

ТРАНСПЛАНТАЦИЯ КИШЕЧНОЙ МИКРОБИОТЫ

И.Ю. Чичерин¹, И.П. Погорельский², И.А. Лундовских², М.Р. Шабалина², И.В. Дармов²

¹ Научное общество «Микробиота», Сергиев Посад

² Вятский государственный университет, Киров

Transplantation of intestinal microbiota

I.Yu. Chicherin¹, I.P. Pogorelskiy², I.A. Lundovskikh², M.R. Shabalina²,

I.V. Darmov²

¹ Scientific society «Microbiota», Sergiev Posad

² Vyatka State University, Kirov

Резюме. Приведены результаты изучения эффективности отфильтрованной водной суспензии фекалий белых мышей-доноров и микроорганизмов их индигенной микрофлоры в коррекции нарушений микробиоценоза кишечника у конвенциональных белых мышей с экспериментальным антибиотико-ассоциированным дисбактериозом при введении суспензии и микроорганизмов *per os* и *per rectum*.

После начала введения нагосагочной жидкости суспензии и микроорганизмов фекальной микрофлоры у подопытных животных оценивали динамику общего содержания микроорганизмов в 1 г фекалий и отдельных представителей кишечной микрофлоры в сравнении с самовосстановлением кишечной микрофлоры у животных контрольной группы.

Установлено, что нагосагочная жидкость водной суспензии фекалий белых мышей-доноров, содержащая микробные экзометаболиты и другие биологически активные соединения, оказывает в короткие сроки наиболее выраженное влияние на восстановление нормальной кишечной микрофлоры у подопытных животных.

Ключевые слова: экзометаболиты, кишечная микрофлора, дисбактериоз, трансплантация кишечной микробиоты.

Введение

Широкие возможности коррекции дисбиотических нарушений микробиоценоза кишечника, в том числе при инфекционной патологии, открываются в связи с разработкой и внедрением в практику весьма оригинальной технологии.

Так, опубликованы результаты испытания способа лечения кишечной инфекции путем пересадки кала [1–3]. Суть способа, который получил название Intestinal Microbiota Transplantation (трансплантация кишечной микробиоты – ТКМ), состоит во введении в желудочно-кишечный тракт больного взвеси фекалий, взятых от здорового донора [1–3].

В итоге проведения указанной манипуляции происходит довольно быстрое восстановление нормальной кишечной микрофлоры [1–3].

Abstract. The results are presented of evaluation of the efficiency of the filtered aqueous suspension of white mice (donors) feces and microorganisms of indigenous microflora in the correction of intestinal microbiocenosis of conventional white mice with antibiotic-associated dysbacteriosis with administration of suspension and microorganisms *per os* and *per rectum*.

After the start of administration of suspension and microorganisms of fecal microflora to experimental animals the dynamics of the total content of microorganisms and the number of some representatives of intestinal microflora in 1 g of feces were evaluated in comparison with self-recovery of intestinal microflora in the control group animals.

Results showed that the supernatant of an aqueous suspension of white mice (donors) feces, containing microbial exometabolites and other biologically active compounds, has in a short time the most pronounced effect on the recovery of the normal intestinal microflora in experimental animals.

Key words: exometabolites, intestinal microflora, dysbacteriosis, transplantation of intestinal microbiota.

Согласно публикации в журнале New England Journal of Medicine [1], участниками клинико-лабораторных испытаний под руководством гастроэнтеролога J.J. Keller стали 43 пациента, страдающих манифестной формой рецидивирующей диареи, вызванной бактериями *Clostridium difficile*.

Части пациентов (16 человек) через дуоденальный зонд в желудочно-кишечный тракт вводили суспензию фекалий здорового донора, а другой части пациентов (26 человек) был назначен ванкомицин. В первой группе после первой же процедуры ТКМ полностью выздоровели 13 пациентов и еще двое после второй процедуры. В контрольной группе пациентов поправились только семеро, остальные члены этой группы сами высказались за проведение процедуры ТКМ.

Способ лечения рецидивирующей диареи, осуществленный под руководством гастроэнтеролога из Амстердамского университета J.J. Keller [1], известен уже на протяжении свыше 50 лет из публикаций, число которых, особенно на протяжении 2011–2013 гг., уже превысило 500. И тем не менее, клинико-лабораторные испытания способа, выполненные группой клиницистов под руководством J.J. Keller, впервые были проведены по всем правилам метода случайной выборки [1–3].

Отчет о положительном клиническом применении процедуры ТКМ представили также специалисты из Henry Ford Hospital в Детройте [4]. Из 49 пациентов, страдавших от тяжелой рецидивирующей диареи, вызванной *C. difficile*, которая не поддавалась стандартным методам лечения, полностью поправились 43 пациента. При этом в течение 3 месяцев после процедуры ТКМ у пациентов не развилось никаких осложнений или побочных эффектов.

Гастроэнтерологами выражена надежда, что процедура ТКМ будет широко применяться для лечения пациентов с высоким риском клостридиоза. Особо следует отметить, что, по данным публикации [4], в настоящее время при терапии кишечной инфекции, вызванной *C. difficile*, применяются ванкомицин и метронидазол, а в тяжелых случаях пораженная часть кишечника удаляется оперативным путем.

