ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«КУРЧАТОВСКИЙ ИНСТИТУТ»

На правах рукописи

Полякова Вероника Игоревна

НАРУШЕНИЯ МИКРОБИОЦЕНОЗА КИШЕЧНИКА МАКАК РЕЗУСОВ В МОДЕЛИ АНТИБИОТИК-АССОЦИИРОВАННОЙ ДИАРЕИ И ИХ КОРРЕКЦИЯ МЕТОДОМ ТРАНСПЛАНТАЦИИ КИШЕЧНОЙ МИКРОБИОТЫ

1.5.11. Микробиология (биологические науки)

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
Кандидат биологических наук
Аршба Илона Мурмановна,

Сочи – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ 4

ГЛАВА 1 Кишечная микробиота человека и обезьян: роль в патологии и методы коррекции (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ) 11

1.1 Современные представления о микробиоте кишечника 11

1.2 Нарушения микробиоценоза кишечника при антибиотик-ассоциированной диарее 16

1.3 Обезьяны как объект экспериментальных моделей в медицине и биологии ... 19

1.4 Современные подходы к коррекции кишечной микробиоты: от пробиотиков до трансплантации 23

ГЛАВА 2 Материалы и методы исследования 41

2.1 Объект исследования 41

2.2 Материал исследования 41

2.3 Методы исследования 45

2.3.1 Методы исследования кишечной микробиоты обезьян 45

2.3.2 Клинические, лабораторные и инструментальные методы обследования обезьян 49

2.3.3 Моделирование антибиотик-ассоциированной диареи 58

2.3.4 Трансплантация кишечной микробиоты 59

2.3.5 Методы статистической обработки 63

ГЛАВА 3 Микробиота кишечника здоровых макак резусов 67

3.1 Микробиота кишечника здоровых макак резусов различного возраста и пола 67

3.2 Характеристика кишечной микробиоты макак резусов на основе анализа гена 16S рРНК методом метагеномного секвенирования 79

ГЛАВА 4 Характеристика изменений количественных параметров основных таксонов кишечной микробиоты макак резусов на модели антибиотик-ассоциированной диареи 86

ГЛАВА 5 Коррекция нарушений микробиоценоза кишечника макак резусов с антибиотик-ассоциированной диареей методом трансплантации кишечной микробиоты 88
5.1 Скрининг потенциальных доноров 88
5.2 Изменения микробиоценоза кишечника после трансплантации кишечной микробиоты с использованием капсул 95
5.3 Изменения микробиоценоза кишечника после трансплантации кишечной микробиоты в форме суспензии 107
5.4 Оценка безопасности трансплантации в зависимости от способа введения .. 119
ЗАКЛЮЧЕНИЕ 131
ВЫВОДЫ 147
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ 149
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ 150
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 153
СПИСОК НАУЧНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ, В КОТОРЫХ ИЗЛОЖЕНЫ ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ДИССЕРТАЦИИ 180
ПРИЛОЖЕНИЯ 183

ВВЕДЕНИЕ

Изучение микробиоты живых организмов сохраняет фундаментальное значение. Объектом наибольшего числа работ для врачей и ученых различных специальностей остается кишечная микробиота человека, которая является самой многочисленной и наиболее разнообразной, если сравнивать ее с микробиотой других локусов организма [125, 149]. Индигенную кишечную микробиоту можно охарактеризовать как эволюционно сформировавшуюся экосистему, включающую разнообразные симбиотические микроорганизмы. Эти микросимбионты поддерживают биохимическое, метаболическое и иммунологическое равновесие, необходимое для сохранения здоровья человека [90]. Микробиота кишечника весьма лабильна и подвержена количественно-качественным изменениям, иногда очень стойким (дисбиоз), под действием различных факторов.

В настоящее время накапливается все больше сведений о важном значении применения пробиотиков, а также трансплантации кишечной микробиоты (ТКМ) для лечения синдрома раздраженной толстой кишки, синдрома избыточного бактериального роста (СИБР), метаболического синдрома, антибиотик-ассоциированной диареи, иммуноопосредованных заболеваний кишечника и ряда других патологических состояний человека [48, 58, 182].

Микробиота кишечника обезьян обладает высоким сходством с микробиотой человека. Приматы из-за сходства важнейших анатомо-физиологических систем с человеческими [37, 157], считаются лучшей животной моделью в медико-биологических экспериментах для изучения механизмов, участвующих в остром и хроническом воспалении. Обезьяны подвержены практически всем бактериальным, вирусным и паразитарным заболеваниям, которыми страдают люди [9, 13, 54]. Согласно имеющимся данным, к нарушениям микробиоценоза кишечника обезьян, как и человека, приводят следующие причины: эмоциональный стресс, несоблюдение диеты, применение антибиотиков, индуцированные иммунодефициты, а также острые и хронические кишечные инфекции различной этиологии [146, 215].

Для оценки безвредности и эффективности разрабатываемых микробных препаратов медицинского назначения, предлагаемых для нормализации кишечного микробиоценоза [98, 157], обезьяны служат адекватным биообъектом – благодаря сходству с человеком по количественному и качественному составу нормобиоты кишечника, а также по причинам и механизмам развития дисбиозов [34, 37]. Понимание особенностей кишечной микробиоты обезьян приобретает критическую важность для корректной интерпретации экспериментальных данных и обеспечения воспроизводимости результатов.

Степень разработанности темы исследования

В Российской Федерации (РФ), несмотря на изучение кишечной микробиоты обезьян и накопленный опыт в клинической медицине [1], экспериментальных работ по трансплантации кишечной микробиоты (ТКМ) на лабораторных приматах ранее не проводилось, а исследования ТКМ на макаках резусах (*Macaca mulatta*) в мировой практике единичны [67, 85]. При этом в литературе имеются отдельные работы по оценке безопасности и эффективности ТКМ на других видах низших обезьян, в частности, на яванских макаках (*Macaca fascicularis*) [96, 104] и обыкновенных игрунках (*Callithrix jacchus*) [93, 157]. Настоящее исследование впервые в РФ позволит оценить возможность коррекции нарушений микробиоценоза кишечника методом трансплантации кишечной микробиоты на макаках резусах, а также разработать протокол отбора доноров и проведения процедуры ТКМ.

Целью настоящего исследования является анализ нарушений таксономического состава микробиоценоза кишечника макак резусов в модели антибиотик-ассоциированной диареи с оценкой эффективности их коррекции методом трансплантации кишечной микробиоты.

Задачи исследования:

1. Изучение состава кишечной микробиоты клинически здоровых особей макак резусов различного возраста и пола.
2. Анализ изменений таксономического состава кишечной микробиоты макак резусов на модели антибиотик-ассоциированной диареи.

3. Оценка эффективности коррекции дисбиотических нарушений микробиоценоза кишечника макак резусов при антибиотик-ассоциированной диареи методом трансплантации кишечной микробиоты.

Научная новизна

Впервые комплексно оценены возрастные и половые особенности кишечной микробиоты клинически здоровых особей макак резусов методами ПЦР-РВ и метагеномного секвенирования гена 16S рРНК. Подтверждено доминирование представителей фил *Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteriota*; установлены референсные интервалы основных таксонов кишечной микробиоты и ее онтогенетические (возрастные) тренды – снижение *Lactobacillus* spp. и *Escherichia coli,* рост *Bacteroides* spp. на фоне относительной стабильности общей бактериальной массы и количества *Faecalibacterium prausnitzii.* С учетом возраста установлено, что у самок по сравнению с самцами: высокий уровень общей бактериальной массы отмечен у детенышей (до 1 года) и старых особей (26-34 года); у особей среднего возраста (15-20 лет) были выше уровни *Lactobacillus* spp.; как у детенышей, так и у особей среднего возраста зафиксированы высокие уровни *Escherichia coli* и *Bacteroides* spp., при этом у первых отношение *Bacteroides fragilis* group / *Faecalibacterium prausnitzii* было достоверно выше.

Разработана модель антибиотик-ассоциированной диареи у макак резусов, индуцированная комбинацией цефиксима и амоксиклава, которая характеризуется дисбиотическими нарушениями микробиоценоза кишечника в виде: снижения общей бактериальной массы и количества *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Faecalibacterium prausnitzii,* увеличения уровня *Escherichia coli*, *Bacteroides* spp. и соотношения *Bacteroides fragilis* group / *Faecalibacterium prausnitzii*.

Впервые показана эффективность коррекции дисбиотических нарушений микробиоценоза кишечника макак резусов с антибиотико-ассоциированной диареей методом трансплантации кишечной микробиоты.

Теоретическая и практическая значимость

Установленные возрастные референсные интервалы и половые различия ключевых таксонов кишечной микробиоты клинически здоровых особей макак

резусов могут служить основой для оценки состояния микробиоценоза кишечника у обезьян и его изменений, в том числе, при патологических состояниях и/или воздействии на животных различных факторах в модельных экспериментах.

Разработанная модель антибиотик-ассоциированной диареи на макаках резусах позволяет оценить характер изменений микробиоценоза кишечника и возможность их коррекции методом трансплантации кишечной микробиоты.

Обоснованы критерии отбора потенциальных доноров кишечной микробиоты на основе данных скрининга, охватывающие комплексный перечень диагностических показателей.

Разработаны модифицированные кишечнорастворимые капсулы для перорального введения донорской кишечной микробиоты у обезьян. Для «адресной» доставки суспензии донорской микробиоты непосредственно в двенадцатиперстную кишку лабораторных приматов обосновано использование зондовой гастроскопии.

Методология и методы исследования

Методология диссертационного исследования спланирована согласно поставленной цели и задачам. В основу научной работы положен принцип изучения и анализа таксономической структуры и количественных параметров кишечной микробиоты макак резусов. Для достижения поставленной цели и решения задач использовали клинические, лабораторные, бактериологические, молекулярно-генетические (ПЦР-РВ, секвенирование гена 16S рРНК), биоинформатические и статистические методы (U-критерий Манна-Уитни, метод Брея-Кертиса, критерий Фридмана, критерий Краскела-Уоллиса с поправкой Данна для множественных сравнений). Статистическая обработка и визуализация данных выполнена с использованием программ OriginPro 8.6, Python3 и R.

Положения, выносимые на защиту:

1. На основе комплексного использования ПЦР-РВ и метагеномного секвенирования гена 16S рРНК определена таксономическая структура кишечной микробиоты макак резусов, установлены возрастные референсные интервалы ключевых таксонов и выявлены половые различия микробиоценозов кишечника.

2. Охарактеризованы нарушения микробиоценоза кишечника макак резусов в модели антибиотик-ассоциированной диареи, которые проявлялись снижением общей бактериальной массы и количества *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Faecalibacterium prausnitzii*, увеличением количества *Escherichia coli* и *Bacteroides* spp., а также повышением отношения *Bacteroides fragilis* group / *Faecalibacterium prausnitzii*.

3. На модели антибиотик-ассоциированной диареи у макак резусов доказана эффективность метода трансплантации кишечной микробиоты (в капсульной форме и в форме суспензии), обеспечивающего нормализацию состава микробиоценоза кишечника.

Степень достоверности и апробации результатов исследования

Достоверность результатов диссертации основана на достаточном объеме выборки изученных материалов, использовании в работе современных методов исследования (ПЦР-РВ, секвенирование) и программного обеспечения для статистической обработки данных (программа OriginPro 8.6, Python3 и R.).

Основные положения диссертационной работы доложены на: Юбилейной научно-практической конференции: «ИЭПиТ 2022. Вчера, сегодня, завтра». Актуальные вопросы экспериментальной биологии и медицины (ноябрь 2022 г., г. Сухум, Абхазия); Научно-практической конференции «Биоресурсные коллекции. Современное состояние и потенциал для создания новых технологий и инновационной продукции в Российской Федерации» (ноябрь 2022 г., г. Сочи); VIII Национальном конгрессе бактериологов (сентябрь 2023 г., г. Москва); II научно-практической конференции «Биоресурсные коллекции: современное состояние и потенциал для создания новых технологий и инновационной продукции в Российской Федерации», в рамках Международного форума природоподобных технологий (октябрь 2023 г., г. Москва).

Личное участие автора в получении результатов

Автор диссертационной работы провела обширный литературный поиск зарубежных и отечественных источников. Участвовала в обсуждении постановки цели и задач диссертации, разработала дизайн исследования. Автор

самостоятельно проводила сбор и пробоподготовку биоматериала. Проводила микробиологические и молекулярно-генетические исследования, анализ таксономического состава микробиоты кишечника. Осуществляла статистическую обработку и анализ результатов исследований, готовила материалы для публикации в журналах, рекомендованных ВАК, и к докладам на конференциях.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 10 печатных работ, включая 5 статей в рецензируемых изданиях, из них 4 – из Перечня ВАК, и 5 публикаций в сборниках материалов конференций.

Связь работы с научными программами

Диссертация выполнена в рамках НИР ККМП НИЦ «Курчатовский институт»: 1ф-МП.2.1 «Разработка моделей наиболее значимых вирусных инфекций человека на лабораторных приматах с целью изучения нерешенных вопросов патогенеза и иммуногенеза, а также испытания разрабатываемых средств профилактики и лечения, включая изучение микробиома кишечника» (2023-2025 г., рег.№ 123122600030-8); 1ф-МП.1 «Комплексные исследования физиологии, а также этиологии и патогенеза заболеваний обезьян различных видов, возраста пола» (2025-2027 г., рег.№ 125070407927-8).

Структура диссертации

Общий объем диссертации составляет 184 страниц. Структурно работа включает введение, обзор литературы, три главы с результатами авторских исследований, заключение и выводы. Материал иллюстрирован 26 таблицами и 33 рисунками. Библиография насчитывает 218 наименование: из них 23 отечественных, 192 зарубежных публикаций и 3 ссылки на электронный ресурс.

Благодарности

Автор выражает глубокую благодарность к.б.н. Аршба И.М. за руководство научной работой; сотрудникам ККМП за проведение отдельных этапов исследования: клинико-ветеринарного отделения, лаборатории патологической анатомии, лаборатории доклинических и клинических исследований лекарственных средств и медицинских изделий, лаборатории иммунологии и

биологии клетки; сотрудникам ФБУН «Научно-исследовательский институт системной биологии и медицины» за проведение и интерпретацию результатов метагеномного секвенирования гена 16S рРНК.

ГЛАВА 1 Кишечная микробиота человека и обезьян: роль в патологии и методы коррекции (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1 Современные представления о микробиоте кишечника

Совокупность всех генов, присутствующих внутри организма, а также коллективные геномы микробных популяций человека обозначаются термином «микробиом» (введен в 2001 г.). При этом микробиом включает не только бактериальные геномы, но и генетический материал архей, эукариот (простейшие, грибы, нематоды) и вирусов; для вирусной составляющей используется отдельное название – virome [12, 192]. По мнению Frank и соавторов [68] метагеномный анализ микробиома может опираться не только на секвенирование фрагмента гена 16S рРНК, но и на прочтение всего генетического материала, включая некодирующие участки; такой подход называют шотган-секвенированием (shotgun sequencing). Это открыло возможность оценивать не только таксономический состав микробиоты в различных биотопах организма, но и ее функциональный потенциал – на основе анализа относительной представленности генов, кодирующих синтез специфических белков, в том числе ферментов, участвующих в ключевых метаболических путях [16]. Постоянно растет число публикаций по метагеномике, накапливаются сведения о функциональной роли микробиоты разных биотопов в норме и при патологии [12, 68].

Термин «микробиота» применяют для описания трех составляющих применительно к определенному периоду и географической области: микробиоценоза конкретных органов и систем (кишечник, кожа, плацента, грудное молоко и др.), совокупности их генов, а также отношений внутри экологической ниши [12, 89].

Только в первое десятилетие XXI века, с появлением высокопроизводительного секвенирующего оборудования, геномные исследования микроорганизмов обрели широкое распространение. Согласно исследованию Li и соавторов [118] первая публикация по метагеному кишечника человека, вышедшая в 2006 году, была посвящена функциональному анализу фекальных образцов, а последующая работа японской группы описала уже 13

новых наборов данных. «В обоих исследованиях применяли полногеномное шотган-секвенирование, после чего выполняли de novo сборку контигов и предсказание открытых рамок считывания» [12]. Таксономию определяли через поиск наибольшего сходства полученных контигов с последовательностями из геномной базы NCBI – в частности, путем построения генетических карт и анализа последовательностей [12, 118].

Оптимизация исследований в области экологии и молекулярной биологии требует детального анализа общих и частных связей внутри микробиоты в различных биологических объектах и средах, выяснения вклада разных типов микроорганизмов в поддержание гомеостаза, а также механизмов их ответа на внешние стимулы. При этом фундаментальной основой остается само изучение микробиоты различных сообществ [124].

Риск развития сердечно-сосудистых, аллергических, онкологических и других заболеваний связывают с вариабельностью микроорганизмов – это один из ключевых медицинсих и клинических аспектов при изучении микробиоты. Основной объем работ при этом приходится на микробиоту кишечника человека, так как она превосходит прочие локусы организма по численности и разнообразию [179].

«Микробиомом» в середине 40-х годов прошлого века называли коллекцию микробных генов в отдельной экосистеме, а термин «микробиота» использовали для характеристики бактериальной обсемененности полости рта. Однако фактическое изучение микробиоты человека стало возможным только в последние 20 лет – с развитием геномной науки и биоинформатики [12, 71, 184].

Согласно полученным данным, в составе человеческой микробиоты насчитывается до 10 миллионов генов, отличных от генома человека, которые распределены среди не менее чем 40 000 бактериальных штаммов, относящихся к 1800 родам [118]. Раннее прогнозирование патологий и индивидуальный подход к лекарственной терапии становятся реальностью благодаря изучению микробиоты в рамках протеомики и метаболомики. Эти направления, фокусируются на нарушениях в синтезе и структуре белков, липидов и ферментативной активности.

Трактовка микробиоты как генетического сообщества человеческих микроорганизмов, обладающего свойствами единого организма с индивидуальными генетическими признаками, была предложена Нобелевским лауреатом Джошуа Ледербергом (1925-2008) [12, 69].

Современная микробиология идентифицировала свыше 5000 видов микроорганизмов, но 90% из них не культивируются стандартными лабораторными методами [http://www.ensembl.org].

С данной точки зрения человек и генетически совместимые микробы, населяющие его кишечник, образуют единый «суперорганизм». Функционирование ферментов в этом сверхорганизме обеспечивается генами как самого человека, так и всех его симбиотических микроорганизмов.

Более 3 млн генов входит в состав кишечной микробиоты. Из них одна треть встречается у большинства людей, а оставшиеся две трети индивидуальны, что создает своеобразное «удостоверение личности» каждого человека [12, 43]. Повышение устойчивости к неблагоприятным воздействиям внешней среды обеспечивается разнообразием кишечной микробиоты, которое, в свою очередь, обусловливает генетические различия между людьми [82, 121].

Применение современных молекулярно-генетических подходов в исследованиях позволило установить, что «в составе кишечной микробиоты выделяются десять основных фил бактерий: *Actinobacteria, Bacteroidetes, Cyanobacteria, Firmicutes, Fusobacteria, Lentisphaerae, Proteobacteria, Spirochaetes, Synergistetes* и *Verrucomicrobia*, а также одной филой домена *Archaea – Euryarchaeota»* [19, 33, 79]. Среди всех бактерий, населяющих кишечник, абсолютное большинство (более 90%) относится к филам *Bacteriodetes* и *Firmicutes*, которые тем самым являются наиболее представленными. [19, 35, 61, 117]. Бактерии филы *Firmicutes*, по данным *P. Turnbaugh et al.* [19, 191], играют ключевую роль в получении энергии из продуктов питания, тогда как другие авторы отмечают, что их преобладание в составе кишечной микробиоты ассоциировано с повышенным уровнем короткоцепочечных жирных кислот (КЦЖК) [19, 156].

Микробный состав кишечника у детей существенно отличается от такового у взрослых по ряду параметров [52, 163]. Более высокая относительная доля *Firmicutes, Proteobacteria* и *Actinobacteria* наряду с пониженной долей *Bacteroides*, таковы отличия детской кишечной микробиоты от взрослой, согласно результатам ряда исследований [51, 88, 163].

Примерно 70-90% от общего состава кишечной микробиоты приходится на следующие роды бактерий (наиболее распространенные): *Alistipes, Bacteroides, Bifidobacterium, Clostridioides, Collinsella, Eubacterium, Faecalibacterium, Parabacteroides, Prevotella, Roseburia, Ruminococcus*, а также ряд других [153, 206]. По данным Сафиной [19], если у взрослых людей основными компонентами микробиоты ЖКТ служат бактерии фил *Firmicutes, Bacteroidetes* и *Proteobacteria*, то у детей, согласно полученным данным, наблюдается повышенное содержание *Alistipes spp., Bacteroides vulgatus, Ruminococcus spp., Roseburia spp., Faecalibacterium spp.* К менее распространенным в микробиоте относятся бактерии фил *Proteobacteria, Verrucomicrobia, Actinobacteria, Fusobacteria и Cyanobacteria* [61, 153].

Единственными представителями домена архей в составе микробиоты можно считать метаногенов, причем наиболее распространенный из них *Methanobrevibacter smithii* [11, 24, 25, 26].

У 70% здоровых людей в кишечнике присутствуют грибы рода *Candida*, основные представители эукариот наряду с простейшими [19, 166]. Вирусы же представлены преимущественно бактериофагами [19, 198].

В 2011 году европейские ученые из консорциума MetaHIT [33], в зависимости от состава микробиоты, предложили разделить человеческую популяцию на три энтеротипа. Каждый такой энтеротип охватывает множество видов бактерий и не определяется местом проживания, состоянием здоровья или возрастом. Бактериальные сообщества были сгруппированы исследователями в кластеры, которым присвоили имена по доминирующим в них родам [8].

Первый (*Bacteroides*) характеризуется интенсивным расщеплением углеводов и участием в синтезе витаминов C, B2, B5, H [18, 105]. Высказывается

мнение, что у носителей этого типа атеросклеротические изменения либо возникают реже, либо сдвигаются к более старшему возрасту.

Второй тип (*Prevotella*) связан с разрушением защитного слизистого барьера кишечника в ходе метаболизма этих бактерий. Это, как полагают, создает предпосылки для повреждения целостности слизистой оболочки.

Третий тип – несколько представителей отдела *Firmicutes*, включая рода *Ruminococcus* и *Faecalibacterium*. Такие микроорганизмы усиливают усвоение углеводов и способствуют повышению глюкозы в крови. Одновременно они обеспечивают организм фолиевой кислотой и витамином B1 [8, 33].

Выявление конкретного энтеротипа дает возможность принимать во внимание метаболические особенности и определять предрасположенность к определенным заболеваниям. Вместе с тем следует помнить, что кишечная микробиота каждого человека уникальна и стабильна [16].

Таксономический профиль кишечной микробиоты сильно отличается от человека к человеку, и это не зависит от способа классификации. При этом микробиота играет важную роль в жизни организма. Ее можно назвать отдельным органом, она поддерживает гомеостаз наравне с другими органами и системами [6, 12, 16].

Колонизационная резистентность формируется благодаря микробиоте [144]. Кроме того, микробиота участвует в регуляции газового состава и окислительно-восстановительного потенциала не только в кишечнике, но и в других полостях организма хозяина [151]. Ферменты, вырабатываемые микробиотой, вовлечены в метаболизм белков, углеводов и липидов; они также улучшают пищеварение и усиливают перистальтику кишечника [72]. Участвует в водно-солевом обмене [144].

Микробиота снабжает эукариотические клетки энергией [73], обезвреживает экзогенные и эндогенные метаболиты через гидролиз и восстановление [144, 185], синтезирует биологически активные соединения и участвует в иммунных реакциях. Она также влияет на слизистую кишечника, состояние желёз и эпителия,

может проявлять мутагенные или антимутагенные свойства [144] и нейтрализовать канцерогенные вещества [180].

Ключевая роль нормальной микробиоты состоит в ее вкладе в формирование колонизационной резистентности (под которой понимается устойчивость, сопротивляемость заселению чужеродными микроорганизмами). Механизмы такой защиты работают комплексно. Многие представители нормобиоты прочно прикрепляются к эпителию слизистой оболочки кишечника, формируя пристеночный барьер, который физически мешает патогенным и условно-патогенным возбудителям закрепиться на стенке кишки. Продуцируют вещества, угнетающие рост и размножение «чужаков» (органические кислоты, перекись водорода и другие биологически активные соединения). За счет таких механизмов собственная микробиота успешно конкурирует с патогенами за питательные ресурсы, что дополнительно ограничивает их распространение.

Главным регулятором численности и видового состава нормальной микробиоты выступает сам макроорганизм, который обеспечивает так называемую колонизационную резистентность, обусловленную свойствами хозяина. Реализуется эта функция через множество различных механизмов и факторов:

1. Макроорганизм управляет микробиотой через механические факторы. Например, микробы удаляются с отшелушивающимся эпителием и секретами, а также за счёт перистальтики кишечника и тока мочи в мочевом пузыре;
2. Работают и химические барьеры. К ним относятся соляная кислота желудка, кишечный сок и желчные кислоты тонкой кишки, щелочной секрет её слизистой, а также бактерицидные выделения кожи и слизистых;
3. Отдельно стоит иммунитет. Секреторные антитела класса IgA подавляют прилипание бактерий к слизистым [12, 27].

1.2 Нарушения микробиоценоза кишечника при антибиотик-ассоциированной диарее

Гомеостаз кишечной микробиоты может быть нарушен многими факторами, в том числе лекарствами, диетой, болезненными состояниями и вакцинацией [103,

215]. Антибиотик-ассоциированная диарея (ААД) представляет собой распространенное ятрогенное осложнение антибактериальной терапии, частота которого варьирует от 5 до 30% в зависимости от класса антибиотика, дозы и длительности лечения. Патогенез ААД тесно связан с нарушением микробиоценоза кишечника – дисбиозом, который характеризуется снижением видового разнообразия микробиоты, изменением ее метаболической активности и утратой колонизационной резистентности [57, 101, 133, 154, 152].

ААД остается одной из наиболее частых причин прерывания или модификации антибактериальной терапии в стационарных и амбулаторных условиях. По данным систематического обзора и мета-анализа, проведенного Motamedi *et al.* [139], среди госпитализированных пациентов наиболее часто выявляемыми возбудителями ААД являются *Clostridioides difficile* (19,6%), *Klebsiella oxytoca* (27%), *Clostridioides perfringens* (14,9%) и *Staphylococcus aureus* (5,2%). Инфекция, вызываемая бактерией *Clostridioides difficile* (CDI, ИКД) остается ведущей причиной тяжелых форм ААД [110], включая псевдомембранозный колит, особенно в условиях стационаров развитых стран а ее патология опосредована токсинами, выделяемыми бактериями [32, 39].

C. difficile – грамположительная спорообразующая анаэробная палочка, широко распространенная в кишечном тракте человека и животных, а также в окружающей среде. За последнее десятилетие частота и тяжесть инфекции *C. difficile* увеличились во всем мире и стали одной из наиболее распространенных внутрибольничных инфекций. Передача этого возбудителя происходит фекально-оральным путем, и наиболее важными факторами риска являются антибиотикотерапия, пожилой возраст, пребывание в больнице или доме престарелых. Клиническая картина разнообразна и варьируется от бессимптомного носительства, диареи различной степени тяжести, до наиболее тяжелого, угрожающего жизни колита, заканчивающегося смертью. Диагностика основана на прямом обнаружении токсинов A/B *C. difficile* в фекалиях, чаще всего с использованием иммуноферментного анализа (ИФА), но ни один тест не подходит в качестве отдельного теста, подтверждающего ИКД [172, 173, 174].

В педиатрической практике ААД также представляет значимую проблему: проспективное исследование показало, что у детей, перенесших ААД, наблюдается пролонгированный дисбиоз с устойчивым снижением α-разнообразия микробиоты даже после завершения антибиотикотерапии. Это подчеркивает необходимость разработки стратегий профилактики и ранней коррекции нарушений микробиоценоза [110].

Антибиотики, особенно широкого спектра действия (цефалоспорины III поколения, фторхинолоны, карбапенемы, линкозамиды), вызывают серьезные изменения в составе кишечной микробиоты уже в первые 24-72 часа после начала приема. Ключевым последствием является снижение альфа-разнообразия – уменьшение числа видов и равномерности их распределения. В частности, наблюдается снижение представителей фил *Bacteroidetes* и *Firmicutes*, которые в норме доминируют в здоровом кишечнике, и относительное увеличение доли *Proteobacteria*, включая потенциально патогенные энтеробактерии [57, 101, 154, 167].

Утрата колонизационной резистентности – центральный механизм развития ААД. В норме комменсальная микробиота конкурирует с патогенами за нутриенты и адгезивные сайты, продуцирует бактериоцины и поддерживает анаэробную среду, неблагоприятную для аэробов. Антибиотики нарушают эти защитные механизмы, создавая «экологические ниши» для экспансии оппортунистических патогенов, таких как *C. difficile*, *Klebsiella oxytoca* и *Candida albicans* [17, 102, 135, 168].

Дисбиоз при ААД сопровождается глубокими метаболическими сдвигами. Одним из наиболее значимых является снижение продукции короткоцепочечных жирных кислот (КЦЖК), особенно бутирата, ацетата и пропионата. Бутират служит основным источником энергии для колоноцитов, поддерживает целостность эпителиального барьера и обладает противовоспалительным действием через ингибирование NF-κB [7]. Его дефицит ведет к нарушению барьерной функции, повышению проницаемости кишечника и усилению воспаления [17, 87, 102, 135, 177].

Другой ключевой механизм связан с нарушением метаболизма желчных кислот. В норме комменсальные бактерии (преимущественно *Clostridioides* кластеров XIVa и IV) конвертируют первичные желчные кислоты (холевую и хенодезоксихоловую) во вторичные (дезоксихоловую и литохолевую), которые ингибируют прорастание спор *C. difficile*. Антибиотики, подавляя эти бактерии, приводят к накоплению первичных желчных кислот (особенно таурохолевой), которые, напротив, стимулируют герминацию спор и вегетативный рост *C. difficile* [137].

C. difficile остается наиболее изученным и клинически значимым возбудителем ААД. Современные данные подчеркивают, что *C. difficile* не просто пассивно использует нарушенную микробиоту, но и активно поддерживает дисбиоз через модуляцию иммунного ответа и метаболизма желчных кислот, создавая условия для рецидивов [86, 94, 112, 203].

Однако важно отметить, что до 50% случаев ААД не связаны с C. difficile. В таких случаях патогенез может быть обусловлен: избыточным ростом *K. oxytoca* (особенно после применения пенициллинов), вызывающим геморрагический колит; активацией *C. perfringens* с продукцией энтеротоксинов; прямым токсическим действием антибиотиков на эпителий (например, макролиды, усиливающие моторику); нарушением всасывания углеводов и осмотической диареей из-за снижения бактериальной ферментации [168, 135].

1.3 Обезьяны как объект экспериментальных моделей в медицине и биологии

Для широкого применения обезьян в медико-биологических исследованиях и корректной организации их содержания и разведения в неволе необходимо понимать нозологическую патологию, характерную для разных видов приматов. В настоящее время накоплен обширный массив данных о спонтанных заболеваниях, возникающих у обезьян при жизни в неволе [9].

В ФГБНУ «НИИ МП» были проведены исследования по изучению кишечной микробиоты кишечника различных видов низших азиатских и африканских

обезьян. Выяснили, что по таксономическому, качественному и количественному составу близка к микробиоте здорового человека. Такая микробиота участвует в обменных процессах, поддерживает гуморальный иммунитет, синтезирует витамины и подавляет размножение патогенных, а также гнилостных бактерий [10, 21]. У здоровых животных в кишечнике наиболее многочисленными и постоянно встречающимися (у 100% особей) в высоких концентрациях являются *Bifidobacterium bifidum* и *Escherichia coli* с нормальной ферментативной активностью, а также аэробные молочнокислые бактерии [2]. Основные представители микробиоты кишечника обезьян представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Состав микробиоты содержимого толстой кишки у клинически здоровых обезьян

Выделяемые микроорганизмы	**Частота выделения, %**
Бифидобактерии	100
Лактобациллы	100
Кишечная палочка биологически полноценная	100
Кишечная палочка со сниженной ферментативной активностью	42-51
Энтерококки	100
Микробы рода протей	60-65
Стафилококки сапрофитные	60-65
Дрожжи и дрожжеподобные грибы	20-22

К причинам, провоцирующим у обезьян дисбактериоз (нарушение количественного и качественного состава кишечной микробиоты), относят эмоциональный стресс, изменение привычного рациона, антибиотикотерапию, индуцированные иммунодефицитные состояния, а также острые и хронические кишечные инфекции с неустановленным возбудителем. В микробиоте кишечника больных обезьян максимальная частота обнаружения бифидобактерий не превышает 16%, что свидетельствует о резком снижении их концентрации.

Нарушение баланса кишечной микробиоты (качественное или количественное) позволяет выделить три последовательные степени дизбиоза. Для начальной (первой) стадии дизбиоза характерно заметное уменьшение численности полноценной в биологическом отношении кишечной палочки. При этом количество условно-патогенных микроорганизмов (УПМ) увеличивается на

фоне достаточно высокого уровня бифидобактерий. Вторая степень дизбиоза характеризуется тем, что начинает доминировать либо отдельный вид условно-патогенных микробов, либо их ассоциации. В то же время количество бифидобактерий уменьшается до минимальных нормативных значений. Наиболее тяжелая, третья, стадия дизбиоза сопровождается следующими изменениями. Доля УПМ резко увеличивается, причем среди них начинают преобладать микроорганизмы рода *Proteus*. Одновременно растет количество ферментативно неполноценных, а также гемолитических форм кишечных палочек (*Escherichia coli*). На этом фоне численность бифидобактерий либо катастрофически падает, либо они полностью исчезают [4, 5, 15].

Проведенные ранее исследования показали, что содержащиеся в неволе приматы дублируют кишечный микробиом человека, и таким образом могут восполнить недостаток данных для лучшего понимания микробного состава кишечника и заболеваний [202].

Исследования на биологических моделях имеют решающее значение для оценки реакция всего организма и исключают воздействие окружающей среды на результаты. Учитывая огромное влияние окружающей среды на микробиоту кишечника и степень, в которой микробиота кишечника участвует во множестве систем организма, биологические модели особенно полезны в этой области. Хотя такая модель, как грызуны, несомненно, полезна, она не может воспроизвести состояние человека в той же степени, что и модели на основе нечеловекообразных приматов, например, хорошо изученные макаки резусы (*Macaca mulatta*). В отличие от исследований на людях, в исследованиях нечеловекообразных приматах, можно полностью описать рацион питания и историю болезни, а исследования можно спланировать так, чтобы обеспечить всесторонний мониторинг субъектов и строгое соблюдение протокола. По сути, исследования на макак резусах могут быть направлены на устранение или уменьшение влияния факторов образа жизни на микробное сообщество [28]. Кроме того, в отличие от грызунов, макаки резусы демонстрируют модель поведения, питания и сна, которые повторяют человеческие, имеют продолжительность жизни, измеряемую

десятилетиями, а также развиваются и стареют так же, как люди. Более того, последовательность макак резус примерно на 93% идентична последовательности генома человека [28, 218], и это сходство распространяется на многочисленные аспекты их анатомии, физиологии, неврологии, эндокринологии, иммунологии и поведения [28, 60]. Широта использования обезьян, в частности макак резусов в биомедицинских исследованиях демонстрирует их как релевантную модель для изучения кишечной микробиоты.

Исследования, изучающие различия в микробиоме кишечника у содержащихся в неволе и диких нечеловекообразных приматов, показали, что подобно микробиому человека, фекалии содержащихся в неволе макак резусов обогащены *Bacteroidetes, Firmicutes* и *Proteobacteria* [9, 204, 205].

В микробиоте кишечника диких макак резусов преобладают *Firmicutes, Bacteroidetes* и *Spirochaetes*. Было обнаружено, что разнообразие и богатство кишечной микробиоты были выше в засушливый сезон, чем в сезон дождей. В частности, в засушливый сезон были обнаружены более высокие доли *Firmicutes, Tenericutes, Cyanobacteria* и неклассифицированных бактерий на уровне типа и больше *Coprococcus* на уровне рода [119]. Также проводили исследование кишечной микробиоты содержащихся в заповеднике и диких популяций макак резус. Наиболее доминирующими типами были *Firmicutes* и *Bacteroidetes*, за ними следовали *Actinobacteria, Spirochetes, Proteobacteria* и *Tenericutes* [49]. На уровне типа *Bacteroidetes, Spirochetes, WPS-2* и *Fibrobacteres* были более обогащены у дикой популяции, тогда как *Firmicutes* и *Verrucomicrobia* были более обогащены у популяции, содержащейся в заповеднике. Полученные данные, соответствует предыдущим данным, полученным на макак резусах, людях и других видов приматов, обитающих в разных средах [31, 75, 116, 160, 195, 212]. Различия можно объяснить различиями в составе рациона, поскольку дикие макаки питаются исключительно натуральными продуктами, в отличие от макак, живущих в условиях неволи. В целом дикие животные имеют более высокое микробное разнообразие кишечника, чем животные в неволе, из-за более сложного состава рациона [134, 140].

В Висконсинском национальном исследовательском центре приматов провели исследование кишечной микробиоты макак резусов. Животные содержались в хорошо контролируемых условиях, аналогичных нашим. Результаты продемонстрировали ограниченное влияние возраста на микробиоту и отсутствие половых различий. Возможность контролировать внешние факторы является преимуществом изучения кишечной микробиоты на макак резусах [28].

1.4 Современные подходы к коррекции кишечной микробиоты: от пробиотиков до трансплантации

Широкое внедрение методов молекулярной генетики для изучения кишечного микробиома, позволили подтвердить, что микробный комплекс участвует в возникновении многих заболеваний, имеющих социальное значение. Полученные результаты привели к резкому росту интереса к подходам, направленным на регуляцию состава и активности микробиоты с целью оздоровления человека. Наиболее распространенным способом решения этой задачи на сегодняшний день является использование пробиотиков. Под такими препаратами понимают живых микробов, которые при введении в организм оказывают на него благотворное влияние [7].

Еще на ранних этапах существования человеческого общества люди уже использовали в пищу продукты, прошедшие ферментацию. Именно с этого момента принято отсчитывать историю применения пробиотиков [74]. Илья Мечников выдвинул гипотезу о том, что состояние организма человека способна улучшить целенаправленная регуляция кишечной микробиоты. Для этого он предлагал использовать благотворные микроорганизмы, содержащиеся в йогурте. Это стало концепцией пробиотиков в медицине [126]. Подобные микроорганизмы обладают способностью благотворно влиять на состав кишечной микробиоты. Кроме того, они сокращают численность патогенов, которые продуцируют токсины в человеческом кишечнике. В прошлом для лечения заболеваний использовались несколько микроорганизмов, что привело к появлению термина «пробиотики» [114]. В 1954 году Фердинанд Вергин (Vergin F.) впервые ввел в

научный оборот термин «пробиотики» в своей статье «Anti- und Probiotika» [197]. Кроме того, ученый обратил внимание на то, антибиотики оказывают негативное действие на микрофлору кишечник. Полезные бактерии, наоборот благотворно влияют на здоровье человека. Именно такое воздействие он обозначил термином «пробиотикой» [162, 201].

Первое средство на основе пробиотиков создали как лекарство против инфекции, которую вызывала кишечная палочка (*E. coli*) у поросят [143]. Аналогичные результаты получили Манн и Сперига. В ходе своих наблюдений они выяснили, что у тех людей, которые регулярно ели йогурты, подвергнутые ферментации с участием *Lactobacillus* spp., содержание холестерина в крови оказалось пониженным [127]. Позднее Харрисон и соавторы [83] зафиксировали снижение уровня холестерина в сыворотке крови у младенцев, употреблявших *Lactobacillus acidophilus*.

По мнению экспертов Всемирной организации здравоохранения, (ВОЗ), пробиотики следует рассматривать в качестве важнейшего резервного компонента иммунной защиты. К такому подходу прибегают в тех ситуациях, когда стандартно назначаемые антибактериальные средства не дают результата в отношении ограниченного круга возбудителей [115, 147]. Такие обитатели кишечной микробиоты, как *Lactobacillus, Bifidobacterium* и *Enterococcus*, оказывают положительное влияние на организм, поддерживая гомеостаз микробного сообщества в кишечнике. Важно, что эти микроорганизмы в норме входят в состав микробиоты как человека, так и животных. Пробиотики оказывают многогранное положительное воздействие на организм человека: они подавляют аллергические реакции, борются с грибковыми инфекциями, снижают выраженность непереносимости лактозы, способствуют заживлению язвенной болезни и купированию диареи, активируют иммунную систему и служат профилактическим средством против колоректального рака [132].

Действие пробиотиков при кишечных заболеваниях объясняется несколькими механизмами. Наиболее эффективный из них – колонизация кишечника, позволяющая бактериям закрепиться и работать. Помимо этого,

пробиотики подавляют патогенную микробиоту за счет выработки разнообразных ингибирующих соединений: органических и короткоцепочечных жирных кислот, углекислого газа, перекиси водорода, ацетальдегида, ацетоина, диацетила, а также бактериоцинов и близких к ним веществ [24, 190]. Бактериоцины – это антимикробные соединения пептидной или белковой природы. Их синтез происходит на рибосомах, и вырабатываются они разными видами бактерий. Диапазон действия таких веществ может быть, как очень ограниченным, так и весьма широким. Бактериоцины эффективны против болезнетворных микроорганизмов, в частности против возбудителей, относящихся к родам *Bacillus, Staphylococcus, Listeria, Clostridioides*, а также некоторых других [58, 63].

Значение бактериоцинов, продуцируемых пробиотическими штаммами, заметно выросло благодаря тому, что эти соединения можно безопасно применять в пищевой промышленности, фармацевтике, ветеринарной практике, а также при создании лекарственных препаратов для людей [38, 120, 171, 181]. Эти соединения могут подавлять как отдельные виды бактерий, так и широкий спектр микроорганизмов. Их действие основано на снижении выживаемости микробных клеток, нарушении внутриклеточного метаболизма, а также на угнетении синтеза токсинов [50, 173, 174].

Пробиотические микроорганизмы способны конкурировать с болезнетворными бактериями за рецепторы на поверхности кишечного эпителия: они закрывают собой участки возможного прикрепления, что в итоге снижает адгезию патогенов к клеткам хозяина. Конкуренция за питательные ресурсы – еще один механизм, с помощью которого пробиотики подавляют патогенную микрофлору. Они ограничивают доступ вредоносных бактерий к необходимым для роста соединениям, тем самым угнетая их развитие [175]. Согласно официальному заключению Европейского ведомства по безопасности продовольствия (EFSA), ряд штаммов, относящихся к группе пробиотических молочнокислых микроорганизмов (LAB), допустимо признавать обладателями статуса Квалифицированная презумпция безопасности (QPS) [108]. Благодаря этому указанные микроорганизмы активно применяются в качестве заквасок при

ферментации овощей, зерновых, а также в молочной и мясной промышленности [26].

Недавно эксперты Международной научной ассоциации пробиотиков и пребиотиков (ISAPP, International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics) пересмотрели формулировку понятия «пребиотик». Специалисты пересмотрели определение термина «пребиотик» и предложили расширенную трактовку. Это субстрат, который избирательно утилизируется микроорганизмами, обитающими в теле человека или животного, что в итоге приносит пользу здоровью хозяина. Такая формулировка существенно расширяет классическое представление о пребиотиках. В частности, она открывает возможность включать в это понятие соединения неуглеводной природы, использовать подобные средства за пределами желудочно-кишечного тракта (в других частях организма), а также относить к ним более широкие классы веществ, не ограничиваясь только пищевыми продуктами [71]. Как правило, это короткоцепочечные углеводы, которые не расщепляются в процессе пищеварения и служат питательной базой для роста пробиотических бактерий в начальных отделах желудочно-кишечного тракта [56, 158].

