Gibson // Am. J. Clin. Nutr. – 1999. – Vol. 69, №5. – P. 1052-1057.
21. Gionchetti P. Probiotics, Prebiotics, and Antibiotics in Medical Management of Inflammatory Bowel Disease / P. Gionchetti, F. Rizzello // Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. – 2012. – Part 4. – P. 517-534.

УДК 615.832.9:579.61

КОРРЕКЦИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ДИСБИОЗА ПРЕПАРАТАМИ ПРОБИОТИКОВ, ИММОБИЛИЗОВАННЫХ НА ЭНТЕРОСОРБЕНТАХ, ПОСЛЕ ИХ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО ХРАНЕНИЯ

Бабинец О. М.

Резюме. Экспериментально показано, что препараты микроорганизмов-пробиотиков, иммобилизованных на энтеросорбентах, оказывают выраженное терапевтическое действие при коррекции экспериментального дисбиоза у лабораторных животных. Хранение этих препаратов при -80° и -196° не влияет на их эффективность.

Ключевые слова: пробиотики, иммобилизация, низкотемпературное хранение, дисбиоз.

УДК 615.832.9:579.61

КОРЕКЦІЯ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ДИСБІОЗУ ПРЕПАРАТАМИ ПРОБІОТИКІВ, ІММОБІЛІЗОВАНИХ НА ЕНТЕРОСОРБЕНТАХ, ПІСЛЯ ЇХ НИЗЬКОТЕМПЕРАТУРНОГО ЗБЕРІГАННЯ

Бабінець О. М.

Резюме. Експериментально показано, що препарати мікроорганізмів-пробіотиків, іммобілізованих на ентеросорбентах, чинять виражену терапевтичну дію при корекції експериментального дисбіозу у лабораторних тварин. Зберігання цих препаратів при -80° і -196° не впливає на їх ефективність.

Ключові слова: пробіотики, іммобілізація, низькотемпературне зберігання, дисбіоз.

UDC 615.832.9:579.61

Correction of Dysbiosis by Preparations of Probiotics Immobilized on Enterosorbents after their Low-Temperature Storage

Babinets O. M.

Summary. Experimentally shown that probiotic preparations of microorganisms immobilized on enterosorbent have a pronounced therapeutic effect of the correction of dysbiosis of experimental laboratory animals. Storage of these drugs at -80° and -196° does not affect their efficiency.

Key words: probiotics, immobilization, low-temperature storage, dysbiosis.

Стаття надійшла 11.09.2012 р.

Рецензент – проф. Бобирьов В. М.