Успех в лечении рецидивирующей диареи, вызванной *C. difficile*, предопределил масштабирование процедуры ТКМ для профилактики диабета [5] и лечения паркинсонизма [6]. Научной основой лечебной эффективности калотерапии при указанных заболеваниях является гипотеза Т. Vorody из Центра расстройств пищеварения в Новом Южном Уэльсе, согласно которой при нарушении состава кишечной микрофлоры в кровотоки попадают различные микробные антигены, вызывающие избыточную реакцию иммунной системы и оказывающие влияние на развитие паркинсонизма и аутоиммунных заболеваний [6].

Вместе с тем, как считает гастроэнтеролог из Миннесотского университета в Миннеаполисе А. Khoruts [7], прошедших процедуру пересадки кишечной микрофлоры, уже не надо убеждать в ее эффективности, однако широкое медицинское сообщество нуждается в том, чтобы самостоятельно пройти путь к восприятию необходимости внедрения процедуры в медицинскую практику.

Микробиолог С. Lee из университета в Гамильтоне, штат Онтарио, убеждена [8], что при положительных отзывах об эффективности трансплантации кишечной микрофлоры здорового донора посредством введения в желудок суспензии фекалий через зонд, вставленный в носоглотку, процедура может вызвать естественное неприятие в сравнении с аналогичным введением суспензии фекалий посредством клизмы в прямую кишку. В этой

связи закономерна постановка вопроса о возможности модификации способа введения в желудок больным фекалий донора с целью изменения отношения к самой процедуре и замене неприглядности фекалий на эстетичные капсулы с соответствующим лечебным содержанием.

В наших экспериментах показана высокая эффективность влияния микробных экзосом на восстановление нарушений нормальной кишечной микрофлоры как при антибиотико-ассоциированном дисбактериозе, так и при инфекционной кишечной патологии [9–11]. По-видимому, естественным будет проведение экспериментов на лабораторных животных с целью коррекции нарушения микробиоценоза кишечника при различных модификациях введения фекалий, полученных от здоровых животных.

Цель исследования — сравнительное изучение эффективности коррекции нарушений микрофлоры кишечника путем введения фекалий и фекальной микрофлоры здоровых мышей-доноров *per os* и *per rectum* конвенциональным белым мышам с антибиотико-ассоциированным дисбактериозом.

Материалы и методы

В работе использовали прошедших акклиматизацию конвенциональных белых мышей обоего пола массой 18–20 г. Часть внешне здоровых животных была донорами фекалий для проведения исследований с животными с выраженными дисбиотическими нарушениями кишечной микрофлоры под влиянием антибиотика гентамицина.

Антибиотико-ассоциированный дисбактериоз кишечника у конвенциональных белых мышей воспроизводили путем перорального введения гентамицина [12]. Гентамицин для парентерального применения произведен фирмой-изготовителем KRKA, Словения [13].

Выращивание бифидобактерий и лактобацилл, выделенных из кишечного содержимого конвенциональных белых мышей, проводили на плотных питательных средах рекомендованного состава [14, 15] в микроаэрофильных условиях с использованием системы для анаэробного культивирования (анаэрогат) Anaerobic system Mark III-LE003 (HiMedia Laboratories Pvt. LTD, Мумбаи, Индия) с пакетами газогенераторными HiAnaero Gas Pacet. Выращивание эшерихий проводили на агаре Хоттингера и агаре Эндо.

Общее количество микробных клеток в пересчете на 1 г фекалий животных определяли путем подсчета в камере Горяева (модель 851, ЛПО «Красногвардеец», Россия).

Количество живых микроорганизмов (КОЕ) в суспензиях фекалий животных определяли высеваем соответствующих десятикратных серийных

разведений на плотные питательные среды и подсчетом выросших колоний по истечении времени инкубирования при температуре +37 °С.

Суспензию фекалий здоровых животных-доноров для введения конвенциональным белым мышам с антибиотико-ассоциированным дисбактериозом готовили, исходя из среднесуточной массы для людей (с учетом переводного коэффициента на единицу поверхности тела).

Статистическую обработку результатов экспериментов проводили согласно рекомендациям, изложенным в руководстве И.П. Ашмарина и А.А. Воробьева [16].

Результаты и обсуждение

Первоначально была отобрана группа внешне здоровых конвенциональных белых мышей, послуживших в последующем донорами фекалий для экспериментов по пересадке кишечной микрофлоры. С использованием микробиологических методов установлено общее количество микроорганизмов в 1 г фекалий, равное $(8,6 \pm 0,7) \cdot 10^9$ КОЕ, бифидобактерий — $(6,8 \pm 0,5) \cdot 10^6$ КОЕ, лактобацилл — $(3,2 \pm 0,6) \cdot 10^8$ КОЕ, эшерихий — $(2,3 \pm 0,6) \cdot 10^4$ КОЕ.

Отобранные фекалии животных-доноров гомогенизировали, суспендировали в теплой воде из расчета 130 мг на одно животное в эксперименте, что соответствовало введению 50 г фекалий от здорового донора больным в клиническом эксперименте лечения кишечной инфекции [1, 4]. Отфильтрованная суспензия фекалий была использована в дальнейшей экспериментальной работе.

Для инициации антибиотико-ассоциированного дисбактериоза кишечника конвенциональным белым мышам в течение 7 суток перорально дважды в сутки вводили гентамицин в дозе по 3 мг. До введения антибиотика, на 2-й и 7-й день введения у животных отбирали фекалии для бактериологического изучения. Всего в опыте было использовано 60 животных. Результаты опытов представлены в таблице 1.