Помимо углеводов, в качестве пребиотиков рекомендуются и другие соединения, например, флаванолы, получаемые из какао-бобов. Способность флаванолов усиливать размножение молочнокислых бактерий подтверждена в экспериментах *in vivo* и *in vitro* [193]. Естественным источником пребиотиков служат многие растения, в том числе топинамбур, цикорий, спаржа, овес, пшеница, лук и чеснок. Стимуляция размножения бактерий в толстой кишке происходит благодаря тому, что такие продукты активируют в пищеварительном тракте метаболические процессы [56]. По данным исследований, включение в рацион фруктоолигосахаридов приводит к выраженному увеличению содержания бифидобактерий в фекалия [59, 122]. Короткоцепочечные полимеры из 2-20 мономерных звеньев, в роли которых обычно выступают ксилоза, галактоза, глюкоза или фруктоза, не подвергаются гидролизу в кишечнике и называются пребиотиками. Кроме того, данные вещества обладают энергетической ценностью. Это объясняется тем, что они не расщепляются в толстом кишечнике, а их

метаболизм за счет брожения обеспечивает поступление дополнительных калорий [159]. В числе пребиотиков, которые привлекают наибольшее внимание исследователей, относятся фруктоолигосахариды (ФОС), ксилоолигосахариды (КОС) и изомальтоолигосахариды (ИМО).

К ценным пищевым волокнам относятся инулин и неосахар, которые входят в группу фруктоолигосахаридов. Их потребление увеличивает объем каловых масс, облегчает запоры и снижает pH (подкисляет содержимое кишечника) [55]. Инулин содержится во многих растениях и поступает в продажу главным образом в виде экстракта, извлекаемого из корней цикория. Для этого соединения доказана способность стимулировать размножение бифидобактерий [70].

Неосахар (также известный под названием мейолиго) синтезируют из сахарозы ферментативным путем с помощью *β*-фруктозидазы, выделяемой *Aspergillus niger*. Данный фермент переносит остатки фруктозы, то есть проявляет трансфруктозилирующую активность.

Эти два соединения служат легкоусвояемым субстратом как для бифидобактерий, так и для других обитателей микробного сообщества, в частности для *Lactobacillus acidophilus*, рода *Enterococcus* (*E. faecium, E. faecalis*), нескольких видов *Bacteroides* spp. (*B. thetaiotaomicron, B. vulgatus, B. fragilis, B. ovatus*) [59, 78].

Питательным субстратом для бифидобактерий и представителей рода *Bacteroides* служат ИМО, которые содержатся в ферментированных продукта (мисо, соевый соус, мед) [106]. Под воздействием ИМО увеличивается численность *Lactobacillus* spp. и *Bifidobacterium spp.* Благодаря этому происходит модуляция иммунной системы и возникают местные и системные реакции по Th-1-типу, что согласуется с данными клинических исследований [207].

Ксилоолигосахариды относятся к пребиотическим соединениям нового поколения и в естественном виде содержатся во многих продуктах, включая мед, молоко, овощи, фрукты, молодые стебли бамбука и других аналогичных источниках [24, 196]. Представители вида *Bifidobacterium teenis* способны утилизировать КОС, тогда как такие бактерии, как *Lactococcus lactis, Lactobacillus plantarum* и *Lactobacillus rhamnosus*, эффективно потребляют *β*-

глюкоолигосахариды [141]. Бифидобактерии могут сбраживать арабино-ксилоолигосахариды, выделенные из пшеничной муки, за счет ферментных систем, расщепляющих ксилан. В число таких ферментов входят ксилозидаза и некоторые арабинозидазы. Согласно начным данным *β*-D-ксилозидаза обнаружена у *Bifidobacterium breve* K-110, арабинозидазы выявлены у *B. teenagelis* DSM20083 [141] и *B. breve* [176]. Помимо них, исследованию подверглись также *B. infantis*, *B. teenis* и *B. bifidum*. Установлено, что все перечисленные виды синтезируют исключительно ксилозидазу и арабинозидазу, тогда как активность ксиланазы, α-глюкуронидазы и ацетилксиланэстеразы у них отсутствует [208]. Гуллон и др. [80] исследовалась способность ряда пробиотических штаммов к ферментации ксилоолигосахаридов, полученных из рисовой шелухи. Авторы установили, что при выращивании на среде в присутсвии КОС штамм *B. teenis* CECT 5781 демонстрировал более активный рост, чем *B. longum* CECT 4503*, B. infantis CECT 4551* и *B. breve* CECT 4839.

Применяемые для укрепления здоровья человека и животных синбиотики представляют собой комбинацию в одном препарате пробиотических и пребиотических компонентов [129]. В составе синбиотических продуктов пребиотические компоненты служат питательной средой, которая избирательно усваивается пробиотическими бактериями и используется ими для размножения [150, 170]. Согласно новой классификации, предложенной экспертами Международной научной ассоциации пробиотиков и пребиотиков (ISAPP) после недавнего пересмотра определения понятия «синбиотики», они подразделяются на две категории: комплементарные и синергетические. Комплементарный тип синбиотика представляет собой сочетание пробиотика и пребиотика, которое приносит организму одну или несколько полезных функций, однако эти компоненты не обязаны действовать взаимозависимо. Синергетический же тип представляет собой, который избирательно утилизируется теми микроорганизмами, что вводятся вместе с ним [186]. Данные положения в будущем могут оказаться полезными для выяснения характера взаимосвязей между

пребиотиками и пробиотиками, а также для конструирования синбиотических средств, применяемых в медицинской практике и терапии.

В ряде научных исследований было показано, что синбиотики благотворно воздействуют на здоровье и пищевой статус организма-хозяина. Наблюдения показали, что на фоне приема синбиотиков происходило не только нарастание численности пробиотических микроорганизмов (включая бифидо- и лактобактерии) в кале, но и сопутствующее уменьшение количества колиформных бактерий. В экспериментальной группе возрастала активность таких пищеварительных ферментов, как изомальтаза, лактаза, липаза и сахараза [204]. У пациентов пожилого возраста прием синбиотиков привел к снижению ряда факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний, уменьшению выраженности метаболического синдрома и улучшению показателей, связанных с инсулинорезистентностью [53]. Решающую роль при целенаправленной коррекции кишечного микробного сообщества посредством тех или иных пребиотических веществ играет то, насколько избирательно бифидобактерии конкретного вида способны перерабатывать соответствующие субстраты [41, 42].

Например, у штамма *Bifidobacterium teenis* G1 β-фруктофуранозидаза взаимодействует с фруктоолигомерами, но не проявляет активности по отношению к инулину [194], аналогичная картина получена для *B. bifidum* [84]. В противоположность этому, штаммы *B. longum* и *B. animalis* способны расщеплять широкий спектр фруктоолигосахаридов и ксилоолигосахаридов, в том числе инулин. Согласно имеющимся данным, максимальное содержание живых бифидобактерий отмечается именно в пищевых продуктах [46]. Та же тенденция характерна и для *B. longum*, внесение фруктоолигосахаридов в творожный продукт повышает выживаемость этих бактерий. Рост и метаболизм пробиотика *B. lactis* стимулируются за счет использования олигосахаридов в ферментированном молоке, чему способствуют ферменты β-глюкозидаза и β-фруктофуранозидаза [130, 169].

Постбиотики – соединения, создаваемые или выделяемые микробами при метаболизме и способные прямо или косвенно приносить пользу хозяину [7].

Сегодня этим термином (иногда ошибочно – «метабиотики») чаще обозначают метаболиты и растворимые факторы: бесклеточные супернатанты, продукты и побочные продукты обмена, которые секретируют живые бактерии [138].

«Термин „метабиотики“ объединяет три группы соеденинений: структурные компоненты пробиотических бактерий, продукты их метаболизма (метаболиты) и сигнальные молекулы с определенным химическим строением. Данные соединения способны благоприятно влиять на физиологические функции организма-хозяина, а также на его регуляторные, обменные и поведенческие реакции, которые, в свою очередь, находятся в прямой зависимости от активности собственной микробиоты хозяина» [142, 172].

В 2019 году Международная научная ассоциация пробиотиков и пребиотиков (ISAPP) рассмотрели определение и сферы применения постбиотиков. Термин «постбиотики» все чаще встречается в научной литературе и коммерческих продуктах, однако используется непоследовательно и не имеет четкого определения. Группа определила постбиотик как «препарат неодушевленных микроорганизмов и/или их компонентов, который приносит пользу здоровью хозяина». Эффективные постбиотики должны содержать инактивированные микробные клетки или клеточные компоненты с метаболитами или без них [161].

«Действие постбиотиков на клетки-хозяева заключается в распространение микробных штаммов, считающихся полезными для здоровья, и подавление развития негативных штаммов. В зависимости от вида микроорганизма, штамма и продукта метаболизма эффекты постбиотиков весьма различны, как и пребиотиков. Наиболее важными полезными эффектами постбиотиков, в частности КЦЖК, являются их противовоспалительные и антиоксидантные свойства" [131]. Постбиотики особенно перспективны в педиатрической практике, поскольку они имеют некоторые преимущества перед пробиотиками, включая отсутствие риска кишечной транслокации или ухудшения местного воспаления [155].

Парапробиотиками называют инактивированные (неживые) формы пробиотических микроорганизмов, которые состоят из убитых микробных клеток

или их фрагментов. Введение таких препаратов в организм способствует укреплению здоровья человека или животного [7, 132, 187].

Терапевтический эффект парапробиотиков во многом определяют поверхностные структуры микробных клеток (пептидогликан, тейхоевые кислоты, полисахариды, белки). Согласно имеющимся данным, именно они, как и в случае с живыми пробиотиками, первыми контактируют с организмом хозяина. Однако точные механизмы действия парапробиотиков требуют дальнейшего изучения [188].

«В последнее десятилетие доказательства эффективности парапробиотиков в профилактике и лечении ряда заболеваний, вызывающих диарею, колит, респираторные, кишечные расстройства, воспаление и аллергию, были подтверждены исследованиями *in vivo* на животных и клиническими испытаниями на людях» [7, 95]. Особое внимание уделялось оценке эффективности парапробиотиков в группах риска, поскольку пробиотики в таких случаях могут быть потенциально опасны [29]. В работе Корниенко показано, что в наиболее уязвимых возрастных группах парапробиотики могут быть предпочтительны, прежде всего, с точки зрения безопасности [7].

По данным Martyniak и соавт. [131], «применение парапробиотиков, для которых нет риска возникновения побочных эффектов, связанных с нарушением иммунитета, может быть хорошей альтернативой для пациентов с ВЗК, сочетая преимущества пробиотиков и исключая возможность побочных эффектов». Противовоспалительная, иммуномодулирующая, антипролиферативная и антиоксидантная активность парапробиотиков, установленная в опытах *in vitro*, открывает широкие перспективы для их применения с целью профилактики и ослабления симптомов воспалительных заболеваний кишечника у человека [131].

Мета-анализ 42 рандомизированных контролируемых исследований (11 305 участников) показал, что совместный прием пробиотиков с антибиотиками снижает риск ААД на 37% (RR = 0,63; 95% CI 0,54–0,73). Наиболее эффективными оказались штаммы *Saccharomyces boulardii, Lactobacillus rhamnosus* GG, *L. casei, Bifidobacterium* spp. и многокомпонентные препараты. Механизмы действия

включают: конкурентное исключение патогенов; продукцию бактериоцинов и органических кислот; усиление барьерной функции; модуляцию иммунного ответа [76, 203]. Пребиотики (инулин, фруктоолигосахариды, галактоолигосахариды) и синбиотики также демонстрируют потенциал в восстановлении микробиоты, особенно за счет стимуляции роста бутират-продуцирующих бактерий [111].

Перспективными направлениями коррекции ААД являются: применение постбиотиков (бутират, бактериоцины, внеклеточные везикулы); узконаправленные антибиотики (например, фидаксомицин, минимально влияющий на микробиоту); фаготерапия против *C. difficile*; модуляторы желчных кислот (например, урсодезоксихолевая кислота) [86, 112].

Трансплантация кишечной микробиоты (ТКМ) – это метод лечения, в ходе которого фекальный материал от здорового донора переносится пациенту-реципиенту. Основная цель метода заключается в нормализации состава кишечной микробиоты и получении положительной клинической динамики [175]. Широкое признание ТКМ обусловлено ее высокой эффективностью в терапии рецидивирующих инфекций, вызываемых *Clostridioides difficile* (rCDI*,* рИКД*)* и воспалительных заболеваний кишечника [32, 39, 91, 136, 177, 189].

Современная клиническая медицина прочно утвердилась в зависимости от кишечной микробиоты для хорошего здоровья из-за недавнего увеличения научных исследований ее роли. Однако медицинская практика, включающая вливание фекалий, существует с древних времен. Первые записи о трансплантации кишечной микробиоты относятся к Китаю. Во времена китайской династии Дун-Цзин Трансплантация кишечной микробиоты была впервые описана в четвертом веке, где человеческие фекалии назывались желтым супом и использовались у пациентов с тяжелой диареей. Китайский врач сообщил об успешном спасении жизни, давая пациентам фекалии через рот при пищевом отравлении или тяжелой диарее. Во времена династии Мин ряд желудочно-кишечных заболеваний, включая диарею, рвоту, запор и боль, лечили свежими или ферментированными фекальными суспензиями [211].

Медицинская теория, называемая трансфаунацией, основанная на переносе содержимого желудочно-кишечного тракта между здоровыми и больными животными, была разработана итальянским хирургом и анатомом Андреа Аквапенденте, позже это широко применялось в ветеринарии. Немецкий врач Кристиан Пауллини описал терапевтический потенциал человеческих выделений в своей книге «Heilsame Dreck-Apotheke» (*Аптека целебных нечистот или Аптека здоровой грязи)* [44, 45]. Антони ван Левенгук обнаружил, что в стуле содержатся микробы, назвав их «мельчайшими созданиями Бога». За этим открытием последовали наблюдения русского ученого И. И. Мечникова [189, 199].

В начале 1940-х годов была открыта *Bacillus subtilis*, обладающая полезными свойствами при лечении инфекционного гастроэнтерита. Немецкие ученые были вынуждены разработать лечение после того, как во время Второй мировой войны, немецкие солдаты из Африканского корпуса умерли от местной дизентерии. Выделение *Bacillus subtilis* из верблюжьих фекалий произошло, когда более обеспеченные местные жители потребляли свежие верблюжьи фекалии при первых признаках болезни. Большинство пациентов излечились от болезни после культивирования и введения бактерии [62]. Однако вышеупомянутые данные были опровергнуты в исследование Нинке Купман.

Утверждение о том, что верблюжий помет издавна применялся при дизентерии, а также его связь с историей возникновения фекальной трансплантации, вызывает серьезные сомнения. Поэтому в публикациях о происхождении этого метода не стоит ссылаться на подобные «факты», ведь количество спор *Bacillus subtilis* в одном грамме верблюжьих экскрементов на несколько порядков ниже терапевтической дозы, необходимой для уменьшения жидкого стула или диареи, связанной с антибиотиками [107].

Доктор Эйсман и его коллеги использовали фекальные клизмы здоровых доноров для лечения четырех пациентов с псевдомембранозным колитом после того, как другие методы лечения оказались неэффективными [62]. Все субъекты полностью выздоровели благодаря лечению. В течение следующих двух десятилетий для этой процедуры было отобрано в общей сложности 16

дополнительных случаев. Показатель успеха в 94% в группе пациентов, резистентных к терапии, был многообещающим [189].

45-летний мужчина, страдающий рефрактерным язвенным колитом после введения инфузии «бактериальной флоры» от здорового донора, продемонстрировал клиническое улучшение после введения инфузии бактериальной флоры от здорового донора в качестве первого документально подтвержденного случая ТКМ при неинфекционном заболевании [30, 44, 62].

Исследователи сообщили о лечении более 700 пациентов с ТКМ по поводу рИКД после эксперимента Эйземана. По данным трех недавних рандомизированных контролируемых исследований, уровень излечения от этого заболевания составляет 90% и более, без побочных эффектов или возникновения каких-либо новых заболеваний в период наблюдения [100]. В 2013 году Элс и соавторы [179], пациентов с рецидивирующими инфекциями *Clostridioides difficile* лечили дуоденальными инфузиями донорских фекалий. Исследование показало, что дуоденальная инфузия донорских фекалий более эффективна для устранения симптомов, чем применение одних только антибиотиков. После того, как клиническое использование ТКМ перешло от инфекционных заболеваний к неинфекционным, диапазон применения ТКМ быстро расширился. Более того, новые данные о связи кишечной микробиоты с внекишечными заболеваниями еще больше расширят клиническую практику ТКМ [199].

Все больше данных, среди которых мета-анализы, систематические обзоры и рандомизированные контролируемые исследования (РКИ), подтверждают, что трансплантация кишечной микробиоты работает как лечение при рецидивирующей инфекции вызванной *Clostridioides difficile* [60, 97, 113, 179, 215]. Исследования показали эффективность ТКМ у пациентов с rCDI, было обнаружено, что применение ТКМ в качестве мототерапии или в комбинации с ванкомицином превосходит схему лечения ванкомицином или фидаксомицином [92, 215]. Управление по контролю за продуктами питания и лекарствами США (FDA) в ноябре 2022 года, впервые одобрили препарат «Rebyota» для профилактики у взрослых rCDI, содержащий фекальную микробиоту человека [64].

Эффективность трансплантации кишечной микробиоты во многом определяется качественным подбором донора. В зависимости от происхождения калового материала различают аллогенных и аутологичных доноров. На практике предпочтение отдают аллогенному варианту, поскольку он позволяет применять схему «один донор – много реципиентов». Более того, он продемонстрировал улучшенную эффективность по сравнению с аутологичным источником [200, 209].

Чтобы уменьшить и предотвратить возникновение нежелательных явлений, рекомендуется проводить строгие скрининговые тесты доноров на ТКМ [183, 184]. Руководящие принципы, принятые на согласительной конференции в США и на Европейской конференции, предлагают использовать анкету донора для соответствия критериям исключения и включения [36, 47, 145, 178, 199]:

Критерии включения: Возраст 18-65 лет. Отсутствие в анамнезе или текущих симптомов желудочно-кишечных заболеваний. Отсутствие других серьезных активных сопутствующих заболеваний. Отсутствие приема препаратов способных повлиять на микробиоту кишечника, включая противомикробные препараты (антибиотики, противогрибковые и противовирусные препараты) или пробиотики в течение предшествующих 3 месяцев.

Критерии исключения: Риск инфекционного агента (Известная инфекция ВИЧ, гепатита В или гепатита С. Известный контакт с ВИЧ или вирусным гепатитом в течение предыдущих 12 месяцев. Сексуальное поведение высокого риска (например, сексуальный контакт с человеком, больным ВИЧ (вирус иммунодефицита человека), СПИДом (Синдром приобретенного иммунодефицита) или вирусным гепатитом, мужчинами, имеющими половые контакты с мужчинами, секс ради наркотиков или денег). Употребление наркотических веществ, татуировка или пирсинг в течение предшествующих 6 месяцев. Известное текущее инфекционное заболевание (например, инфекция верхних дыхательных путей). Факторы риска варианта болезни Крейтцфельдта-Якоба. Поездки в течение последних 6 месяцев в регионы мира, где диарейные заболевания являются эндемичными или риск возникновения диареи у путешественников высок).

Желудочно-кишечные сопутствующие заболевания (История или текущее ВЗК. Синдром раздраженного кишечника в анамнезе или в настоящее время, хронический запор, хроническая диарея или другое внутреннее желудочно-кишечное заболевание/состояние. Злокачественные заболевания желудочно-кишечного тракта или текущий полипоз в анамнезе или отягощенный семейный анамнез по колоректальному раку. В анамнезе серьезные операции на желудочно-кишечном тракте (например, желудочное шунтирование, частичная колэктомия).

Факторы, которые могут повлиять на состав кишечной микробиоты (Противомикробные препараты (антибиотики, противогрибковые, противовирусные препараты) или пробиотики в течение предшествующих 3 месяцев. Основные иммунодепрессивные препараты (например, ингибиторы кальциневрина, биологические агенты, экзогенные глюкокортикоиды). Системные противоопухолевые средства. Члены семьи с активной желудочно-кишечной инфекцией).

Другие условия (Системный аутоиммунитет (например, рассеянный склероз, заболевание соединительной ткани). Атопические заболевания (например, астма средней и тяжелой степени, экзема, эозинофильные нарушения желудочно-кишечного тракта). Метаболический синдром, ожирение (ИМТ>30) или недостаточное/недоедание от умеренной до тяжелой степени. Синдромы хронической боли (например, синдром хронической усталости, фибромиалгия) или неврологические нарушения/нарушения развития нервной системы. Злокачественные заболевания в анамнезе или продолжающаяся онкологическая терапия. Тюремное заключение или проживание в учреждении длительного ухода. Пирсинг или татуировка на теле в течение предшествующих 6 месяцев) [1].

Программа обследования донора включает в себя общий клинический и биохимический анализ крови, обследование на сифилис, анализы на носительство вируса гепатитов А, В и С, ВИЧ, цитомегаловируса (ЦМВ), вируса Эпштейна-Барра (ВЭБ), Т-лимфотропного вируса человека [3, 23, 45, 77, 199].

Фекальный материал донора исследуется на наличие токсинов А и В к *C. difficile*, на наличие бактерий (*Salmonella, Shigella, Campylobacter, Escherichia coli*

O157, Staphylococcus aureus, Yersinia, Helicobacter pylori, Vibrioparahaemolyticus etcholerae), грибов рода *Candida*, ротовирус/норовирус, антигена криптоспоридий и ляблий, яйца глист и цист (включая *Blastocystis hominis* и *Dientamoeba frag*ilis), а также определение концентраци кальпротектина [3, 22, 23, 199].

Способы доставки кишечной микробиоты можно разделить по отделам ЖКТ-верхний, средний и нижний [66, 81, 146, 210]. Трансплантация фекалий под гастроскопическим контролем, а также капсулы с микробиотой являются прямыми способами трансплантации в верхний отдел кишечника. Гастроскопические трансплантаты можно проводить до тонкой кишки за пределами второго сегмента двенадцатиперстной кишки, определяемого как средняя кишка, с помощью эндоскопии, назодуденального зонда, трансэндоскопической энтеральной трубки (ТЭТ) средней кишки, стомы тонкой кишки или чрескожной эндоскопической гастроеюностомии (ЧЭГ). Фекальный трансплантат также может быть доставлен в нижний отдел кишечника посредством колоноскопии, клизмы, стомы дистального отдела подвздошной кишки, колостомы и ТЭТ толстой кишки. Согласно недавнему систематическому обзору, среди всех методов доставки ТЭТ толстой кишки, пожалуй, является самым безопасным и имеет самый низкий уровень побочных эффектов [128, 200].

ТЕТ толстой кишки – это последний прогресс в доставке фекального трансплантата. Было доказано, что это безопасная и удобная процедура для многократного проведения ТКМ и введения лекарств в толстую кишку пациентам в возрасте старше 7 лет [149]. Согласно опросу, пациенты, перенесшие процедуру с помощью ТЕТ, с большей вероятностью рекомендовали ТКМ, чем пациенты, которые этого не делали [213]. Чжун и соавторы [214], также сообщили, что ТЭТ толстой кишки является безопасным и удобным методом доставки у детей в возрасте 3-7 лет.

Правила ТКМ различаются в зависимости от страны или региона по всему миру. В целом, ТКМ можно разделить на четыре категории: биологический препарат, продукт на основе клеток или тканей человека, лекарственный препарат или медицинская практика [66, 165, 200]. К сожалению, классификация

национальными агентствами оказывает значительное влияние на прямую доступность продуктов ТКМ для пациентов. Основным преимуществом парадигмы биологического регулирования является гарантия безопасности и эффективности ТКМ при любом заболевании. С точки зрения Крагснес и соавторов [109] централизованная некоммерческая служба трансплантации крови и тканей была идеальной моделью для создания банка стула с высококачественными продуктами ТКМ и обеспечения эквивалентной доступности. Келлер и соовторы [99] предположили, что стул при ТКМ классифицируется как продукт трансплантации, а не как лекарство. Регулирующие органы Австралии и Швейцарии классифицировали ТКМ как исследуемый лекарственный препарат, что сделало ТКМ более доступным для пациентов. Регулирующие органы могут регулировать стул по усмотрению практикующего врача. При таком подходе все решения, касающиеся скрининга доноров, обработки материалов и, возможно, решения, связанные с использованием показаний, делегируются врачу каждого пациента и учреждению, контролирующему его врача [165]. Политика использования ТКМ в Китае является разрешенной медицинской терапией ИКД и многих других заболеваний [123]. В США ТКМ классифицируют как новые исследуемые лекарственные препараты для лечения инфекции *C. difficile*, не поддающейся стандартным методам лечения [199]. Управление по контролю за продуктами питания и лекарствами США (FDA) уже одобрили два препарата для профилактики у взрослых rCDI, содержащие фекальную микробиоту человека, «Rebyota» в жидкой форме [64] и «Vowst» в форме капсул [65].

В Российской Федерации законодательно четко не урегулировано клиническое применение фекального материала. Юридически процедура ТКМ всегда рассматривалась как новый метод лечения. До 2015 года внедрение таких методов на законодательном уровне не регулировалось (за исключением возможности включения в протокол лечения или клинические рекомендации согласно п. 2 ст. 76 Федерального закона «Об основах охраны здоровья граждан в РФ»). В настоящее время для метода ТКМ наиболее целесообразно пройти процедуру клинической апробации в соответствии со статьей 36.1 ФЗ «Об основах

охраны здоровья граждан в Российской Федерации». Важно отметить, если фекальный материал, полученный от донора, предназначен для трансплантации и замораживается без изменения исходного состава, то такая микробиота квалифицируется как биологический материал. Согласно действующим нормам, она не относится ни к лекарственным средствам, ни к продуктам биомедицинского клеточного происхождения.

Приказ № 298н «Об утверждении Порядка диагностики состояния микробиоты, осуществления мер по сохранению или восстановлению нормальной микробиоты человека» был утвержден Минздравом РФ в апреле 2022 года. В пункте 8 говорится, что восстановление нормальной микробиоты проводят в рамках медицинской помощи, опираясь на клинические рекомендации, но сами конкретные методы в приказе не приведены. Поэтому сегодня клиническая апробация или клинические исследования служат правовым основанием для использования ТКМ на практике. Тем не менее отдельные аспекты процедуры, например порядок диагностики состояния микробиоты, могут регулироваться тем же приказом [1]. Несмотря на то, что полезность ТКМ для лечения в целом растет, остаются препятствия для доступа пациентов, усугубляемые сложными нормативными вопросами в разных юрисдикциях. Параллельная международная стандартизация в области надлежащей производственной практики (GMP) для продуктов ТКМ также могла бы поддержать стандарты эффективности и безопасности ТКМ в соответствии с другими биологическими методами лечения и, таким образом, ускорить внедрение в отстающих странах.

ТКМ признана высокоэффективным методом лечения рецидивирующей ИКД (эффективность >85%) и рассматривается как перспективная стратегия восстановления микробиоценоза при тяжелых формах ААД. ТКМ восстанавливает видовое разнообразие, метаболический профиль (КЦЖК, желчные кислоты) и колонизационную резистентность [86, 112]. Однако вопросы стандартизации, безопасности и долгосрочных эффектов требуют дальнейшего изучения.

Представленный литературный обзор убедительно демонстрирует, что кишечная микробиота низших обезьян, особенно макак резусов, по

таксономическому и функциональному профилю близка к таковой у здорового человека. Важным сходством является общность патологических изменений: под действием антибиотиков, стресса и изменений рациона у обезьян развивается дисбиоз со стадийным снижением бифидобактерий и ростом условно-патогенных микроорганизмов, что полностью коррелирует с картиной антибиотик-ассоциированной диареи у человека. Сравнение диких и неволевых особей выявило более высокое разнообразие микробиоты у первых, обусловленное сложным натуральным рационом, тогда как контролируемые условия содержания позволяют нивелировать внешние факторы и делают приматов удобным объектом для изучения фундаментальных механизмов взаимодействия микробиоты и хозяина.

Макаки резусы обладают рядом преимуществ перед грызунами: 93% геномной идентичности с человеком, схожие физиология, иммунология, поведение и продолжительность жизни. Это позволяет использовать их для доклинической оценки современных методов коррекции микробиоценоза – от пробиотиков до трансплантации кишечной микробиоты (ТКМ).

Накопленные сведения обосновывают применение обезьян как высокоинформативной модели с большой трансляционной ценностью для разработки стратегий восстановления микробиоценоза в клинической медицине.

ГЛАВА 2 Материалы и методы исследования

2.1 Объект исследования

В исследовании были использованы обезьяны вида *Macaca mulatta* (макаки резусы) различного возраста и пола, содержащихся в Курчатовском комплексе медицинской приматологии (ККМП) НИЦ "Курчатовский институт" г. Сочи.

Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и требования Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или иных целей, ETS №123 и Директивы №2010 /63/ EU, принятой Европейским Парламентом 22 сентября 2010г.

Разрешение на проведение работ было получено от:

1. Комитета по Биоэтике ФГБНУ «НИИ Медицинской Приматологии», который работает в соответствии с требованиями законодательства Российской Федерации. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом организации (ФГБНУ «НИИ МП») – №91 от 12.04.21г.

2. Локальной этической комиссии по вопросам биомедицинских исследований НИЦ "Курчатовский институт», который работает в соответствии с требованиями законодательства Российской Федерации. Протокол исследования одобрен Локальной этической комиссией НИЦ "Курчатовский институт" – №2ПР от 20.02.24г.

2.2 Материал исследования

Материалом для исследования количественного состава микробиоты толстого кишечника послужили пробы фекалий от 120 клинически здоровых макак резусов, распределенных по 7 возрастным группам (Таблица 2).

Таблица 2 – Структура выборки макак резусов по возрасту и полу при оценке таксономического состава и количественных показателей кишечной микробиоты

Группа	**Возраст, г.**	**Пол**	**Количество особей**	
			С учетом пола	**Всего в группе**
I - Детеныши	До 1	♂	8	12
		♀	4	
II - Молодые неполовозрелые особи	1-3	♂	27	36
		♀	9	
III - Молодые половозрелые особи	4-7	♂	-	12
		♀	12	
IV - Взрослые особи	8-14	♂	4	12
		♀	8	
V - Особи среднего возраста	15-20	♂	16	24
		♀	8	
VI - Пожилые особи	21-25	♂	10	12
		♀	2	
VII - Старые особи	От 26	♂	9	12
		♀	3	
Всего	**120**			

Разделение на 7 возрастных групп было обусловлено влиянием различных факторов на микробиоту кишечника. В течение первого года жизни ведущим фактором в формировании кишечной микробиоты обезьян можно считать грудное или искусственное вскармливание, а также введение прикорма и постепенный переход к сбалансированному рациону, аналогичному питанию взрослых особей – гранулированный корм из продуктов растительного и животного происхождения, дополненный минеральными солями и витаминами. Дополнительно к гранулированному корму добавляют сочные корма (зелень, овощи, фрукты), а также в рацион входит хлеб и одно яйцо, что существенно влияет на становление кишечной микробиоты молодых неполовозрелых особей.

Заслуживают внимания молодые половозрелые особи, поскольку запуск активных ростовых процессов и гормональная перестройка в период полового созревания могут оказывать модулирующие воздействие на состав кишечной микробиоты. Взрослые особи и особи среднего возраста позволяют оценить состав относительно стабильного «ядра» микробиоты в репродуктивный и пост-репродуктивный период при минимальных изменениях рациона и физиологии. У пожилых и старых особей происходят значительные изменения в работе

желудочно-кишечного тракта. Это обусловлено естественным старением организма, ослаблением перистальтики и уменьшением способности усваивать питательные вещества. Как следствие, микробные сообщества кишечника подвергаются закономерной реорганизации.

Обезьяны находились в специальном помещении для содержания животных, все животные содержались в индивидуальных клетках (оборудованных автоматическими поилками), на которых указаны номера обезьян. Под каждой клеткой были установлены металлические поддоны для сбора фекальных образцов.

Сбор материала (фекальных образцов) проводили с утра, после уборки помещений и мытья поддонов. Материал в стерильных контейнерах доставляли в лабораторию для дальнейшего исследования.

Для отработки методов доставки биоматериала с использованием оральных капсул было использовано 9 клинически здоровых обезьян вида – макак резус (Таблица 3).

Таблица 3 – Данные обезьян, использованных для рентгеноскопического контроля прохождения оральных капсул

№ п/п	№ обезьяны	Пол	Возраст	Масса, кг
1	45135	♂	3г	4,800
2	44850	♂	3г	4,100
3	45037	♂	4г	4,100
4	44900	♂	4г	4,050
5	45059	♂	4г	5,550
6	45604	♂	4г	4,660
7	46705	♂	3г 5м	4,500
8	46670	♂	3г 5м	4,500
9	47724	♂	2г 3м	4,200

При проведении гастроскопии было обследовано 11 обезьян вида макаки резус (Таблица 4).

Таблица 4 – Данные обезьян, подвергнутых гастроскопии

№ п/п	№ обезьян	Пол	Дата рождения
1	45604	♂	29.03.2019
2	45059	♂	25.05.2018
3	43040	♂	07.06.2016
4	41935	♂	20.04.2015
5	41899	♂	10.04.2015

Продолжение таблицы 4

6	36651	♂	29.05.2006
7	36852	♂	04.09.2006
8	36587	♂	11.05.2006
9	33970	♂	28.04.2000
10	34260	♂	12.04.2001
11	34786	♂	04.06.2002

При отборе группы доноров было обследовано 8 клинически здоровых макак резусов (Таблица 5).

Таблица 5 – Клинически здоровые особи макак резусов, отобранные в качестве потенциальных доноров

№ п/п	№ обезьяны	Пол	Дата рождения
1	47767	♂	15.06.2021
2	48060	♀	18.10.2021
3	47482	♀	19.04.2021
4	48260	♂	25.03.2022
5	48362	♂	28.03.2022
6	48261	♀	25.03.2022
7	48326	♂	20.04.2022
8	48251	♂	22.03.2022

Изучение разнообразия микробиоты толстого кишечника метагеномным секвенированием гена 16S рРНК проводили на 17 клинически здоровых особях (Таблица 6).

Таблица 6 – Номера обезьян, отобранных для секвенирования кишечной микробиоты

№ п/п	№ обезьяны	Пол	Дата рождения	Возраст	Вес, кг
1	47291	♂	07.12.20	11 мес.	1,350
2	47292	♀	07.12.20	11мес.	1,390
3	44003	♂	18.05.17	3 года	4,200
4	42867	♂	12.05.16	4 года	4,400
5	43978	♂	11.05.17	3 года	4,450
6	42757	♂	21.04.16	4 года	6,450
7	44148	♂	27.06.17	3 года	3,650
8	44002	♂	18.05.17	3 года	3,950
9	32912	♀	07.07.97	26 лет	4,100
10	32809	♂	14.05.97	26 лет	8,800
11	32474	♂	11.07.96	27 лет	12,300
12	32379	♂	30.05.96	27 лет	8,400
13	32230	♂	26.03.96	27 лет	6,800
14	32411	♂	11.06.96	26 лет	9,800
15	33217	♂	05.05.98	25 лет	11,800
16	32985	♂	11.08.97	26 лет	8,000
17	31150	♂	13.04.92	31 год	6,000

При проведении экспериментального исследования по трансплантации кишечной микробиоты были использованы 24 клинически здоровые обезьяны (Таблица 7).

Таблица 7 – Экспериментальные животные

Группа	№ п.п.	Номер обезьян	Вес, кг
1	1	46883	4,400
	2	46632	4,430
	3	47668	4,470
	4	46910	4,490
2	5	47862	4,250
	6	46740	4,300
	7	47052	4,370
	8	47493	4,370
3	9	46868	3,380
	10	47608	3,460
	11	47095	3,760
	12	47588	3,840
4	13	46734	5,230
	14	46931	5,280
	15	47070	5,330
	16	46736	5,550
5	17	46957	5,040
	18	46960	5,050
	19	46879	5,190
	20	47564	4,490
6	21	47084	4,660
	22	47653	4,660
	23	47083	4,670
	24	46660	4,860

2.3 Методы исследования

2.3.1 Методы исследования кишечной микробиоты обезьян

Микробиологические методы исследования

Бактериологическое и микроскопическое исследование выполнено по стандартным лабораторным методикам. Для посева использовали плотные дифференциально-диагностические среды (Эндо, Плоскирева, 5% кровяной агар, иерсиния-агар, элективный желточно-солевой агар, хромогенный кандида-агар). Изучали морфологические, тинкториальные свойства, культуральные, ферментативные особенности выделенных энтеробактерий. Для биохимической

идентификации энтеробактерий использовали бактериологический анализатор VITEK2 (производитель «bioMerieux», США).

Молекулярно-генетические исследования

Предварительную обработку фекальных образцов проводили в соответствии с методическими указаниями «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности» МУ 1.3.2569-09, Москва, 2009 [14].

Приготовление фекальной суспензии и бактериальных фракций

В микроцентрифужные пробирки (объемом 1,5 мл) вносили 0,8 мл стерильного изотонического раствора натрия хлорида. В каждую пробирку отдельным наконечником с фильтром (или одноразовыми лопатками) вносили 0,1 мл фекалий и тщательно ресуспендировали на вортексе до образования гомогенной суспензии.

Для приготовления бактериальной фракции использовали свежеприготовленную суспензию фекалий. Пробирки с суспензией (водянистыми фекалиями) центрифугировали при 12 000 g в течение 5 мин на центрифуге «MiniSpin», Eppendorf, Германия. Отдельным наконечником с фильтром из каждой пробирки отбирали бактериальную фракцию в объеме 0,1 мл (верхняя бело–желтая часть образовавшегося осадка). Отобранную часть пробы, содержащую высокую концентрацию бактерий, переносили в новую микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл. Хранили при температуре -20°С в течении недели, при -70°С длительно.

Проведение ПЦР

Выделение нуклеиновых кислот из фекальных образцов проводили при использовании комплекта реагентов «ДНК-сорб-В» производства AmpliSens, ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, а также комплекта реагентов на основе термического лизиса «Экспресс-ДНК-Био» производства ООО «Компания Алкор Био» (Россия) в соответствии с инструкциями производителя.

Выявление и дифференциацию ДНК диареегенных *E. coli* осуществляли методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной

детекцией (ПЦР-РВ), при использовании набора реагентов «АмплиСенс® Эшерихиозы-FL» (ФБУН ЦНИИЭ, Россия) согласно прилагаемой инструкции, на приборе Rotor-Gene Q 6plex QIAGEN, США.

Детекцию возбудителя кампилобактериоза *Campylobacter jejuni* проводили, используя коммерческую тест-систему "ПЦР-Кампилобактериоз-ФАКТОР" (ООО "ВЕТ ФАКТОР", Россия) согласно инструкции, методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с флуоресцентной детекцией, на приборе Rotor-Gene Q 6plex QIAGEN, США.

Для выявления 24 показателей (22 группы микроорганизмов, общая бактериальная масса и индекс анаэробного дисбаланса) использовали набор реагентов «КОЛОНОФЛОР-16 (биоценоз)» с детекцией на приборе CFX96 (BioRad), согласно инструкции производителя. Спектр детектируемых микроорганизмов включал основных представителей нормобиоты (*Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Escherichia coli, Enterococcus* spp., *Bacteroides* spp., *Bacteroides thetaiotaomicron, Faecalibacterium prausnitzii, Akkermansia muciniphila*). Помимо представителей нормобиоты детектируется широкий спектр условно-патогенных и патогенных микроорганизмов (энтеропатогенная *E. coli, Staphylococcus aureus, Clostridioides difficile, Clostridioides perfringens, Klebsiella pneumoniae, Klebsiella oxytoca, Enterobacter spp., Citrobacter spp., Proteus vulgaris/Proteus mirabilis, Fusobacterium nucleatum, Parvimonas micra, Candida spp., Salmonella* spp., *Shigella* spp).

Для изучения разнообразия микробиоты толстого кишечника метагеномным секвенированием гена 16S рРНК, выделение ДНК из фекальных образцов производили с использованием коммерческого набора MagMAX Microbiome Ultra Nucleic Acid Isolation Kit. Амплификацию методом полимеразной цепной реакции проводили на образцах с применением праймеров, направленных на регион V3-V4 гена 16S рРНК. Для шести образцо (n = 6) применяли двойное баркодирование индексами Illumina (Nextera) и стандартными баркодами Oxford из Native Barcoding Kit (SQK-DCS109 with EXP-NBD104 или EXP-NBD114). Вставка индексов Illumina осуществляли повторной амплификацией. После чего проводили вторичное

баркодирование набором для подготовки ДНК библиотек ONT Native Barcoding Kit (SQK-DCS109 with EXP-NBD104 and EXP-NBD114). Таким образом, каждый образец содержал баркоды и Oxford и Illumina. Остальные образцы (*n* = 11) не подвергались вторичной амплификации с индексами Illumina, а сразу баркодировались набором Native Barcoding Kit (SQK -DCS109 with EXP-NBD104 или EXP-NBD114).

Для лигирования баркодов, адаптеров и секвенирования использовали набор реагентов SQK-LSK109 (ONT) и вспомогательные реагенты производства NEB или MGI. Секвенирование проводили на приборе Oxford Nanopore GridION.

Построение amplicon sequence variants (ASV) осуществляли с помощью программного пакета DADA2 v1.29.0. filterAndTrim запускали со следующими параметрами: truncLen=c (225,220), maxN=0, maxEE=2, truncQ=2. learnErrors, mergePairs и removeBimeraDenovo запускали со стандартными параметрами. Таксономия определяли с параметром minBoot = 70 с использованием базы данных SILVA rRNA v138. Деконтаминация ASV поводили с помощью функции isContaminant (method="frequency", conc="Concentration") из программного пакета decontam. Для агломерации ASV до уровня вида использовали функцию tax_glom из пакета speedyseq.

Диско-диффузионный метод определения чувствительности к антибиотикам

Для выявления ванкомицин-резистентных Enterococcus spp. оценивали их чувствительность к антибактериальным препаратам. Исследование проводили в соответствии с методическими указаниями МУК 4.2.1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам». В работе использовали агар Мюллер-Хинтон и коммерческие диски с антибиотиками (производство ООО «НИЦФ», Россия).

2.3.2 Клинические, лабораторные и инструментальные методы обследования обезьян

Паразитологические методы исследования

Для определения паразитарной инвазии применялся общепринятый метод микроскопии нативных препаратов из свежевыделенных фекалий. Для изучения гельминтов и их яиц, небольшое количество фекалий из разных мест исследуемой порции растирали на предметном стекле в капле физиологического раствора и 50% водного раствора глицерина, накрывали покровным стеклом и просматривали под микроскопом при увеличении 10х10 и 10х40.

Серологические методы

Антитела к ВГЕ (анти–ВГЕ), ВГС (анти–ВГС), ВПГ–1,2 (анти–ВПГ–1,2), ЦМВ (анти–ЦМВ) и ВЭБ (анти–ВЭБ) определяли посредством иммуноферментного анализа с помощью коммерческих тест-систем «ДС–ИФА–АНТИ–HEV–G», «ДС–ИФА–АНТИ–HEV–M», «ИФА–АНТИ–HCV», «ДС–ИФА–АНТИ–ВПГ–1,2–G», «ДС–ИФА–АНТИ–ЦМВ–G» и «ДС–ИФА–АНТИ–ВЭБ–VCA–G» (НПО «Диагностические системы», Россия).

Антиген ротавируса группы А, кишечного аденовируса и норавируса 1 и 2 генотпов определяли в образцах фекалий с помощью коммерческих тест−систем ЗАО «Вектор Бест» – «ИФА–Rota–Ag», «ИФА–Adeno–Ag» и «ИФА–Nora–1,2–Ag» соответственно. Все постановки производили согласно инструкции производителя.

Результаты ИФА учитывали на спектрофотометре ImmunoChem–2100 производства «Интермедика сервис» (США). Полученные данные выражали в единицах оптической плотности при длине волны 450 нм ($ОП_{450}$).

Гематологические и биохимические исследования

Сбор крови для общего анализа и биохимических исследований проводили утром до кормления обезьян из бедренной вены в области паха (v. femoralis), по 1 мл в вакуумные пробирки Vacuette (1 мл 13х75 мм с К3 ЭДТА) и по 4 мл в вакуумные пробирки Vacuette (5 мл 13х100 мм с активатором образования сгустка и гелем для получения сыворотки) (Германия).