Таблица 1

Динамика концентрации микроорганизмов в кишечном содержимом конвенциональных белых мышей при пероральном введении гентамицина ($X \pm I_{95}$, n=10)

Микроорганизмы	Содержание живых бактерий в 1 г фекалий на ... сутки эксперимента, КОЕ·г ⁻¹		
	Начало эксперимента	2-е сутки	7-е сутки
Общее количество	$(8,6 \pm 0,5) \cdot 10^9$	$(8,1 \pm 0,6) \cdot 10^5$	$(2,0 \pm 0,6) \cdot 10^4$
Бифидобактерии	$(6,4 \pm 0,5) \cdot 10^6$	$(2,2 \pm 0,5) \cdot 10^4$	$(1,2 \pm 0,5) \cdot 10^2$
Лактобациллы	$(3,6 \pm 0,6) \cdot 10^8$	$(1,9 \pm 0,7) \cdot 10^6$	$(1,1 \pm 0,7) \cdot 10^3$
Эшерихии	$(2,6 \pm 0,7) \cdot 10^4$	$(2,1 \pm 0,6) \cdot 10^3$	$(2,4 \pm 0,6) \cdot 10^1$

Здесь и в таблице 2 «n» — количество повторных определений.

Представленные в таблице 1 данные выборочного исследования фекалий животных, получавших перорально гентамицин, однозначно свидетельствуют о том, что под влиянием антибиотика происходит существенное снижение как общего количества кишечной микрофлоры, так и отдельных ее представителей.

Для проведения последующих экспериментов отфильтрованную суспензию фекалий, полученных от здоровых белых мышей-доноров, центрифугировали при 10000 g в течение 15 мин, осадок микробов кишечной микрофлоры ресуспендировали в аналогичном объеме раствора хлорида натрия. Как надосадочную жидкость фекалий, так и микроорганизмы фекальной микрофлоры использовали для введения *per os* и *per rectum* конвенциональным белым мышам с антибиотико-ассоциированным дисбактериозом.

Все конвенциональные белые мыши в течение 5 дней после окончания введения антибиотика находились на обычном пищевом рационе, что снижало концентрацию антибиотика гентамицина в кишечном содержимом и не сказывалось на жизнеспособности микроорганизмов доноров при введении в желудочно-кишечный тракт подопытным животным. На 6-й день животных разделили на 5 групп по 10 особей в каждой. Животным 1-й и 2-й групп вводили соответственно *per os* и *per rectum* по 0,2 мл 1 раз в сутки надосадочную жидкость фекалий доноров.

Животным 3-й и 4-й групп вводили соответственно *per os* и *per rectum* по 0,2 мл 1 раз в сутки ресуспендированные в растворе хлорида натрия микроорганизмы фекальной микрофлоры доноров.

Конвенциональные белые мыши 5-й группы являлись контрольными, они находились на обычном пищевом рационе, а нормализация кишечной микрофлоры происходила путем самовосстановления.

Еще одна, 6-я группа животных также являлась контрольной, антибиотик гентамицин животным изначально не вводили и не иницировали дисбиотические изменения кишечной микрофлоры.

Введение надосадочной жидкости и ресуспендированных микроорганизмов кишечной микрофлоры доноров животным 1–4-й групп продолжали в течение 5 суток. Содержание бактерий в фекалиях подопытных животных во всех 6 группах определяли в начале эксперимента, на 2-е, 4-е, 7-е и 10-е сутки. Результаты экспериментов представлены в таблице 2.

Из представленных результатов следует, что наиболее благоприятное действие на восстановление микрофлоры кишечника белых мышей с антибиотико-ассоциированным дисбактериозом оказывает надосадочная жидкость фекалий доно-

ров, вводимая животным *per os* (1 группа животных). Та же надосадочная жидкость, но вводимая животным 2-й группы *per rectum*, оказывала положительное влияние на восстановление кишечной микрофлоры, но в более отдаленный период (на 10-е сутки наблюдения).

Осажденные центрифугированием и ресуспендированные в изотоническом растворе хлорида натрия микробные клетки индигенной микрофлоры белых мышей-доноров при введении как *per os*, так и *per rectum* животным с антибиотико-ассоциированным дисбактериозом (группы 3 и 4) уступают по эффективности восстановления кишечной микрофлоры надосадочной жидкости, полученной центрифугированием фильтрованных суспензий фекалий белых мышей-доноров.

У животных 5-й контрольной группы, находившихся на обычном пищевом рационе, происходило самовосстановление кишечной микрофлоры, которое значительно отставало от такового в опытных группах животных.

У животных 6-й контрольной группы нарушений микробиоценоза кишечника выявлено не было.

С учетом представленных в таблице 2 данных, была определена скорость восстановления кишечной микрофлоры у конвенциональных белых мышей с антибиотико-ассоциированным дисбактериозом под влиянием вводимых в пищеварительный тракт компонентов суспензии фекалий белых мышей-доноров [17]. Результаты определения представлены в таблице 3.

Как следует из представленных в таблице 3 результатов, наиболее высокая скорость восстановления нормальной микрофлоры отмечена у животных 1-й опытной группы под влиянием вводимой перорально надосадочной жидкости фекалий доноров. Так, скорость восстановления общего количества микроорганизмов превышала таковую при самовосстановлении кишечной микрофлоры у животных 5-й контрольной группы в 1139 раз, бифидобактерий – в 4789 раз, лактобацилл – в 3238 раз, эшерихий – в 36 раз.

Таблица 2

Динамика концентрации микроорганизмов в кишечном содержимом конвенциональных белых мышей с антибиотико-ассоциированным дисбактериозом на фоне введения *per os* и *per rectum* компонентов фекалий здоровых мышей-доноров ($X \pm I_{95}$, n=10)

Порядковый номер	Группа животных	Микроорганизмы	Содержание живых бактерий в 1 г фекалий на ... сутки эксперимента, КОЕ·г ⁻¹				
			Начало эксперимента	2-е сутки	4-е сутки	7-е сутки	10-е сутки
1	Белые мыши, получавшие <i>per os</i> надосадочную жидкость фекалий доноров	Общее количество	(2,7±0,6)·10 ⁴	(2,6±0,7)·10 ⁶	(5,0±0,7)·10 ⁸	(6,2±0,7)·10 ⁹	(9,8±0,6)·10 ⁹
		Бифидобактерии	(1,8±0,5)·10 ²	(2,6±0,5)·10 ³	(6,4±0,4)·10 ⁵	(8,1±0,7)·10 ⁶	(9,1±0,5)·10 ⁷
		Лактобациллы	(2,0±0,7)·10 ³	(3,8±0,6)·10 ⁴	(6,1±0,6)·10 ⁶	(6,1±0,5)·10 ⁸	(6,8±0,7)·10 ⁸
		Эшерихии	(1,5±0,6)·10 ¹	(2,8±0,7)·10 ²	(3,0±0,6)·10 ³	(4,9±0,6)·10 ⁴	(7,2±0,6)·10 ⁴
2	Белые мыши, получавшие <i>per rectum</i> надосадочную жидкость фекалий доноров	Общее количество	(2,8±0,6)·10 ⁴	(2,9±0,5)·10 ⁵	(3,0±0,7)·10 ⁶	(2,8±0,6)·10 ⁸	(1,5±0,7)·10 ⁹
		Бифидобактерии	(1,6±0,5)·10 ²	(2,6±0,7)·10 ²	(5,0±0,8)·10 ⁴	(3,2±0,5)·10 ⁵	(2,4±0,8)·10 ⁶
		Лактобациллы	(2,4±0,7)·10 ³	(2,0±0,5)·10 ³	(2,9±0,5)·10 ⁵	(4,1±0,7)·10 ⁶	(1,9±0,5)·10 ⁷
		Эшерихии	(1,8±0,6)·10 ¹	(1,9±0,7)·10 ¹	(8,9±0,7)·10 ²	(3,8±0,6)·10 ³	(1,6±0,6)·10 ⁴
3	Белые мыши, получавшие <i>per os</i> ресуспендированную кишечную микрофлору доноров	Общее количество	(2,5±0,6)·10 ⁴	(2,0±0,6)·10 ⁴	(6,9±0,8)·10 ⁵	(3,0±0,6)·10 ⁶	(1,5±0,6)·10 ⁷
		Бифидобактерии	(1,5±0,5)·10 ²	(1,5±0,5)·10 ²	(1,3±0,7)·10 ³	(1,5±0,5)·10 ⁴	(2,3±0,5)·10 ⁵
		Лактобациллы	(2,3±0,7)·10 ³	(2,4±0,6)·10 ³	(2,8±0,7)·10 ⁴	(1,6±0,6)·10 ⁵	(1,8±0,6)·10 ⁶
		Эшерихии	(1,5±0,6)·10 ¹	(1,9±0,5)·10 ¹	(3,0±0,5)·10 ²	(2,4±0,6)·10 ³	(3,0±0,7)·10 ³
4	Белые мыши, получавшие <i>per rectum</i> ресуспендированную кишечную микрофлору доноров	Общее количество	(2,8±0,5)·10 ⁴	(6,5±0,4)·10 ⁴	(2,5±0,6)·10 ⁵	(3,1±0,7)·10 ⁵	(2,0±0,6)·10 ⁷
		Бифидобактерии	(1,9±0,6)·10 ²	(2,0±0,5)·10 ²	(1,8±0,7)·10 ³	(2,5±0,6)·10 ⁴	(2,8±0,7)·10 ⁵
		Лактобациллы	(1,8±0,6)·10 ³	(1,4±0,7)·10 ³	(6,3±0,8)·10 ⁴	(9,8±0,5)·10 ⁴	(2,0±0,6)·10 ⁶
		Эшерихии	(2,0±0,7)·10 ¹	(3,1±0,5)·10 ¹	(2,1±0,6)·10 ²	(1,0±0,6)·10 ³	(5,2±0,7)·10 ³
5	Белые мыши: самовосстановление кишечной микрофлоры (контроль)	Общее количество	(2,4±0,6)·10 ⁴	(3,0±0,5)·10 ⁴	(2,9±0,7)·10 ⁴	(1,5±0,6)·10 ⁵	(8,6±0,7)·10 ⁶
		Бифидобактерии	(1,6±0,7)·10 ²	(1,6±0,7)·10 ²	(3,5±0,5)·10 ²	(1,4±0,6)·10 ⁴	(1,9±0,5)·10 ⁴
		Лактобациллы	(1,4±0,6)·10 ³	(2,4±0,8)·10 ³	(4,1±0,7)·10 ³	(2,0±0,7)·10 ⁴	(2,1±0,6)·10 ⁵
		Эшерихии	(1,8±0,6)·10 ¹	(1,9±0,7)·10 ¹	(6,8±0,6)·10 ²	(1,8±0,6)·10 ²	(2,0±0,6)·10 ³
6	Контрольная группа белых мышей	Общее количество	(8,8±0,7)·10 ⁹	(8,2±0,6)·10 ⁹	(8,4±0,5)·10 ⁹	(8,6±0,7)·10 ⁹	(8,8±0,7)·10 ⁹
		Бифидобактерии	(6,1±0,6)·10 ⁶	(7,3±0,8)·10 ⁶	(6,9±0,6)·10 ⁶	(6,5±0,6)·10 ⁶	(7,0±0,6)·10 ⁶
		Лактобациллы	(3,1±0,8)·10 ⁸	(4,2±0,6)·10 ⁸	(4,0±0,7)·10 ⁸	(3,5±0,5)·10 ⁸	(4,0±0,7)·10 ⁸
		Эшерихии	(2,5±0,6)·10 ⁴	(3,0±0,5)·10 ⁴	(2,5±0,6)·10 ⁴	(2,0±0,5)·10 ⁴	(2,6±0,6)·10 ⁴