Для получения сыворотки пробирки с кровью отстаивали при комнатной температуре в течение 30 мин до полного образования сгустка или помещали в термостат при 37° С на 15 мин. Затем центрифугировали при 1500g (ОПн–3 с ротором, ОАО ТНК «DASTAN», г. Бишкек) в течение 15 мин. при комнатной температуре. Сыворотку переносили отдельными наконечниками с фильтром в стерильные пробирки объемом 1,5 мл. Сыворотка не должна быть гемолизированной.

Общий анализ крови будут проводить на автоматическом гематологическом анализаторе МЕК-7300 К (NIHON KOHDEN, Япония). Изучаемые показатели представлены в Таблице 9.

Таблица 9 – Показатели общего анализа крови

Показатель	**Аббревиатура**	**Единицы измерения**
Эритроциты	RBC	$\times 10^{12}$/л
Лейкоциты	WBC	$\times 10^{9}$/л
Лимфоциты	LY	% и $\times 10^{9}$/л
Моноциты	MO	% и $\times 10^{9}$/л
Нейтрофилы	NE	% и $\times 10^{9}$/л
Эозинофилы	EO	% и $\times 10^{9}$/л
Базофилы	BA	% и $\times 10^{9}$/л
Тромбоциты	PLT	$\times 10^{9}$/л
Гемоглобин	HGB	г/л
Скорость оседания эритроцитов	СОЭ	Мм/ч

Биохимический анализ крови будут проводить на биохимическом анализаторе Biolit-8020, China. Изучаемые показатели представлены в Таблице 10.

Таблица 10– Биохимические показатели, определяемые в крови экспериментальных животных

Показатель	**Аббревиатура**	**Единицы измерения**
Аланинаминотрансфераза	АлАТ	Ед/л
Аспартатаминотрансфераза	АсАТ	Ед/л
Билирубин общий	−	МкМоль/л
Гамма − глютамилтранспептидаза	ГГТ	Ед/л Ед/л
Глюкоза	−	мМоль/л
Калий	−	мМоль/л
Креатинин	−	МкМоль/л
Мочевина	−	мМоль/л
Натрий	−	мМоль /л
Общий белок	−	г/л
Холестерин общий	−	мМоль/л
Щелочная фосфатаза	ЩФ	Ед/л

Общий анализ мочи

Для проведения анализа за 18 часов до отбора проб животных лишали корма, сохраняя свободный доступ к воде. Отбор образцов мочи осуществляли с поддона клетки в пробирки.

Анализ выполняли на анализаторе мочи «DocUReader 2PRO» (77 ELEKTRONIKA, Венгрия) с использованием тест-полосок этой же фирмы. Изучаемые показатели представлены в Таблице 11.

Таблица 11 – Показатели клинического анализа мочи

Показатель	**Аббревиатура**	**Единицы измерения**
Цвет	–	–
pH	–	–
Нитриты	–	+/–
Кетоновые тела	–	мг/дл
Билирубин	–	мг/дл
Эритроциты	–	Ед/мкл
Лейкоциты	–	Ед/мкл
Уробилиноген	–	мг/дл
Удельный вес	–	–
Общий белок	–	мг/дл
Глюкоза	–	мг/дл

Рентгенологические исследования

Рентгенологические исследования проводили с использованием портативного ветеринарного рентгеновского аппарата Porta 100HF («JOB Corporation», Япония).

На данном этапе исследования, в соответствии с ветеринарным протоколом №91, проводили пероральное введение капсул разного размера и структуры (капсулы заполнены медицинским рентгеноконтрастным препаратом Бар-ВИПС) и определяли места вскрытия капсул под контролем рентгенологических исследований. С помощью рентгеновского аппарата проводили ренгенографию брюшной полости обезьян.

Ниже представлены ряд капсул разного размера и структуры:

Капсула №1 – кислотоустойчивая оболочка, размер 25*10мм (000)

Капсула №2 – кислотоустойчивая оболочка, размер 20*0,7мм (00)

Капсула №3 – кислотоустойчивая оболочка, размер 17*0,5мм (0)

Капсула №4 – кислотоустойчивая оболочка, размер 15*0,6мм (2)

Капсула №5 – желатиновая оболочка, размер 14*0,5мм (3)

Капсула №6 – желатиновая оболочка, размер13*0,5 мм (4)

Перед проведением рентгенологического исследования животные были осмотрены ветеринарным врачом. После осмотра проводили введение капсул. Капсулы вводили при полной фиксации животных с помощью роторасширителя, шпателя для языка с круглым отверстием и интродьюсера (таблеткодаватель ветеринарный) для исключения механического повреждения капсул и заливали шприцем воду (100мл) в ротовую полость животных для полного заглатывания капсул. Введение капсул проводили натощак и после приема пищи. Время экспозиции капсул в желудке составляло от 20 до 100 минут. Животным вводили сочетанный наркоз Ксила 0,1+ Золетил 0,05 мл/кг в зависимости от веса обезьян. Обезьян доставляли в клетках-переносках, рабочими по уходу, в манипуляционную для проведения рентгенографии. Далее животных помещали в индивидуальные клетки, где обезьяны отходили от анестезии, все манипуляции проводили под присмотром ветеринарного врача.

После попадания лекарственной формы из желудка в кишечник активные вещества должны высвобождаться в двенадцатиперстной кишке в пределах 5-30 минут, поскольку переваривание панкреатическими ферментами и всасывание метаболитов главным образом происходят в верхнем отделе кишечника, хотя переваривание и всасывание могут иметь место в любом месте ЖКТ.

Для придания необходимых свойств ацидо-энзиморезистентному покрытию растворы из синтетических полимеров наносили на капсулы послойно, чередуя между собой. В исследованиях были использованы все три выпускаемых типа клуцела: GF, JF и LF, отличающиеся друг от друга молекулярной массой. Разработанное покрытие полностью соответствует всем заданным характеристикам, а именно устойчиво в кислой среде (модель среды желудка) и растворяется в щелочной среде.

Использовано 3 вида капсул двух размеров с защитным покрытием, также заполненных медицинским рентгеноконтрастным препаратом Бар-ВИПС:

Группа I – образец 2. LONZA/Capsugel/DRcaps^{TM}/ACID-RESISTANT CAPSULES/EMPTY CAPSULES/SAMPLE/размер 2: с защитным покрытием, 2 слоя; с защитным покрытием, 4 слоя.

Группа II – образец 1. CAPSULGEL/Coni-Snap^{R}/SAMPLE/размер 3: с защитным покрытием, 4 слоя.

Нами выявлено, что капсулы №4 быстро растворились в желудке у обеих обезьян: контраст из этих капсул оказался размазанным в желудочном содержимом при первой рентгенографии к 20-ой (Рисунок 1.А) и 26-ой (Рисунок 1.В) минутах соответственно.

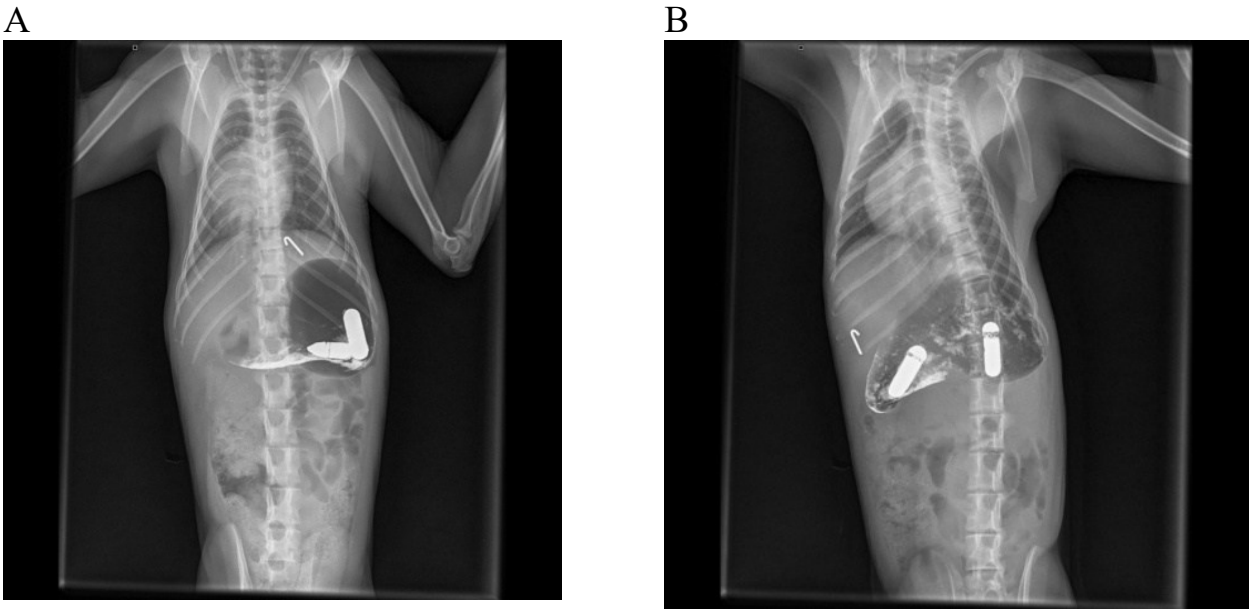


Рисунок 1 – Рентгенограмма
А. Обезьяна №44850 (экспозиция 20 минут). В. Обезьяна №45135 (экспозиция 26 минут).

Материал капсул №1 и №2 продемонстрировал устойчивость к желудочному соку и не разрушился внутри желудка на протяжении 88 минут у одной (Рисунок 2.А) и 100 минут у другой обезьяны (Рисунок 2.В).

A B

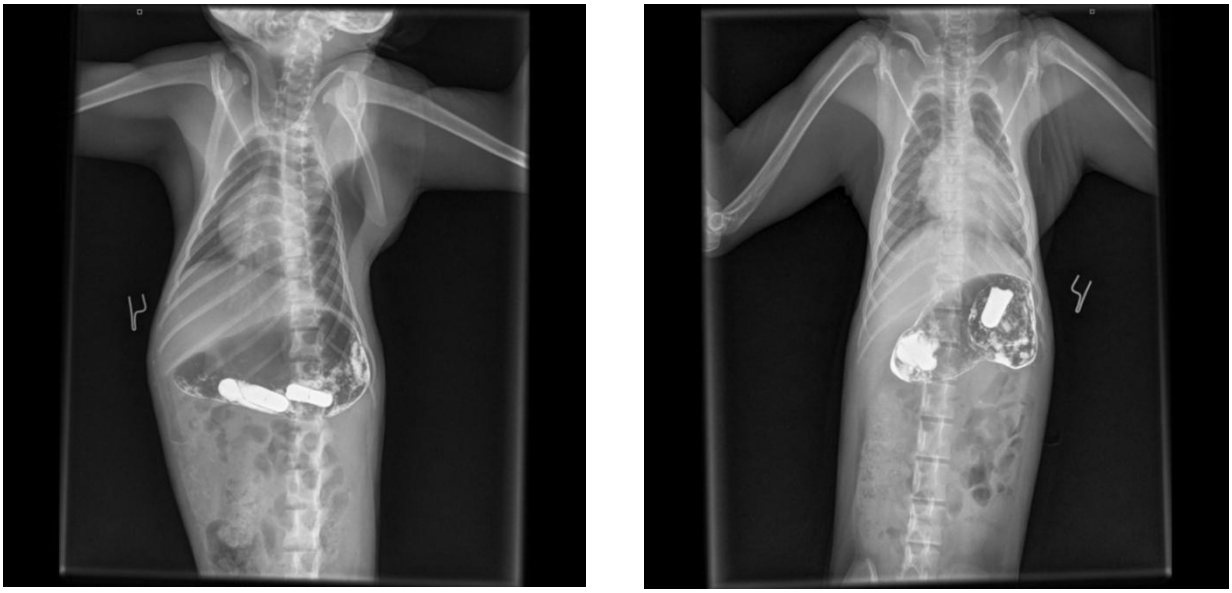


Рисунок 2 – Рентгенограмма
А. Обезьяна №44850 (экспозиция 88 минут). В. Обезьяна №45135 (экспозиция 100 минут).

На всех контрольных снимках контраст в этих капсулах четко отграничен стенками капсул. Размер капсул №1 и №2, а также особенности анатомического строения и активности перистальтики пилорического отдела желудка и луковицы двенадцатиперстной кишки, блокирует прохождение капсулы, заполненные препаратом Бар-ВИПС, через указанные отделы ЖКТ.

Результаты введения капсул меньшего размера №3 и №5 показали, что защитные свойства капсул не обеспечивают устойчивую защиту содержимого, они разрушаются на 7 минуте после введения.

При введении капсулы двойного высвобождения (капсула в капсуле) натощак, время экспозиции в желудочном соке достигало 67 минут. Капсулы начинали разрушаться, что видно на рентгенограмме, выполненной на 63-й минуте после введения капсул у одной из обезьян (Рисунок 3.А).

A B

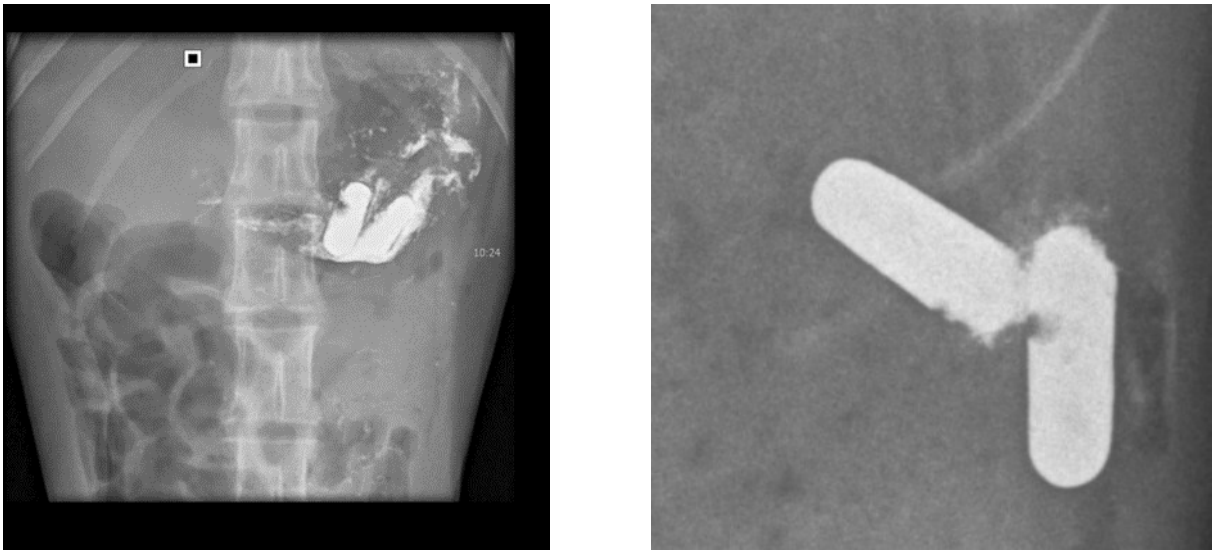


Рисунок 3 – Рентгенограмма.
А. Обезьяна №44900 (экспозиция 63 минуты). В. Обезьяна №45037 (экспозиция 66 минут).

Наибольшую кислотоустойчивость показала комбинация капсул №3+№5, при введении натощак – 67 мин, а также после приема пищи, капсулы не разрушались на протяжении 137 минут (Рисунок 3.В).

Комбинация капсул №3+№6, при введении натощак выдерживает примерно такую же экспозицию (66мин), но капсулы №3+№5 обеспечивают наилучшее прилегание стенок собранной капсулы друг к другу.

Разрушение капсул начинается чаще всего в местах стыков двух половин. Прилегание друг к другу стенок собранной капсулы недостаточно плотное, желудочный сок проникает внутрь капсулы и начинает разрушать ее изнутри. Хотя в некоторых эпизодах капсульная стенка разрушается и снаружи. При введении натощак, капсулы не осуществляют целевую доставку и растворяются, поэтому продолжили исследование с использованием капсулы двойного высвобождения (№3+№5), при введении после приема пищи.

У обезьяны №45604, получившей капсулы натощак, обе капсулы полностью оказались разрушенными через 60 мин нахождения в желудке. Контрастный препарат "размазался" по поверхности слизистой желудка (Рисунок 4. А).

A B

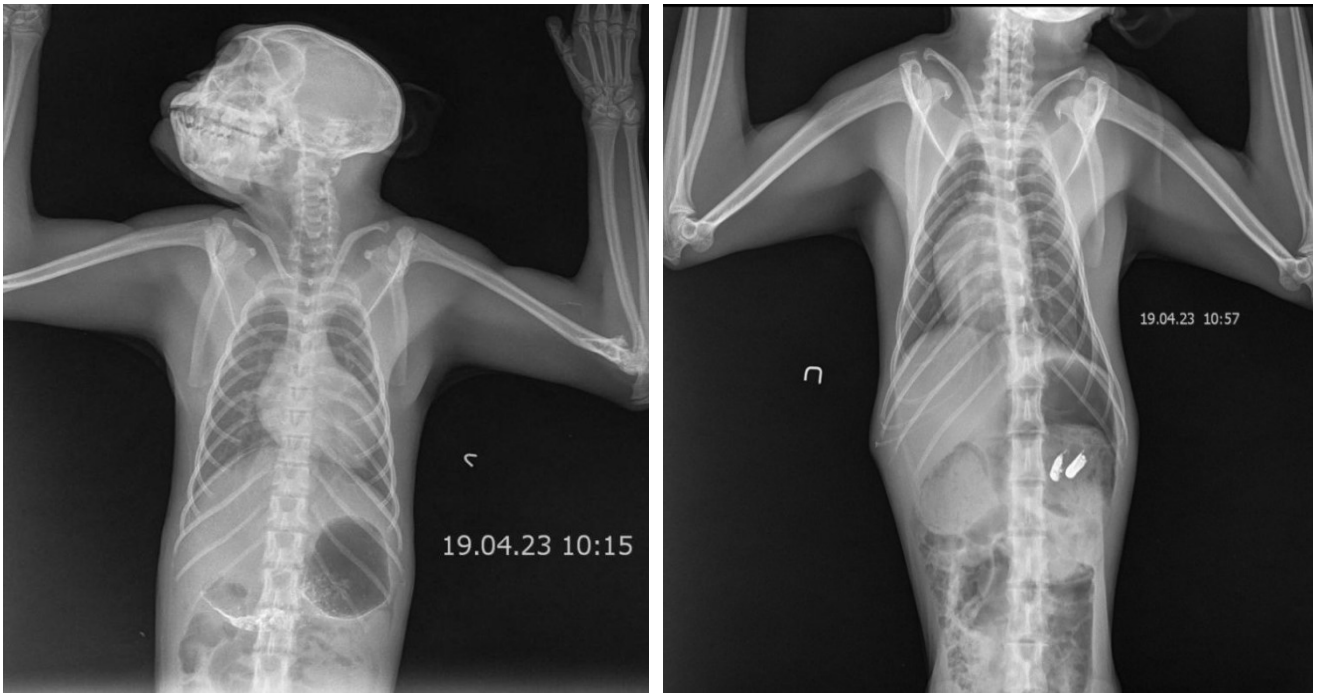


Рисунок 4 – Рентгенограмма
A. Обезьяна №45604 (экспозиция 60 минут). B. Обезьяна №45059 (экспозиция 60 минут).

У второй обезьяны №45059, которой ввели капсулы после приема, обе капсулы также разрушились через 1 час экспозиции в желудке, однако, степень разрушения стенок обеих капсул была неполная, часть капсульной стенки обеих капсул сохранилась (Рисунок 4.B).

В результате исследования было получено: кислотоустойчивое покрытие использованных капсул оказалось недостаточным, все капсулы разрушались в кислой среде желудка; пища, принятая до введения капсул, замедлила разрушение капсул, но не предотвратила. Было принято решение изготовить новую партию капсул с дополнительной энтеросолюбильной оболочкой.

Обезьяны № 46670 получила 2 капсулы с 4-хслойным защитным кислотоустойчивым покрытием (группа 1). Через 120 минут экспозиции обе капсулы находились в желудке. В обеих капсулах защитное покрытие начало разрушаться. Но разрушения незначительные и недавнее, так как единичные пятна контраста выявляются за пределами стенок капсул (Рисунок 5.A).

A B C



Рисунок 5 – Рентгенограмма
А. Обезьяна №46670 (экспозиция 120 минут). В. Обезьяна №46705 (экспозиция 120 минут). С. Обезьяна №47724 (экспозиция 120 минут)

Обезьяна №46705 получила 2 капсулы с 2-х слойным защитным кислотоустойчивым покрытием (группа 1). Через 120 минут экспозиции одна капсула находилась в желудке, а вторая – в тонкой кишке. В обеих капсулах выявляются дефекты в защитной оболочке. Однако, эти дефекты небольшие и произошли недавно, так как единичные мазки контраста выявляются в окружающем пространстве рядом с капсулами (Рисунок 5.В).

Обезьяны № 47724 получила 2 капсулы с 4-х слойным защитным кислотоустойчивым покрытием (группа 2). Через 120 минут экспозиции обе капсулы разрушены, но в разной степени. Одна из капсул разрушена в полной мере. Сульфат бария в виде мазков контраста распределен в желудке и тонкой кишке. Другая капсула находилась в желудке, ее стенки разрушены хотя и в меньшей степени, но достаточно выражено (Рисунок 5.С).

В результате исследования 2-х слойных и 4-х слойных капсул разных групп показало, что капсулы с 2-х слойным защитным кислотоустойчивым покрытием (группа 1) наиболее устойчивы к желудочному соку и могут осуществить целевую доставку материала.

Исследование обезьян с использованием гастроскопа

Гастроскопические исследования проводили с использованием гастроскопа – стойка мобильная для эндоскопического оборудования с принадлежностями в комплекте «Карл Шторц СЕ и Ко.КГ», Германия.

Проводили гастроскопию для изучения особенностей анатомического строения и активности перистальтики пилорического отдела желудка и луковицы двенадцатиперстной кишки, а также для оценки прохождения капсул через данные отделы ЖКТ и воможности введения фекального трансплантата в виде жидкой суспензии.

Гастроскопию проводили натощак. Вечером накануне процедуры корм из кормушки удаляли. Воду пить разрешали. В день проведения гастроскопии прием пищи и воды прекращался.

Перед проведением исследования желудочно-кишечного тракта животные были осмотрены ветеринарным врачом. Общее состояние животных было удовлетворительным: активные, нормальное состояние шерстного покрова, стул оформленный. После осмотра вводили сочетанный наркоз Ксила 0,5 +Золетил 500,25мл/кг**,** через 15-20 мин дополнительно вводили наркоз Ксила 0,2 +Золетил 500,1мл/кг в зависимости от веса обезьян.

Животное доставляли в клетках-переносках, рабочими по уходу, в операционную для проведения гастроскопии. В пасть обезьяны вставляли загубник или роторасширитель, который препятствует спонтанному прикусыванию гастроскопа. Далее животных помещали в индивидуальные клетки, где обезьяны отходили от анестезии, все манипуляции проводили под присмотром ветеринарного врача.

Пробный алгоритм действий для проведения трансплантации микробиоты кишечника посредством эндоскопа, с использованием смеси жидкого рисового отвара и рентгеноконтрастного препарата Бар-ВИПС, продемонстрировал благоприятный эффект, без осложнений (тошнота, рвота) и определил возможность введения фекального трансплантата в виде жидкой суспензии.

2.3.3 Моделирование антибиотик-ассоциированной диареи

Для моделирования антибиотик-ассоциированной диареи 16 животным в течение 5 дней вводили перорально 1 таблетку (400 мг) Цефиксим-ЭКСПРЕСС (ЗАО «ЛЕККО») и внутримышечно Амоксигард (амоксициллин+клавулановая

кислота) (ООО «Нита-Фарм») в расчете 200 мг/кг веса. Развитие антибиотик-ассоциированной диареи оценивали по консистенции стула (кашицеобразный, жидкий, водянистый).

2.3.4 Трансплантация кишечной микробиоты

Характеристика кишечной микробиоты в форме капсул

Для трансплантации кишечной микробиоты (ТКМ) с помощью капсул материал готовили по следующему протоколу: 10 грамм свежих фекалий разводили в стерильном фосфатном буфере (PBS) содержащим 5% сахарозы в качестве криопротектанта. Соотношение объемов образца фекалий и буфера составляло 1/4. Гомогенизат центрифугировали в течение 5 мин с ускорением 300G. Супернатант отделяли и полученную суспензию разливали во флаконы объемом 25-30 мл (высота слоя 7-15 мм) и замораживали при -80 для хранения и дальнейшей лиофильной сушки.

Замороженную субстанцию помещали на замораживающую плиту в сублиматор сушильной установки. Высушивание микробной субстанции ТКМ осуществляли в лабораторной сублимационной установке FreeZone 6 Labconco (США), посредством подвода тепла к замороженному материалу через плиту, на которой располагался высушиваемый материал во флаконах.

Начальная стадия температуры полок в сублиматоре составляла -37°С, продолжительность первого этапа составляет 14 часов. Далее, температуру полок сублиматора с высушиваемым материалом постепенно поднимали каждый час на 5°С. После окончания процесса сублимации свободной влаги, о чем свидетельствовал подъем температуры материала выше 0°С, температуру нагрева полок поднимали до 25°С. Процесс высушивания (досушивание) осуществляли еще в течении 6 часов. Весь процесс сублимационного обезвоживания составил 32 часа.

Высушенную субстанцию извлекали из флаконов, измельчали. Остаточную влажность сухого препарата («потерю в массе при высушивании»), которая составила 6%, определяли широко распространенным гравиметрическим методом.

Далее ее использовали в качестве активной субстанции для приготовления капсул с дополнительной энтеросолюбильной оболочкой. Капсулы заполняли субстанцией с помощью ручной капсульной машины PRESSORE 100 Perni MC2, использовали капсулы DRcaps™ ACID-RESISTANT CAPSULES (Code V44.700/V44 700, WHITE OP.V700/ WHITE OP.V700, размер 2, партия 5402512, срок годности – июнь 2025 г.). После заполнения капсулы были дополнительно защищены энтеросолюбильной оболочкой, которая состояла из двух слоев: первый - из гидроксипропилцеллюлозы (клуцел LF NF), второй - из ацетатфталатцеллюлозы, воска пчелиного и твина-20, при следующем соотношении компонентов в оболочке, масс.%: гидроксипропилцеллюлоза - 2,56; ацетатфталатцеллюлоза - 35,3; воск пчелиный - 4,0; твин-20 - 8,0; желатин 10% и альгинат натрия 1%.

Капсулы были дополнительно покрыты сначала первым слоем, затем после полного высыхания - вторым. Так как капсулы содержали микробиологическую субстанцию, высушивание капсул осуществляли при температуре +5°С. Для проверки защитных свойств ацидо-энзиморезистентной энтеросолюбильной оболочки было ею покрыто несколько капсул без субстанции.

Испытание распадаемости капсул с кишечнорастворимым покрытием проводили в соответствии ОФС.1.4.1.0005.14 (п. 1.2.1.2) в 0,1 М растворе хлористоводородной кислоты в течение 2 ч. Кишечнорастворимые капсулы должны были оставаться неповрежденными в 0,1 М растворе хлористоводородной кислоты не менее 1 ч. Повреждением капсулы считалось любое нарушение целостности стенки капсулы, позволяющее содержимому выйти в окружающую среду. Затем капсулы промывали дистиллированной водой и помещали в фосфатный буферный раствор со значением pH 6,8, подвергали воздействию в течение 1 ч. Температура среды растворения должна контролироваться на протяжении всего исследования и составлять (37 ± 0,5) °С. Скорость вращения мешалки должна составлять 100 об/мин.

При воздействии на капсулы 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты в течение 3 ч, поверхность покрытия оставалась без изменений. Через 15 минут после

помещения капсул в фосфатный буферный раствор на поверхности ацидо-энзиморезистентным покрытия стали образовываться пузыри, характеризующие нарушение целостности слоя покрытия (воздух, заключенный внутри капсулы, выходил наружу). Таким образом, капсулы DR capsTM ACID-RESISTANT CAPSULES EMPTY CAPSULES SAMPLE, дополнительно покрытые энтеросолюбильной оболочкой, выдерживают целостность в течение 3 часов в среде, имитирующей желудочный сок.

Полученную готовую форму (капсулы) анализировали по микробиологическим показателям кишечной микробиоты: Общая бактериальная масса (ОБМ) $5*10^8$ генокопий/г, *Lactobacillus* spp. $9*10^8$, *Bifidobacterium* spp. $9*10^{10}$, *Escherichia coli* 10^7, *Bacteroides* spp. 10^8, *Faecalibacterium prausnitzii* $3*10^9$.

Вес капсулы для перорального введения составил 0,3-0,35г и капсулы с сахарозой (плацебо) 0,22г. Срок хранения капсул 1 год с даты изготовления, при температуре - 20°C

Характеристика кишечной микробиоты в форме суспензии

Для трансплантации кишечной микробиоты с использованием эндоскопа материал готовили по следующему протоколу: на каждые 10 гр. свежих фекалий добавляли 50 мл. физиологического раствора (0,9% NaCl). Соотношение объемов образца фекалий и физиологического раствора составляло 1/5. Гомогенизат центрифугировали в течение 5 мин с ускорением 300G. В супернатант добавляли глицерин (от общей массы 10%). Раствор фекалий с глицерином (суспензия кишечной микробиоты) переливали в контейнеры и замораживали при -70° С. Все манипуляции были проведены не более чем за 90 минут с момента дефекации. Перед проведением трансплантации кишечной микробиоты за 4-5 часов приготовленные образцы доставали и размораживали при комнатной температуре, либо в водяной бане при +37° С (можно за меньшее время в этом случае). Жидкую суспензию перемешивали и фильтровали. В качестве плацебо использовали физиологический раствор.

Суспензия кишечной микробиоты характеризовалась следующими микробиологическими параметрами: ОБМ 10^8, *Lactobacillus* spp. $8*10^8$,

Bifidobacterium spp. $3*10^{10}$, *Escherichia coli* 10^7, *Bacteroides* spp. 10^8, *Faecalibacterium prausnitzii* $2*10^9$.

Жидкую суспензию хранили не более 4 месяцев с даты изготовления при температуре -70°С. Перед использованием хранили при комнатной температуре от +20°С до +24°С, в защищенном от света месте не более 30 минут.

Проведение трансплантации кишечной микробиоты

После окончания периода карантинирования животных разделили на 6 экспериментальных групп в зависимости от формы, вводимой кишечной микробиоты: капсулы или суспензия (Таблица 8).

Таблица 8 – Распределение экспериментальных животных по группам

Группа	Количество животных	Исследуемое вещество/ контрольный образец	Доза
Группа 1 (опытная) – ААД *+ ТКМ	4	Капсулы-КМ**	1 кап/кг
Группа 2 (опытная) – ААД + плацебо (нелеченый)	4	Капсулы-плацебо	1 кап/кг
Группа 3 (опытная) – ААД +ТКМ	4	Жидкая суспензия-КМ	30 мл
Группа 4 (опытная) – ААД + плацебо (нелеченый)	4	Жидкая суспензия-плацебо	30 мл
Группа 5 (контрольная) – здоровые обезьяны + ТКМ	4	Капсулы-КМ	1 кап/кг
Группа 6 (контрольная) – здоровые обезьяны + ТКМ	4	Жидкая суспензия-КМ	30 мл

*ААД-антибиотик-ассоциированная диарея; **КМ-кишечная микробиота

В качестве критерия рандомизации использована масса тела животных. Животных распределили по группам таким образом, чтобы средние значения массы в группах различались не более чем на 10%.

Кишечную микробиоту в виде капсул вводили животным экспериментальных групп перорально по 4 капсулы однократно. Введение капсул проводили перорально натощак, капсулы вводили при полной фиксации животных. При введении капсул использовали роторасширитель, шпатель для языка и интродьюсер. После введения каждой капсулы животному при помощи шприца медленно вливали в полость рта по 5-10 мл воды комнатной температуры. Введение КМ будут осуществляли каждому животному. Капсулы с сахарозой вводили животным контрольной группы.

Кишечную микробиоту в виде жидкой суспензии (по 30 мл) вводили животным экспериментальных групп с помощью эндоскопа однократно, введение жидкой суспензии осуществляли в состоянии общего наркоза в течение 15-20 минут. Для введения животных в состояние общего наркоза использовали Ксила 0,05мл/кг (ксилазин для ветеринарного применения, производитель АО «Интерхеми веркен», Эстония) и Золетил 50 (тилетамин, золазепам для ветеринарного применения, производитель «Вальдерфарм», Франция) 0,1мл/кг. Введение КМ осуществляли каждому животному. Животным контрольной группы вводили физиологический раствор в таком же объеме.

Микробиологические показатели учитывали в точках: фон, после приема антибиотиков, 1 день, 3 день, 7 день, 14 день, 28 день после введения трансплантата. Наблюдения за общим состоянием животных и оценке характера стула проводились ежедневно в течение всего эксперимента. Термометрию и взвешивание, показатели общего анализа крови, мочи, биохимические показатели сыворотки крови проводили в следующих точках: фон, 1 день, 3 день, 7 день, 14 день, 28 день после введения трансплантата.

2.3.5 Методы статистической обработки

Обработка первичных данных проводилась с использованием программного обеспечения «Microsoft Office Excel 2016». Статистическая обработка данных, их визуализация и анализ выполнены с использованием программного обеспечения OriginPro 8.6, Python3 и R. Априорный уровень статистической значимости установлен $\alpha = 0,05$. Все различия считались статистически значимыми при $p < \alpha$.

Содержание микроорганизмов выражали в частотах обнаружения, представленных в процентах (%). Количественные показатели выражались в десятичном логарифме копий ДНК/мл (log10, копий/мл).

Для оценки значимости различий в распределении частот встречаемости микроорганизмов между всеми возрастными группами использовали критерий $\chi 2$.

Для сравнения показателей в каждой возрастной группе использовали медиану (Me) и межквартильный размах (Q1; Q3).

Непараметрический критерий Краскела-Уоллиса использоовали для оценки статистической значимости различий между возрастными группами. Критерий предназначен для анализа различий между тремя и более группами, когда данные не подчиняются нормальному распределению. Нормальность распределения проверяли тестом Шапиро-Уилка. Для проверки статистической значимости между группами был применен пост-хок анализ (критерий Данна с коррекцией Бонферрони) для попарного сравнения.

Для анализа непрерывной связи относительной численности филотипов с возрастом использовали точечные диаграммы рассеяния (диаграммы разброса). Для визуализации и количественной оценки линейного тренда на них была наложена линия регрессии, построенная методом наименьших квадратов, которая аппроксимирует линейную зависимость. Характер и сила линейной зависимости оценивались с помощью углового коэффициента (*k*) этой линии. Коэффициент *k,* равный тангенсу угла наклона линии регрессии, количественно выражает скорость изменения относительной численности на единицу изменения возраста. Отрицательное значение *k* указывает на тенденцию к снижению, а положительное – на тенденцию к увеличению численности с возрастом.

Для оценки парных линейных взаимосвязей между всеми исследуемыми параметрами (возраст и филотипы) была построена матрица корреляций, представленная нижним треугольником, где исключено дублирование данных для улучшения читаемости. Сила и направление линейных связей определялись с помощью коэффициента корреляции Пирсона (*r*). Статистическая значимость каждого коэффициента корреляции оценивалась путем расчета соответствующего значения *p*. Визуально сила и направленность корреляции кодировалась цветом: оттенки красного обозначали статистически значимую положительную корреляцию, оттенки синего – статистически значимую отрицательную корреляцию (рисунок 2.G). Для оценки доли объясняемой вариации рассчитывали коэффициент детерминации (r^2).

Триммирование адаптерных последовательностей проводилось с помощью Trimmomatic v0.39 [213]. Далее с помощью cutadapt v4.6 [214] отрезались

последовательности праймеров, в последующий анализ брались только те прочтения, которые исходно содержали последовательности праймеров как в R1, так и в R2.

Консенсусные последовательности ampliconsequencevariants (ASV) были получены с помощью программного пакета DADA2 v1.29.0 [215]. Модуль filterAndTrim запускался со следующими параметрами: truncLen=c(225,220), maxN=0, maxEE=2, truncQ=2. learnErrors, mergePairs и removeBimeraDenovo запускались со стандартными параметрами. Таксономия определялась с параметром minBoot = 70 с использование базы данных SILVA rRNA v138 [202]. Деконтаминация последовательностей ASV осуществлялась с помощью функции isContaminant (method="frequency", conc="Concentration") из программного пакета decontam [216]. В последующий анализ брались только те образцы, покрытие для которых было не менее 1000 прочтений. Для агломерации ASV до уровня вида использовалась функция tax_glom из пакета speedyseq.

Для определения альфа-разнообразия были использованы метрики Chao1 и критерии информационной энтропии Shannon и Simpson. Статистическая значимость между распределениями значений альфа разнообразия оценивалась с помощью U-критерия Манна Уитни.

Кластеризация образцов была получена с помощью PCoA с расстоянием Брея-Кертиса. Статистическая значимость определялась с помощью U-критерия Манна Уитни (p-value<0,05).

Дифференциальная представленность ASV оценивалась с помощью DESeq2 с тестом Вальда в качестве теста оценки правдоподобия [217]. Дифференциально представленными организмами считались те, для которых значение p-value<0,05 и |Log2FoldChange| > 2.

Для оценки различий количественных показателей между двумя временными точками (фон и после притма антибиотиков), а также при сравнении групп разного пола использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни.

Для оценки внутригрупповой динамики в повторных временных точках общеклинических исследований и результатов кишечной микробиоты

использовали критерий Фридмана с поправкой Данна для множественных сравнений.

Для оценки межгрупповых различий в определенный день исследования, общеклинических анализов и результатов кишечной микробиоты, использовали критерий Краскела-Уоллиса с поправкой Данна для множественных сравнений.

ГЛАВА 3 Микробиота кишечника здоровых макак резусов

3.1 Микробиота кишечника здоровых макак резусов различного возраста и пола

В ходе исследования методом ПЦР-РВ были установлены референсные интервалы (Q1-Q3) для таксонов кишечной микробиоты на основе анализа микробиоценозов кишечника 120 здоровых особей макак резусов в семи возрастных группах. Для сравнения приведены референсные значения для человека, представленные в наборе реагентов «КОЛОНОФЛОР-16 (биоценоз)» (Таблица 12).

Таблица 12 – Возрастные референсные интервалы кишечной микробиоты макак резусов (log10, копий/мл)

№ п/п	Показатель	Референсные значения для людей	**Группа I (До 1 года)**	**Группа II (1-3 лет)**	**Группа III (4-7 лет)**	**Группа IV (8-14 лет)**	**Группа V (15-20 лет)**	**Группа VI (21-25 лет)**	**Группа VII (от 26 лет)**
			Результат, Q1-Q3						
1	Общая бактериальная масса	11,00-13,00	10,08-11,48	8,30-11,18	9,30-11,65	9,30-10,30	8,65-9,90	9,48-10,18	9,65-11,7
2	*Lactobacillus* spp.	7,00 – 8,00	7,74-9,81	7,65-8,65	6,30-8,65	7,74-9,90	5,85-8,48	5,18-8,74	5,88-6,98
3	*Bifidobacterium* spp.	9,00 – 10,00	9,93-11,18	8,74-9,74	8,48-10,11	9,60-11,08	8,85-10,00	9,54-10,81	9,18-10,90
4	*Escherichia coli*	6,00 – 8,00	7,30-9,04	6,30-7,30	6,78-7,98	6,30-7,74	5,88-6,74	5,18-5,81	5,85-7,48
5	*Bacteroides* spp.	9,00 – 12,00	7,60-8,85	7,60-8,95	8,90-11,08	8,85-10,30	7,60-9,48	9,48-10,30	9,30-10,18
6	*Faecalibacterium prausnitzii*	8,00 – 11,00	8,60-11,16	9,00-10,30	8,95-10,78	9,93-10,60	9,18-10,40	9,60-10,54	9,88-10,48
7	*Bacteroides fragilis group / Faecalibacterium prausnitzii*	0,01 – 100	0,002-0,171	0,005-0,5	0,241-4,215	0,046-1,415	0,005-0,422	0,085-1,625	0,092-1,50
8	*Bacteroides thetaiotaomicron*	Любое	-	13,30-13,30	-	8,30-8,30	-	-	-
9	*Akkermansia muciniphila*	Не более 11,00	-	12,30-12,30	-	9,30-9,84	6,47-10,69	9,00-10,69	6,00-7,69
10	*Enterococcus* spp.	Не более 8,00	5,30-6,00	5,84-7,00	7,30-10,15	8,30-8,30	10,84-11,38	8,77-8,77	5,00-11,60

Продолжение таблицы 12

№ п/п	Показатель	Референсные значения для людей	**Группа I (До 1 года)**	**Группа II (1-3 лет)**	**Группа III (4-7 лет)**	**Группа IV (8-14 лет)**	**Группа V (15-20 лет)**	**Группа VI (21-25 лет)**	**Группа VII (от 26 лет)**
			Результат, Q1-Q3						
11	*Escherichia coli enteropathogenic*	Не более 4,00	5,69-7,30	5,30-7,30	6,77-6,77	-	-	-	4,60-4,60
12	*Klebsiella pneumoniae*	Не более 4,00	6,47-6,47	-	-	-	10,47-10,47	-	5,00-5,60
13	*Klebsiella oxytoca*	Не более 4,00	5,00-5,00	-	9,77-9,77	-	7,69-8,22	9,84-9,84	9,00-9,69
14	*Candida* spp.	Не более 4,00	6,00-6,00	-	-	8,00-8,00	-	-	5,00-5,00
15	*Staphylococcus aureus*	Не более 4,00	5,30-7,83	5,69-7,38	6,30-6,30	6,84-7,76	6,30-8,30	5,77-6,69	7,30-7,30
16	*Clostridioides difficile*	Не обнаружено	8,84-8,84	-	-	-	-	-	-
17	*Clostridioides perfringens*	Не обнаружено	7,60-9,24	7,71-9,26	6,69-6,69	-	5,84-7,69	7,30-8,47	-
18	*Proteus vulgaris/mirabilis*	Не более 4,00	6,00-8,69	6,30-7,60	-	7,00-7,90	5,47-7,00	5,00-8,30	7,69-7,69
19	*Citrobacter* spp.	Не более 4,00	5,47-6,30	5,60-10,00	-	-	-	-	-
20	*Enterobacter* spp.	Не более 4,00	7,30-9,30	7,30-7,78	5,47-5,47	6,69-7,00	6,69-8,30	5,69-7,30	7,47-8,30
21	*Fusobacterium nucleatum*	Не обнаружено	5,30-5,69	6,00-6,00	-	-	5,30-5,30	-	5,00-6,47
22	*Parvimonas micra*	Не обнаружено	5,77-7,30	7,26-10,24	-	10,60-10,60	5,62-9,15	6,30-10,30	5,70-7,78
23	*Salmonella* spp.	Не обнаружено	-	-	-	-	-	-	-
24	*Shigella* spp.	Не обнаружено	-	-	-	-	-	-	-

Симбионты и ключевые комменсалы (*Lactobacillus* spp. *(p=1,00), Bifidobacterium* spp. *(p=1,00), Escherichia coli (p=1,000), Bacteroides* spp. *(p=1,00), Faecalibacterium prausnitzii (p=1,00)* выявлены у 100,0% особей во всех возрастных группах, что указывает на схожесть базового состава кишечной микробиоты (Приложение 1).

Общая бактериальная масса (ОБМ) – интегральный показатель, отражающий общее количество всех микроорганизмов, населяющих кишечник. Отличается относительно стабильными показателями и отсутствием выраженного возрастного снижения. Во всех возрастных группах ОБМ несколько ниже, чем типичный для человека диапазон, что свидетельствует о видовых особенностях общей микробной нагрузки у макак резусов. Группа I (детеныши до 1 года) – характеризуется самыми высокими уровнями *Lactobacillus* spp. и *Bifidobacterium* spp., что схоже с младенческой микробиотой человека. Снижение уровня *Lactobacillus* spp. и *Escherichia coli* до минимальных значений наблюдается в группах V-VI. У старых особей (группа VII) уровень *Escherichia coli* оставался сниженным по сравнению с человеческой нормой. Уровень *Faecalibacterium prausnitzii* – одного из главных продуцентов масляной (бутановой) кислоты, остается стабильно высоким во всех возрастных группах, соответствуя человеческой норме.