Влияние надосадочной жидкости и индигенной микрофлоры белых мышей-доноров на скорость восстановления кишечной микрофлоры у конвенциональных белых мышей с антибиотико-ассоциированным дисбактериозом

Группа животных	Скорость восстановления кишечной микрофлоры							
	Общее количество микробов		Бифидобактерии		Лактобациллы		Эшерихии	
	КОЕ·г ⁻¹ ·сут ⁻¹	Кратность к контролю	КОЕ·г ⁻¹ ·сут ⁻¹	Кратность к контролю	КОЕ·г ⁻¹ ·сут ⁻¹	Кратность к контролю	КОЕ·г ⁻¹ ·сут ⁻¹	Кратность к контролю
Белые мыши, получавшие <i>per os</i> надосадочную жидкость фекалий доноров	9,8·10 ⁸	1139	9,1·10 ⁶	4789	6,8·10 ⁷	3238	7,2·10 ³	3,6
Белые мыши, получавшие <i>per rectum</i> надосадочную жидкость фекалий доноров	1,5·10 ⁸	174	2,4·10 ⁵	126	1,9·10 ⁶	90	1,6·10 ³	7,9
Белые мыши, получавшие <i>per os</i> ресуспендированную кишечную микрофлору доноров	1,5·10 ⁶	1,7	2,3·10 ⁴	12,1	1,8·10 ⁵	8,6	3,0·10 ²	1,5
Белые мыши, получавшие <i>per rectum</i> ресуспендированную кишечную микрофлору доноров	2,0·10 ⁶	2,3	2,8·10 ⁴	14,7	2,0·10 ⁵	9,5	5,2·10 ²	2,6
Белые мыши: самовосстановление кишечной микрофлоры (контроль)	8,6·10 ⁵	1	1,9·10 ³	1	2,1·10 ⁴	1	2,0·10 ²	1

Выявленная тенденция стимуляции размножения кишечной микрофлоры у животных с антибиотико-ассоциированным дисбактериозом (2-я опытная группа) прослеживается и в случае введения надосадочной жидкости фекалий доноров *per rectum*. Однако в данном случае скорость восстановления нарушений кишечной микрофлоры у животных этой группы значительно отстает: кратность увеличения общего количества кишечной микрофлоры у животных 1-й группы в сравнении с контрольной группой животных составила 1139, а во 2-й группе — 174.

Более низкая скорость восстановления нормальной кишечной микрофлоры выявлена у животных, которым вводили *per os* изолированные от животных-доноров фекальные микроорганизмы (3-я группа животных), а также у животных, которым эти же микроорганизмы вводили *per rectum* (4-я группа животных).

Таким образом, результаты экспериментальных исследований говорят в пользу того, что основными стимуляторами размножения собственной микрофлоры у конвенциональных белых мышей с антибиотико-ассоциированным дисбактериозом являются не столько микроорганизмы кишечной микрофлоры мышей-доноров, сколько микробные экзометаболиты и некоторые другие компоненты кишечного содержимого.

Предложенная на рассмотрение научной общественности оригинальная технология нормализации кишечной микрофлоры при различных дисбиотических состояниях, в том числе при тяжелой

диарее, вызванной *C. difficile*, путем пересадки кишечной микрофлоры [1–4], безусловно, не оставит равнодушным ни одного гастроэнтеролога или микробиолога, причастного к решению проблем клинической гастроэнтерологии.

Действительно, при современной тактике ведения больных с тяжелыми кишечными инфекциями практически невозможно добиться хоть какого-то улучшения в первые сутки лечения. В то же время, как отмечено в публикациях [1, 4], у большинства пациентов уже через несколько часов после проведения процедуры ТКМ появился аппетит, значительно улучшилось общее состояние. Через неделю пациенты были полностью здоровы. В дальнейшем в течение 3 месяцев после процедуры ТКМ у них не развилось никаких осложнений или побочных эффектов такого метода лечения.

Согласно представленным в работе [1] данным, кишечная микробиота у больных с рецидивирующей диареей клостридиальной (*C. difficile*) этиологией характеризуется выраженной депривацией. Естественно, что снижение микробиологического биоразнообразия существенно меняет функционирование пищеварительного тракта больных и сказывается на их самочувствии. Это и предопределило решение гастроэнтерологов заменить в результате трансплантации микробиоты доноров индигенную обедненную микрофлору больных, предполагая, что «пересаженная» микробиота доноров приживется в новом биотопе.

Однако, как показано в выполненных нами исследованиях [18], даже гомопробиотические

бифидобактерии и лактобациллы, находящиеся в функционально активном состоянии и вводимые перорально конвенциональным белым мышам, в том числе с антибиотико-ассоциированным дисбактериозом, не приживаются в кишечнике нового хозяина и элиминируются к 3-м и 5-м суткам соответственно после прекращения их введения животным.

Именно экспериментальные данные ставят под сомнение существующий принцип заместительного действия пробиотикотерапии на основе живых микроорганизмов, а также заместительного действия микробиоты доноров при ее трансплантации в кишечник больных с выраженными нарушениями нормальной кишечной микрофлоры.

Очевидно, что положительный эффект процедуры ТКМ, связанной с введением через зонд в желудок пациентов водной суспензии фекалий (30–50 г), обусловлен не самими микроорганизмами фекальной микрофлоры, поскольку эффект от проведенной процедуры был зафиксирован уже через 2 ч [1, 4]. Этот срок явно недостаточен для значительного размножения пересаженной микрофлоры донора и сопряженного с этим положительного эффекта восстановления собственной микрофлоры кишечника больных.

С большой долей вероятности можно утверждать, что успешный опыт лечения кишечной инфекции, скорее всего, связан с компонентами фекалий, в частности, с микробными экзосометаболитами. Разнонаправленный характер физиологических эффектов низкомолекулярных метаболитов микрофлоры кишечника рассмотрен в работе [19].

Так, короткоцепочечные жирные кислоты (уксусная, пропионовая, масляная) участвуют в энергообеспечении эпителия; пропионовая кислота и пропионат обладают антибактериальным действием, осуществляют поставку субстратов глюконеогенеза, а в совокупности с масляной кислотой и бутиратом участвуют в регуляции пролиферации и дифференцировки эпителия; ацетат и бутират поставляют субстраты липогенеза; формиат активизирует фагоцитоз; пропионат и пропионовая кислота блокируют адгезию патогенов к слизистой; короткоцепочечные жирные кислоты и их соли, ГАМК и глутамат регулируют моторную активность кишечника; β -аланин – поставщик субстратов для синтеза коферментов; масляная кислота и бутират усиливают местный иммунитет; короткоцепочечные жирные кислоты и их соли участвуют в поддержании ионного обмена.

Приведенный перечень микробных экзосометаболитов, поступающих в содержимое кишечника в процессе жизнедеятельности нормальной кишечной микрофлоры, и их физиологических эффектов на уровне целостного организма свидетельствует о больших потенциальных возможностях как ми-

кробных экзосометаболитов, так и других компонентов кишечного содержимого в защите кишечника и организма от патогенных микроорганизмов.

При этом, возможно, формирование колонизационной резистентности слизистой оболочки кишечника и поддержание его нормального биоценоза является одной из приоритетных функций микроорганизмов нормальной микрофлоры, но осуществляются они за счет микробных экзосометаболитов. В пользу данного утверждения свидетельствуют полученные нами экспериментальные данные по сравнительной оценке эффективности жидких нативных культур бифидобактерий и лактобацилл, а также их компонентов в коррекции нарушений микробиоценоза белых мышей с антибиотико-ассоциированным дисбактериозом [17].

В прямых опытах на экспериментальных животных впервые было установлено, что основной вклад в эффективность пробиотических препаратов вносят продукты жизнедеятельности микроорганизмов – экзосометаболиты, а микробные клетки, их продуцирующие, не участвуют в восстановлении микробиоценоза кишечника.

В следующей серии экспериментов, связанных с изучением пребиотической эффективности надосадочной жидкости нативной культуры пробиотического микроорганизма *Lactobacillus plantarum* 8P-A3, было установлено, что основным ее компонентом является молочная кислота. Она, а также присутствующие в надосадочной жидкости дипептиды, азотистые соединения, аминокислоты, жирные кислоты (олеиновая, эруковая, пальмитиновая, трикозановая и др.) оказывают выраженный биоцидный эффект *in vitro* и *in vivo* в отношении возбудителей псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза и препятствуют развитию дисбактериоза [9–11].

Результаты, полученные в ходе выполнения настоящей работы, вполне созвучны результатам, опубликованным в других наших работах [9–11, 17]. Кроме того, полученные нами данные о выживаемости в опытах *in vitro* и *in vivo* пробиотических микроорганизмов, свидетельствуют о том, что кислотно-щелочной барьер преодолевают и остаются жизнеспособными крайне незначительное количество пробиотических микроорганизмов [20, 21]. Но и они вследствие чужеродности подвергаются рестрикции и удаляются из организма [22].

Таким образом, выполненный цикл исследований подтверждает сделанный ранее вывод о том, что создана основа для экспериментально обоснованной разработки новых пробиотических препаратов, в состав которых войдут экзосометаболиты микроорганизмов [17]. А это уже новый уровень понимания взаимоотношений макроорганизма и микроорганизмов индигенной микрофлоры.

Решение возникающих в этой связи многих вопросов может происходить, по мнению Б.А. Шендерова [23], в рамках создания нового научно-прикладного направления в функциональной геномике — микроэкологической эпигеномике. Сам инициатор формирования данного научно-прикладного направления Б.А. Шендеров видит основную цель развертывания исследований в «... обнаружении и установлении роли определенных микробных низкомолекулярных соединений, ассоциируемых с симбиотической индигенной микробиотой, в регуляции экспрессии генов у эукариотических и прокариотических организмов и в посттрансляционной модификации продуктов этих генов» [23]. В итоге реализации проекта может быть разработана средства, повышающих, с одной стороны, устойчивость человека к вредным факторам окружающей среды, а с другой — позволяющих эффективно бороться с недугами, являющимися результатом эпигеномных нарушений [23, 24].