Соотношение *Bacteroides fragilis* group / *Faecalibacterium prausnitzii* – еще один интегральный показатель, который демонстрирует вариабельность в популяции; у макак резусов в раннем возрасте (группы I, II, IV) оно на порядок ниже, чем у человека, что указывает на иной баланс между этими важными группами микроорганизмов.

Статистически значимые возрастные различия позволили идентифицировать таксоны с выраженной возрастной специфичностью. Наиболее яркой закономерностью характеризуется *Akkermansia muciniphila* (*p=0,003*), частота встречаемости которой прогрессивно возрастала от полного отсутствия у особей группы I и III до максимальных значений в группе VI (50,0%), что может отражать процесс созревания слизистого барьера кишечника. Ее уровни демонстрируют

значительные индивидуальные колебания особенно в группах V и VI. В группе II зафиксирован максимальный уровень, превышающий типичные для человека значения. Однако во взрослом возрасте наблюдается стабилизация концентраций, в пределах, установленных для макак резусов референсных интервалов, которые сохраняются до старости (группа IV-VII) (Таблица 2).

Enterococcus spp. был выявлен во всех семи возрастных группах. Статистически значимые различия в частоте встречаемости между группами были установлены *(p=0,04)*, с пиком распространенности в группах II-III (33,3%). Количественные показатели демонстрировали умеренную вариабельность. В группах IV-VII наблюдается превышение человеческой нормы (>8,00 log10, копий/мл), что может быть вариантом нормы для макак резусов. Данный профиль свидетельствует о постоянном присутствии с выраженными индивидуальными колебаниями.

Fusobacterium nucleatum выявляется спорадически (*p=0,04*) в 4 из 7 групп (I, II, V, VII) в низких или умеренных титрах. Такая нерегулярная картина распространения характерна для транзиторного носительства или эпизодической колонизации. При этом наблюдался U-образный профиль колонизации с пиковыми значениями в группах I (16,7%) и VII (41,67%), что может указывать на реактивацию в старшем возрасте.

Микроорганизмы с клинически значимой, но статистически не достигшей порога значимости частоты встречаемости включали несколько ключевых таксонов. Обнаружены во всех возрастных группах в количествах превышающих человеческую норму: *Enterobacter* spp. (*p=0,33*) проявлял экстремально высокую частоту колонизации в группе I (75,0%) с последующей стабилизацией на уровне 40,0-50,0% у взрослых особей. Аналогичный паттерн доминирования в раннем возрасте с последующим снижением наблюдался для *Staphylococcus aureus* (*p=0,861*) (66,7% в группе I).

Parvimonas micra стабильно выявляется в большинстве возрастных групп (Группы I, II, IV, V, VI, VII) *(p=0,46)*, характеризуется двухфазным распределением с высокими показателями в группах I (50,0%) и VII (66,7%). Данные подтверждают,

что использование человеческих референсов ("не обнаружено") для оценки микробиоты макак резусов некорректно. *Parvimonas micra* является нормальным, постоянно присутствующим компонентом кишечной микробиоты, в отличие от человека.

Анализ видоспецифичных паттернов колонизации позволил выделить три категории микроорганизмов. К "ранним колонизаторам" отнесены *Clostridioides difficile* (*p=0,6*) и *Citrobacter* spp. *(p=0,46)*, обнаруживаемые преимущественно в раннем периоде (Группа I). "Поздние колонизаторы", такие как *Klebsiella pneumoniae (p=0,52)* и *Klebsiella oxytoca (p=0,34)* появлялись в старших возрастных группах. Группу "персистирующих микроорганизмов" составили *Proteus vulgaris/mirabilis (p=0,71),* стабильно присутствующие в большинстве исследуемых групп, а также *Clostridioides perfringens* выявленный в 5 из 7 исследуемых групп (I, II, III, V, VI) *(p=0,29).* Как показывают проведенные ранее исследования, анаэробные спорообразующие палочки рода *Clostridioides,* являются представителями микробиоты толстого кишечника у обезьян [20]. Энтеропатогенная *Escherichia coli* была обнаружена в 4 из 7 исследуемых групп *(p=0,13).*

В отличие от резидентных и персистирующих видов, обнаружение таких таксонов, как *Candida* spp. *(p=0,49)* и *Bacteroides thetaiotaomicron (p=0,07)*, для которых зафиксированы единичные значения без диапазона, с высокой вероятностью отражают случайный характер и не связаны с устойчивым носительством.

Проведенный анализ выявил сложную и разнонаправленную динамику возраст-зависимой колонизации кишечника макак резусов условно-патогенными микроорганизмами и комменсалами.

Важным результатом является отсутствие абсолютных патогенов: *Salmonella* spp. и *Shigella* spp. не были детектированы ни в одной возрастной группе, что свидетельствует о благополучном эпизоотическом статусе исследуемой популяции и контролируемых условиях содержания животных.

Кишечная микробиота макак резусов представляет собой уникальную экосистему, находящуюся в динамическом равновесии с организмом хозяина. Ее основная особенность – постоянное присутствие значительного количества условно-патогенных микроорганизмов, которые являются не отклонением, а вариантом видовой нормы.

Тем не менее референсные интервалы макак резусов значимо отличаются от человеческих по большинству микробиологических показателей, что подтверждает необходимость использования видовых норм.

Наглядное подтверждение этому – комплексный анализ возрастной динамики доминирующих таксонов кишечной микробиоты макак резусов с оценкой статистической значимости выявленных различий между возрастными группами, представленный на рисунке 6.

Статистически значимая возрастная динамика выявлена для большинства показателей ($p<0,01$, по критерию Краскела-Уоллиса): *Lactobacillus* spp. ($p=0,004$) – наблюдается выраженное снижение численности от максимальных значений в группе I (7,74-9,81) к минимальным в группе VII (5,88-6,98), что свидетельствует о значительной перестройке микробного сообщества в процессе онтогенеза. Несмотря на достоверность общего теста, пост-хок анализ не выявил значимых попарных различий между группами, что указывает на распределенный характер изменений. *Bifidobacterium* spp. ($p=0,00005$) – демонстрирует высоко значимые изменения с пиковыми значениями в группах I и IV (9,93-11,18 и 9,60-11,08 соответственно), указывая на сложную нелинейную динамику этого ключевого таксона. Достоверные различия выявлены между группами I и II ($p<0,001$), I и III ($p=0,02$), II и IV ($p=0,04$). Фундаментальные микробные изменения в микробной экосистеме отражает *Escherichia coli* ($p=0,00002$), поскольку данный таксон показывает наиболее значимые возрастные различия с прогрессирующим снижением концентрации от молодого возраста к зрелому. Достоверные различия: I и V ($p<0,001$), I и VI ($p<0,001$), II и VI ($p=0,004$), III и VI ($p=0,002$), IV и VI ($p=0,03$). Характеризующие процессы созревания микробиоты *Bacteroides* spp.

(*p=0,00002*), значительно увеличиваются с возрастом, достигая максимума в группах VI-VII (9,48-10,30).

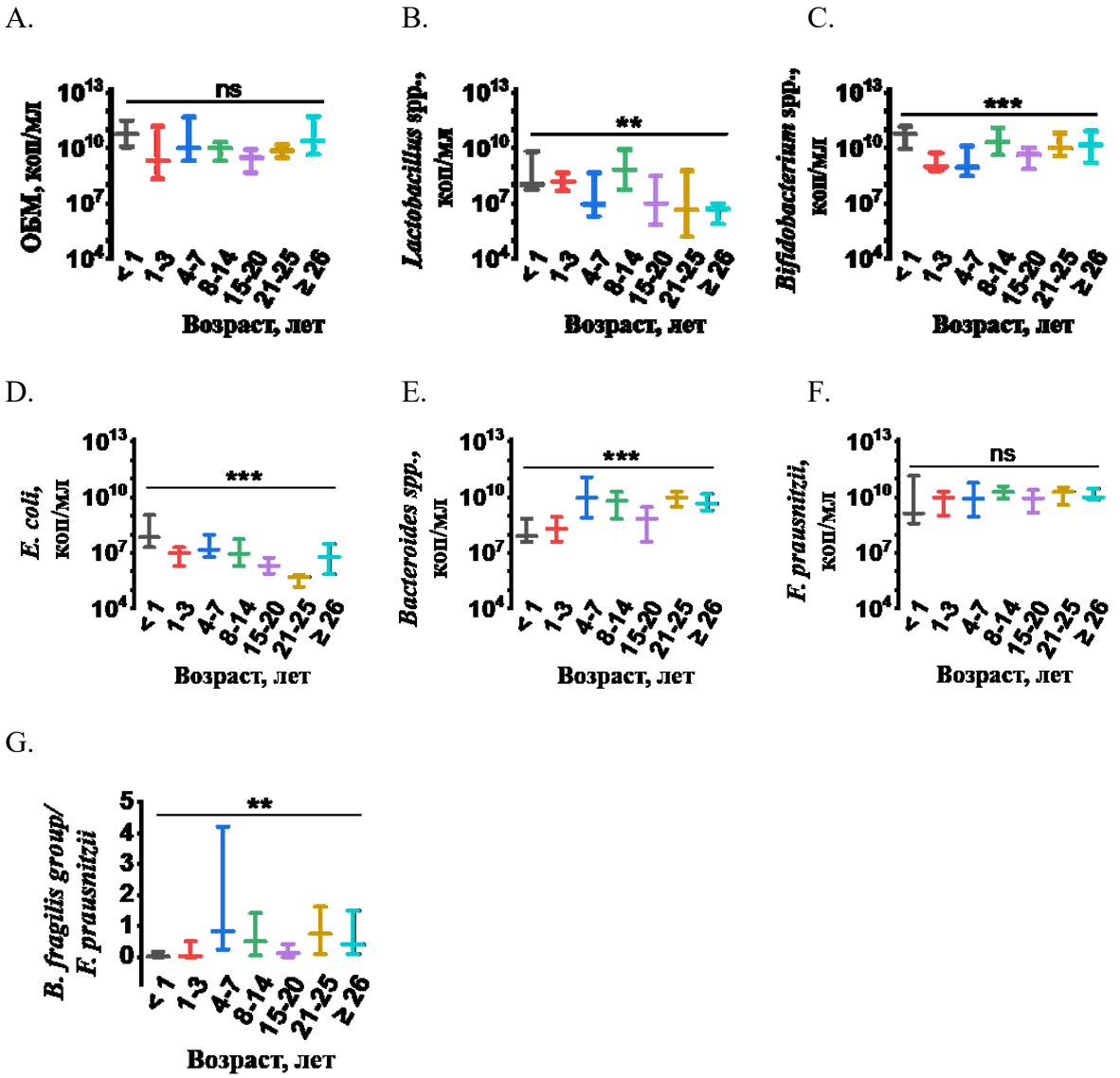


Рисунок 6 – Возрастная динамика относительной численности доминирующих таксонов кишечной микробиоты у макак резусов.
А. Общая бактериальная масса. B. *Lactobacillus* spp. C. *Bifidobacterium* spp. D. *Escherichia coli.* E. *Bacteroides* spp. F. *Faecalibacterium prausnitzii*. G. Соотношение *Bacteroides fragilis* group / *Faecalibacterium prausnitzii* копий/мл. Данные представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха (Q1-Q3). Критерий Краскела – Уоллиса. Уровни значимости: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; ns – статистически незначимые различия.

Достоверные различия с группой I выявлены для групп III-VII ($p<0,001$); с группой II для групп III-VII ($p<0,001$). Значимые изменения баланса между ключевыми бактериальными группами *Bacteroides fragilis* group */ Faecalibacterium prausnitzii* ($p=0,005$), свидетельствуют о возрастных изменениях в функциональном состоянии микробиоты. Общий тест показал достоверные различия, однако пост-хок анализ не выявил значимых попарных различий между конкретными возрастными группами.

Основные стабильные показатели ($p\geq0,05$): ОБМ *($p=0,08$)* остается относительно постоянной на протяжении всей жизни, что свидетельствует о сохранении стабильной количественной кишечной микробиоты при возрастных перестройках качественного состава. *F. prausnitzii* ($p=0,6$) демонстрирует исключительную стабильность во всех возрастных группах, что позволяет рассматривать его как стабильное ядро микробиоты.

Разработанные референсные интервалы, учитывающие видовую принадлежность и возраст животных, являются необходимым инструментом для достоверной оценки состояния кишечной микробиоты в научных исследованиях. Несмотря на сходство, наши результаты не только доказывают неприменимость человеческих нормативов для приматов, но и раскрывают сложную динамику возрастного становления их микробного статуса, что диктует обязательность использования возрастных нормативов.

Для оценки половых различий количественных показателей микробиоты применяли непараметрический U-критерий Манна-Уитни ($p<0,05$). Анализ проводили в возрастных группах (Таблица 13), характеризующихся достаточной и сопоставимой численностью выборок самцов и самок; в группах III (12 самок, самцы отсутствовали) и VI (10 самцов, 2 самки) сравнение не выполнялось ввиду выраженного дисбаланса полов, исключающего корректность статистического вывода.

Таблица 13 – Половые различия в референсных интервалах доминирующих таксонов кишечной микробиоты макак резусов (log10, копий/мл)

№ п/п	Показатель		**Группа I** До 1 года (♂ n=8, ♀ n=4)	**Группа II** 1–3 года (♂ n=27, ♀ n=9)	**Группа IV** 8–14 лет (♂ n=4, ♀ n=8)	**Группа V** 15–20 лет (♂ n=16, ♀ n=8)	**Группа VII** От 26 лет (♂ n=9, ♀ n=3)
1	Общая бактериальная масса	♂	9,40 – 11,20	8,30 – 10,60	9,45 – 11,19	8,51 – 9,60	9,54 – 10,65
		♀	11,01 – 11,68	10,32 – 11,93	9,18 – 10,30	9,01 – 11,57	11,95 – 12,95
		U/*p*	U=5,5; *p=0,09*	U=58; ***p=0,02***	U=19,5; *p=0,61*	U=42,5; *p=0,2*	U=0; ***p=0,02***
2	*Lactobacillus* spp.	♂	7,40 – 10,35	7,48 – 8,70	8,70 – 9,95	5,18 – 7,76	5,65 – 6,93
		♀	8,24 – 9,92	7,70 – 8,78	7,68 – 9,89	7,18 – 8,98	5,85 – 9,85
		U/*p*	U=9; *p=0,27*	U=118,5; *p=0,93*	U=18,5; *p=0,73*	U=100; ***p=0,03***	U=8; *p=0,35*
3	*Bifidobacterium* spp.	♂	9,70 – 10,95	8,70 – 9,85	9,70 – 11,37	8,68 – 9,94	8,90 – 10,78
		♀	10,81 – 11,78	8,65 – 9,30	9,54 – 11,20	9,51 – 10,88	9,30 – 11,00
		U/*p*	U=27,5; *p=0,06*	U=136,5; *p=0,59*	U=17,5; *p=0,87*	U=32,5; *p=0,06*	U=8; *p=0,35*
4	*Escherichia coli*	♂	7,10 – 9,19	5,95 – 7,30	5,92 – 7,79	5,78 – 6,30	5,65 – 7,30
		♀	7,40 – 9,48	7,30 – 7,65	6,40 – 7,83	6,72 – 8,30	7,30 – 7,90
		U/*p*	U=14; *p=0,67*	U=26; ***p<0,001***	U=12; *p=0,55*	U=16; ***p=0,003***	U=4,5; *p=0,12*
5	*Bacteroides* spp.	♂	7,24 – 8,70	7,48 – 8,78	8,74 – 10,24	7,05 – 9,00	9,48 – 10,18
		♀	7,72 – 9,79	8,40 – 9,60	9,02 – 10,30	8,40 – 11,37	9,00 – 10,78
		U/*p*	U=10,5; *p=0,4*	U=56,5; ***p=0,02***	U=14; *p=0,8*	U=27,5; ***p=0,03***	U=17; *p=0,58*
6	*Faecalibacterium prausnitzii*	♂	8,60 – 9,90	9,85 – 10,30	9,24 – 10,44	8,89 – 9,99	9,88 – 10,60
		♀	10,36 – 11,81	8,48 – 9,30	10,10 – 10,70	10,10 – 10,99	9,00 – 10,48
		U/*p*	U=8,5; *p=0,23*	U=206; ***p=0,002***	U=8,5; *p=0,23*	U=22,5; ***p=0,01***	U=16; *p=0,71*
7	*Bacteroides fragilis group / Faecalibacterium prausnitzii*	♂	0,00538 – 0,2935	0,004 – 0,0667	0,15 – 2,4775	0,00167 – 0,383	0,0875 – 1,25
		♀	0,00115 – 0,1026	0,408 – 13,335	0,025 – 1,375	0,0096 – 1,0785	0,0333 – 6,0
		U/*p*	U=24; *p=0,2*	U=32; ***p=0,001***	U=20,5; *p=0,5*	U=50,5; *p=0,43*	U=9; *p=0,46*

В возрастной группе I установлены достоверные половые различия. У самок зафиксированы значимо более высокие значения общей бактериальной массы (U=58, *p=0,02*), уровня *Escherichia coli* (U=26, *p<0,001*), *Bacteroides* spp. (U=56,5, *p=0,02*), а также отношения *Bacteroides fragilis* group / *Faecalibacterium prausnitzii* (U=32, *p=0,001*). В то же время уровень *Faecalibacterium prausnitzii* в данной возрастной группе оказался достоверно выше у самцов (U=206, *p=0,002*).

В группе V также выявлены значимые различия, причем все они направлены в сторону более высоких значений у самок: для *Lactobacillus* spp. (U=100, *p=0,03*), *Escherichia coli* (U=16, *p=0,003*), *Bacteroides* spp. (U=27,5, *p=0,03*) и *Faecalibacterium prausnitzii* (U=22,5, *p=0,01*).

В возрастной группе VII единственным достоверно различающимся показателем явилась общая бактериальная масса, которая была выше у самок (U=0, *p=0,02*). По остальным изученным таксонам статистически значимых межполовых отличий в данном возрасте не зарегистрировано.

Таким образом, половые различия кишечной микробиоты проявляются не во все возрастные периоды, а имеют четкую возрастную специфику. В большинстве случаев значимые различия характеризуются преобладанием показателей у самок, за исключением *F. prausnitzii* в возрасте 1-3 года, где доминируют самцы. Полученные результаты указывают на гетерогенность половых эффектов в разных возрастных группах и обосновывают необходимость учета как пола, так и возраста при интерпретации микробиологических показателей.

Для анализа непрерывной зависимости относительной численности таксонов от возраста были построены точечные диаграммы рассеяния с линиями тренда (Рисунок 7. A-E). Построение линий тренда и расчет коэффициента наклона (k) показали разнонаправленные возрастные изменения: для *Lactobacillus* spp. (Рисунок 7.A) и *Escherichia coli* (Рисунок 7.C) коэффициент наклона был отрицательным (*k<0*), что отражает тенденцию к снижению их относительной численности с возрастом, тогда как для *Bacteroides* spp. (Рисунок 7.D) наклон был положительным (*k>0*), свидетельствуя о тенденции к увеличению. При этом для *Bifidobacterium* spp. и

Faecalibacterium prausnitzii визуализированные линии тренда демонстрировали слабый положительный наклон.

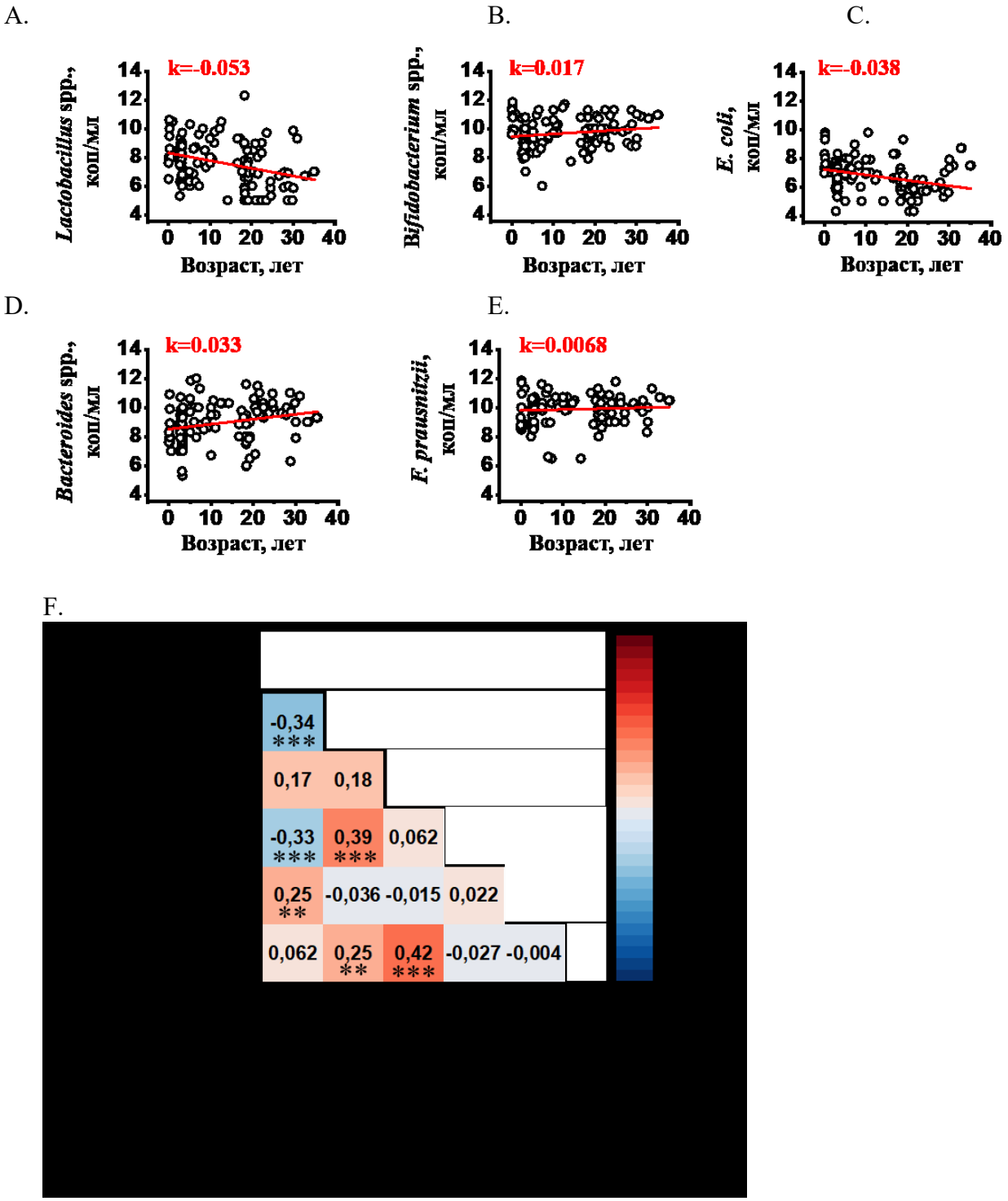


Рисунок 7 – Взаимосвязь возрастной динамики и состава кишечной микробиоты у макак резусов

Графики зависимости относительной численность (копий/мл) симбионтов и ключевых комменсалов: A. *Lactobacillus* spp. B. *Bifidobacterium* spp. C. *Escherichia coli.* D. *Bacteroides* spp. E. *Faecalibacterium prausnitzii*. Красным обозначена линия тренда с коэффициентом наклона (k). F. Нижний треугольник корреляции между возрастом и относительной численностью основных таксонов кишечной микробиоты. Цвета ячеек отображают силу корреляции: красный цвет указывает на положительную корреляцию, а синий - на отрицательную. В ячейках указаны коэффициенты Пирсона (r).

Расчет коэффициента наклона линии тренда не только количественно подтвердил выявленные ранее возрастные различия, но и позволил установить направление и силу непрерывной связи между возрастом особи и численностью ключевых таксонов. Это указывает на наличие устойчивых онтогенетических трендов: прогрессирующего снижения доли *Lactobacillus* spp. и *Escherichia coli*, а также увеличения доли *Bacteroides* spp. в составе кишечной микробиоты макак резусов на протяжении жизни.

Результаты корреляционного анализа, представленные в виде матрицы корреляций (Рисунок 7.F), выявили статистически значимые линейные связи с возрастом. Обнаружена умеренная отрицательная корреляция относительной численности с возрастом для *Lactobacillus* spp. ($r = -0,34$, $r^2 = 11,56\%$, $p<0,001$) и *Escherichia coli* ($r= -0,33$, $r^2 = 10,89\%$, $p<0,001$). Для *Bacteroides* spp. выявлена слабая, но достоверная положительная корреляция ($r=0,25$, $r^2 = 6,25\%$, $p<0,01$).

Для *Bifidobacterium* spp. ($r=0,17$, $r^2 = 2,89\%$, $p=0,07$) и *Faecalibacterium prausnitzii* ($r=0,062$, $r^2 = 0,38\%$ $p=0,51$) значимой линейной связи с возрастом не обнаружено, что может свидетельствовать о наличии нелинейной зависимости или значительном влиянии иных, неучтенных факторов.

Выявлены корреляции между относительными численностями бактерий: умеренная положительная связь – увеличение численности *Lactobacillus* spp. сопряжено с ростом *Escherichia coli* ($r=0,39$, $r^2=15,3\%$, $p<0,001$); умеренная положительная корреляция наблюдается между *Bifidobacterium spp. и Faecalibacterium prausnitzii* ($r=0,42$, $r^2=17,5\%$, $p<0,001$), их численности изменяются синхронно. Кроме того, выявлена слабая положительная связь *Lactobacillus* spp. и *Faecalibacterium prausnitzii* ($r=0,25$, $r^2=6,3\%$, $p=0,006$).

Таким образом, несмотря на умеренные значения коэффициента корреляции, доля объясняемой вариации ($r^2=10–12\%$) является статистически значимой ($p<0,001$) и, учитывая высокую сложность микробной экосистемы, свидетельствует о существенном вкладе возраста в формирование количественных характеристик ключевых таксонов кишечной микробиоты. Полученные данные подтверждают, что возраст выступает значимым фактором, определяющим структуру микробного

сообщества, а выявленные индикаторные таксоны могут рассматриваться в качестве маркеров возрастных этапов развития организма. Установленные закономерности отражают сложный характер перестроек кишечной микробиоты в процессе онтогенеза макак резусов, где наряду с выраженными линейными трендами для одних таксонов (*Lactobacillus* spp., *Escherichia coli, Bacteroides* spp.) наблюдаются более сложные паттерны динамики для других (*Bifidobacterium* spp., *Faecalibacterium prausnitzii).* Обнаруженные положительные корреляции между относительными численностями таксонов указывают на то, что возрастные перестройки микробиоты не ограничиваются изолированными изменениями отдельных групп, а затрагивают межвидовые взаимодействия, что подтверждает системный характер онтогенетической сукцессии кишечного сообщества

3.2 Характеристика кишечной микробиоты макак резусов на основе анализа гена 16S рРНК методом метагеномного секвенирования

В результате проведенного метагеномного секвенирования, включенных в исследование 17 образцов, накоплен общий массив данных объемом 369 Mb (Мегабаз) и с медианным покрытием образца равным 40397 прочтений. После проведения всех процедур фильтрации, описанных в разделе «Материалы и методы», была сформирована подгруппа образцов (n = 15), покрытие которых составило не менее 1000 отфильтрованных прочтений. В эту подгруппу вошли 9 образцов от старых особей, 4 – от молодых и 2 – от детенышей. Всего в анализируемом массиве данных было обнаружено 190 уникальных видов бактерий. В группе детенышей наблюдалось 70 уникальных видов, в группе молодых – 92 и 114 в группе старых обезьян. Для визуализации композиции бактериальной микробиоты была построена тепловая карта с агломерацией массива до уровня вида (Рисунок 8). Деревья на графике были построены с помощью алгоритма агломеративной кластеризации. Использовалось корреляционное расстояние для кластеризации образцов и евклидово расстояние для кластеризации видов.

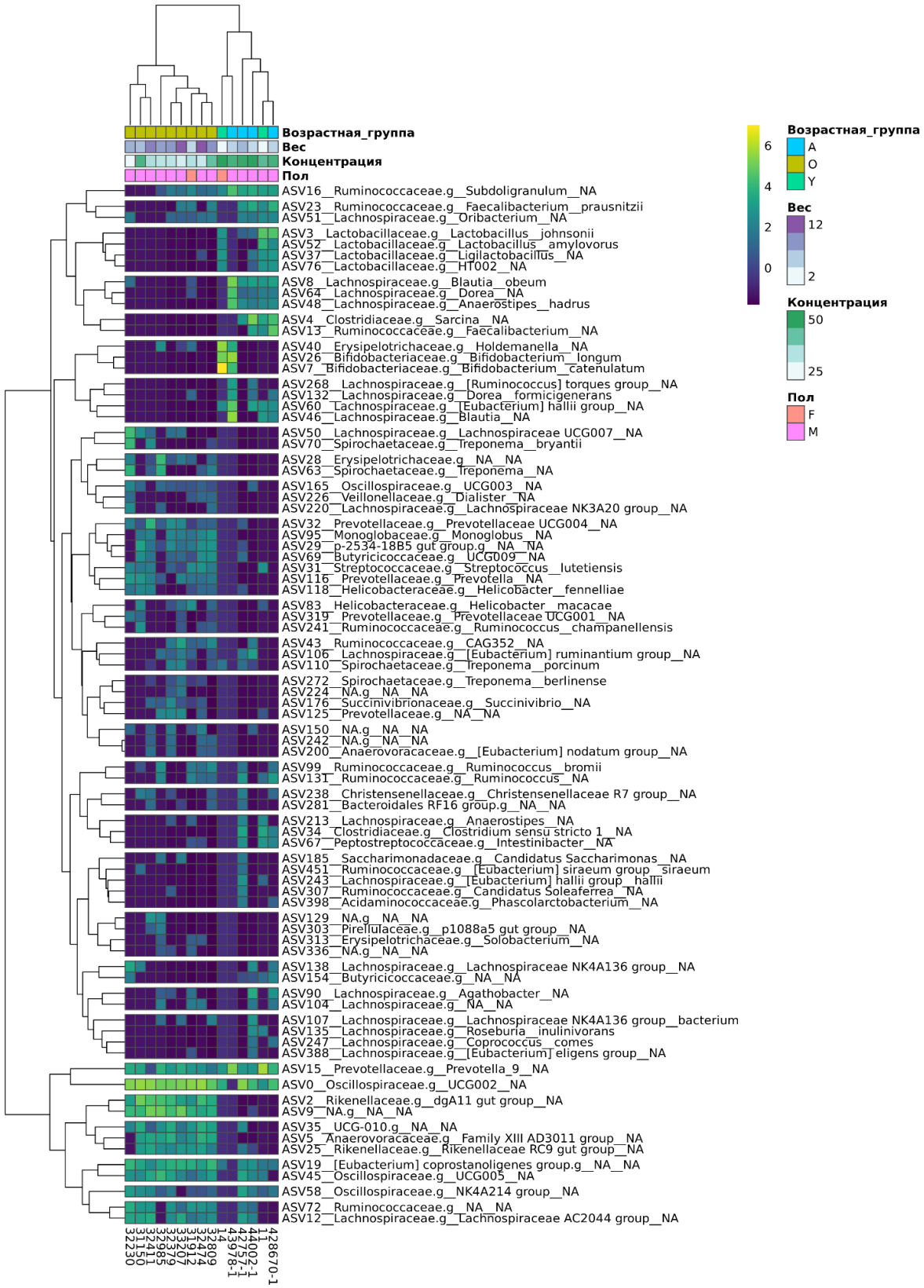


Рисунок 8 – Тепловая карта профиля метагенома исследуемого набора данных (clr преобразование, фильтрация ASV со следующими критериями: обнаружение=10, распространенность=0,1). Возрастная группа (Y – детеныши, A – молодые, O – старые). Вес макаки (кг). Концентрация ДНК, нг/трансплантации кишечной микробиотыл.

Большая часть бактерий представлена филами *Firmicutes*, *Bacteriodetes* и *Actinobacteriota* (Рисунок 9.A), которые являются доминирующими в кишечнике у людей [121]. Для оценки вариации мажорных составляющих микробного сообщества были построены боксплоты с распределением значений относительной представленности, трансформированных с помощью clr (Рисунок 9.E-G).

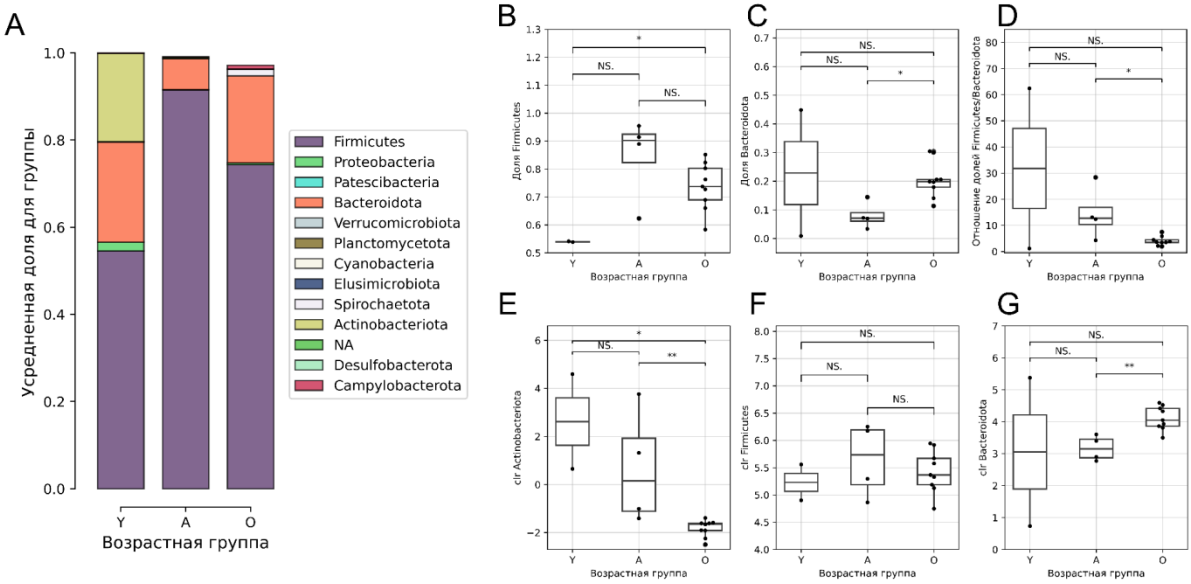


Рисунок 9 – Отличия кишечной микробиоты макак с учетом возраста (Y – детеныши, A – молодые, O –старые). A – Медианная представленность фил в разных возрастных группах. B-C боксплоты для распределений долей относительных представленностей для *Firmicutes* и *Bacteriodetes*. D –боксплоты для распределения отношений долей относительных представленностей *Firmicutes/Bacteriodetes*. E-F – боксплоты с распределением clr трансформированных долей относительной представленности мажорных таксонов

Представители фила *Actinobacteriota* визуально уменьшаются по возрастным группам, их максимальная представленность наблюдается в группе детенышей, а минимальная в группе старых макак. Отличия между группой молодых и старых макак являются статистически значимыми (p-value $<<0,05$). Максимальная доля бактерий отдела *Firmicutes* достигается в группе молодых макак, медианы значений clr в группе детенышей и старых макак практически не отличается. Фила *Bacteriodetes* увеличиваются в представленности по возрастным группам и статистически значимо отличаются в группах молодых и старых макак (p-value $<<0,05$). Отдельно было оценено отношение относительных представленностей *Firmicutes* к *Bacteriodetes*, где наблюдается падение с возрастных групп и статистически значимо различаются распределения значений между группами молодых и старых макак (p-value $<0,05$).

Результаты сходятся с опубликованными в работе [28] за исключением группы макак детенышей. Однако, результаты, полученные для группы детенышей, могут отличаться вследствие малого количества анализируемых образцов.

Оценка меры альфа разнообразия проводилась с помощью трех метрик: Chao1 richness, Shannonentropy и Simpsonentropy (Рисунок 10).

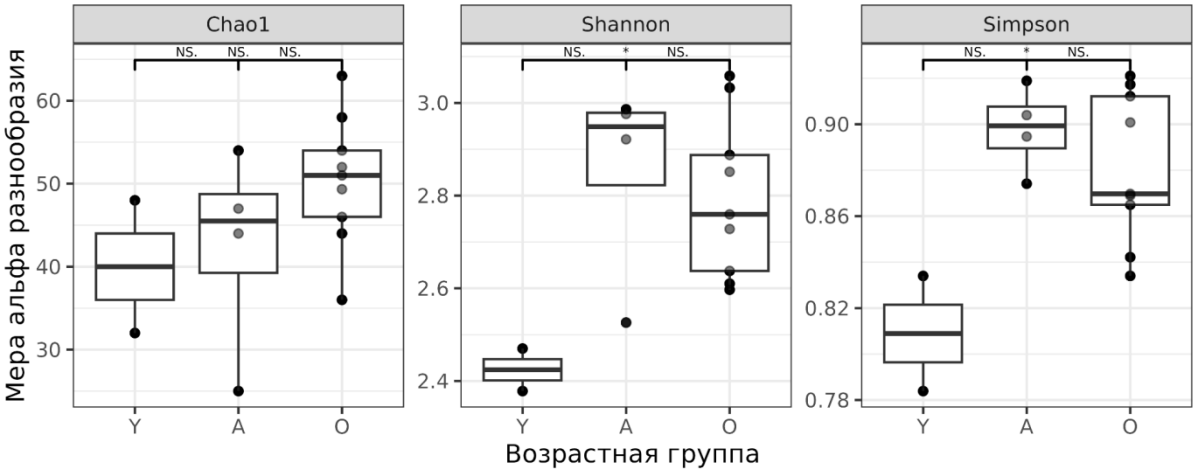


Рисунок 10 – Оценка альфа разнообразия для разных возрастных групп. Agestatus – возрастная группа (Y – детеныши, A – молодые, O – старые).
(NS – не значимая разница, *p-value <0,05).

Наименьшие значения Shannonentropy и Simpsonentropy наблюдались в группе детенышей, наибольшие в группе старых макак. Значения Chao1 richness имеет восходящий тренд по возрастным группам (наименьшие значения наблюдаются в группе детенышей, наибольшие в группе старых). Отличия между группой детенышей и любой другой группой нельзя считать достоверными, поскольку в группе макаки детеныши всего 2 точки. Однако, предварительно, общий тренд говорит о повышении внутреннего бактериального разнообразия в группе молодых относительно детенышей. Вероятно, это связано с более разнообразным питанием и колонизацией кишечника внешней бактериальной флорой. Статистически значимых отличий между группами выявлено не было.

Полученные результаты согласуются с ранее опубликованными литературными данными, в которых также показано, что альфа разнообразие также склонно сначала повышаться по возрастным группам, а после снижаться [28]. Однако, полученные в настоящей работе значения разнообразия отличаются от

опубликованных в работе [28] , что, вероятно, является следствием в отличии методики питания.

Для кластеризации образцов был получен PCoA график на расстоянии Брея–Кертиса для относительной представленности индивидуальных видов бактерий (Рисунок 11.А).

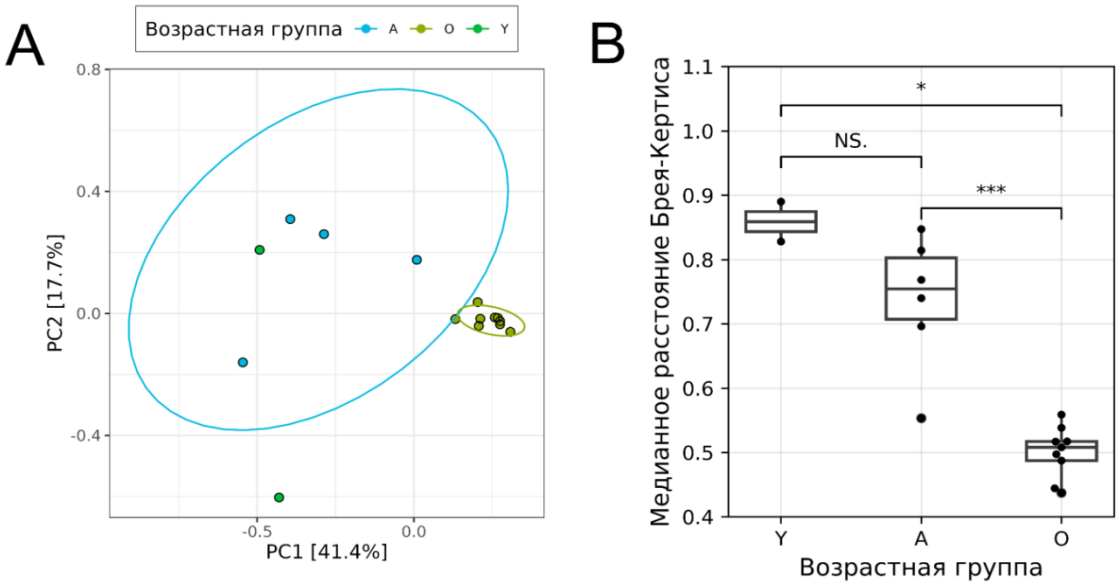


Рисунок 11 – Оценка бета разнообразия разных возрастных групп (Y–детеныши, A–молодые, O–старые). A – PCoA график для метагенома исследуемого набора данных. B – Медианные расстояния Брея-Кертиса (NS – не значимая разница, *p-value <0,05).

По 1 координате наблюдается относительно большой процент объясненной дисперсии 41,4%, что, в большей степени, обуславливается сильными межвозрастными отличиями в составе микробиоты. Причем, образцы макак из группы детенышей мало отличаются от группы молодых особей. Все это дополнительно подтверждается деревьями агломеративный кластеризации образцов на рисунке 8.

Вариации внутри группы старых макак значительно меньше по сравнению с группами молодых и детенышей. Этот тезис дополнительно подтверждается на Рисунке 11.В., на котором представлены боксплоты для медианных расстояний Брея-Кертиса для всех образцов внутри возрастной группы. Статистически значимые отличия между распределениями медианных расстояний Брея-Кертиса были обнаружены между группой старых и молодых макак (*p*-value *<<<0,05*).

Оценка дифференциальной представленности бактерий проводилась только в сравнении группы образцов от молодых и старых макак, поскольку в группе макак детенышей было всего два образца. При использовании инструмента DESeq2 дифференциально представленными считались только те организмы, для которых значения |log2FoldChange|>*2* и *p*-value <*0,05* (Рисунок 12).