На сегодняшний день существует реальная возможность реализации такого важного положения проекта, как персональное питание конкретного человека, которым в контексте настоящей работы является здоровый донор кишечной микробиоты.

В случае широкого использования технологии трансплантации кишечной микробиоты с лечебной целью потребность в микробиоте от здорового донора будет возрастать. Персонализированные рационы питания доноров кишечной микробиоты позволят, как об этом пишет Б.А. Шендеров [23], компенсировать возможные последствия экспрессии полиморфных генов, неблагоприятных для здоровья, и получать от них кондиционный биологический материал.

Последний с помощью несложных манипуляций может быть подвергнут фракционированию, после чего фракция, содержащая микробные экзометаболиты и другие биоактивные соединения, может быть использована для создания нового класса препаратов, перспективных для применения в инкапсулированной форме в лечебно-профилактических целях.

Выводы

1. В опытах на конвенциональных белых мышях с экспериментальным антибиотико-ассоциированным дисбактериозом изучено влияние компонентов фекалий здоровых белых мышей-доноров — микроорганизмов индигенной микрофлоры и надосадочной жидкости водной суспензии фекалий при введении *per os* и *per rectum* на восстановление нормальной кишечной микрофлоры.

2. Наиболее выраженный стимулирующий эффект восстановления в короткие сроки нормальной кишечной микрофлоры у конвенциональных

белых мышей оказывает надосадочная жидкость водной суспензии фекалий белых мышей-доноров при пероральном введении.

3. Скорость восстановления общего содержания микрофлоры в кишечнике у конвенциональных белых мышей под воздействием перорального введения надосадочной жидкости водной суспензии фекалий белых мышей-доноров относительно контроля возрастает в 1139 раз. Одновременно отмечается ускорение восстановления относительно контроля бифидобактерий в 4789 раз, лактобацилл — в 3238 раз, эшерихий — в 36 раз.

4. При введении надосадочной жидкости водной суспензии фекалий белых мышей-доноров в кишечник через прямую кишку конвенциональным белым мышам с антибиотико-ассоциированным дисбактериозом скорость восстановления нормальной кишечной микрофлоры была ниже таковой при пероральном введении надосадочной жидкости, но относительно контроля была выше по общему содержанию микроорганизмов в 174 раза, по бифидобактериям — в 126 раз, по лактобациллам — в 90 раз, по эшерихиям — почти в 8 раз.

5. Введение конвенциональным белым мышам с антибиотико-ассоциированным дисбактериозом суспензии изолированных центрифугированных микроорганизмов индигенной микрофлоры белых мышей-доноров как *per os*, так и *per rectum* было менее эффективным в плане восстановления общего содержания микроорганизмов кишечной микрофлоры и отдельных ее представителей, хотя и превосходило, особенно по бифидобактериям — в 12,1 — 14,7 раз и по лактобациллам — в 8,6 — 9,5 раз, аналогичный показатель при самовосстановлении кишечной микрофлоры у животных контрольной группы.

6. Полученные результаты, связанные с доказательством положительного влияния на нормализацию кишечной микрофлоры у конвенциональных белых мышей с антибиотико-ассоциированным дисбактериозом перорально введенной отфильтрованной водной суспензии фекалий белых мышей-доноров, свидетельствуют о наличии в кишечном содержимом микробных экзометаболитов, а также других соединений, в том числе сигнальных транспортных молекул и молекул с метаболической активностью, потенциальные возможности которых могут быть использованы при лечении кишечных заболеваний инфекционной природы.

Литература

1. Van Nood, E. Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile* / E. Van Nood [et al] // N. Engl. J. Med. — 2013. — V. 368. — P. 407—415.

2. Пересадка кала оказалась в четыре раза эффективнее антибиотика. — [http://medportal.ru/mednovosti/news/2013/01/17/imt/\(17.01.2013\)](http://medportal.ru/mednovosti/news/2013/01/17/imt/(17.01.2013)).