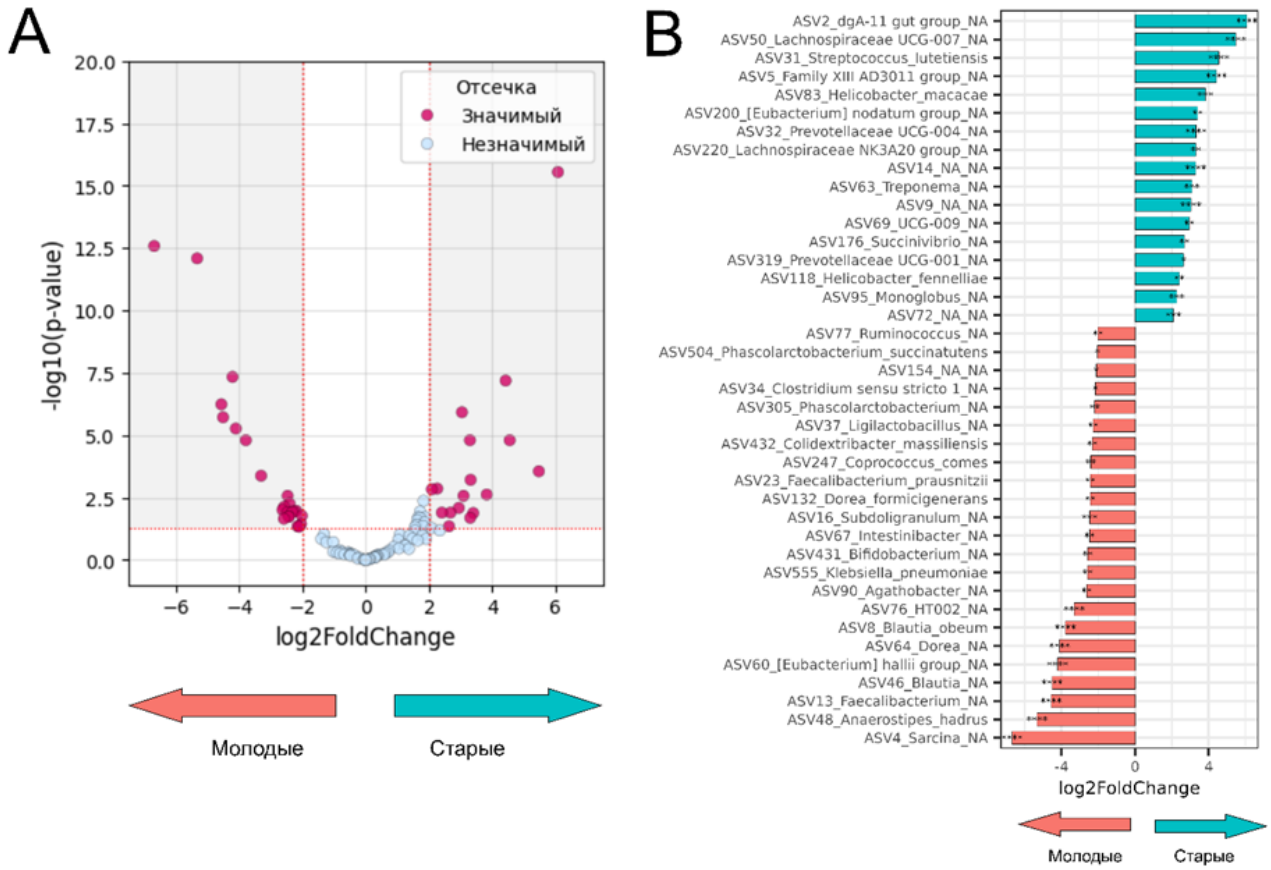


Рисунок 12 – Результаты оценки дифференциальной представленности микроорганизмов. А – Volcano диаграмма, полученная по результатам определения дифференциально представленных микроорганизмов с помощью DESeq2. В – столбчатая диаграмма, полученная по результатам DESeq2 (*p-value≤0,05, **p-value≤0,01, ***p-value≤0,001, ****p-value=0)

Среди выявленных дифференциально представленных таксонов в микробиоте кишечника взрослых особей по сравнению с группой старых животных наблюдается повышенная представленность *Faecalibacterium, Blautia, Eubacterium*, которые относятся к группе бутират-продуцирующих бактерий, обеспечивающих энергией колоноциты, оказывающих противовоспалительное и противоопухолевое действие, а также усиливающих регенерацию кишечного эпителия у людей [40, 216], что указывает на отсутствие нарушений состояния местного иммунитета кишечника. При этом в микробиоте кишечника старых особей наблюдается повышенная

представленность *Streptococcus и Lachnospiraceae,* которые можно интерпретировать как маркеры воспаления [121, 164].

Оценка дифференциальной представленности между группами детенышей и старых, и детенышей и молодых не проводилась в связи с малым количеством образцов в группе. Стоит отметить, что в полученных результатах наблюдаются большие значения размера эффекта. Это, по-видимому, также объясняется сильными межвозрастными отличиями.

Проведенный анализ данных гена 16S рРНК метагеномного секвенирования кишечной микробиоты макак резусов показал, что в анализируемой группе образцов доминируют бактерии, относящиеся к филам *Firmicutes*, *Bacteriodetes* и *Actinobacteriota,* которые также являются доминирующими у людей. Однако их соотношение меняется в разных возрастных группах. Во всех возрастных группах мажорная часть бактериальной флоры принадлежала к филе *Firmicutes.* Однако, фила *Actinobacteriota* в большей степени была представлена в образцах макак детенышей, снижаясь с увеличением возраста животного. Также с возрастом наблюдалось снижение соотношения *Firmicutes*/*Bacteriodetes*.

В результате анализа было выявлено, что альфа разнообразие кишечной микробиоты разных возрастных групп макак резусов не имеет статистически значимых отличий. В то же время, наибольшие абсолютные значения альфа разнообразия наблюдались в группе молодых особей. Наблюдаемые отличия между группами макак в большей степени объясняются межвозрастными различиями. При этом вариации внутри групп детенышей и молодых меньше, чем в группе старых.

Результаты проведенного секвенирования кишечной микробиоты обезьян, продемонстрировавшие сходство его состава с микробиотой кишечника человека, в сочетании с особенностями возрастных изменений таксономического состава кишечной микробиоты макак резусов, которые в определенной степени могут использоваться в качестве модельной возрастной динамики кишечной микробиоты человека, перспективны для проведения возрастных исследований различных веществ, композиций и других факторов воздействия на организм человека, потенциально способных положительно или отрицательно влиять на его микробиоту.

ГЛАВА 4 Характеристика изменений количественных параметров основных таксонов кишечной микробиоты макак резусов на модели антибиотик-ассоциированной диареи

Для выявления изменений микробиоценоза кишечника у 16 макак резусов с индуцированной антибиотик-ассоциированной диареей проведено сравнение ключевых микробиологических показателей в точке «после приема антибиотиков» с фоновыми значениями. Статистическую значимость различий оценивали с помощью U-критерия Манна-Уитни (Таблица 14).

Таблица 14 – Изменения ключевых показателей микробиоценоза кишечника при антибиотик-ассоциированной диарее (log10, копий/мл)

№ п/п	Показатель	Фон, Me [Q1; Q3]	После АБ, Me [Q1; Q3]	*p*, (тренд)
1	Общая бактериальная масса	9,78 [9,51; 10,24]	8,90 [8,60; 9,24]	<0,0001↓
2	*Lactobacillus* spp.	8,30 [7,97; 9,00]	7,40 [6,89; 7,60]	0,0005↓
3	*Bifidobacterium* spp.	9,30 [9,00; 9,93]	8,81 [8,30; 8,99]	0,002↓
4	*Escherichia coli*	6,40 [5,78; 6,98]	9,30 [8,40; 10,30]	<0,0001↑
5	*Bacteroides* spp.	7,95 [7,60; 8,68]	12,40 [10,85; 13,00]	<0,0001↑
6	*Faecalibacterium prausnitzii*	10,30 [10,00; 10,57]	9,48 [9,30; 9,78]	<0,0001↓
7	*Bacteroides fragilis group/ Faecalibacterium prausnitzii*	0,005 [0,001; 0,048]	1500 [321,4; 5833,3]	<0,0001↑

Примечание: Me – медиана; Q1-Q3 – межквартильный интервал; направление изменений (↓ – снижение, ↑ – повышение). Все различия статистически значимы ($p<0,05$).

Микробиота кишечника обезьян на фоне развившейся у них антибиотик-ассоциированной диареи характеризовалась статистически значимым дисбиотическими сдвигами основных таксонов кишечной микробиоты макак резусов.

Общая бактериальная масса (ОБМ) достоверно снижалась после приема антибиотиков ($p<0,0001$) с 9,78 до 8,90 копий/мл. Это указывает на угнетение общей микробной популяции под действием антибиотиков.

Содержание представителей облигатной микробиоты также существенно уменьшилось. Уровень *Lactobacillus* spp. снизился 8,30 до 7,40 копий/мл ($p=0,0005$), а *Bifidobacterium* spp. – с 9,30 до 8,81 копий/мл ($p=0,002$). Особенно выраженное снижение отмечено для *Faecalibacterium prausnitzii*: его концентрация уменьшилась с 10,30 до 9,48 копий/мл ($p<0,0001$), что указывает на подавление

одного из ключевых компонентов здоровой микробиоты, обеспечивающего колонизационную резистентность и продукцию бутирата.

Напротив, представители факультативно и анаэробной микрофлоры продемонстрировали резкий рост. Концентрация *Escherichia coli* возросла с 6,40 до 9,30 копий/мл ($p<0,0001$), а *Bacteroides* spp. – с 7,95 до 12,40 копий/мл ($p<0,0001$). Подобный избиточный рост является типичным следствием антибиотик-индуцированного дисбиоза и отражает нарушение баланса между различными микробными группами.

Ключевым индикатором дисбиотических изменений является соотношение *Bacteroides fragilis* group / *Faecalibacterium prausnitzii*. Данный показатель увеличился с 0,005 до 1500 ($p<0,0001$), что свидетельствует о глубоком анаэробном дисбалансе. Доминировании *Bacteroides fragilis* group на фоне выраженного дефицита *Faecalibacterium prausnitzii*. Такое изменение является ключевым маркером антибиотик-индуцированных нарушений микробиоценоза кишечника.

Таким образом, на фоне антибиотик-ассоциированной диареи у макак резусов развивается выраженный дисбиоз кишечника, который характеризуется статистически значимым ($p<0,05$) снижением общей бактериальной массы и численности представителей облигатной микрофлоры (*Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Faecalibacterium prausnitzii*) при одновременном достоверном повышении содержания *Escherichia* coli и *Bacteroides* spp. Зарегистрированное увеличение соотношения *Bacteroides fragilis* group / *Faecalibacterium prausnitzii* отражает глубокий анаэробный дисбаланс и является ключевым звеном антибиотик-индуцированных нарушений микробиоценоза кишечника. Выявленные изменения служат исходной точкой для последующей оценки эффективности трансплантации кишечной микробиоты.

ГЛАВА 5 Коррекция нарушений микробиоценоза кишечника макак резусов с антибиотик-ассоциированной диареей методом трансплантации кишечной микробиоты

5.1 Скрининг потенциальных доноров

На этапе подготовки к трансплантации кишечной микробиоты был составлен список показателей для исследования потенциальных доноров и проведен их отбор на основе ретроспективного анализа данных и особенностей инфекционных и паразитарных болезней человека и приматов. Животные были обследованы на вирусные, бактериальные и паразитарные инфекции/инвазии: на наличие бактерий (*Salmonella, Shigella, Campylobacter, патогены Escherichia coli, Clostridioides difficile/perfringens, Staphylococcus aureus, Yersinia, Helicobacter pylori.* ванкомицин-резистентный *Enterococcus spp.*), токсинов А и В к *Clostridioides difficile,* дрожжевых грибов рода *Candida*; гепатита A/B/C/E, *Adenovirus, Rotavirus, Norovirus*, CMV, EBV, HSV-1,2; простейших (*Balantidium coli, Blastocystis hominis, Cryptosporidium spp., Entamoeba histolytica, Giardia lamblia)* и гельминтов (*Strongyloides stercoralis, Trichocephalis trichiuris*), а также определяли концентрацию фекального кальпротектина.

В начале исследования по подбору доноров был проведен клинический осмотр животных, общий клинический (Таблица 15) и биохимический анализ крови (Таблица 16).

Таблица 15 – Гематологические показатели потенциальных доноров

№ Обезьяны	Пол	Дата Рожд−я	Гематологичекие показатели													
											Лейкоцитарная формула, %					
			RBC, × 10^{12}/л (5,00 – 6,20)	MCV, фл (52 – 97)	HGB, г/л (110 – 145)	MCH, пг (18,0 – 33,0)	MCHC, г/л (238 – 442)	HCT, % (26,0 – 45,0)	PLT, × 10^9/л (200 – 400)	WBC, × 10^9/л (5,5 – 13,0)	MO (1,0 – 5,0)	LY (25,0 – 55,0)	NE (35,0 – 65,0)	EO (1,0 – 5,0)	BA (0,0 – 2,0)	СОЭ, мм/ч (1 – 5)
47767	♂	15.06.21	5,35	70,5	120	22,4	318	37,7	413	14,3	4,9	9,3	28,7	0,9	0,4	2
48060	♀	18.10.21	5,85	68,9	123	21,0	305	40,3	430	13,2	2,6	74,5	21,4	0,6	0,9	1
47482	♀	19.04.21	6,13	69,5	131	21,4	308	42,6	577	10,2	7,2	55,6	36,2	0,6	0,4	2
48260	♂	25.03.22	5,59	72,8	131	22,2	305	42,9	431	14,4	5,8	72,9	18,9	1,7	0,7	1
48362	♂	28.03.22	6,15	72,0	140	22,8	316	44,3	299	10,7	4,9	70,2	23,5	1,1	0,3	1
48261	♀	25.03.22	5,79	70,6	130	22,5	318	40,9	236	11,0	4,4	65,6	29,1	0,3	0,6	2
48326	♂	20.04.22	5,78	69,6	128	22,1	318	40,2	461	15,6	3,2	58,7	36,0	1,1	1,0	1
48251	♂	22.03.22	6,29	71,2	150	23,8	335	44,8	44	11,4	5,6	20,9	71,7	0,3	1,5	1

Таблица 16 – Биохимические показатели сыворотки крови потенциальных доноров

№ Обезьяны	Пол	Дата Рожд−я	Биохимичекие показатели										
			Бил.общ. (3,76–6,25)	Креатинин (75,2–101,4)	Альбумин (54,4–61,6)	Щелоч. фос−за (886–1482)	ГГТ (0–50)	АСТ (54,6–103,8)	АЛТ (43,2–75,6)	Na+ (135–155)	K+ (3,3–5,1)	СРБ (0,0–10,0)	АЛТ/ АСТ (1,0–1,2)
47767	♂	15.06.21	7,1	91	49	822	93	37	57	108	6,0	0,0	1,5
48060	♀	18.10.21	6,2	95	49	1394	103	37	35	107	3,7	0,0	0,9
47482	♀	19.04.21	6,7	93	50	1411	129	36	47	103	6,7	0,0	1,3
48260	♂	25.03.22	8,3	86	51	1083	107	54	70	107	3,5	0,0	1,3
48362	♂	28.03.22	11,6	98	53	1340	100	31	28	109	4,9	0,0	0,9
48261	♀	25.03.22	10,8	88	55	1508	83	47	64	105	6,3	0,0	1,4
48326	♂	20.04.22	7,4	79	41	1493	78	38	32	106	3,6	0,0	0,8
48251	♂	22.03.22	7,2	79	76,1	328	78	44	33	153	4,8	0,0	0,7

Далее определяли наличие вирусов гепатитов (A, B, C, E), Adenovirus, Rotavirus, Norovirus, CMV, EBV, HSV−1,2 для выявления серонегативных особей методом ИФА (Таблица 17).

Таблица 17 – Иммуноферментный анализ образцов сыворотки крови и фекалий, полученных от потенциальных доноров

№ п/п	№ обезьяны	ОПкрит.										
		HAV−Ag ≥0,261	HBV ≥0,108	HCV ≥0,342	HEV		Adenovirus−Ag ≥0,261	Rotavirus−Ag ≥0,260	Norovirus−Ag ≥0,251	CMV IgG ≥0,243	EBV IgG ≥0,229	HSV−1,2 IgG ≥0,271
					IgG ≥0,233	Ig M ≥0,232						
1	47767	0,117	0,101	0,042	0,040	0,039	0,105	0,068	0,084	**1,172**	0,036	0,117
2	48060	0,049	0,073	0,042	0,041	0,040	0,130	0,220	0,087	0,078	0,210	0,058
3	47482	0,071	0,048	0,042	**1,173**	0,039	0,095	0,209	0,072	0,106	0,038	0,151
4	48260	0,051	0,057	0,042	0,041	0,041	0,102	0,249	0,083	0,054	0,042	0,202
5	48362	0,069	0,093	0,042	0,040	0,042	0,067	0,218	0,077	0,066	0,092	0,082
6	48261	0,049	0,074	0,042	0,040	0,042	0,186	0,060	0,076	0,076	0,042	0,130
7	48326	0,081	0,061	0,042	0,040	0,045	0,894	0,185	0,085	0,099	0,042	0,099
8	48251	0,076	0,072	0,042	0,040	0,045	0,103	0,201	0,078	0,077	0,042	0,148

У обезьяны № 47767 обнаружен IgG к ЦМВ, а у обезьяны №47482 IgG к гепатиту Е.

Для исключения патогенных энтеробактерий была проведена ПЦР-диагностика кишечной микробиоты (Таблица 18-21).

Таблица 18 – Количественный состав микробиоты толстой кишки потенциальных доноров. Набор реагентов «КОЛОНОФЛОР-16 (биоценоз)»

№ п/п	Показатель	Норма	47767	48060	47482	48260	48362	48261	48326	48251
1	Общая бактериальная масса	Не более 10^12	3*10^10	2*10^10	4*10^8	8*10^6	3*10^9	10^7	8*10^10	3*10^8
2	*Lactobacillus* spp.	10^7 – 10^8	7*10^6	10^7	2*10^7	2*10^5	**2*10^8**	**10^8**	**2*10^9**	*10^8
3	*Bifidobacterium* spp.	10^9 – 10^10	8*10^8	8*10^8	5*10^8	7*10^7	5*10^9	2*10^9	**10^11**	3*10^9
4	*Escherichia coli*	10^7 – 10^8	3*10^6	10^6	4*10^6	2*10^6	9*10^6	5*10^6	7*10^6	10^6
5	*Bacteroides* spp.	10^9 – 10^12	3*10^10	2*10^10	4*10^8	4*10^6	2*10^8	10^7	2*10^8	2*10^9
6	*Faecalibacterium prausnitzii*	10^8 – 10^11	5*10^9	5*10^8	10^9	2*10^9	10^10	8*10^8	3*10^10	4*10^9
7	*Bacteroides thetaomicron*	любое	не обн.	не обн.	не обн.	**3*10^8**	не обн.	не обн.	не обн.	не обн.
8	*Akkermansia muciniphila*	не более 10^11	не обн.	не обн.	не обн.	**3*10^8**	не обн.	не обн.	не обн.	не обн.
9	*Enterococcus* spp.	не более 10^8	не обн.	не обн.	не обн.	не обн.	не обн.	не обн.	не обн.	не обн.
10	*Escherichia coli enteropathogenic*	не более 10^4	**3*10^6**	**10^6**	не обн.	**2*10^6**	не обн.	не обн.	не обн.	не обн
11	*Klebsiella pneumoniae*	не более 10^4	не обн.	не обн.	**3*10^8**	не обн.	не обн.	не обн.	не обн.	не обн.
12	*Klebsiella oxytoca*	не более 10^4	**2*10^6**	**3*5**	**2*10^6**	не обн.	не обн.	не обн.	не обн.	не обн.
13	*Candida* spp.	не более 10^4	**10^9**	не обн.	не обн.	не обн.	не обн.	не обн.	не обн.	не обн.
14	*Staphylococcus aureus*	не более 10^4	**7*10^5**	не обн.	**3*10^8**	не обн.	**5*10^8**	не обн.	не обн.	не обн.
15	*Clostridioides difficile**	отсутствует	не обн.	не обн.	не обн.	**3*10^8**	**5*10^8**	не обн.	не обн.	не обн.
16	*Clostridioides perfringens*	отсутствует	не обн.	**2*10^10**	не обн.	**5*10^8**	не обн.	не обн.	не обн.	не обн.
17	*Proteus vulgaris/mirabilis*	не более 10^4	**3*10^5**	**5*10^6**	**2*10^8**	не обн.	не обн.	не обн.	не обн.	не обн.
18	*Citrobacter* spp.	не более 10^4	не обн.	не обн.	не обн.	**10^8**	**9*10^8**	не обн.	не обн.	не обн.
19	*Enterobacter* spp.	не более 10^4	не обн.	не обн.	**5*10^5**	**9*10^6**	не обн.	не обн.	не обн.	не обн.
20	*Fusobacterium nucleatum*	отсутствует	не обн.	не обн.	не обн.	**5*10^6**	**6*10^7**	не обн.	не обн.	не обн.
21	*Parvimonas micra*	отсутствует	**6*10^5**	**7*10^5**	**2*10^9**	**4*10^8**	**4*10^9**	не обн.	не обн.	не обн.
22	*Salmonella* spp.	отсутствует	не обн.	не обн.	не обн.	не обн.	не обн.	не обн.	не обн.	не обн.
23	*Shigella* spp.	отсутствует	не обн.	не обн.	не обн.	не обн.	не обн.	не обн.	не обн.	не обн.
24	*Bacteroides fragilis group / Faecalibacterium prausnitzii*	0,01–100	6	40	0,4	**0,002**	0,02	0,0125	**0,00667**	0,5

Примечание: *- токсинов А и В к *Clostridioides difficile не обнаружно*

Таблица 19 – Выявление и дифференциации диарогенных эшерихий

№ п/п	№ обезьяны	EIEC	EHEC	EAgEC	EPEC	ETEC
1	47767	**29,53**	–	–	–	–
2	48060	–	–	–	–	–
3	47482	–	–	–	–	–
4	48260	–	–	–	–	–
5	48362	–	–	–	–	–
6	48261	–	–	–	–	–
7	48326	–	–	–	–	–
8	48251	–	–	–	–	–

Таблица 20 – Выявление *Campylobacter jejuni* (возбудителя кампилобактериоза)

№ п/п	№ обезьяны	*Campylobacter jejuni*
1	47767	**22,15**
2	48060	–
3	47482	**25,05**
4	48260	–
5	48362	**13,99**
6	48261	–
7	48326	–
8	48251	–

Таблица 21 – Выявление *Helicobacter pylori* (возбудителя хеликобактериоза)

№ п/п	№ обезьяны	*Helicobacter pylori*
1	47767	Не обнаружено
2	48060	Не обнаружено
3	47482	Не обнаружено
4	48260	Не обнаружено
5	48362	Не обнаружено
6	48261	Не обнаружено
7	48326	Не обнаружено
8	48251	Не обнаружено

Результаты бактериологического исследования кала (ректальный мазок) на твердых питательных средах (Эндо, Плоскирева, Кровяной агар, Желточно-солевой агар, Энтерококк агар, Иерсиния агар) представлены в таблице 22.

Таблица 22 – Бактериологическое исследование кала

№ п/п	№обезьяны	Выделенные микроорганизмы
1	47767	*E.coli гем.+, E.faecium +++*
2	48060	*E.coli +, E.faecium +++*
3	47482	*E.coli +, E.faecalis гем.+++, E.cloacae+, S.aureus+*
4	48260	*E.coli #, E.faecium +++, S.aureus+*
5	48362	*E.coli +++, E.faecium +++, S.aureus ед.*
6	48261	*E. coli +++, E. coli л/отр. +, E.faecium +++*
7	48326	*E.coli+, E.faecium +++*
8	48251	*E.coli ++, E.faecium +++*

Для выявления метициллин-резистентного *S. aureus* и ванкомицин-резитентных *Enterococcus spp* определили чувствительность к антибиотикам (Таблица 23).

Таблица 23 – Чувствительность к антибактериальным препаратам

№ п/п	№обезьяны	Микроорганизм	Антибиотик	Результат*
1	47767	*E.faecium*	Ванкомицин 30 мг/кг	*S*
2	48060	*E.faecium*	Ванкомицин 30 мг/кг	*S*
3	47482	*E.faecalis гем*	Ванкомицин 30 мг/кг	*R*
4	48260	*E.faecium*	Ванкомицин 30 мг/кг	*S*
5	48362	*E.faecium*	Ванкомицин 30 мг/кг	*S*
6	48261	*E.faecium*	Ванкомицин 30 мг/кг	*S*
7	48326	*E.faecium*	Ванкомицин 30 мг/кг	*S*

Примечание: *S – чувствительный, I – умеренно-чувствительный, R – устойчивый

В таблице 24 представлены результаты паразитологичского исследования.

Таблица 24 – Паразитологическое исследования кала.

№ п/п	Показатель	47767	48060	47482	48260	48362	48261	48326	48251
1	*Balantidium coli*	–	–	**Обн.**	–	–	–	–	–
2	*Blastocystis hominis*	–	–	–	–	–	–	–	–
3	*Cryptosporidium*	–	–	–	–	–	–	–	–
4	*Entamoeba histolytica*	–	–	–	–	–	–	–	–
5	*Giardia lamblia*	–	–	–	–	–	–	–	–
6	*Strongyloides stercoralis*	–	–	–	–	–	–	–	–
7	*Trichocephalis trichiuris*	–	–	–	–	–	–	–	–

Примечание: (–) не обнаружено

Результаты проведенного скрининга представленны в таблице 25.

.

Таблица 25 – Результаты скрининга потенциальных доноров

№ п/п	Показатель*		47767	48060	47482	48260	48362	48261	48326	48251
1	Общий анализ крови (ОАК)		–	–	–	–	–	–	–	–
2	Биохимический анализ крови (БАК)		–	–	–	–	–	–	–	–
3	ВИРУСНЫЕ ИНФЕКЦИИ	Гепатиты А	–	–	–	–	–	–	–	–
4		Гепатиты В	–	–	–	–	–	–	–	–
5		Гепатиты С	–	–	–	–	–	–	–	–
6		Гепатиты Е	–	–	+	–	–	–	–	–
7		Adenovirus	–	–	–	–	–	–	–	–
8		Rotavirus	–	–	–	–	–	–	–	–
9		Norovirus	–	–	–	–	–	–	–	–
10		CMV	+	–	–	–	–	–	–	–
11		EBV	–	–	–	–	–	–	–	–
12		HSV−1,2	–	–	–	–	–	–	–	–
13	БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ИНФЕКЦИИ	Возбудители ОКИ	+	+	–	+	–	–	–	–
14		*Campylobacter jejuni*	+	–	+	–	+	–	–	–
15		*Helicobacter pylori*	–	–	–	–	–	–	–	–
16		*Yersinia enterocolitica/pseudotuberculosis*	–	–	–	–	–	–	–	–
17		*Enterococcus spp ванкомицин-резитентные*	–	–	+	–	–	–	–	–
18		*Staphylococcus aureus метициллин-резистентный*	–	–	–	–	–	–	–	–
19		*Грамотрицательные бактерии продуцирующие карбопенемазы и β−лактамазы расширенного спектра*	–	–	+	–	–	–	–	–
20		*Clostridioides difficile/perfringens*	–	+	–	+	+	–	–	–
21	ПАРАЗИТАРНЫЕ ИНФЕКЦИИ	*Balantidium coli*	–	–	+	–	–	–	–	–
22		*Blastocystis hominis*	–	–	–	–	–	–	–	–
23		*Cryptosporidium*	–	–	–	–	–	–	–	–
24		*Entamoeba histolytica*	–	–	–	–	–	–	–	–
25		*Giardia Lamblia*	–	–	–	–	–	–	–	–
26		*Strongyloides stercoralis*	–	–	–	–	–	–	–	–
27		*Trichocephalus trichiurus*	–	–	–	–	–	–	–	–

Примечание: (+) обнаружено, (−) не обнаружено

Дополнительно проведено исследование по определению количества кальпротектина в кале, позволяющее диагностировать воспалительные заболевания кишечника (Таблица 26).

Таблица 26 – Определение кальпротектина в кале

№ п/п	№ обезьяны	Результат (0−50,0 трансплантации кишечной микробиотыг/г)
1	48060	21,8
2	48260	< 19,5
3	48261	< 19,5
4	48326	< 19,5
5	48251	<19,5

По результатам комплексного скрининга, включающего оценку клинического статуса, гематологических и биохимических показателей крови, исключение инфекционной патологии (отрицательные тесты на вирусные, бактериальные и паразитарные агенты), подтверждение нормального уровня фекального кальпротектина (отсутствие скрытого воспаления кишечника) и соответствие качественного и количественного состава кишечной микробиоты референсным значениям, в качестве доноров кишечной микробиоты отобраны три клинически здоровые особи: обезьяны № 48261, № 48326 и № 48251. Отобранные животные удовлетворяют всем критериям включения и могут быть использованы для дальнейших процедур трансплантации кишечной микробиоты (или формирования пула доноров) без дополнительных ограничений.

5.2 Изменения микробиоценоза кишечника после трансплантации кишечной микробиоты с использованием капсул

В результате исследования характера стула в течение эксперимента было отмечено, что у животных 1-ой и 2-ой группы с первого дня введения антибиотиков отмечен кашицеобразный стул, переходящий в жидкий у 2 особей из 8. При этом к 6-м суткам у всех стул вновь стал кашицеобразным или нормальным, тогда как у одной особи жидкий стул впервые появился на 8-й день (в день введения ТКМ) и сохранялся также на 9-й день, после чего перешел в

кашицеобразный. На 1-й день после введения капсул у обезьян 1-й группы стул был нормальным за исключением одной особи, у которой слизь уже не наблюдалась, однако стул перешел в кашицеобразный и через двое суток стал нормальным. В группе плацебо после отмены антибиотиков в течение пяти дней отмечался кашицеобразный стул с последующим восстановлением до нормы.

Для оценки динамики ключевых таксонов кишечной микробиоты, массы тела, температуры, показателей общеклинического и биохимического анализа крови в исследуемых группах использовали непараметрический критерий Фридмана (для повторных измерений). При обнаружении статистически значимой динамики проводили апостериорный анализ с поправкой Данна для множественных сравнений временных точек.

Для оценки влияния трансплантации кишечной микробиоты в форме капсул проведен анализ ключевых микробиологических показателей в группах 1 и 2 (Рисунок 13).

В каждой группе зафиксированы статистически значимые изменения значений ОБМ между различными временными точками наблюдения (Рисунок 13.А). Обнаружена высокодостоверная динамика показателя в группе 1 *(p=0,002)* и 2 *(p=0,001)*. Пост-хок анализ показал статистически значимое увеличение ОБМ на фоне антибиотиков на 1-е *(p=0,007)* и 3-е сутки (*p=0,007)* в группе 1. Антибиотики вызывают рост ОБМ, который усиливается после введения капсул, но затем постепенно снижается. Отмечено аналогичное значимое увеличение ОБМ на фоне антибиотиков на 1-е (*p=0,003*) и на 3-и сутки (*p=0,030*). В отсутствие коррекции ААД рост ОБМ после антибиотиков сохраняется дольше.

Lactobacillus spp. демонстрирует достоверную динамику в группе 2 (*p=0,008*) (Рисунок 13.В). Анализ с поправкой на множественные сравнения показал статистически значимое снижение уровня *Lactobacillus* spp. на 1-е сутки по сравнению с антибиотиками (*p=0,007*). Антибиотики вызывают снижение лактобацилл, которое сохраняется после введения капсул в группе 2.

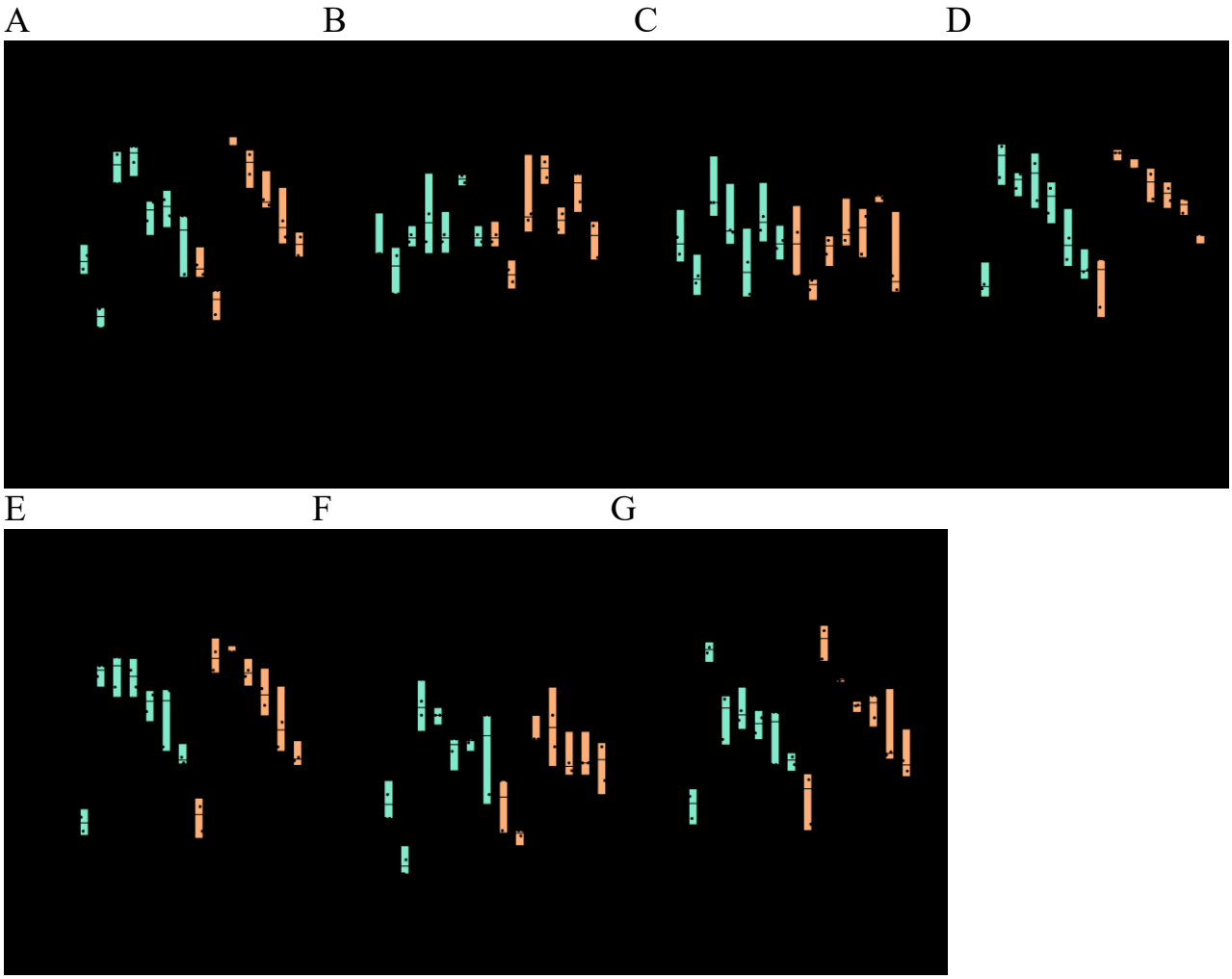


Рисунок 13 – Динамика изменений показателей кишечной микробиоты в группе 1-2. A. ОБМ-общая бактериальная масса. B. *Lactobacillus* spp. C. *Bifidobacterium* spp. D. *Escherichia coli.* E. *Bacteroides* spp. F. *Faecalibacterium prausnitzii*; G. Соотношение *Bacteroides fragilis* group / *Faecalibacterium prausnitzii.* Критерия Фридмана (**p<0,05*; ***p<0,01*; ****p<0,001*; ns – статистически незначимые различия)

Статистически значимые изменения уровня *Bifidobacterium* spp. выявлены только в 2 *(p=0,04)* (Рисунок 13.C). Пост-хок анализ установил значимое увеличение уровня *Bifidobacterium* spp. на 14-е сутки относительно антибиотиков *(p=0,03)*. Бифидобактерии восстанавливаются после антибиотиков на 14-е сутки даже в отсутствии коррекции ААД.

Достоверные изменения в динамике уровня *E. coli* зафиксированы в группе 1 *(p=0,006)* и группе 2 *(p=0,001)* (Рисунок 13.D). В группе 1 отмечено на уровне тенденции увеличение уровня *E. coli* на 1-е сутки после введения капсул *(p=0,09)* и на 3-и сутки *(p=0,07)* по сравнению с фоном. Также отмечена тенденция к увеличению на 1-е сутки относительно антибиотиков *(p=0,05)*. Антибиотики

вызывают рост *E. coli,* который сохраняется после введения капсул, но затем постепенно снижается. В группе 2 антибиотики вызывают достоверный рост *E. coli* по сравнению с фоном *(p=0,005)*, а также достоверное увеличение *E. coli* на 1-е сутки по сравнению с фоном (*p=0,009*). В отсутствие коррекции ААД рост *E. coli* после антибиотиков более выражен и сохраняется дольше.

Достоверная динамика уровня *Bacteroides spp*. установлена в группе 1 *(p=0,002)* и группе 2 *(p=0,003)* (Рисунок 13.E). В группе 1 статистически значимое увеличение уровня *Bacteroides spp*. зафиксировано на 1-е *(p=0,01)* и на 3-и сутки *(p=0,02)* по сравнению с фоновыми значениями. Также отмечено увеличение на 1-е сутки по сравнению с антибиотиками на уровне тенденции *(p=0,05).* Антибиотики вызывают рост бактероидов, который усиливается после введения капсул. В группе 2 установлено значимое увеличение уровня в после антибиотиков *(p=0,04)* и на 1-е суткам *(p=0,009)* относительно фона. В обеих группах к 28-м суткам отмечено визуальное снижение к концу наблюдения.

Статистически значимые изменения динамики *F. prausnitzii* выявлены в группах 1 *(p=0,004)* и 2 *(p=0,02)* (Рисунок 13.F). В группе 1 на фоне антибиотиков установлено значимое увеличение уровня на 1-е сутки *(p=0,009*) и 3-и сутки *(p=0,02)*. Антибиотики не вызывают значимого снижения *F. prausnitzii*, однако после введения капсул происходит его быстрое восстановление. В группе 2 фоне антибиотиков также установлено значимое увеличение уровня на 1-е сутки *(p=0,02).* В отсутствие терапии восстановление *F. prausnitzii* происходит медленнее, чем в группе 1 (на 3-и сутки различия уже незначимы).

Достоверные изменения отношения *B. fragilis group* / *F. prausnitzii* также зафиксированы в группе 1 *(p=0,004)* и группе 2 *(p=0,002)* (Рисунок 13.G). В группе 1 антибиотики вызывают достоверное увеличение относительно фона (*p=0,002)*. Антибиотики вызывают выраженный дисбаланс, который затем постепенно нормализуется после введения капсул (тенденция к снижению к 28-м суткам, *p=0,11*). В группе 2 статистически значимое увеличение показателя в период антибиотикотерапии *(p=0,002)* и на 1-е сутки по сравнению с фоном *(p=0,04)*. Также выявлено значимое снижение к 28-м суткам по сравнению с

антибиотиками *(p=0,04).* В отсутствие терапии дисбаланс сохраняется дольше, но к 28-м суткам нормализуется.

Ряд микроорганизмов (*Clostridioides difficile, Clostridioides perfringens, Enterobacter cloacae, Proteus spp.*) характеризовались нерегулярной встречаемостью и высокой межиндивидуальной вариабельностью концентраций, что сделало невозможным проведение корректного количественного статистического анализа. Оценка проводилась по частоте встречаемости и срокам детекции.

В группе 1 *Clostridioides difficile* не обнаруживался ни на одном сроке, что позволяет предположить отсутствие индукции его роста при проведении трансплантации микробиоты. В группе 2 детектировался на 1-е сутки после введения капсул с частотой 75% (на фоне ААД), что свидетельствует о развитии колонизации на фоне антибиотико-ассоциированной диареи (ААД). В точке «после антибиотиков» его отсутствие во всех группах указывает на то, что сам антибиотик не создает прямых условий для детекции *C. difficile,* а его появление связано с последующими факторами (в группе 2 – с развитием ААД).

Clostridioides perfringens выявлялся в точке «после антибиотиков» зафиксированы только в группе 2 (25%). В группах 1 и 2 частота детекции составила 75%. В группах 1 и 2 микроорганизм появлялся уже на 1-е сутки и сохранялся до 28-х суток наблюдения.

Enterobacter cloacae после антибиотиков появлялся спорадически в группах 1 (25 %) и 2 (50 %). После введения капсул динамика различалась: в группе 1 пик на 7-е сутки (100 %), в группе 2 – пик на 3-и и 7-е (по 75 %), в группе 3 – пик на 14-е (100 %). Во всех группах микроорганизм исчезал к 28-м суткам. Это свидетельствует о том, что капсулы не блокируют колонизацию *E. cloacae*, но могут изменять ее сроки. Во всех группах микроорганизм отсутствовал в фоновом периоде.

Proteus vulgaris/mirabilis выявлялся во всех группах, однако с низкой частотой: на фоне регистрировался только в группе 2 (25 %). После введения капсул: в группе 1 (50 %) на 1-е и 3-и сутки; в группе 2 (25 %) на 1-е и 3-и. Частота

была низкой во всех группах, что указывает на отсутствие активной индукции протея капсулами.

Для оценки межгрупповых различий на каждом этапе эксперимента был применен критерий Краскела-Уоллиса с поправкой Данна. Межгрупповых различий в ключевых показателях кишечной микробиоты в группе 1 и группе 2 не выявлено.

Анализ данных выявил достоверную динамику температуры тела только в группе 1 (*p=0,008*), однако попарные сравнения не выявили ни одной пары временных точек с *p<0,05* (Рисунок 14).

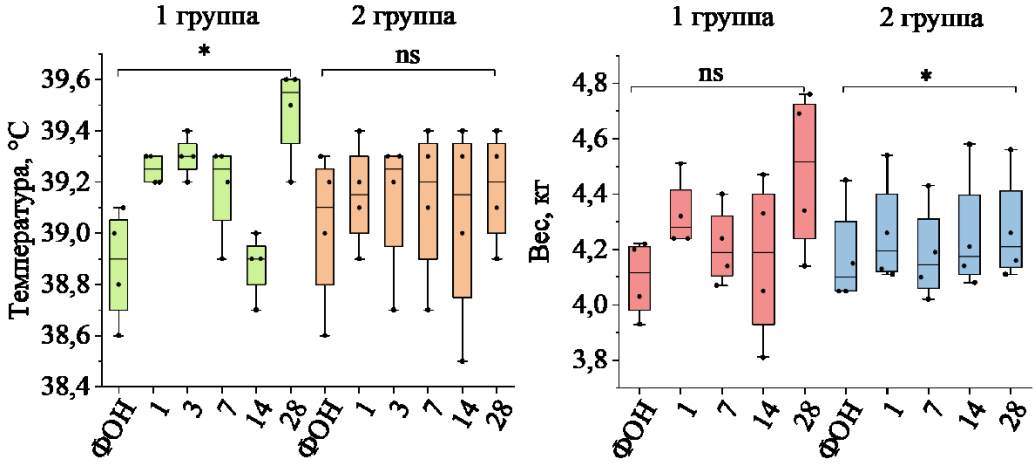


Рисунок 14–Динамика изменения температуры и веса в течении эксперимента в группах 1-2. Критерия Фридмана (*$p<0,05$; **$p<0,01$; ***$p<0,001$; ns – статистически незначимые различия)

Значения уровня температуры в данной группе демонстрировали тенденцию к повышению к концу наблюдения. Это может быть связано с плавным характером изменений.

Выявлена достоверная динамика изменения веса в группе 2 *(p=0,02)*. Однако конкретных пар временных точек в группе 2, между которыми различия достигают статистической значимости не выявлено *(p>0,05)*, что может указывать на плавный характер изменений. Межгрупповых различий в динамике температуры и массы телы группе 1 и 2 не выявлено.

Среди всех показателей общего анализа мочи, только pH и удельный вес подлежали статистической обработке. Однако у животных, получивших капсулы, достоверных изменений динамики в значениях pH не происходило. В

группе 2 зафиксирована достоверная динамика удельного веса мочи на протяжении эксперимента (*p=0,01*). Межгрупповых различий не выявлено (Рисунок 15).

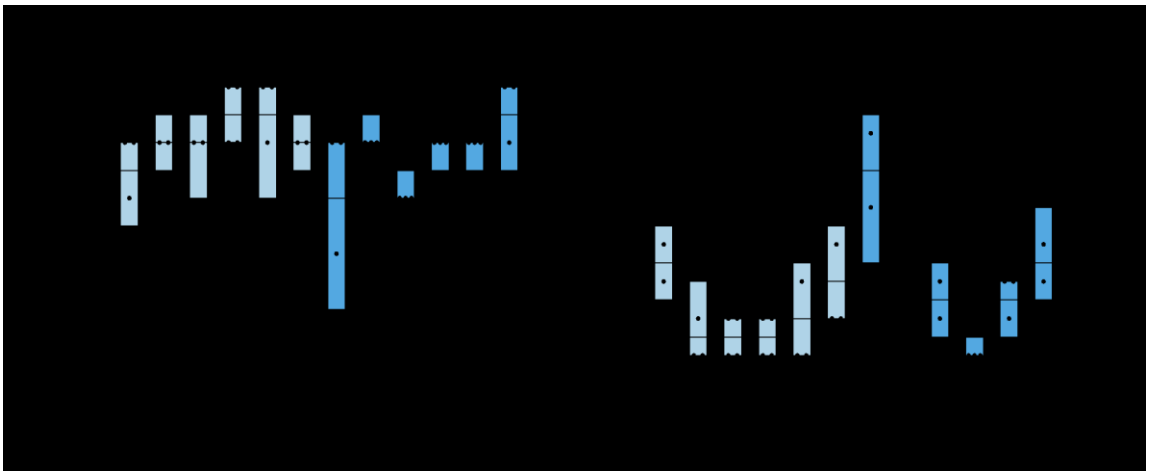


Рисунок 15–Динамика изменения показателей мочи в группах 1-2
Критерий Фридмана (**p<0,05*; ***p<0,01*; ****p<0,001*; ns – статистически незначимые различия)

При этом попарные сравнения не позволили идентифицировать конкретные временные интервалы, между которыми различия достигают уровня значимости (*p>0,05*). Данный результат может свидетельствовать о плавном характере изменений показателя в этих группах, без резких скачков между отдельными точками.

Следует отметить, что остальные показатели мочи (билирубин, уробилиноген, нитриты, кетоновые тела, аскорбиновая кислота, глюкоза, общий белок, эритроциты, лейкоциты) фиксировались только у единичных особей, что, вероятно, связано с индивидуальными особенностями, а также не имели выраженной временной динамики, в связи с чем они не были включены в сравнительный статистический анализ.

При оценке гематологических показателей выявлена разнонаправленная динамика изучаемых параметров в зависимости от группы наблюдения (Рисунок 16-17).

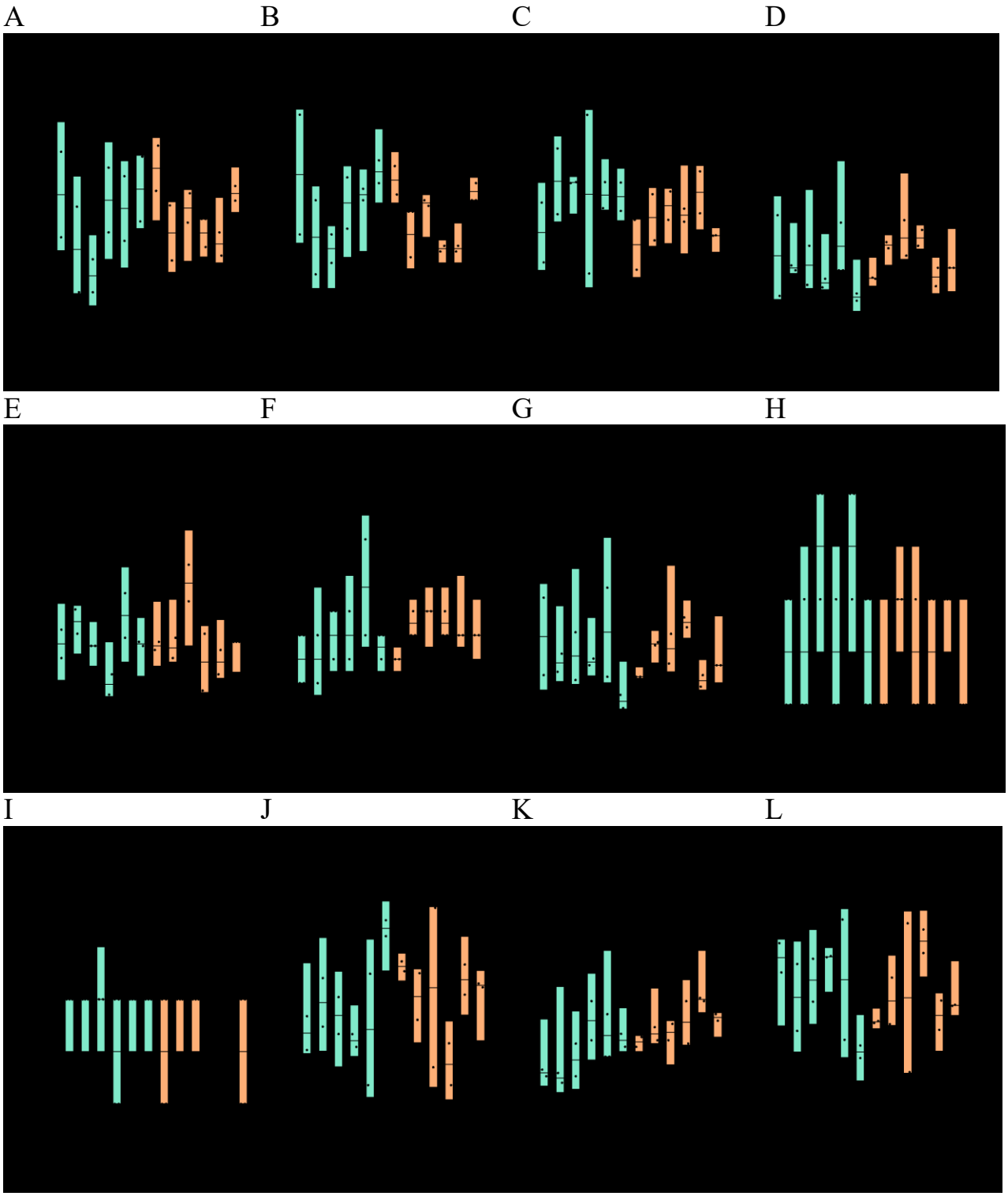


Рисунок 16–Динамика изменения гематологических показателей в группах 1-2.
A. RBC-эритроциты; B. HGB-гемоглобин; C. PLT-тромбоциты; D. WBC-лейкоциты; E. LY-лимфоциты; F. MO-моноциты; G. NE-нейтрофилы; H. EO-эозинофилы; I. BA-базофилы. J. LY%- лимфоциты; K. MO%- моноциты; L. NE%-нейтрофилы.
Критерия Фридмана (*$p<0,05$; **$p<0,01$; ***$p<0,001$; ns – статистически незначимые различия)

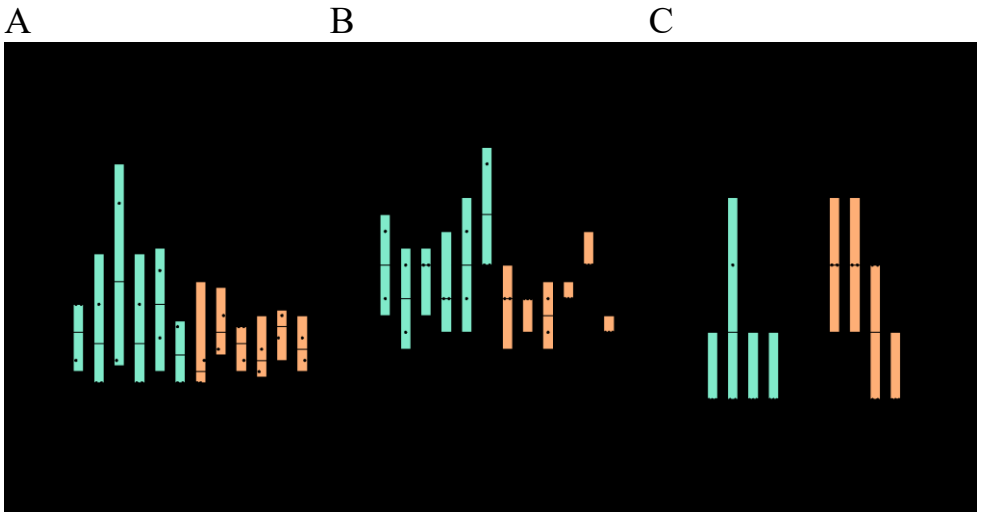


Рисунок 17–Динамика изменения гематологических показателей в группах 1-2. A. EO%-эозинофилы; B. BA%-базофилы; C. СОЭ-скорость оседания эритроцитов. Критерия Фридмана (*$p<0,05$; **$p<0,01$; ***$p<0,001$; ns – статистически незначимые различия)

Анализ данных числа эритроцитов (RBC) выявил достоверную динамику изменения в обеих группах: группа 1 *(p=0,049)*, группа 2 *(p=0,03).* (Рисунок 16.A). Значения уровня эритроцитов демонстрировали тенденцию к снижению в первые сутки после введения с последующим восстановлением к 28-м суткам. Однако анализ с поправкой на множественные сравнения не выявил достоверных различий при попарном сравнении временных интервалов ни в одной группе *(p>0,05).*

При анализе содержания гемоглобина (HGB) динамика его изменения в группе 2 (*p=0,03*) подтверждена критерием Фридмана (Рисунок 16.B). Значения уровня гемоглобина характеризовались снижением на 1-е сутки с последующим восстановлением к 28-м суткам. Изменения носили плавный характер без выраженных отличий между отдельными временными точками.

Анализ данных числа лейкоцитов (WBC) выявил достоверную динамику их изменения в группе 1 (*p = 0,046*) (Рисунок 16.D). Анализ с поправкой на множественные сравнения показал достоверное снижение уровня WBC на 28-е сутки по сравнению с 14-ми сутками (*p=0,04*).

Анализ данных числа тромбоцитов (Plt), моноцитов (MO), лимфоцитов (LY), нейтрофилов (Ne) эозинофилов (EO), базофилов (BA), процентного

содержания лимфоцитов (LY%), моноцитов (MO%), эозинофилов (EO%) и базофилов (BA%), а также скорости оседания эритроцитов (СОЭ) не выявил достоверную динамику их изменения в группах 1-3 (*p>0,05*) (Рисунок 16-17).

Межгрупповых различий в гематологических показателях в группе 1 и 2 не выявлено.

Биохимические показатели сыворотки крови в экспериментальных группах демонстрировали различные вариации (Рисунок 18-19).

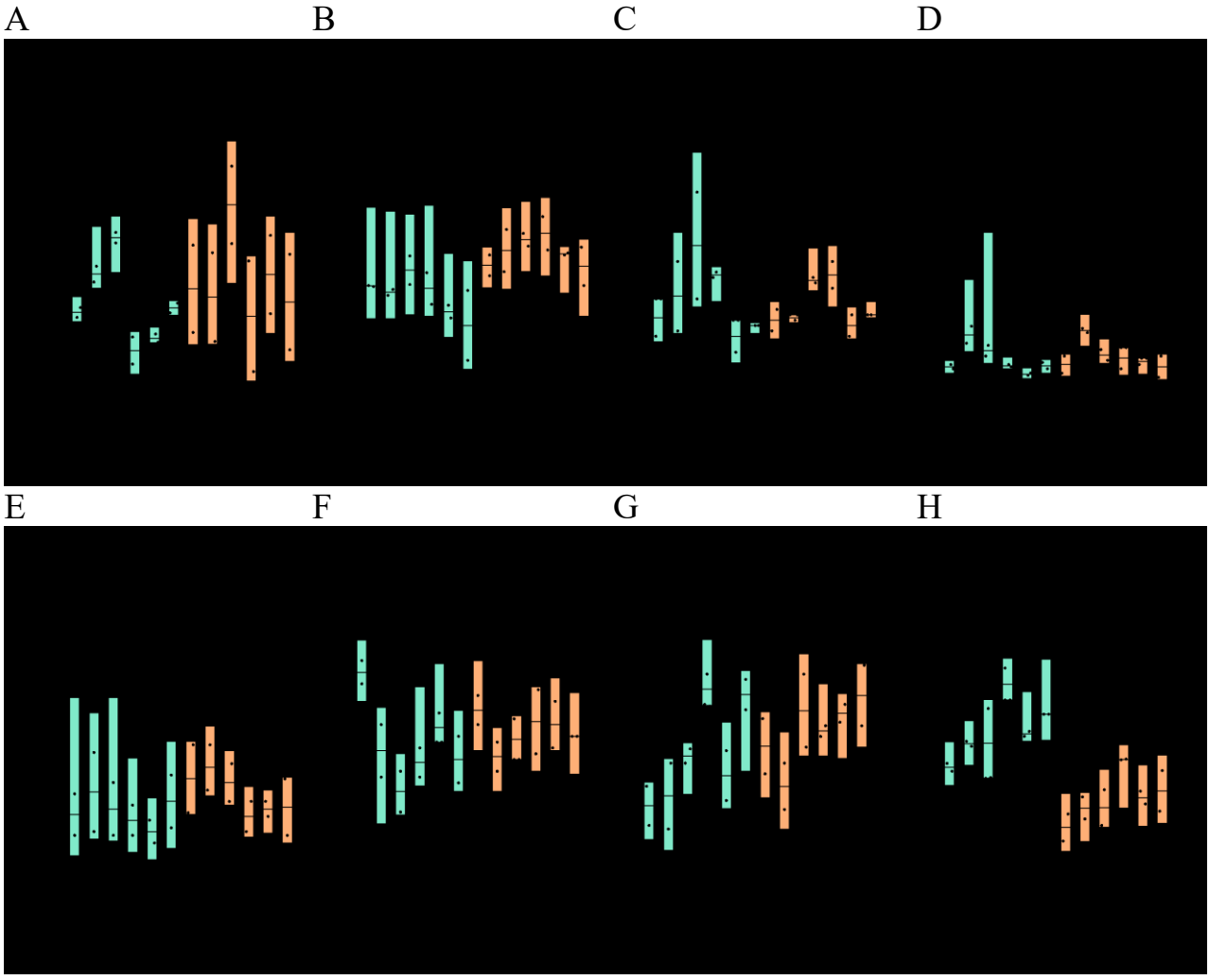


Рисунок 18−Динамика изменения биохимических показателей крови в группах 1-2.
A. Амилаза; B. Щелочная фосфатаза; C. Билирубин общий; D. АСТ; E. АЛТ; F. Мочевина; G. Общий белок; H. Холестерин.
Критерия Фридмана (*$p<0,05$; **$p<0,01$; ***$p<0,001$; ns – статистически незначимые различия)

При оценке в группах 1 *(p=0,003)* и 2*(p=0,006)* (Рисунок 18.A). После поправки на множественные сравнения выявлено: в группе 1 статистически значимое снижение на 7-е сутки по сравнению с 1-ми *(p=0,020)* и 3-ми сутками

(p=0,02); в группе 2 значимое снижение на 7-е *(p=0,01)* и 28-е сутки *(p=0,02)* по сравнению с 3-ми сутками.

Анализ уровня щелочной фосфатаза показал достоверную динамику в группе 1 *(p=0,03)* (Рисунок 18.A). После поправки на множественные сравнения статистически значимых различий между конкретными временными точками в обеих группах не обнаружено.

Достоверная динамика уровня общего билирубина установлена только в группе 1 (*p=0,009*) со значимым снижением уровня на 14-е сутки по сравнению с 3-ми сутками *(p=0,02)* (Рисунок 18.B).

При анализе уровня АСТ выявлена достоверная динамика в группе 1 *(p=0,02)* и группе 2 *(p=0,009)* (Рисунок 18.D). После поправки на множественные сравнения установлено статистически значимое: снижение уровня АСТ на 14-е сутки по сравнению с 1-ми сутками в группе 1 *(p=0,007)* и группе 2 *(p=0,02).*

Достоверная динамика уровня АЛТ выявлена в группе 2 *(p=0,01)* (Рисунок 18.E). Отмечено статистически значимое снижение уровня на 28-е сутки по сравнению с 1-ми сутками 2 (*p=0,04*).

При анализе уровня мочевины выявлена достоверная динамика в группе 1 (*p=0,02*) (Рисунок 18.F). Установлено статистически значимое снижение уровня мочевины на 3-и сутки относительно фона (*p=0,01*) после поправки на множественные сравнения. В группе 2 статистически значимых изменений не обнаружено (*p=0,75*).

Достоверная динамика уровня общего белка выявлена только в группе 2 (*p=0,02*). После поправки на множественные сравнения статистически значимых различий между конкретными временными точками не обнаружено (Рисунок 18.G).

Статистически значимые изменения уровня холестерина выявлены в группе 1 *(p=0,03)* и группе 2 *(p=0,03)* (Рисунок 18.H). На 7-е стуки достоверный подъем относительно фона отмечен только в группе 1 *(p=0,04)*.

Анализ уровня креатинина показал достоверную динамику в группе 2 (*p=0,005*) (Рисунок 19.D). После поправки на множественные сравнения

установлено статистически значимое снижение уровня на 7-е сутки по сравнению с 3-ми сутками *(p=0,005),* а также на 28-е сутки по сравнению с 3-ми сутками *(p=0,04).*

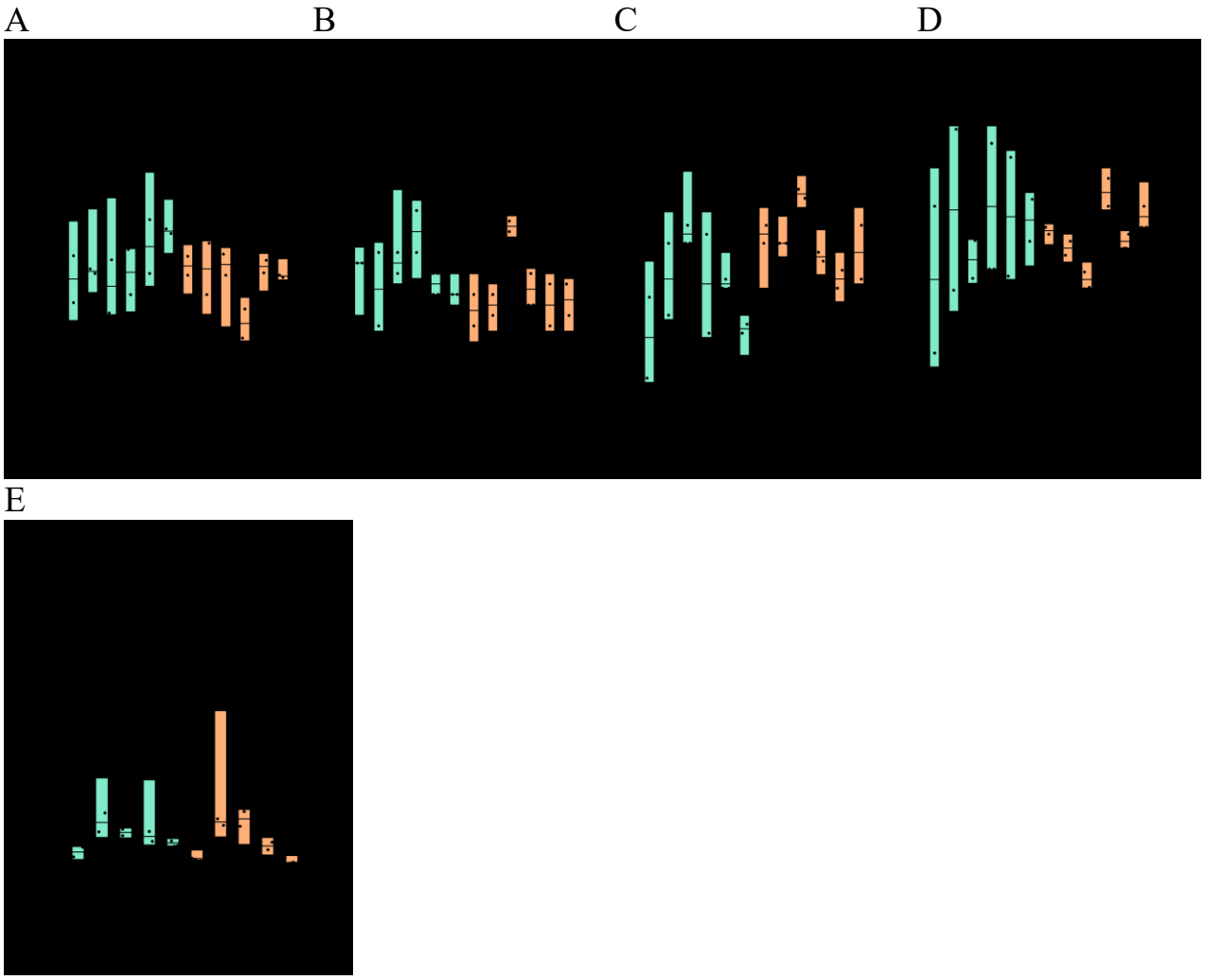


Рисунок 19–Динамика изменения биохимических показателей крови в группах 1-2. A. Глюкоза. B. K+,калий; C. Na+.натрий; D.Креатинин; E. СРБ - С-реактивный белок. Критерия Фридмана (*$p<0,05$; **$p<0,01$; ***$p<0,001$; ns – статистически незначимые различия)

При анализе уровня СРБ выявлена достоверная динамика в группе 1 *(p=0,031)* и группе 2 *(p=0,02)* (Рисунок 19.E). После поправки на множественные сравнения установлено статистически значимое повышение уровня на 1-е сутки по сравнению с фоном в группе 1 *(p = 0,04)* и снижение уровня на 28-е сутки по сравнению с 1-ми сутками в группе 2 *(p = 0,03).* В группах 1 и 2 полностью отсутствовала динамика (*p>0,05* во всех трех группах) для показателей: глюкоза, K^+ и Na^+ (Рисунок 19. A-B).

Межгрупповых различий в биохимических показателях сыворотки крови в группе 1 и 2 не выявлено.

Введение капсул с ТКМ (группа 1) способствует более быстрой нормализации микробиоты по сравнению с плацебо (группа 2), что проявляется: более ранним снижением ОБМ; отсутствием значимого снижения *Lactobacillus* spp.; более быстрым восстановлением *F. prausnitzii* и нормализацией анаэробного дисбаланса; отсутствием колонизации *C. difficile* и более низкой частотой/длительностью детекции условно-патогенной флоры.

Клинические, гематологические и биохимические изменения в обеих группах минимальны, носят кратковременный и обратимый характер. Статистически значимых различий между группой 1 и группой 2 не выявлено ни по одному из исследованных параметров. Это указывает на то, что на фоне ААД введение капсул с трансплантатом кишечной микробиоты не приводит к достоверным отличиям от плацебо по основным клинико-лабораторным показателям, однако по ряду микробиологических параметров (скорость восстановления *F. prausnitzii*, отсутствие *C. difficile*, более быстрая нормализация ОБМ и анаэробного дисбаланса) наблюдается явная положительная тенденция, что может свидетельствовать о модулирующем действии ТКМ на кишечный микробиоценоз.

5.3 Изменения микробиоценоза кишечника после трансплантации кишечной микробиоты в форме суспензии

Анализ характера стула выявил отчетливую зависимость от антибиотикотерапии. В обеих группах во время антибиотикотерапии у всех восьми особей отмечается только кашицеобразный характер стула, после введения суспензии микробиоты у большинства животных стул нормализовался в течение 1-3 суток, только у одной обезьяны после введения в первый и второй день отмечен жидкий, а затем кашицеобразный переходящий в нормальный. В группе обезьян с плацебо, также после отмены антибиотиков в течение пяти дней отмечался кашицеобразный стул с последующим восстановлением в норму.

Для оценки влияния трансплантации кишечной микробиоты в форме суспензии проведен анализ ключевых микробиологических показателей в группах 3-4 (Рисунок 20).

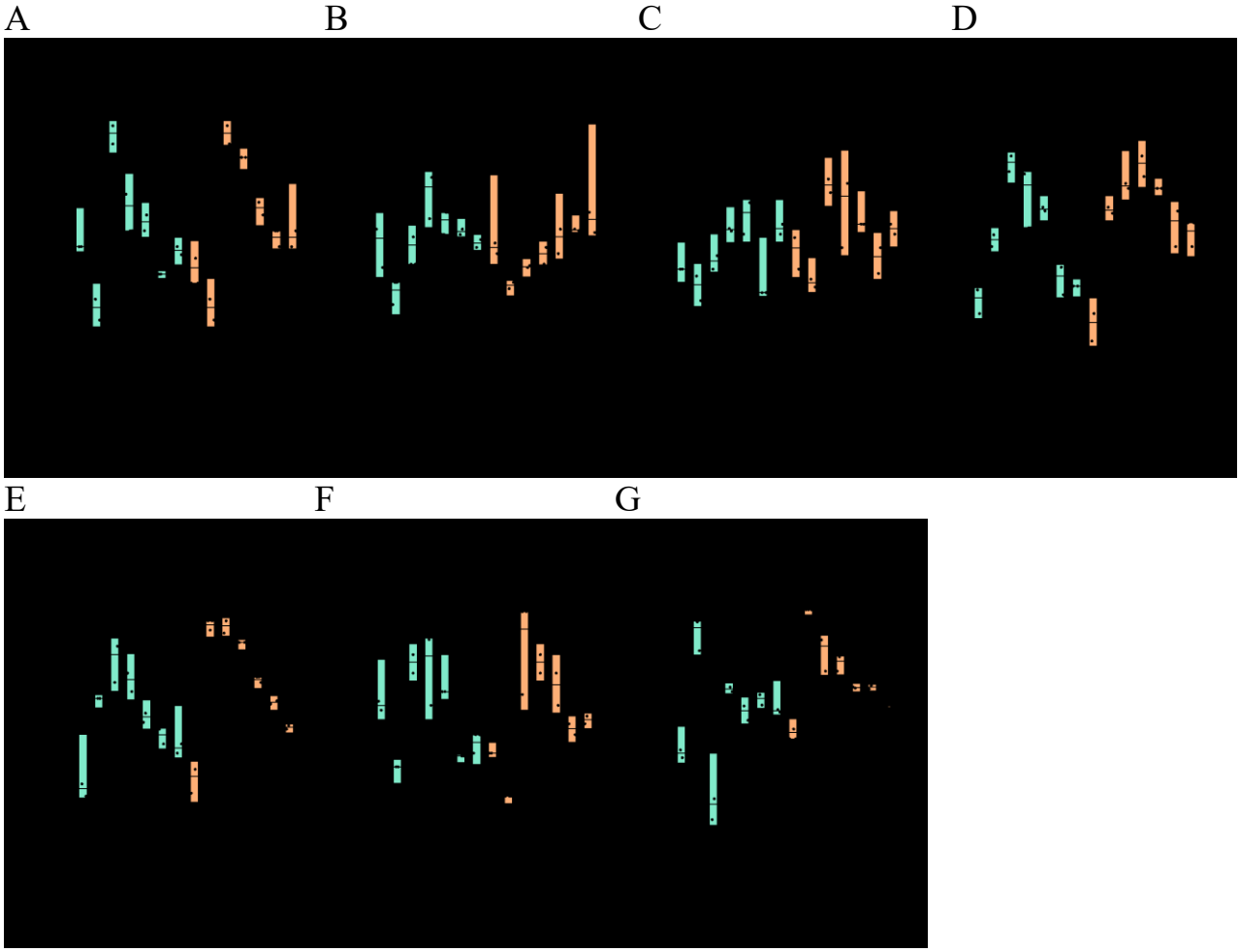


Рисунок 20 – Динамика изменений показателей кишечной микробиоты в группе 3-4. A. ОБМ-общая бактериальная масса. B. *Lactobacillus* spp. C. *Bifidobacterium* spp. D. *Escherichia coli.* E. *Bacteroides* spp. F. *Faecalibacterium prausnitzii*; G. Соотношение *Bacteroides fragilis* group / *Faecalibacterium prausnitzii.* Критерия Фридмана (**p<0,05*; ***p<0,01*; ****p<0,001*; ns – статистически незначимые различия)

Достоверные изменения ОБМ во времени зафиксированы только в группе 4 *(p=0,005)* (Рисунок 20.A). В группе 3 визуально отмечается рост ОБМ на фоне антибиотиков с последующим снижением к 14-м суткам, но различия не достигают статистической значимости (*p=0,08*). Статистически значимое увеличение ОБМ на 1-е сутки (*p=0,04*) и 3-и сутки (*p=0,01*) в группе 4 после приема антибиотиков. Это указывает на сохраняющийся рост общей бактериальной массы после отмены антибиотиков в отсутствие терапии.

В группе 4 выявлена статистически значимая динамики уровня *Lactobacillus spp.* (*p=0,02*) (Рисунок 20.B). Общая динамика в группе 3 не достигла уровня значимости *(p=0,07)*.

Во всех трех группах изменения уровней бифидобактерий не достигали порога статистической значимости *(p>0,05)* (Рисунок 20.C).

Противоположные результаты были установлены для *E. coli*, в отличие от большинства изученных показателей, статистически значимая динамика была выявлена в обеих группах (*p<0,05*) (Рисунок 20.D). Выявлена высокодостоверная общая динамика в группе 3 *(p=0,002)*, обусловленная значимым увеличением уровня *E. coli* на 1-е сутки по сравнению с фоном (*p=0,009*) и снижение уровня к 28-м суткам по сравнению с пиком на 1-е сутки (*p=0,03*). Антибиотики вызывают резкий рост *E. coli*, который усиливается после введения суспензии, но затем быстро нормализуется. Общая динамика показателя достигла статистической значимости в группе 4 *(p=0,03)*, однако при попарном сравнении с поправкой Данна ни одно из отличий не подтвердилось *(p>0,05)*. Наблюдается визуальный рост на 1-е и 3-и сутки. Это может свидетельствовать о более вариабельном и менее управляемом характере изменений на фоне антибиотика без дополнительной коррекции.

В обеих группах наблюдалась значимая динамика *Bacteroides spp.* в процессе эксперимента *(p<0,05)* (Рисунок 20.E). Выявлена значимая общая динамика в группе 3 *(p=0,006)*. Установлено статистически значимое повышение количества *Bacteroides spp.* на 1-й *(p=0,02)* и 3-й *(p=0,02)* дни эксперимента относительно фона. Начиная с 7-х суток и на всех последующих этапах наблюдения, значения показателя не имели достоверных отличий от исходных. Обнаружена значимая динамика в группе 4 *(p=0,001)*. Анализ выявил высокодостоверное увеличение уровня на 1-е сутки (*p=0,009*) и и после приема антибиотиков (*p=0,009)* сутки по сравнению с фоном. Антибиотики вызывают рост, который сохраняется и усиливается после плацебо.

Достоверные изменения в распределении уровня *F. prausnitzii* во времени зафиксированы в группе 3 *(p=0,007)* и группе 4 *(p=0,005) (*Рисунок 55.F). После

поправки на множественные сравнения выявлено статистически значимое увеличение в группе 4 на 1-е сутки (*p=0,04*) и на 3-и сутки (*p=0,01*) по сравнению с точкой после приема антибиотиков.

Отношение *B. fragilis group / F. prausnitzii* продемонстрировало динамику в группе 3 *(p=0,002)* и группе 4 *(p=0,001)* (Рисунок 20.G). В группе 3 происходило статистически значимое увеличение показателя анаэробного дисбаланса на 1-е сутки по сравнению с точкой АБ *(p=0,002).* Антибиотики вызывают дисбаланс (фон vs АБ: *p=0,04*), а введение суспензии временно усиливает его, но затем происходит нормализация. В группе 4 также наблюдалось достоверное увеличение показателя на 1-е сутки по сравнению с фоном *(p=0,04)* и антибиотиками (*p=0,002*), с последующим снижением к 28-м суткам (*p=0,02*). В группе плацебо дисбаланс сохраняется дольше.

Наиболее выраженная колонизация УПМ наблюдалась в группе 4, где зафиксирована максимальная частота встречаемости *C. perfringens* (100%), *E. cloacae* (100%), *P. vulgaris/mirabilis* (100%) и наиболее длительная персистенция этих микроорганизмов.

В фоновом периоде, непосредственно после антибиотиков и на всех сроках наблюдения *C. difficile* не выявлялся ни в одной из групп. Отсутствие колонизации подтверждает, что сам антибиотик не индуцирует рост этого микроорганизма.

Clostridioides perfringens на фоне отсутствовал; после антибиотиков выявлялся с высокой частотой: группа 3 (100 %), группа 4 (25 %). После отмены антибиотика частота оставалась высокой на всех сроках: в группе 3 (100 %) с 1 по 14 сутки, в группе 4 (100 %) на 1-е, (75 %) на 3-и, (100 %) на 7-е и 14-е. Это указывает на стойкую и длительную колонизацию *C. Perfringens*.

Enterobacter cloacae на фоне отсутствовал; после антибиотиков (100 %) в обеих группах. После отмены препарата частота оставалась высокой (75-100 %) на всех сроках до 14-х суток, со снижением к 28-м.

Proteus vulgaris/mirabilis на фоне (25 %) и после антибиотиков (100 %) выявлялся только в группе 3. После введения группа 3 (100 %) с 1-е по 14-е сутки; группа 4 (100 %) с 1-е по 14-е сутки.

Межгрупповых различий в ключевых показателях кишечной микробиоты в группе 3 и 4 не выявлено.

На рисунке 21 представлена динамика массы тела и температуры в процессе эксперимента в группах 3-4.

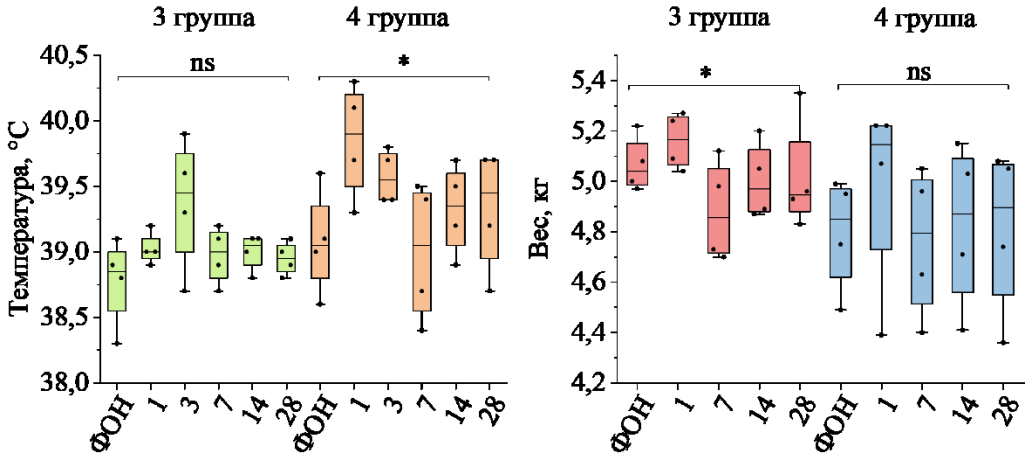


Рисунок 21–Динамика изменения температуры и веса в течении эксперимента в группах 3-4. Критерия Фридмана (*$p<0,05$; **$p<0,01$; ***$p<0,001$; ns – статистически незначимые различия)

У обезьян, получивших суспензию через эндоскоп, наблюдалось повышение температуры тела в первые сутки после введения. Однако статистически значимых различий между фоновыми значениями и первым днем не установлено ни в одной из групп (пост-хок сравнения $p>0,05$). Лишь в группе 4 критерий Фридмана выявил общую значимую динамику ($p=0,02$), но при попарном сравнении конкретные временные точки не различались. К 28-му дню значения приближались к исходным. Таким образом, процедура введения суспензии через эндоскоп сопровождалась тенденцией к кратковременному повышению температуры, однако статистически подтвержденных изменений не зарегистрировано.

Установлена статистически значимая общая динамика массы тела в ходе эксперимента в группе 3 ($p=0,03$). Апостериорный анализ выявил значимое снижение массы тела на 7-е сутки по сравнению с 1-ми сутками ($p=0,04$). К 28-м

суткам показатели вернулись к значениям, сопоставимым с фоном (*p>0,05*), что свидетельствует о кратковременном характере изменений. Показатели массы тела демонстрировали стабильность на протяжении всего эксперимента.

Межгрупповых различий в динамике температуры и массы тела в группе 3 и 4 не выявлено.

По результатам анализа pH мочи и удельного веса мочи в группах 3-4 с применением критерия Фридмана и последующего пост-хок анализа (попарные сравнения) достоверной динамики не выявлено (Рисунок 22).

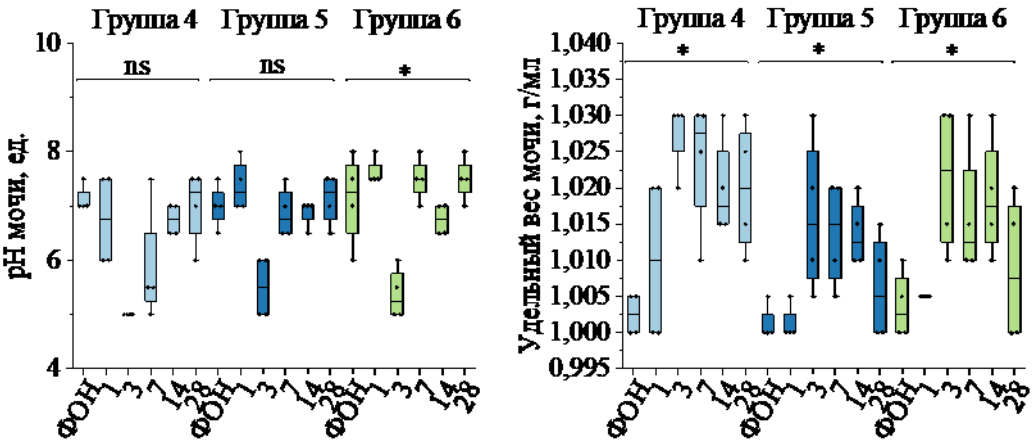


Рисунок 22−Динамика изменения показателей мочи в группах 3-4
Критерия Фридмана (*$p<0,05$; **$p<0,01$; ***$p<0,001$; ns – статистически незначимые различия)

В обеих группах критерий Фридмана показал статистически значимую динамику удельного веса мочи ($p=0,049$ и $p=0,03$ соответственно). При этом пост-хок анализ не выявил достоверных различий между отдельными временными точками ни в одной из групп. Наблюдалась тенденция к повышению удельного веса в первые сутки после введения суспензии с последующей вариабельностью, однако статистически подтвержденных сдвигов не зарегистрировано.

Межгрупповых различий показателей мочи в группе 3 и 4 не выявлено.

В группах 3-4, у животных, получивших суспензии посредством эндоскопа, изменения в гематологических параметрах были значительно более выражены (Рисунок 23-24).

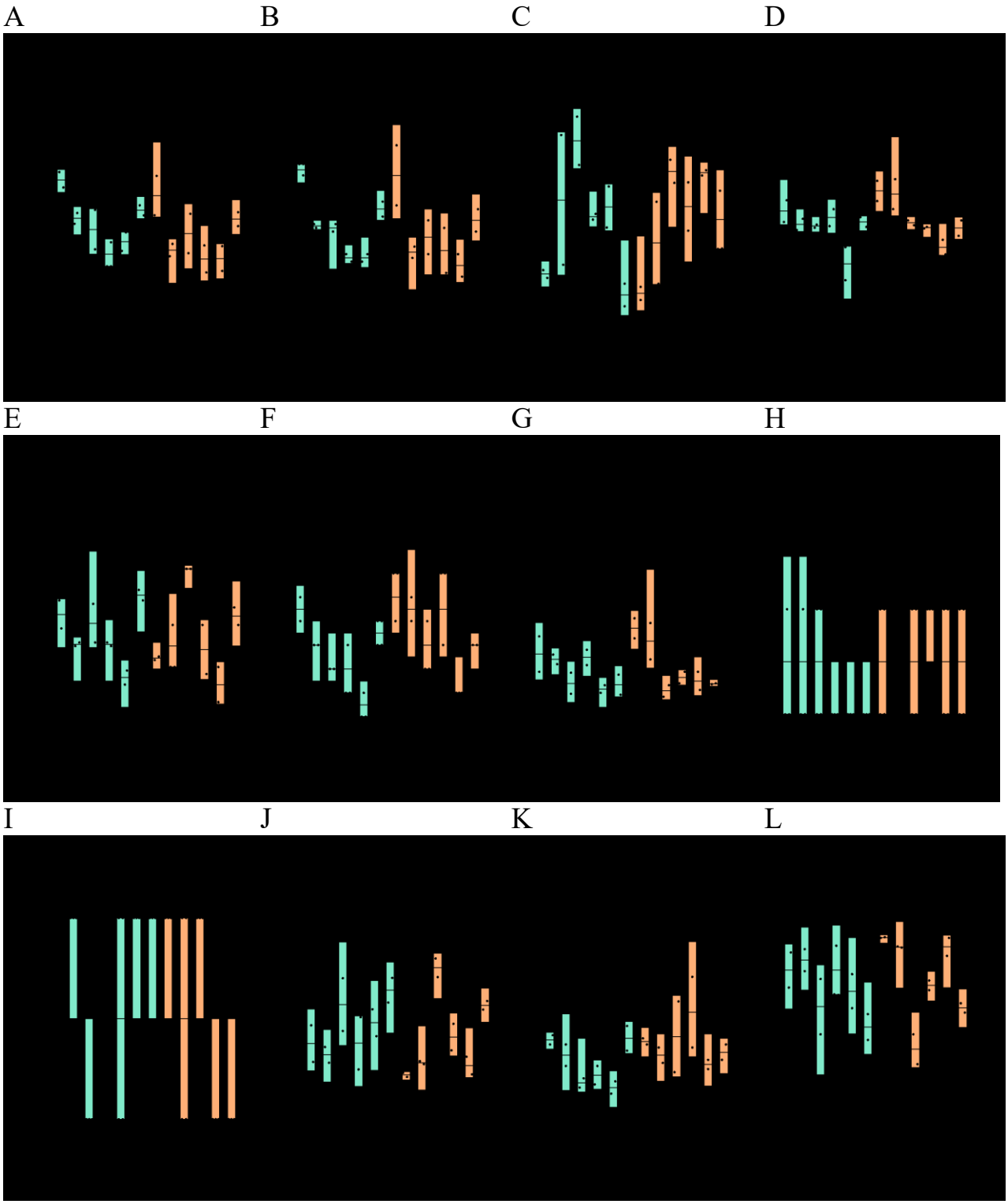


Рисунок 23−Динамика изменения гематологических показателей в группах 3-4.
A. RBC-эритроциты; B. HGB-гемоглобин; C. PLT-тромбоциты; D. WBC-лейкоциты; E. LY-лимфоциты; F. MO-моноциты; G. NE-нейтрофилы; H. EO-эозинофил; I. BA-базофилы; J. LY%- лимфоциты; K. MO%- моноциты; L. NE%-нейтрофилы.
Критерия Фридмана (*$p<0,05$; **$p<0,01$; ***$p<0,001$; ns – статистически незначимые различия)

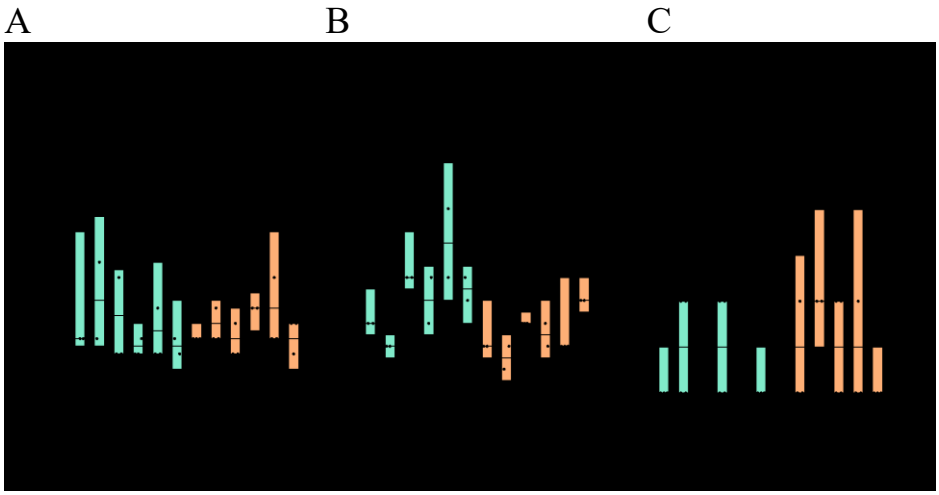


Рисунок 24–Динамика изменения гематологических показателей в группах 3-4. A. EO%-эозинофилы; B. BA%-базофилы; C. СОЭ-скорость оседания эритроцитов. Критерия Фридмана (*$p<0,05$; **$p<0,01$; ***$p<0,001$; ns – статистически незначимые различия)

Общая динамика показателя числа эритроцитов (RBC) являлась статистически значимой в группе 3 *(p=0,006)* и группе 4 *(p=0,02)* (Рисунок 23.A). Но только в группе 3 выявлено достоверное снижение уровня RBC от фонового значения к 7-м суткам *(p=0,005)*.