3. Эффективность «калотерапии» доказана клиническими исследованиями. — <http://www.vechnayamolodost.ru/pages/biomedical/jeffekaldokkliisse> 8.html.
4. Кишечную инфекцию вылечили пересадкой кала. — <http://medportal.ru/mednovosti/news/2012/10/23/int/> (23.10.2012).
5. Пересадку микрофлоры предложили использовать для профилактики диабета. — <http://medportal.ru/mednovosti/news/2012/04/19/biota/> (19.04.2012).
6. Австралийцы предложили лечить паркинсонизм пересадкой кала. — <http://medportal.ru/mednovosti/news/2011/01/20/faetra/> (20.01.2011).
7. Khoruts, A. Changes in the composition of the human fecal microbiome after bacteriotherapy for recurrent Clostridium difficile-associated diarrhea / A. Khoruts // J. Clin. Gastroenterol. — 2010. — V. 44. — P. 354–360.
8. Follow you nose. Nature. doi: 10.1038/nature.2013.12227.
9. Чичерин, И.Ю. Экспериментальный псевдотуберкулез: оценка возможности профилактики, лечения и коррекции дисбиотических нарушений кишечной микрофлоры / И.Ю. Чичерин [и др.] // Журн. инфектологии. — 2012. — Т. 4, № 4. — С. 71–79.
10. Чичерин, И.Ю. Колонизационная резистентность слизистой оболочки кишечника при экспериментальном иерсиниозе / И.Ю. Чичерин [и др.] // Журн. инфектоогии. — 2013. — Т. 5, № 1. — С. 75–82.
11. Чичерин, И.Ю. Антибактериальная активность и состав надосадочной жидкости нативной культуры Lactobacillus plantarum 8P-A3 / И.Ю. Чичерин [и др.] // Журн. междунар. медицины. — 2013. — № 1(2). — С. 131–139.
12. Патент 2477894, Российская Федерация. Способ моделирования дисбактериоза кишечника у лабораторных животных / И.В. Дармов, И.Ю. Чичерин, А.С. Ердякова, И.П. Погорельский, И.А. Лундовских; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВПО «Вятский государственный университет». — № 2011149501/14: заявл. 05.12.2011; опубл. 20.03.2013 Бюл. № 8.
13. Гентамицин-К. Инструкция, применение, описание лекарственного действия, синонимы, аналоги и цена препарата Гентамицина-К (международное название Гентамицин) — <http://www.ros-med.info>.
14. Иванов, В.П. Совершенствование методов диагностики дисбактериоза толстого кишечника : информационное письмо / В.П. Иванов [и др.]. — СПб.: Центр Госсанэпиднадзора, 2002. — 31 с.
15. Бондаренко, В.М. Методические рекомендации: микробиологическая диагностика дисбактериоза кишечника / В.М. Бондаренко, В.Г. Лихоед. — М.: ГУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН, 2007. — 70 с.
16. Ашмарин, И.П. Статистические методы в микробиологических исследованиях / И.П. Ашмарин, А.А. Воробьев. — Л: Медгиз, 1962. — 280 с.
17. Чичерин, И.Ю. Пробиотики: вектор развития / И.Ю. Чичерин [и др.] // Практическая медицина. — 2012. — № 3 (58). — С. 180–188.
18. Чичерин, И.Ю. Заместительное действие пробиотиков: миф или реальность. Кишечная микрофлора: взгляд изнутри / И.Ю. Чичерин [и др.] // Инновационный сборник научных статей. — 2013. — Вып. 2. — С. 36–41. — <http://gastroportal.ru/files/microflora.pdf>.
19. Минушкин, О.Н. Дисбактериоз кишечника (понятие, диагностика, принципы лечебной коррекции). Современные возможности пребиотической терапии : учебно-методическое пособие для врачей и курсантов циклов усовершенствования врачей / О.Н. Минушкин [и др.]. — М.: ФГУ «Учебно-научный медицинский центр» Управления делами Президента Российской Федерации, 2010. — 50 с.
20. Дармов, И.В. Выживаемость микроорганизмов пробиотиков в условиях in vitro, имитирующих процесс пищеварения у человека / И.В. Дармов [и др.] // Эксп. и клин. гастроэнтерол. — 2011. — № 3. — С. 6–11.
21. Дармов, И.В. Выживаемость микроорганизмов пробиотиков в желудочно-кишечном тракте экспериментальных животных / И.В. Дармов [и др.] // Журн. инфектоогии. — 2012. — Т. 4, № 4. — С. 68–74.
22. Погорельский, И.П. Экологическая и функциональная маргинальность пробиотических микроорганизмов / И.П. Погорельский, И.Ю. Чичерин, И.А. Лундовских // Общество, наука, инновации (НТК-2012) : ежегод. открыт. всерос. науч.-техн. конф. 16–27 апреля 2012 г. : сб. материалов Вят. гос. ун-т; отв. ред. С.Г. Литвинец. — Киров, 2012. — 1 электрон. опт. диск (CD-ROM) (Биологический факультет. Секция «Микробиология»).
23. Шендеров, Б.А. Роль питания и кишечной микрофлоры в программировании и реализации эпигенома здоровых и больных людей / Б.А. Шендеров // Вестник восстановит. медицины. — 2013. — Специальный выпуск. — Январь. — С. 102–107.
24. Shenderov, B.A. Gut indigenous microbiota and epigenetics / B.A. Shenderov // Microb. ecology in health and diseases. — 2012. — № 23. — 17461-DOI: 10.3402/mehd.v23i01.17461.

Авторский коллектив:

Чичерин Игорь Юрьевич — президент научного общества «Микробиота», к.м.н.; тел. 8(496) 547-53-00, e-mail: gpatron@mail.ru;

Погорельский Иван Петрович — профессор кафедры микробиологии биологического факультета Вятского государственного университета, д.м.н., профессор; тел. 8(8332)32-16-50, e-mail: ipogorelsky@inbox.ru;

Лундовских Ирина Александровна — доцент кафедры микробиологии биологического факультета Вятского государственного университета, к.х.н., доцент; тел. 8(8332)32-16-50, e-mail: lundovskih@vyatsu.ru;

Шабалина Марина Робертовна — доцент кафедры высшей математики факультета прикладной математики и телекоммуникаций Вятского государственного университета, к.пед.н., доцент; тел. 8(8332)64-21-19, e-mail: kaf_mb@vyatsu.ru;

Дармов Илья Владимирович — заведующий кафедрой микробиологии биологического факультета Вятского государственного университета, д.м.н., профессор; тел. 8(8332)32-16-50, e-mail: darmov@vyatsu.ru