Выявлена высокодостоверная динамика содержания гемоглобина (HGB) в группе 3 *(p=0,008)* (Рисунок 23.B). Пост-хок анализ показал статистически значимое снижение уровня HGB на 7-е сутки *(p=0,02)* и 14-е сутки по сравнению с исходным значением *(p=0,04)*. Обнаружена значимая общая динамика в группе 4 *(p=0,01)*. Пост-хок анализ выявил достоверное снижение уровня HGB на 1-е сутки по сравнению с фоном *(p=0,04)*.

Выявлена достоверная общая динамика числа лейкоцитов (WBC) в группе 4 *(p=0,03)* (Рисунок 23.D). Однако после поправки на множественные сравнения различия не выявлены.

Анализ числа лимфоцитов (LY) демонстрирует достоверную динамику в группе 3 *(p=0,01)* и группе 4 *(p=0,02)* (Рисунок 23.E). После поправки на множественные сравнения статистически значимые различия между конкретными временными точками были обнаружены в двух группах: значимое снижение уровня LY на 28-е сутки по сравнению с 14-ми сутками в группе 3

(p=0,04), а также снижение уровня LY на 14-е сутки по сравнению с 3-ми сутками в группе 4 *(p=0,02)*.

Достоверные изменения уровня моноцитов (MO) в динамике выявлены только в группе 3 (*p=0,04*) (Рисунок 23.F). При апостериорном анализе установлено значимое снижение содержания моноцитов на 14-е сутки относительно фона (*p=0,02*).

Уровень нейтрофилов (NE) показал достоверную динамику в группе 4 *(p=0,01)* (Рисунок 23.G). Однако после поправки на множественные сравнения статистически значимых различий между конкретными временными точками не выявлено *(p>0,05)*.

При анализе процентного содержания лимфоцитов (LY%) выявлена достоверная динамика группе 4 *(p=0,006)* (Рисунок 23.J), а также подтверждено достоверное повышение уровня LY% на 3-и сутки по сравнению с фоном *(p=0,02)*.

Выявлена достоверную динамику процентного содержания нейтрофилов (NE%) в группе 4 *(p=0,007)* (Рисунок 23.L), с последующим достоверным снижением уровня NE% на 3-и сутки по сравнению с фоном *(p=0,01)*.

Статистически значимая динамика процентного содержания базафилов (BA%) с установленными точками различий зафиксирована только в группе 3 *(p=0,03)*: достоверное повышение процентного содержания базофилов на 14-е сутки по сравнению с 1-ми сутками *(p=0,02)*, а также на 28-е сутки по сравнению с 1-ми сутками *(p=0,03)* (Рисунок 24.B).

Анализ данных числа эозинофилов (EO), базофилов (BA), процентного содержания эозинофилов (EO%), моноцитов (MO%) и скорости оседания эритроцитов (СОЭ) не выявил достоверную динамику их изменения в группах 3-4 (*p>0,05*) (Рисунок 23-24).

Межгрупповых различий в гематологических показателях в группе 3 и 4 не выявлено.

Динамика изменения биохимических показателей обезьян в группах 3-4 представлена на рисунках 25-26.

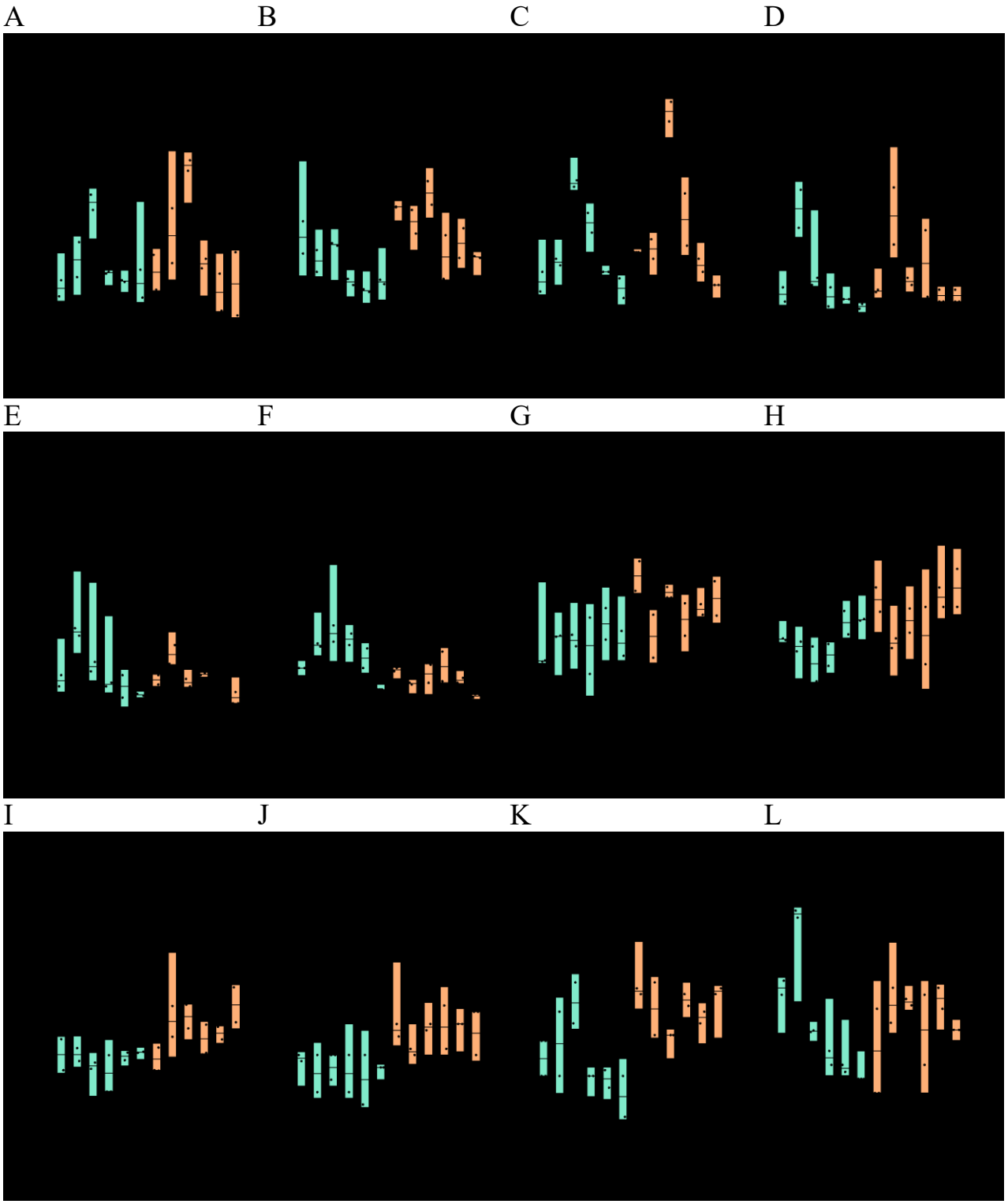


Рисунок 25−Динамика изменения биохимических показателей крови в группах 3-4. A. Амилаза; B. Щелочная фосфатаза; C. Билирубин общий; D. АСТ; E. АЛТ; F. Мочевина; G. Общий белок; H. Холестерин. I. Глюкоза. J. K+,калий; K. Na+.натрий; L.Креатинин; Критерия Фридмана (*$p<0,05$; **$p<0,01$; ***$p<0,001$; ns – статистически незначимые различия)

A

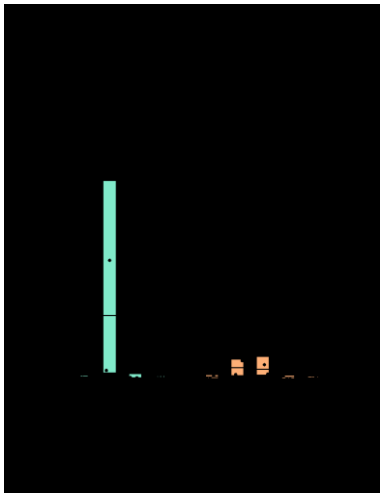


Рисунок 26–Динамика изменения биохимических показателей крови в группах 3-4.
А. СРБ - С-реактивный белок.
Критерия Фридмана (*$p<0,05$; **$p<0,01$; ***$p<0,001$; ns – статистически незначимые различия)

Выявлена достоверная динамика уровня щелочной фосфатазы в группе 4 *($p=0,01$)* (Рисунок 25.B). После поправки на множественные сравнения установлено статистически значимое снижение на 28-е сутки по сравнению с 3-ми сутками ($p=0,01$).

Уровень общего билирубина показал достоверную динамику в группе 3 ($p=0,03$) и группе 4 ($p=0,006$) (Рисунок 25.C). В обеих группах выявлено статистически значимое снижение уровня билирубина на 28-е сутки по сравнению с 3-ми сутками *($p=0,01$* и *$p=0,002$* соответственно).

Показатель АСТ демонстрирует достоверную динамику в группе 3 ($p=0,01$) (Рисунок 25.D). После поправки на множественные сравнения установлено статистически значимое снижение уровня АСТ на 28-е сутки по сравнению с 1-ми сутками ($p=0,02$).

Достоверная динамика уровня АЛТ с установленными точками различий выявлена в обеих группах: группа 3 ($p=0,007$), группе 4 ($p=0,01$) (Рисунок 25.E). Установлено статистически значимое снижение АЛТ на 28-е сутки по сравнению с 1-ми сутками в группе 3 ($p=0,03$), группе 4 ($p=0,01$), с дополнительным снижением на 14-е сутки по сравнению с 1-ми сутками в группе 4 ($p=0,04$).

Достоверная динамика уровня мочевины выявлена в группе 3 (*p=0,01*) и группе 4 (*p=0,04*), с установленной точкой различий, зафиксированной в группе 3 – снижение на 28-е сутки по сравнению с 3-ми сутками (*p=0,04*) (Рисунок 25.F).

Выявлена достоверная общая динамика холестерина в группа 3 *(p=0,02)* и группа 4 *(p=0,006)* (Рисунок 25.H). После поправки на множественные сравнения установлено статистически значимое снижение уровня холестерина на 28-е сутки по сравнению с 1-ми сутками в группе 4 *(p=0,03)*.

В группах 3-4 полностью отсутствовала динамика (*p>0,05* во всех трех группах) для показателей: амилазы, общий белок, креатинин, глюкоза, СРБ, K^+ и Na^+ (Рисунок 25-26).

Межгрупповых различий в биохимических показателях в группе 3 и 4 не выявлено.

Введение суспензии ассоциировано с более быстрой нормализацией стула (1-3 суток) по сравнению с плацебо (5 дней). В группе с ТКМ наблюдаются более благоприятные изменения микробиоты: стабилизация уровня *Lactobacillus* spp.; тенденция к более быстрой нормализации ОБМ; более быстрая нормализация анаэробного дисбаланса. В группе плацебо (группа 4) изменения микробиоты носят менее управляемый характер: ОБМ и *Lactobacillus* spp. демонстрируют более выраженную динамику; дисбаланс сохраняется дольше; колонизация УПМ носит более стойкий и длительный характер. Клинические, гематологические и биохимические изменения в обеих группах минимальны, носят кратковременный и обратимый характер, что подтверждает безопасность введения суспензии. Статистически значимых различий между группой 3 и группой 4 не выявлено ни по одному из параметров. Однако по ряду микробиологических и клинических показателей (скорость нормализации стула, динамика *Lactobacillus*, нормализация анаэробного дисбаланса, длительность колонизации УПМ) наблюдается явная положительная тенденция в группе с ТКМ, что свидетельствует о модулирующем действии суспензии кишечной микробиоты на микробиоценоз, несмотря на отсутствие статистической значимости межгрупповых различий.

Способ введения (капсулы vs суспензия) не оказывал статистически значимого влияния на большинство показателей микробиоты при сравнении групп с одинаковым типом вмешательства (1 vs 3, 2 vs 4). Исключение составил уровень ОБМ (группа 1 vs группа 3 на 14-е сутки, *p=0,04*).

5.4 Оценка безопасности трансплантации в зависимости от способа введения

У здоровых животных в группе 5 и 6 оба способа введения (капсулы и суспензия) не вызывали изменений стула, что свидетельствует об отсутствии нежелательных эффектов при проведении ТКМ у интактных особей независимо от формы введения.

Микробиологические показатели продемонстрировали следующую динамику (Рисунок 27).

В группе 5 и группе 6 выявлена статистически значимая динамики уровня *Lactobacillus* spp. (*p=0,003* и *p=0,03* соответственно) (Рисунок 27.B). В группе 5 установлено достоверное увеличение уровня *Lactobacillus* spp. на 14-е сутки по сравнению с фоном (*p = 0,03*), с последующим достоверным снижением на 28-е сутки по сравнению с уровнем на 14-е сутки (*p=0,03*). У здоровой животной капсулы вызывают транзиторный рост *Lactobacillus* spp. с последующей нормализацией. В группе 6 наблюдался выраженный, но статистически не подтвержденный всплеск уровня микроорганизма с 1-е по 3-е сутки, что может указывать на потенциальный, но нестабильный эффект изолированного приема суспензии на уровень *Lactobacillus* spp.

Выявлена высокодостоверная динамика уровня *E. coli* в группе 6 *(p=0,002)*. Зафиксировано значимое увеличение на 1-е сутки относительно фона (*p=0,007*) с последующим значимым снижением к 28-м суткам относительно пиковых значений на 1-е сутки (*p=0,02*) (Рисунок 27.D). Изолированное применение суспензии само по себе вызывает краткосрочный, но статистически значимый рост уровня *E. coli*, который полностью нормализуется к концу наблюдения.

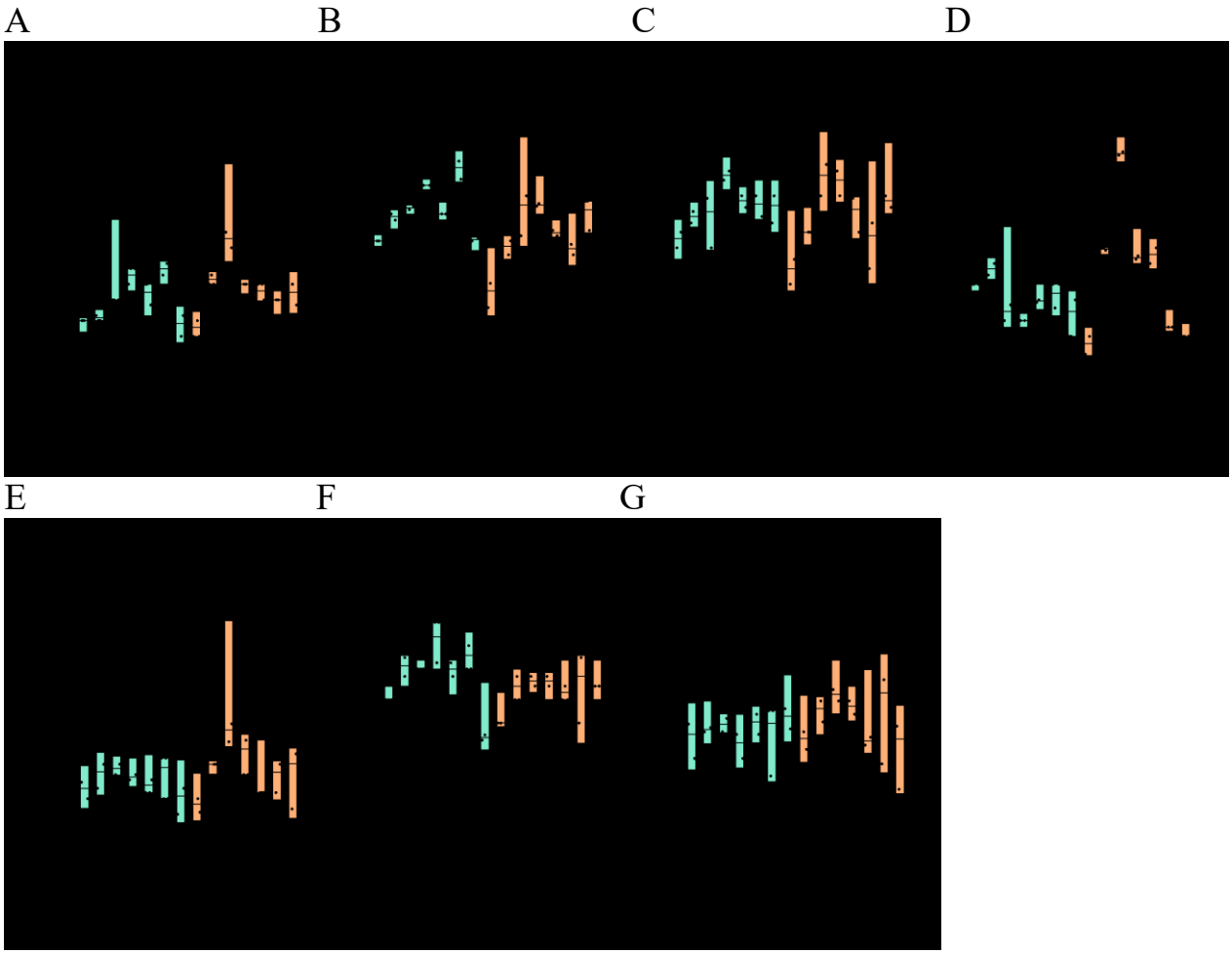


Рисунок 27 – Динамика изменений показателей кишечной микробиоты в группе 5-6. A. ОБМ-общая бактериальная масса. B. *Lactobacillus* spp. C. *Bifidobacterium* spp. D. *Escherichia coli.* E. *Bacteroides* spp. F. *Faecalibacterium prausnitzii*; G. Соотношение *Bacteroides fragilis* group / *Faecalibacterium prausnitzii.* Критерия Фридмана (**p<0,05*; ***p<0,01*; ****p<0,001*; ns – статистически незначимые различия)

В группе 6 зафиксирована динамика *Bacteroides spp. (p=0,03)* со значимым увеличением показателя на 1-е сутки по сравнению с фоном *(p=0,009)* (Рисунок 27.E). Суспензия у здоровых животных также вызывает кратковременный рост бактероидов.

Статистически значимые изменения динамики *F. prausnitzii* выявлены в группе 5 *(p=0,043).* После поправки на множественные сравнения не выявлено различий в конкретных временных точках.

Таким образом, ТКМ (независимо от способа введения – капсулы или суспензия) не оказывала статистически значимого влияния на общую бактериальную массу (ОБМ), уровень *Bifidobacterium* spp., соотношение *B. fragilis* group / *F. prausnitzii*, а также не приводила к межгрупповым различиям

по *E. coli* и *Bacteroides* spp. (несмотря на внутригрупповые транзиторные изменения в группе 6). В то же время в группе 5 зафиксирована достоверная динамика уровня *F. prausnitzii* (*p=0,043*), что свидетельствует о чувствительности данного таксона к капсулированной форме ТКМ у здоровых животных. Остальные изменения носили изолированный и транзиторный характер: в группе 5 – для *Lactobacillus* spp., в группе 6 – для *E. coli* и *Bacteroides* spp. Полученные данные указывают на высокую резистентность большинства изученных показателей микробиоценоза, однако выявленный эффект на *F. prausnitzii* в группе 5 требует отдельной интерпретации. Фундаментальная структура анаэробного кишечного сообщества в целом сохранялась стабильной.

При межгрупповом сравнении (5 vs 6) статистически значимых различий по большинству показателей не выявлено (*p> 0,05*). Единственным исключением стал уровень *Lactobacillus* spp. на 14-е сутки (*p=0,01*), который был выше в группе 5. Это указывает на то, что капсулы способны вызывать отсроченный рост лактобацилл (к 14-м суткам), тогда как суспензия такого эффекта не дает. Оба способа введения признаются безопасными с точки зрения грубой перестройки микробиоты у здоровых особей, а все зафиксированные изменения носят транзиторный, самоограничивающийся характер.

В обеих группах *Clostridioides difficile* не выявлялся ни на одном сроке наблюдения. Микроорганизм отсутствовал в фоновом периоде, непосредственно после антибиотиков, а также после введения как капсул (группа 5), так и суспензии (группа 6). Таким образом, ни одна из изученных форм трансплантации кишечной микробиты не ассоциирована с колонизацией *C. difficile,* что подтверждает специфическую связь этого микроорганизма с антибиотико-ассоциированной диареей.

Статистически значимой динамики температуры тела в группе 5 и 6 не выявлено *p>0,05* (Рисунок 28).

Выявлена достоверная динамика изменения веса в группе 5 (*p=0,033*). Установлено, что в группе 5 достоверное различие между фоновым значением и 28-м днем эксперимента (*p=0,017*), что свидетельствует о достоверном

увеличении веса к концу наблюдения. Статистически значимой динамики веса в группе 6 не выявлено. Показатели массы тела демонстрировали стабильность на протяжении всего эксперимента.

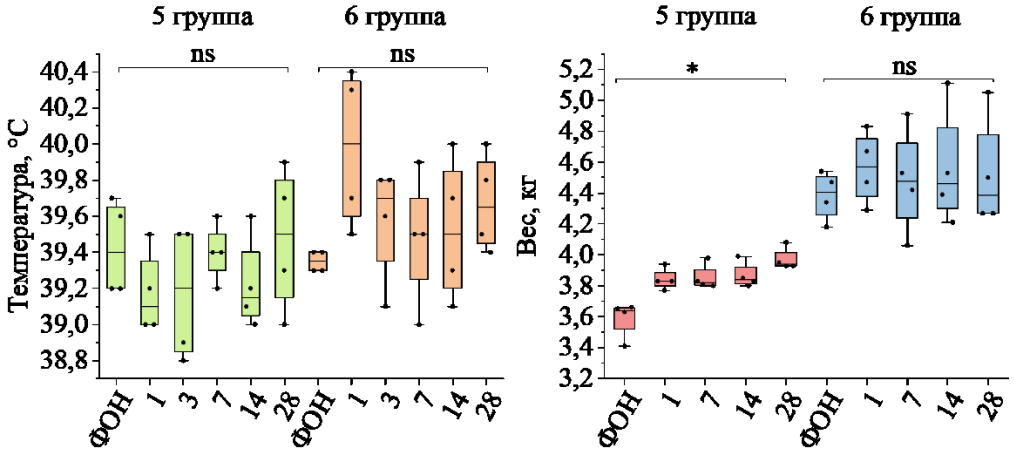


Рисунок 28–Динамика изменения температуры и веса в течении эксперимента в группах 5-6. Критерия Фридмана (*$p<0,05$; **$p<0,01$; ***$p<0,001$; ns – статистически незначимые различия)

Межгрупповых различий (5 vs 6) в показателях температуры и массы тела не выявлено ($p> 0,05$).

У животных, получивших суспензию через эндоскоп (группа 6) выявлены значимые изменения pH мочи ($p=0,022$), однако поправки по множественным сравнениям не позволили идентифицировать конкретные временные точки, между которыми различия достоверны. Значения демонстрировали тенденцию к снижению pH на 3 и сутки ($p=0,051$) с последующим постепенным возвращением к исходному уровню к 28 дню (Рисунок 29).

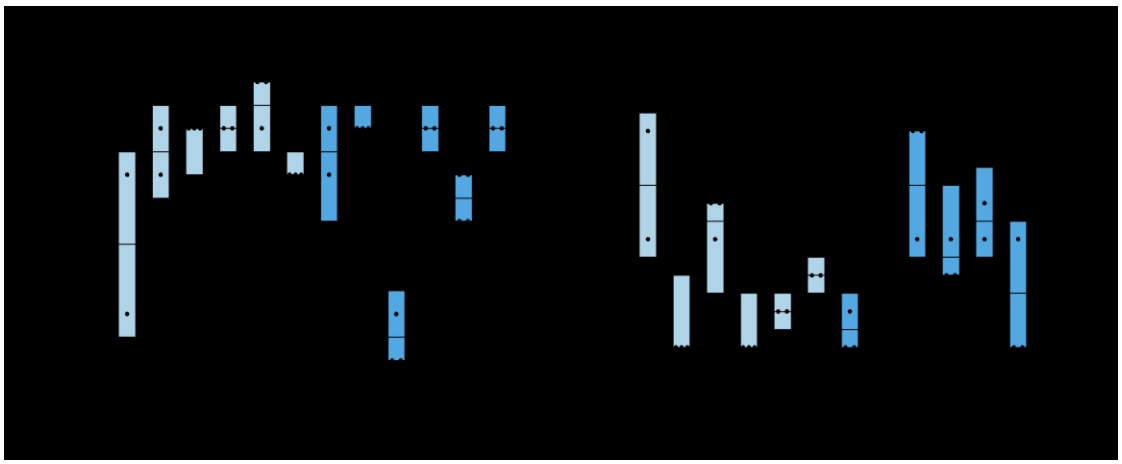


Рисунок 29–Динамика изменения показателей мочи в группах 5-6. Критерия Фридмана (*$p<0,05$; **$p<0,01$; ***$p<0,001$; ns – статистически незначимые различия)

В группах 5 и 6 зафиксирована достоверная динамика удельного веса мочи на протяжении эксперимента (*p=0,048* и *p=0,034* соответственно) (Рисунок 29).

У здоровых животных способ введения ТКМ (капсулы vs суспензия) не оказывает статистически значимого влияния ни на pH мочи, ни на удельный вес мочи. Межгрупповых различий между данными группами не выявлено (p>0,05 на всех сроках.

При оценке гематологических показателей выявлена разнонаправленная динамика изучаемых параметров в зависимости от группы наблюдения (Рисунок 30-31).

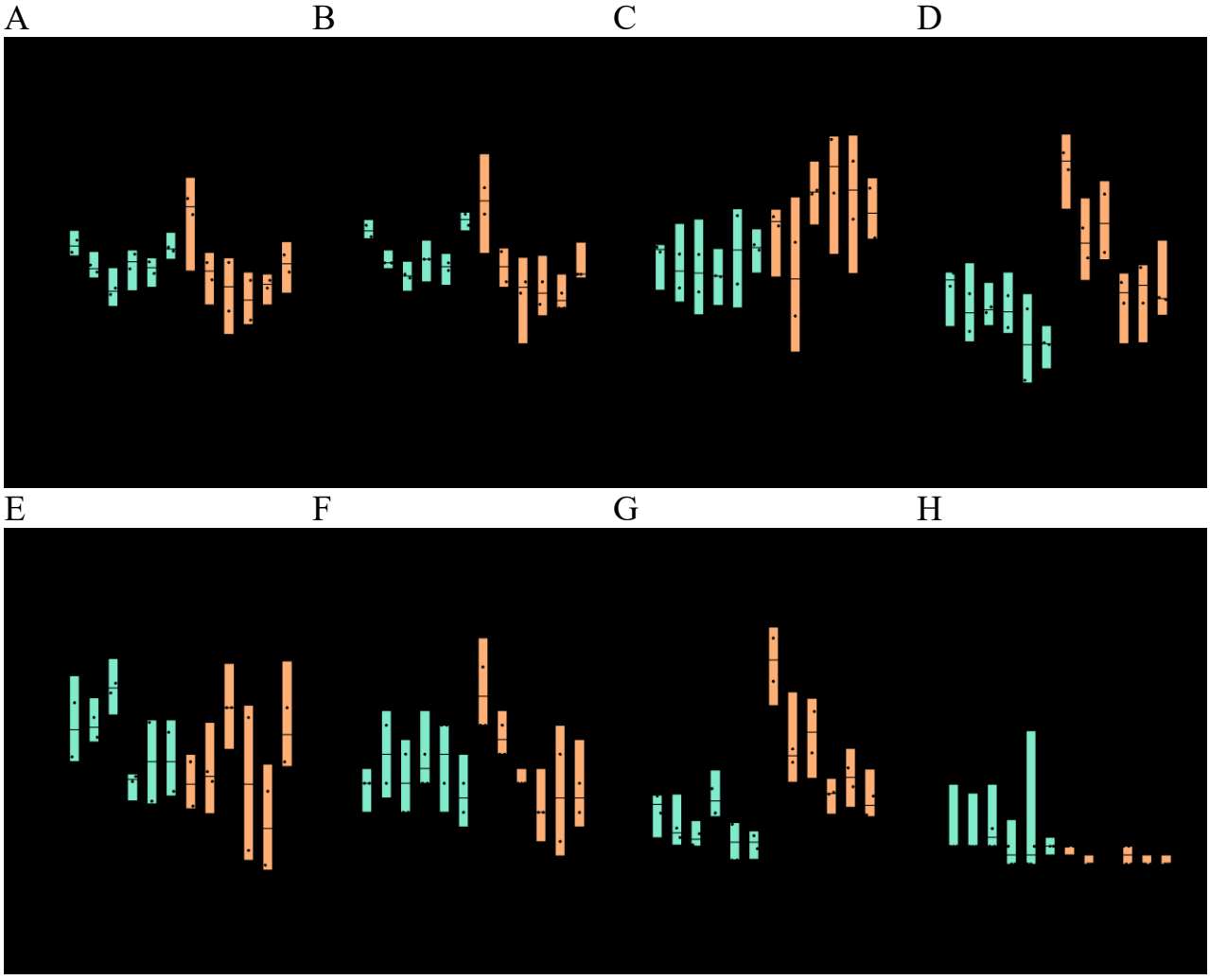


Рисунок 30−Динамика изменения гематологических показателей в группах 5-6.
A. RBC-эритроциты; B. HGB-гемоглобин; C. PLT-тромбоциты; D. WBC-лейкоциты; E. LY-лимфоциты; F. MO-моноциты; G. NE-нейтрофилы; H. EO-эозинофилы
Критерия Фридмана (**p<0,05*; ***p<0,01*; ****p<0,001*; ns – статистически незначимые различия)

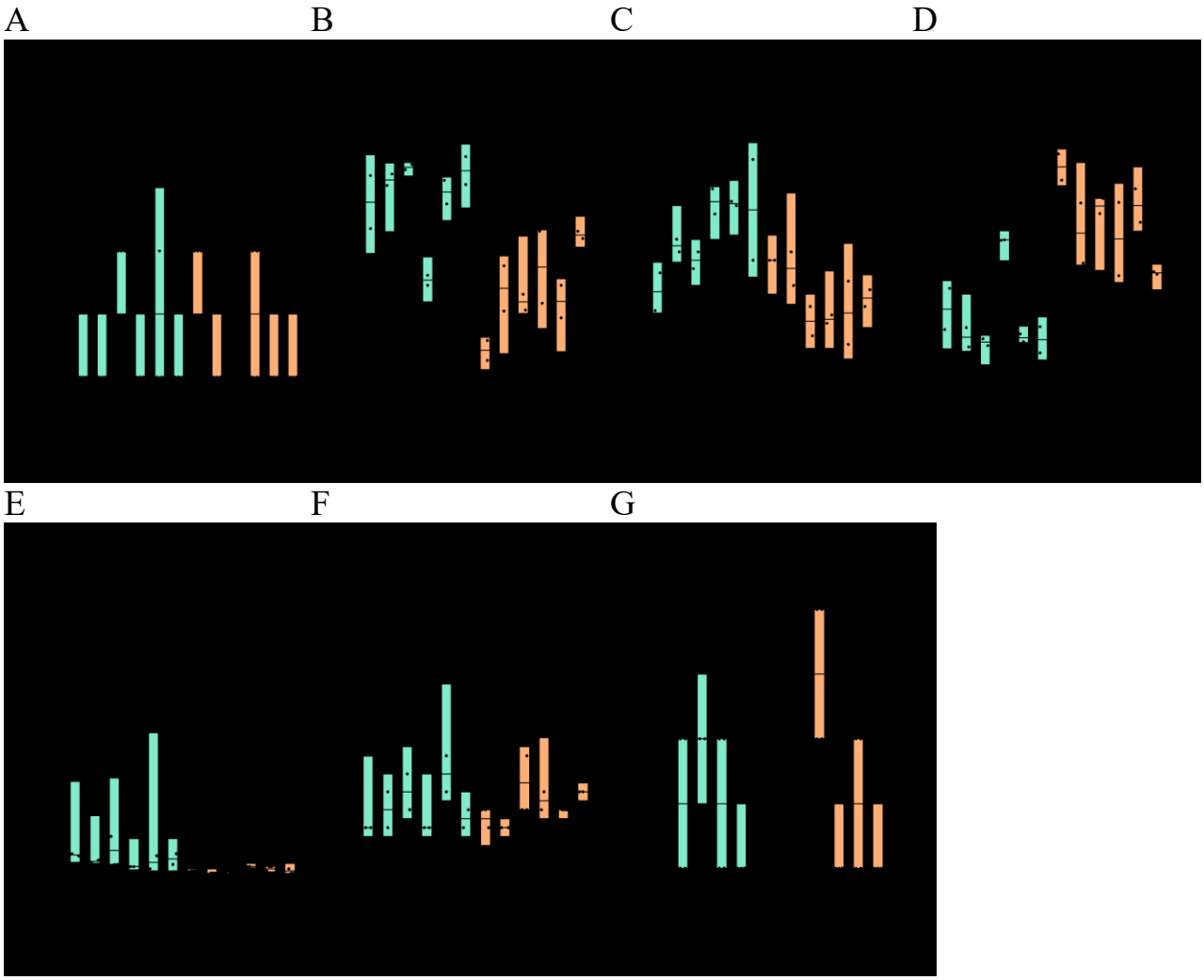


Рисунок 31−Динамика изменения гематологических показателей в группах 5-6.
A. BA-базофилы. B. LY%- лимфоциты. C. MO%-моноциты. D. NE%-нейтрофилы.
E. EO%-эозинофилы; F. BA%-базофилы; G. СОЭ-скорость оседания эритроцитов.
Критерия Фридмана (*$p<0,05$; **$p<0,01$; ***$p<0,001$; ns – статистически незначимые различия)

Значения уровня эритроцитов (RBC) в группах демонстрировали тенденцию к снижению в первые сутки после введения с последующим восстановлением к 28-м суткам (Рисунок 30.A). Однако анализ с поправкой на множественные сравнения не выявил достоверных различий при попарном сравнении временных интервалов ни в одной группе ($p>0,05$).

При анализе содержания гемоглобина (HGB) динамика его изменения в группе 5 ($p=0,015$) и группе 6 ($p=0,019$) подтверждена критерием Фридмана (Рисунок 30.B). В группе 6 установлено статистически значимое снижение уровня HGB на 14-е сутки по сравнению с фоном ($p=0,037$).

Выявлена достоверная общая динамика числа лейкоцитов (WBC) в группе 6 (*p=0,030*) (Рисунок 30.D). После поправки на множественные сравнения наблюдалось статистически значимое снижение уровня WBC на 7-е сутки по сравнению с фоном (*p=0,037*).

Выявлена достоверная общая динамика уровня лимфоцитов (LY) только в группе 5 (*p=0,022*) и группе 6 (*p=0,048*) (Рисунок 30.E). Однако после поправки на множественные сравнения статистически значимых различий между конкретными временными точками не обнаружено.

Уровень нейтрофилов (NE) показал достоверную динамику только в группе 6 (*p=0,041*) (Рисунок 30.G). Однако после поправки на множественные сравнения статистически значимых различий между конкретными временными точками не выявлено (*p>0,05*).

Достоверная значимая динамика процентного содержания лимфоцитов (LY%) обнаружена в группе 5 (*p=0,026*) и группе 6 (*p=0,026*) (Рисунок 31.B). Анализ с поправкой на множественные сравнения показал статистически значимое снижение уровня LY% на 28-е сутки по сравнению с 7-ми сутками (*p=0,020*) в группе 5, а также в группе 6 установлено достоверное повышение уровня LY% на 28-е сутки по сравнению с фоном (*p=0,037*).

В группе 5 также была отмечена статистически значимая динамика процентного содержания моноцитов (MO%) (*p=0,017*) и достоверное повышение процентного содержания моноцитов на 28-е сутки по сравнению с фоном (*p=0,027*) (Рисунок 31.C).

Выявлена достоверную динамику процентного содержания нейтрофилов (NE%) в группе 6 (*p=0,020*) (Рисунок 52.D). Зафиксировано статистически значимое снижение уровня NE% на 28-е сутки относительно фона (*p=0,020*).

Анализ данных числа тромбоцитов (Plt), моноцитов (MO), эозинофилов (EO), базофилов (BA), процентного содержания эозинофилов (EO%) и базофилов (BA%), а также скорости оседания эритроцитов (СОЭ) не выявил достоверную динамику их изменения в группах 5-6 (*p>0,05*) (Рисунок 30-31).

У здоровых животных способ введения ТКМ (капсулы vs суспензия) не оказывает статистически значимого влияния на все исследованные гематологические показатели. Межгрупповых различий между данными группами не выявлено (*p>0,05* на всех сроках) ни по одному из показателей

Биохимические показатели сыворотки крови в экспериментальных группах демонстрировали различные вариации (Рисунок 32-33).

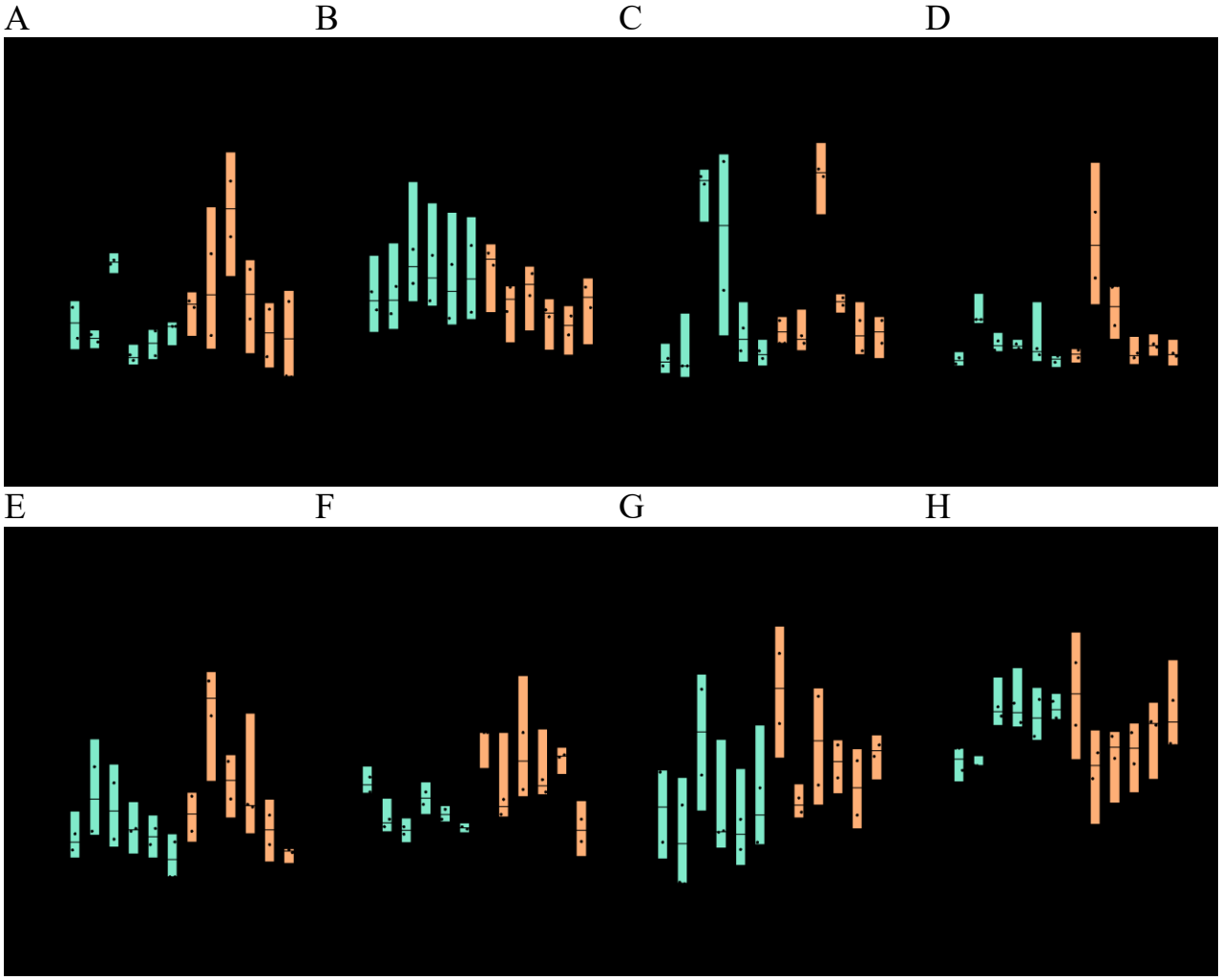


Рисунок 32–Динамика изменения биохимических показателей крови в группах 5-6.
A. Амилаза; B. Щелочная фосфатаза; C. Билирубин общий; D. АСТ; E. АЛТ; F. Мочевина; G. Общий белок; H. Холестерин.
Критерия Фридмана (**p<0,05*; ***p<0,01*; ****p<0,001*; ns – статистически незначимые различия)

При оценке уровня амилазы установили достоверную динамику во обеих группах (Рисунок 32.A): группа 5 (*p=0,011*) и группе 6 (*p=0,022*). После поправки на множественные сравнения выявлено: в группе 5 значимое снижение на 7-е

сутки по сравнению с 3-ми сутками (*p=0,005*); в группе 6 значимое снижение на 14-е сутки по сравнению с 3-ми сутками (*p=0,020*).

Анализ уровня щелочной фосфатаза показал достоверную динамику в группе 5 (*p=0,029*) и группе 6 (*p=0,007*) (Рисунок 32.B). После поправки на множественные сравнения установлено статистически значимое снижение на 7-е сутки (*p=0,020*) и на 14-е сутки (*p=0,020*) по сравнению с фоном в группе 6.

При анализе уровня АСТ выявлена достоверная динамика в группе 5 (p=0,012) и группе 6 (p=0,011) (Рисунок 32.D). После поправки на множественные сравнения установлено статистически значимое уровня АСТ снижение на 28-е сутки по сравнению с 1-ми сутками в группе 5 (*p=0,020*) и группе 6 (*p=0,037*).

Достоверная динамика уровня АЛТ выявлена в группе 5 (*p=0,011*) и 6 (*p=0,007*) (Рисунок 32.E). Также отмечено статистически значимое снижение уровня на 28-е сутки по сравнению с 1-ми сутками группах 5 и 6 (*p=0,005* и *p=0,020* соответственно).

При анализе уровня мочевины выявлена достоверная динамика в группе 5 (*p=0,035*) (Рисунок 32.F). После поправки на множественные сравнения статистически значимых изменений не обнаружено (*p>0,05*).

Статистически значимые изменения уровня холестерина выявлены в группе 5 (*p=0,013*) и группе 6 (*p=0,018*) (Рисунок 32.H). После поправки на множественные сравнения статистически значимых изменений не обнаружено (*p>0,05*).

Статистически значимая динамика уровня глюкозы выявлена в группе 5 (*p=0,044*) и группе 6 (*p=0,023*) (Рисунок 33.A). Установлено достоверное снижение уровня на 7-е сутки по сравнению с 1-ми сутками (*p=0,020*) в группе 5, а также достоверное повышением на 1-е сутки относительно фона (*p=0,037*) в группе 6.

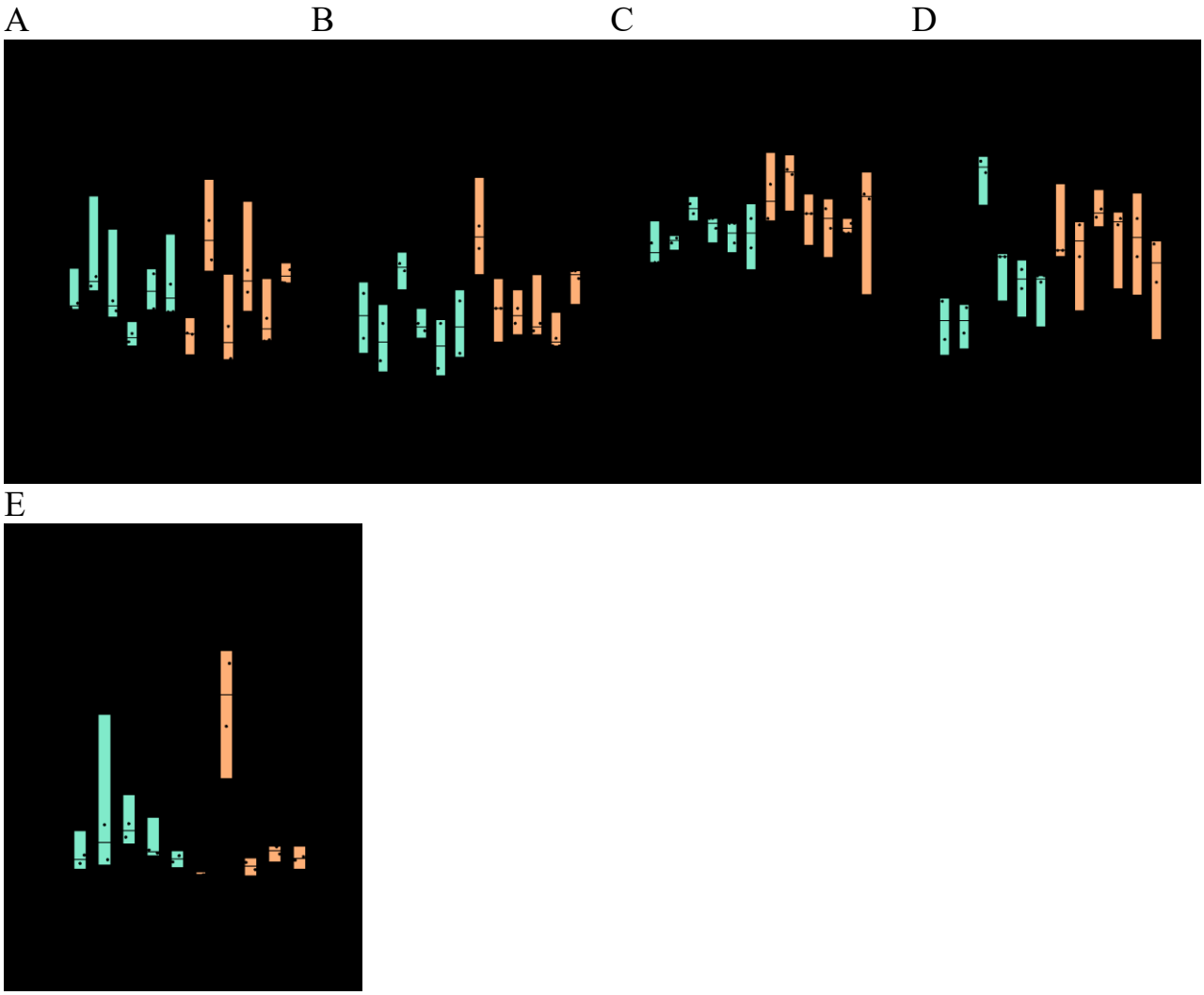


Рисунок 33−Динамика изменения биохимических показателей крови в группах 5-6. A. Глюкоза. B. K+,калий; C. Na+.натрий; D.Креатинин; E. СРБ - С-реактивный белок. Критерия Фридмана (*$p<0,05$; **$p<0,01$; ***$p<0,001$; ns – статистически незначимые различия)

Анализ уровня креатинина показал достоверную динамику только в группе 5 ($p=0,005$) (Рисунок 33.D). После поправки на множественные сравнения установлено статистически значимое повышение на 3-и сутки по сравнению с фоном ($p=0,014$) и по сравнению с 1-ми сутками ($p=0,020$).

При анализе уровня СРБ достоверную динамику обнаружена только в группе 6 ($p=0,009$) (Рисунок 33.E). После поправки на множественные сравнения установлено статистически значимое: повышение уровня на 1-е сутки по сравнению с фоном ($p=0,017$), а также снижение на 7-е сутки по сравнению с 1-ми сутками ($p=0,037$).

В группах 5 и 6 полностью отсутствовала динамика (*p>0,05*) для показателей: общий билирубин, общий белок, K^+ и Na^+. Все зафиксированные изменения по остальным показателям носили кратковременный характер, полностью нормализовались к 28-м суткам наблюдения и не выходили за пределы физиологических значений. Статистически значимых межгрупповых различий между группами 5 и 6 не выявлено ни по одному из биохимических показателей (*p>0,05* на всех сроках наблюдения). Таким образом, способ введения ТКМ (капсулы или суспензия) у здоровых особей не оказывает статистически значимого влияния на биохимический профиль крови, что подтверждает высокий профиль безопасности обеих форм.

Способ введения (капсулы vs суспензия) не оказывал статистически значимого влияния на большинство показателей микробиоты при сравнении групп с одинаковым типом вмешательства (1 vs 3, 2 vs 4, 5 vs 6). Исключение составили два показателя: уровень ОБМ на 14-е сутки в группе 4 был достоверно ниже, чем в группе 1 (*p=0,04*); уровень *Lactobacillus* spp. на 14-е сутки в группе 5 был достоверно выше, чем в группе 6 (*p=0,01*).

Выявлены следующие межгрупповые различия по способу введения для групп 1 vs 3: pH мочи на 3-и сутки – в группе 3 значение pH снизилось до 5,0, тогда как в группе 1 оставалось на уровне 7,5 (*p=0,03*). Это указывает на подкисление мочи только у животных, получавших суспензию на фоне ААД; удельный вес мочи на 3-и сутки – в группе 3 был достоверно выше, чем в группе 1 (*p=0,02*), что свидетельствует о более концентрированной моче у животных, получавших суспензию на фоне ААД.

Среди биохимических показателей выявлены различия только в уровне холестерин на 7-е сутки (1 vs 3), в группе 3 показатель оказался достоверно ниже, чем в группе 1 (*p=0,02*).

Способ введения (капсулы vs суспензия) не оказывал статистически значимого влияния на массу тела, температуру тела, все показатели клинического анализа крови при сравнении групп с одинаковым типом вмешательства (1 vs 3, 2 vs 4, 5 vs 6).

Способ введения (капсулы vs суспензия) в целом не оказывал значимого влияния на основные показатели микробиоты кишечника, интегральные показатели состояния организма (масса тела, температура, клинический анализ крови) и большинство биохимических показателей. Однако выявлены единичные, но статистически значимые эффекты на отдельные показатели микробиоты (ОБМ, *Lactobacillus* spp.), показатели мочи (pH, удельный вес) и уровень холестерина. Эти различия носили кратковременный характер с полной нормализацией к 28-м суткам наблюдения, что свидетельствует о транзиторности данных изменений и отсутствии устойчивых сдвигов гомеостаза.

Все выявленные различия носили транзиторный характер и полностью нормализовались к 28-м суткам, что позволяет расценивать их как временные адаптационные реакции и свидетельствует об отсутствии патологического влияния способа введения на эффективность и безопасность трансплантации кишечной микробиоты.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе исследования проведен анализ ключевых таксонов кишечной микробиоты макак резусов, содержащихся в Курчатовском комплексе медицинской приматологии НИЦ "Курчатовский институт» с использованием метода ПЦР-РВ. Установлены комплексные возраст-зависимые референсные интервалы для кишечной микробиоты макак-резусов. Выявлены статистически значимые онтогенетические тренды, отражающие закономерные процессы микробно-хозяйской коадаптации: прогрессирующее снижение численности *Lactobacillus* spp. и *Escherichia coli* на фоне увеличения *Bacteroides* spp. Показана стабильность общей бактериальной массы и уровня *Faecalibacterium prausnitzii* (ключевого продуцента бутирата) на протяжении всей жизни. Обнаружена выраженная возрастная динамика таксонов, являющихся комменсалами кишечника макак резусов. Частота встречаемости *Akkermansia muciniphila* увеличивается от полного отсутствия у детенышей до стабилизации в пределах видовых норм у взрослых и старых особей, что обусловлено созреванием иммунной системы, слизистого барьера. *Enterococcus* spp. выявлен во всех возрастных группах и демонстрирует вариабельность количественных значений. Присутствие значительного количества условно-патогенных микроорганизмов в трансплантации кишечной микробиоты физиологической нормы макак резусов указывает на выработанные в процессе эволюции механизмы толерантности, отсутствующие у человека. Присутствие *Fusobacterium nucleatum* в исследованной выборке не ассоциировано с патологическими состояниями и является видовой нормой, а не маркером дисбиоза. Полученные данные являются основой для интерпретации микробного статуса при моделировании патологий, ассоциированных с дисбиозом (воспалительные заболевания кишечника, метаболический синдром). Выявлено, что половые различия микробиоты носят возрастзависимый характер: у самок показатели выше в группах I, V и VII, за исключением более высокого уровня *F. prausnitzii* у самцов в возрасте 1-3 лет. Результаты подчеркивают необходимость учета не только возрастных, но и половых нормативов при оценке микробиоты лабораторных

приматов и создают базу для разработки более точных диагностических критериев в трансляционных исследованиях.

Проведен анализ кишечного микробиома макак резусов, с использованием метагеномного секвенирования гена 16S рРНК. Анализ данных гена 16S рРНК показал, что в кишечной микробиоте макак резусов доминируют бактерии фил *Firmicutes*, *Bacteriodetes* и *Actinobacteriota* и их соотношение изменяется в разных возрастных группах, которые также являются доминирующими у людей. С возрастом наблюдалось снижение представленности филы *Actinobacteriota* и соотношение *Firmicutes*/*Bacteriodetes*. Альфа разнообразие кишечной микробиоты разных возрастных групп макак резусов статистически не различалось, в то же время, наибольшие абсолютные значения альфа разнообразия наблюдались в группе молодых особей.

Проведенное исследование показало возможность введения фекального трансплантата в виде жидкой суспензии через эндоскоп. Метод доставки оральных капсул продемонстрировал преимущество за счет отсутствия инвазивных процедур, наркоза и наиболее комфортного введения для животных. Гастроскопия показала, что размер капсул, исходя из строения привратника желудка, не должен превышать 16 мм. Подобраны условия целевой доставки препаратов в кишечник макак резусов с использованием модифицированных кишечнорастворимых капсул и посредством эндоскопа в виде жидкой суспензии.

Выявлены изменения микробиоценоза кишечника макак резусов на модели антибиотик-ассоциированной диареи характеризующиеся статистически значимым снижением ($p<0,05$) общей бактериальной массы и *Faecalibacterium prausnitzii,* повышением уровня *Escherichia coli, Bacteroides* spp. и резким возрастание соотношение *Bacteroides fragilis group / F. prausnitzii.* Снижением *Lactobacillus* spp. и *Bifidobacterium* spp. статистически значимым только в группе 2, в остальных группах после приема антибиотиков проявляющиеся на уровне тенденции. В контрольных группах (3 и 6) характерных для ААД сдвигов не

наблюдалось, за исключением умеренного повышения *E. coli,* что подтверждает антибиотик-индуцированный характер выявленного дисбиоза.

При оценке динамики ключевых таксонов кишечной микробиоты с использованием критерия Фридмана и апостериорного анализа с поправкой Данна установлены статистически значимые внутригрупповые изменения. В группе 1 зафиксировано достоверное увеличение общей бактериальной массы (ОБМ) на фоне антибиотиков на 1-е ($p=0,007$) и 3-и сутки ($p=0,007$), с последующим постепенным снижением после введения капсул; в группе 2 рост ОБМ сохранялся дольше. Уровень *Lactobacillus* spp. демонстрировал достоверное снижение в группе 2 на 1-е сутки по сравнению с антибиотиками ($p=0,007$), тогда как в группе 1 значимого падения не отмечено. Уровень *Bifidobacterium* spp. достоверно увеличивался к 14-м суткам только в группе 2 (p=0,03), что указывает на спонтанное восстановление бифидобактерий даже без коррекции. В отношении *E. coli* и *Bacteroides* spp. в обеих группах зафиксирован значимый рост на фоне антибиотиков, однако в группе 1 эти изменения быстрее регрессировали после введения капсул. Для *F. prausnitzii* в группе 1 отмечено значимое увеличение на 1-е ($p=0,009$) и 3-и сутки ($p=0,02$) на фоне антибиотиков с последующим быстрым восстановлением, тогда как в группе 2 восстановление происходило медленнее. Соотношение *B. fragilis* group / *F. prausnitzii* достоверно увеличивалось в обеих группах на фоне антибиотиков, но в группе 1 отмечалась тенденция к нормализации к 28-м суткам ($p=0,11$), тогда как в группе 2 дисбаланс сохранялся дольше, хотя к концу наблюдения также нормализовался. В отношении условно-патогенных микроорганизмов установлено, что *C. difficile* не детектировался в группе 1 ни на одном сроке, тогда как в группе 2 его частота на 1-е сутки составила 75%. *C. perfringens* выявлялся в обеих группах с частотой до 75%, но в группе 1 отсутствовала его персистенция. *E. cloacae* появлялся во всех группах после антибиотиков, однако в группе 1 пик детекции приходился на 7-е сутки (100%), в группе 2 – на 3-и и 7-е (по 75%), а в группе 3 – на 14-е (100%), с полным исчезновением к 28-м суткам во всех группах, что свидетельствует о модулирующем влиянии ТКМ на сроки колонизации. *Proteus*

spp. выявлялся с низкой частотой во всех группах, что указывает на отсутствие активной индукции капсулами. Межгрупповых различий по ключевым микробиологическим показателям между группой 1 и группой 2 не выявлено.

Клиническая динамика также характеризовалась положительной тенденцией: кашицеобразный и жидкий стул, индуцированный антибиотиками, в группе ТКМ регрессировал быстрее, с переходом к нормальной консистенции уже к 6-м суткам эксперимента, тогда как в группе плацебо восстановление занимало не менее пяти дней после отмены антибиотиков (11 день). Оценка общеклинических, гематологических и биохимических показателей выявила лишь минимальные, кратковременные и обратимые изменения, которые не выходили за пределы физиологических норм и не сопровождались клинически значимыми отклонениями.

При оценке динамики температуры тела достоверные изменения зафиксированы только в группе 1 ($p=0,008$), однако попарные сравнения не выявили конкретных временных точек со статистически значимыми различиями ($p>0,05$); при этом наблюдалась тенденция к повышению температуры к концу наблюдения, что может свидетельствовать о плавном характере изменений. В отношении массы тела достоверная динамика выявлена в группе 2 ($p=0,02$), но также без идентификации значимых пар временных точек, что указывает на постепенные колебания веса в процессе восстановления. Межгрупповых различий по температуре и массе тела между группой 1 и группой 2 не обнаружено, что позволяет заключить, что введение ТКМ не оказывает системного влияния на терморегуляцию и массу тела, а регистрируемые изменения носят кратковременный и адаптационный характер.

Среди показателей общего анализа мочи статистическому анализу подвергались только pH и удельный вес. В группе 1 достоверных изменений pH не зафиксировано; в группе 2 отмечена достоверная динамика удельного веса мочи на протяжении эксперимента ($p=0,01$), однако попарные сравнения не позволили идентифицировать конкретные временные интервалы со значимыми различиями ($p>0,05$), что свидетельствует о плавном характере изменений без

резких скачков. Остальные показатели мочи (билирубин, уробилиноген, нитриты, кетоновые тела, аскорбиновая кислота, глюкоза, общий белок, эритроциты, лейкоциты) регистрировались лишь у единичных особей и не имели выраженной временной динамики, в связи с чем не были включены в сравнительный статистический анализ. Межгрупповых различий по показателям мочи не выявлено, что подтверждает отсутствие нефротоксического действия ТКМ.

При оценке гематологических показателей установлена достоверная динамика числа эритроцитов (RBC) в группе 1 ($p=0,049$) и группе 2 ($p=0,03$) с тенденцией к снижению в первые сутки и последующим восстановлением к 28-м суткам, однако попарные сравнения не выявили значимых различий ($p>0,05$). Уровень гемоглобина (HGB) демонстрировал достоверную динамику в группе 2 ($p=0,03$) со схожей тенденцией. Число лейкоцитов (WBC) значимо снижалось в группе 1 на 28-е сутки по сравнению с 14-ми ($p=0,04$). По остальным показателям – тромбоциты, моноциты, лимфоциты, нейтрофилы, эозинофилы, базофилы (включая процентные доли), а также скорость оседания эритроцитов – достоверной динамики не выявлено ни в одной из групп ($p>0,05$). Межгрупповых различий по гематологическим показателям между группой 1 и группой 2 не обнаружено. Таким образом, гематологические изменения были минимальными, носили кратковременный и обратимый характер, что указывает на отсутствие значимого влияния ТКМ на систему крови.

Анализ биохимических показателей сыворотки крови выявил разнонаправленную динамику. Уровень амилазы достоверно снижался в группе 1 на 7-е сутки по сравнению с 1-ми ($p=0,020$) и 3-ми сутками ($p=0,02$), а в группе 2 – на 7-е ($p=0,01$) и 28-е сутки ($p=0,02$) по сравнению с 3-ми сутками. Щелочная фосфатаза демонстрировала достоверную динамику только в группе 1 ($p=0,03$), но без значимых попарных различий. Общий билирубин значимо снижался в группе 1 на 14-е сутки по сравнению с 3-ми ($p=0,02$). Уровень АСТ достоверно снижался на 14-е сутки по сравнению с 1-ми как в группе 1 ($p=0,007$), так и в группе 2 ($p=0,02$). АЛТ значимо снижался в группе 2 на 28-е сутки по сравнению

с 1-ми ($p=0,04$). Мочевина в группе 1 снижалась на 3-и сутки относительно фона ($p=0,01$), в группе 2 значимых изменений не выявлено. Общий белок демонстрировал достоверную динамику только в группе 2 ($p=0,02$), но без значимых попарных различий. Холестерин значимо повышался на 7-е сутки относительно фона в группе 1 ($p=0,04$), в группе 2 также зафиксирована достоверная динамика ($p=0,03$), но без конкретных значимых пар. Креатинин в группе 2 снижался на 7-е ($p=0,005$) и 28-е сутки ($p=0,04$) по сравнению с 3-ми сутками. СРБ значимо повышался на 1-е сутки по сравнению с фоном в группе 1 ($p=0,04$) и снижался на 28-е сутки по сравнению с 1-ми в группе 2 ($p=0,03$). Показатели глюкозы, калия и натрия не имели достоверной динамики ни в одной из групп ($p>0,05$). Межгрупповых различий по биохимическим параметрам между группой 1 и группой 2 не установлено. Все биохимические изменения носили транзиторный и адаптационный характер, не выходили за пределы физиологических норм и не свидетельствовали о токсическом поражении органов.

При оценке динамики ключевых таксонов кишечной микробиоты при введение кишечной микробиоты через эндоскоп выявлено следующие изменения. Достоверные изменения общей бактериальной массы (ОБМ) во времени зафиксированы только в группе 4 ($p=0,005$), где отмечено статистически значимое увеличение ОБМ на 1-е ($p=0,04$) и 3-и сутки ($p=0,01$) после приема антибиотиков, что указывает на сохраняющийся рост бактериальной массы после отмены антибиотиков в отсутствие терапии; в группе 3 наблюдалась визуальная тенденция к росту ОБМ с последующим снижением к 14-м суткам, но различия не достигали статистической значимости ($p=0,08$). Уровень *Lactobacillus* spp. демонстрировал статистически значимую динамику только в группе 4 ($p=0,02$), тогда как в группе 3 динамика не достигла уровня значимости ($p=0,07$), что свидетельствует о стабилизирующем влиянии ТКМ на популяцию лактобацилл. Изменения уровней бифидобактерий во всех группах не достигали порога статистической значимости ($p>0,05$). В отношении E. coli установлена высокодостоверная динамика в группе 3 ($p=0,002$),

обусловленная значимым увеличением уровня на 1-е сутки по сравнению с фоном (*p=0,009*) и последующим снижением к 28-м суткам (*p=0,03*), что указывает на резкий рост *E. coli* на фоне антибиотиков с последующей быстрой нормализацией после введения суспензии; в группе 4 общая динамика также достигла значимости (*p=0,03*), однако попарные сравнения не подтвердили отдельных различий, что может свидетельствовать о более вариабельном и менее управляемом характере изменений без коррекции. Уровень *Bacteroides* spp. демонстрировал значимую динамику в обеих группах: в группе 3 установлено значимое повышение на 1-й (*p=0,02*) и 3-й (*p=0,02*) дни относительно фона с последующей нормализацией к 7-м суткам; в группе 4 выявлено высокодостоверное увеличение на 1-е сутки (*p=0,009*) и после антибиотиков (*p=0,009*) по сравнению с фоном, при этом рост сохранялся и усиливался после плацебо. Для *F. prausnitzii* зафиксированы достоверные изменения в обеих группах (*p=0,007* и *p=0,005* соответственно), причем в группе 4 выявлено значимое увеличение на 1-е (*p=0,04*) и 3-и сутки (*p=0,01*) по сравнению с точкой после антибиотиков. Соотношение *B. fragilis* group / *F. prausnitzii* продемонстрировало динамику в обеих группах: в группе 3 зафиксировано значимое увеличение анаэробного дисбаланса на 1-е сутки по сравнению с точкой антибиотиков (*p=0,002*), при этом антибиотики вызывали дисбаланс (фон vs АБ*: p=0,04*), а введение суспензии временно усиливало его с последующей нормализацией; в группе 4 также наблюдалось достоверное увеличение показателя на 1-е сутки по сравнению с фоном (*p=0,04*) и антибиотиками (*p=0,002*) со снижением к 28-м суткам (*p=0,02*), однако в группе плацебо дисбаланс сохранялся дольше. В отношении условно-патогенных микроорганизмов наиболее выраженная колонизация наблюдалась в группе 4, где зафиксирована максимальная частота встречаемости *C. perfringens* (100%), *E. cloacae* (100%) и *P. vulgaris/mirabilis* (100%) с наиболее длительной персистенцией. *C. difficile* не выявлялся ни в одной группе, ни на одном сроке, что подтверждает отсутствие индукции его роста антибиотиком. *C. perfringens* после антибиотиков выявлялся с высокой частотой: в группе 3 (100%), в группе

4 (25%), с сохранением высокой частоты на всех сроках до 14-х суток, что указывает на стойкую колонизацию. *E. cloacae* после антибиотиков детектировался в 100% в обеих группах с сохранением высокой частоты (75–100%) на всех сроках до 14-х суток со снижением к 28-м. *Proteus* spp. выявлялся в группе 3 (100%) с 1-х по 14-е сутки и в группе 4 (100%) в те же сроки. Межгрупповых различий по ключевым микробиологическим показателям между группой 3 и группой 4 не выявлено.

Анализ характера стула выявил отчетливую зависимость от антибиотикотерапии. В обеих группах во время введения антибиотиков у всех восьми особей отмечался исключительно кашицеобразный стул. После введения суспензии микробиоты (группа 3) у большинства животных стул нормализовался в течение 1-3 суток. В группе плацебо (группа 4) после отмены антибиотиков в течение пяти дней сохранялся кашицеобразный стул с последующим восстановлением до нормы. Таким образом, введение суспензии ТКМ ассоциировалось с более быстрой нормализацией стула (1-3 суток) по сравнению с плацебо (5 дней), что подтверждает клиническую эффективность трансплантации кишечной микробиоты в купировании антибиотико-ассоциированной диареи.

У обезьян, получивших суспензию через эндоскоп, наблюдалось повышение температуры тела в первые сутки после введения, однако статистически значимых различий между фоновыми значениями и первым днем не установлено ни в одной из групп (пост-хок сравнения $p>0,05$). Лишь в группе 4 критерий Фридмана выявил общую значимую динамику ($p=0,02$), но при попарном сравнении конкретные временные точки не различались. К 28-му дню значения температуры приближались к исходным, что свидетельствует о кратковременном характере температурной реакции на процедуру эндоскопического введения. В отношении массы тела установлена статистически значимая общая динамика в группе 3 ($p=0,03$) с выявленным значимым снижением массы тела на 7-е сутки по сравнению с 1-ми ($p=0,04$); к 28-м суткам показатели вернулись к значениям, сопоставимым с фоном ($p>0,05$),

что свидетельствует о кратковременном и обратимом характере изменений. В группе 4 значимой динамики массы тела не выявлено. Межгрупповых различий по температуре и массе тела между группой 3 и группой 4 не обнаружено.

По результатам анализа pH мочи и удельного веса мочи в группах 3-4 с применением критерия Фридмана и последующего пост-хок анализа достоверной динамики pH не выявлено ни в одной из групп. В отношении удельного веса мочи критерий Фридмана показал статистически значимую динамику в обеих группах ($p=0,049$ и $p=0,03$ соответственно), однако пост-хок анализ не выявил достоверных различий между отдельными временными точками ни в одной из групп. Наблюдалась тенденция к повышению удельного веса в первые сутки после введения суспензии, однако статистически подтвержденных сдвигов не зарегистрировано. Межгрупповых различий по показателям мочи между группой 3 и группой 4 не выявлено.

В группах 3 и 4, у животных, получивших суспензию посредством эндоскопа, изменения гематологических параметров были более выраженными по сравнению с группами капсульного введения. Общая динамика числа эритроцитов (RBC) являлась статистически значимой в обеих группах ($p=0,006$ и $p=0,02$ соответственно), однако достоверное снижение уровня RBC от фонового значения к 7-м суткам выявлено только в группе 3 ($p=0,005$). Уровень гемоглобина (HGB) демонстрировал высокодостоверную динамику в группе 3 ($p=0,008$) со значимым снижением на 7-е ($p=0,02$) и 14-е сутки ($p=0,04$) по сравнению с исходным значением; в группе 4 также выявлена значимая динамика ($p=0,01$) со снижением на 1-е сутки по сравнению с фоном ($p=0,04$). Число лейкоцитов (WBC) показало достоверную общую динамику только в группе 4 ($p=0,03$), однако после поправки на множественные сравнения различия не подтвердились. Уровень лимфоцитов (LY) демонстрировал достоверную динамику в обеих группах ($p=0,01$ и $p=0,02$ соответственно) со значимым снижением на 28-е сутки по сравнению с 14-ми в группе 3 ($p=0,04$) и на 14-е сутки по сравнению с 3-ми в группе 4 ($p=0,02$). Уровень моноцитов (MO) показал достоверную динамику только в группе 3 ($p=0,04$) со снижением на 14-е сутки

относительно фона (*p=0,02*). Уровень нейтрофилов (NE) демонстрировал достоверную динамику в группе 4 (*p=0,01*), но без значимых попарных различий. Процентное содержание лимфоцитов (LY%) выявило достоверную динамику в группе 4 (*p=0,006*) с повышением на 3-и сутки по сравнению с фоном (*p=0,02*). Процентное содержание нейтрофилов (NE%) показало достоверную динамику в группе 4 (*p=0,007*) со снижением на 3-и сутки по сравнению с фоном (*p=0,01*). Процентное содержание базофилов (BA%) с установленными точками различий зафиксировано только в группе 3 (*p=0,03*) с достоверным повышением на 14-е (*p=0,02*) и 28-е сутки (*p=0,03*) по сравнению с 1-ми сутками. Анализ числа эозинофилов, базофилов, процентного содержания эозинофилов, моноцитов и скорости оседания эритроцитов не выявил достоверной динамики ни в одной из групп (*p>0,05*). Межгрупповых различий по гематологическим показателям между группой 3 и группой 4 не обнаружено. Все выявленные изменения носили транзиторный и обратимый характер.

Анализ биохимических показателей сыворотки крови в группах 3 и 4 выявил следующие закономерности. Уровень щелочной фосфатазы демонстрировал достоверную динамику только в группе 4 (*p=0,01*) со значимым снижением на 28-е сутки по сравнению с 3-ми (*p=0,01*). Уровень общего билирубина показал достоверную динамику в обеих группах (*p=0,03* и *p=0,006* соответственно) со значимым снижением на 28-е сутки по сравнению с 3-ми (*p=0,01* и *p=0,002* соответственно). Показатель АСТ демонстрировал достоверную динамику только в группе 3 (*p=0,01*) со снижением на 28-е сутки по сравнению с 1-ми (*p=0,02*). Уровень АЛТ выявил достоверную динамику в обеих группах (*p=0,007* и *p=0,01* соответственно) со значимым снижением на 28-е сутки по сравнению с 1-ми в группе 3 (*p=0,03*) и группе 4 (*p=0,01*), а также дополнительным снижением на 14-е сутки по сравнению с 1-ми в группе 4 (*p=0,04*). Уровень мочевины показал достоверную динамику в обеих группах (*p=0,01* и *p=0,04*) с установленным снижением на 28-е сутки по сравнению с 3-ми только в группе 3 (*p=0,04*). Уровень холестерина демонстрировал достоверную общую динамику в обеих группах (*p=0,02* и *p=0,006*) со значимым

снижением на 28-е сутки по сравнению с 1-ми в группе 4 ($p=0,03$). В группах 3 и 4 полностью отсутствовала статистически значимая динамика для показателей амилазы, общего белка, креатинина, глюкозы, С-реактивного белка, калия и натрия ($p>0,05$ во всех группах). Межгрупповых различий по биохимическим параметрам между группой 3 и группой 4 не установлено. Все биохимические изменения носили транзиторный, адаптационный и обратимый характер, не выходили за пределы физиологических норм и не свидетельствовали о токсическом поражении органов.

При оценке микробиологических показателей у здоровых животных установлено, что ТКМ независимо от способа введения не оказывала статистически значимого влияния на общую бактериальную массу (ОБМ), уровень *Bifidobacterium* spp., уровень *F. prausnitzii* и соотношение *B. fragilis* group / *F. prausnitzii*, что свидетельствует о высокой стабильности и резистентности перечисленных таксонов и интегральных показателей микробиоценоза к изучаемым формам ТКМ у здоровых животных. В отношении *E. coli* выявлена высокодостоверная динамика только в группе 6 ($p=0,002$), где зафиксировано значимое увеличение на 1-е сутки относительно фона ($p=0,007$) с последующим значимым снижением к 28-м суткам относительно пиковых значений ($p=0,02$), что указывает на краткосрочный, но статистически значимый рост *E. coli*, полностью нормализующийся к концу наблюдения. Уровень *Lactobacillus* spp. демонстрировал статистически значимую динамику в обеих группах ($p=0,003$ и $p=0,03$ соответственно): в группе 5 установлено достоверное увеличение на 14-е сутки по сравнению с фоном ($p=0,03$) с последующим снижением на 28-е сутки ($p=0,03$), что свидетельствует о транзиторном росте лактобацилл, индуцированном капсулами, с последующей нормализацией; в группе 6 наблюдался выраженный, но статистически не подтвержденный всплеск уровня микроорганизма с 1-х по 3-и сутки, что может указывать на потенциальный, но нестабильный эффект изолированного приема суспензии. В группе 6 также зафиксирована динамика *Bacteroides* spp. ($p=0,03$) со значимым увеличением на 1-е сутки по сравнению с фоном ($p=0,009$), что свидетельствует

о кратковременном росте бактероидов в ответ на введение суспензии. При межгрупповом сравнении (5 vs 6) статистически значимых различий по большинству показателей не выявлено ($p>0,05$); единственным исключением стал уровень *Lactobacillus* spp. на 14-е сутки ($p=0,01$), который был выше в группе 5, что указывает на способность капсул вызывать отсроченный рост лактобацилл, тогда как суспензия такого эффекта не дает. *Clostridioides difficile* не выявлялся ни в одной группе, ни на одном сроке наблюдения, что подтверждает специфическую связь этого микроорганизма с антибиотико-ассоциированной диареей и отсутствие его индукции обеими формами ТКМ у здоровых особей.

Статистически значимой динамики температуры тела в группах 5 и 6 не выявлено ($p>0,05$), что указывает на отсутствие пирогенной реакции на введение как капсул, так и суспензии у здоровых животных. В отношении массы тела установлена достоверная динамика только в группе 5 ($p=0,033$), где выявлено достоверное увеличение веса к 28-му дню эксперимента по сравнению с фоновым значением ($p=0,017$); в группе 6 значимой динамики массы тела не зарегистрировано. Показатели массы тела в целом демонстрировали стабильность на протяжении всего эксперимента. Межгрупповых различий по температуре и массе тела между группами 5 и 6 не выявлено ($p>0,05$), что свидетельствует об отсутствии системного влияния способа введения ТКМ на данные показатели у здоровых особей.

У животных, получивших суспензию через эндоскоп (группа 6), выявлены значимые изменения pH мочи ($p=0,022$), однако поправка на множественные сравнения не позволила идентифицировать конкретные временные точки с достоверными различиями; при этом наблюдалась тенденция к снижению pH на 3-и сутки ($p=0,051$) с последующим возвращением к исходному уровню к 28-му дню. В группах 5 и 6 зафиксирована достоверная динамика удельного веса мочи на протяжении эксперимента ($p=0,048$ и $p=0,034$ соответственно), что может отражать физиологические колебания водно-электролитного обмена. При межгрупповом сравнении способ введения ТКМ (капсулы vs суспензия) не

оказывал статистически значимого влияния ни на pH, ни на удельный вес мочи (*p>0,05* на всех сроках), что свидетельствует о сопоставимом профиле безопасности обеих форм на функцию почек.

При оценке гематологических показателей у здоровых животных выявлена разнонаправленная, но транзиторная динамика. Число эритроцитов (RBC) демонстрировало достоверную динамику только в группе 5 (*p=0,020*) с тенденцией к снижению в первые сутки и восстановлением к 28-м суткам, однако попарные сравнения не выявили значимых различий. Уровень гемоглобина (HGB) изменялся достоверно в обеих группах (*p=0,015* и *p=0,019*), причем в группе 6 установлено значимое снижение на 14-е сутки по сравнению с фоном (*p=0,037*). Число лейкоцитов (WBC) показало достоверную динамику только в группе 6 (*p=0,030*) со значимым снижением на 7-е сутки по сравнению с фоном (*p=0,037*). Уровень лимфоцитов (LY) демонстрировал достоверную общую динамику в обеих группах (*p=0,022* и *p=0,048*), но без значимых попарных различий. Уровень нейтрофилов (NE) показал достоверную динамику только в группе 6 (*p=0,041*), также без подтвержденных попарных различий. Процентное содержание лимфоцитов (LY%) обнаружило значимую динамику в обеих группах (*p=0,026* и *p=0,026*) со снижением на 28-е сутки по сравнению с 7-ми в группе 5 (*p=0,020*) и повышением на 28-е сутки по сравнению с фоном в группе 6 (*p=0,037*). В группе 5 выявлена динамика процентного содержания моноцитов (MO%) (*p=0,017*) с повышением на 28-е сутки по сравнению с фоном (*p=0,027*). Процентное содержание нейтрофилов (NE%) демонстрировало достоверную динамику в группе 6 (*p=0,020*) со снижением на 28-е сутки относительно фона (*p=0,020*). Анализ числа тромбоцитов, моноцитов, эозинофилов, базофилов, процентного содержания эозинофилов и базофилов, а также скорости оседания эритроцитов не выявил достоверной динамики ни в одной из групп (*p>0,05*). У здоровых животных способ введения ТКМ (капсулы vs суспензия) не оказывал статистически значимого влияния ни на один из исследованных гематологических показателей, и межгрупповых различий между группами 5 и 6

не выявлено (*p>0,05* на всех сроках), что подтверждает отсутствие системного гематологического воздействия обеих форм ТКМ.

Анализ биохимических показателей сыворотки крови у здоровых животных выявил ряд транзиторных изменений. Уровень амилазы демонстрировал достоверную динамику в обеих группах (*p=0,011* и *p=0,022*) со значимым снижением в группе 5 на 7-е сутки по сравнению с 3-ми (p=0,005) и в группе 6 на 14-е сутки по сравнению с 3-ми (*p=0,020*). Уровень щелочной фосфатазы изменялся достоверно в обеих группах (*p=0,029* и *p=0,007*) со значимым снижением в группе 6 на 7-е (*p=0,020*) и 14-е сутки (*p=0,020*) по сравнению с фоном. Уровень АСТ демонстрировал достоверную динамику в обеих группах (*p=0,012* и *p=0,011*) со снижением на 28-е сутки по сравнению с 1-ми как в группе 5 (*p=0,020*), так и в группе 6 (*p=0,037*). Уровень АЛТ также изменялся достоверно в обеих группах (*p=0,011* и *p=0,007*) со значимым снижением на 28-е сутки по сравнению с 1-ми в группах 5 и 6 (*p=0,005* и p=0,020 соответственно). Уровень мочевины показал достоверную динамику только в группе 5 (*p=0,035*), но без значимых попарных различий. Уровень холестерина изменялся достоверно в обеих группах (*p=0,013* и *p=0,018*), однако попарные сравнения не выявили значимых различий. Уровень глюкозы демонстрировал достоверную динамику в обеих группах (*p=0,044* и *p=0,023*) со снижением на 7-е сутки по сравнению с 1-ми в группе 5 (*p=0,020*) и повышением на 1-е сутки относительно фона в группе 6 (*p=0,037*). Уровень креатинина показал достоверную динамику только в группе 5 (*p=0,005*) с повышением на 3-и сутки по сравнению с фоном (*p=0,014*) и с 1-ми сутками (*p=0,020*). Уровень СРБ демонстрировал достоверную динамику только в группе 6 (*p=0,009*) с повышением на 1-е сутки по сравнению с фоном (*p=0,017*) и снижением на 7-е сутки по сравнению с 1-ми (*p=0,037*). В группах 5 и 6 полностью отсутствовала статистически значимая динамика для показателей общего билирубина, общего белка, калия и натрия (*p>0,05*). Все зафиксированные биохимические изменения носили кратковременный характер, полностью нормализовались к 28-м суткам наблюдения и не выходили за пределы физиологических значений.

Статистически значимых межгрупповых различий между группами 5 и 6 не выявлено ни по одному из биохимических показателей (*p>0,05* на всех сроках наблюдения), что подтверждает высокий профиль безопасности обеих форм ТКМ и отсутствие системного токсического или метаболического воздействия на организм здоровых животных.

Проведенный сравнительный анализ влияния способа введения трансплантата кишечной микробиоты – капсульного (группы 1, 2, 5) и эндоскопического с использованием суспензии (группы 3, 4, 6) – на основные микробиологические, клинические, лабораторные и инструментальные показатели показал, что в подавляющем большинстве случаев способ введения не оказывал статистически значимого влияния на исследуемые параметры. При сопоставлении групп с одинаковым типом вмешательства (1 vs 3, 2 vs 4, 5 vs 6) установлено, что большинство показателей микробиоты, клинического анализа крови, биохимических маркеров, температуры тела и массы тела не демонстрировали достоверных межгрупповых различий, что свидетельствует о принципиальной сопоставимости обеих форм введения ТКМ по основным интегральным параметрам.

Вместе с тем выявлены единичные, но статистически значимые различия, которые заслуживают отдельного рассмотрения. В отношении микробиологических показателей установлены два исключения: уровень общей бактериальной массы (ОБМ) на 14-е сутки при сравнении групп 1 vs 3 – в группе 3 (ААД+суспензия) показатель был достоверно ниже, чем в группе 1 (ААД+ капсулы) (*p=0,04*); уровень *Lactobacillus* spp. на 14-е сутки при сравнении групп 5 vs 6 – в группе 5 (капсулы, здоровые животные) показатель был достоверно выше, чем в группе 6 (суспензия, здоровые животные) (*p=0,01*). При сравнении групп 2 vs 4 (плацебо, капсулы vs плацебо, суспензия) статистически значимых межгрупповых различий по микробиологическим показателям не выявлено.

При оценке показателей мочи выявлены различия только между группами 1 и 3: на 3-и сутки pH мочи в группе 3 снизился до 5,0, тогда как в группе 1 оставался на уровне 7,5 (*p=0,03*), что указывает на подкисление мочи только у

животных, получавших суспензию на фоне ААД; удельный вес мочи на 3-и сутки в группе 3 был достоверно выше, чем в группе 1 (*p=0,02*), что свидетельствует о более концентрированной моче у животных, получавших суспензию на фоне ААД. При сравнении групп 2 vs 4 и 5 vs 6 статистически значимых межгрупповых различий по показателям мочи не выявлено.

Среди биохимических показателей единственное различие зафиксировано по уровню холестерина на 7-е сутки при сравнении групп 1 vs 3: в группе 3 показатель оказался достоверно ниже, чем в группе 1 (*p=0,02*). При сравнении групп 2 vs 4 и 5 vs 6 статистически значимых межгрупповых различий по биохимическим показателям не выявлено.

Способ введения (капсулы vs суспензия) не оказывал статистически значимого влияния на массу тела, температуру тела, а также на все показатели клинического анализа крови при сравнении групп с одинаковым типом вмешательства (1 vs 3, 2 vs 4, 5 vs 6).

Важно подчеркнуть, что все выявленные различия носили транзиторный характер и полностью нормализовались к 28-м суткам наблюдения, не выходя за пределы физиологических значений и не сопровождаясь клинически значимыми отклонениями. Это позволяет расценивать данные изменения как временные адаптационные реакции организма на различную форму и способ введения, а не как патологические сдвиги гомеостаза. Способ введения ТКМ (капсулы vs суспензия) в целом не оказывает значимого влияния на основные интегральные показатели состояния организма и большинство биохимических параметров. Можно заключить, что оба метода демонстрируют сопоставимый профиль безопасности и эффективности.

ВЫВОДЫ

1. По результатам метагеномного секвенирования гена 16S рРНК подтверждено доминирование фил *Firmicutes, Bacteroidetes* и *Actinobacteriota* и выявлена возрастная динамика их соотношения – снижение с возрастом отношения *Firmicutes/Bacteriodetes*.

2. Установлены возраст-зависимые референсные интервалы для ключевых таксонов и выявлены статистически значимые онтогенетические тренды: снижение с возрастом *Lactobacillus* spp. *(p=0,004)* и *Escherichia coli (p=0,00002)*, увеличение *Bacteroides* spp. *(p=0,00002),* а также стабильность общей бактериальной массы *(p=0,08)* и *Faecalibacterium prausnitzii (p=0,6)*.

3. Выявлены половые различия количественных показателей кишечной микробиоты в возрастных группах: у самок в группах I и V достоверно выше уровни *Escherichia coli (p<0,001; p=0,003)* и *Bacteroides* spp. *(p=0,02; p=0,03), Lactobacillus* spp. только в группе V (*p=0,03*), ОБМ *(p=0,02)* и отношения *Bacteroides fragilis* group */ Faecalibacterium prausnitzii* (*p=0,001*) только в группе I. *Faecalibacterium prausnitzii* выше у самцов в группе I *(p=0,002),* у самок в группе V *(p=0,01).* В группе VII значимых половых различий не выявлено, за исключением общей бактериальной массы, которая выше у самок *(p = 0,02).*

4. На макаках резусах воспроизведена модель антибиотик-ассоциированной диареи, которая сопровождается достоверным снижением общей бактериальной массы и уровня *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Faecalibacterium prausnitzii,* а также увеличением *Escherichia coli, Bacteroides spp.* и соотношения *Bacteroides fragilis group / Faecalibacterium.*

5. Трансплантация кишечной микробиоты (как в форме капсул, так и в форме суспензии) обеспечивает целевую доставку донорской микробиоты в кишечник макак резусов и является эффективным и безопасным методом коррекции нарушений микробиоценоза кишечника при антибиотик-ассоциированной диарее.

6. Введение кишечной микробиоты в форме капсул, сопровождается значимым увеличение *Lactobacillus* spp. на 14-е сутки *(p=0,02)* и

Faecalibacterium prausnitzii на 1-е *(p=0,009)* и 3-е сутки *(p=0,02)* и обеспечивает нормализацию стула на 1-2 сутки. Введение кишечной микробиоты в форме суспензии ассоциировано с достоверным увеличением на 1-е и 3-и сутки общей бактериальной массы *(p=0,04; p=0,01), Bacteroides* spp. *(p=0,02; p=0,02)* и *Faecalibacterium prausnitzii (p=0,04; p=0,01),* а также сопровождаются купированием симптомов диареи на 1-3-и сутки.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для установления референсных значений и выявления дисбиотических состояний, а также определения и анализа разнообразия кишечной микробиоты у обезьян разных видов, возраста и пола рекомендуется проведение мультиплексной полимеразной цепной реакции и метагеномного секвенирования гена 16S рРНК.

2. Для коррекции дисбиотических нарушений микробиоценоза кишечника у лабораторных приматов в трансляционных исследованиях целесообразно применение методов трансплантации кишечной микробиоты: пероральное введение модифицированных кишечнорастворимых капсул и зондовой гастроскопии с введением суспензии в двенадцатиперстную кишку.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

БА	–	Болезнь Альцгеймера
ВГЕ	–	Вирус гепатита Е
ВГС	–	Вирус гепатита С
ВЗК	–	Воспалительные заболевания кишечника
ВИЧ	–	Вирус иммунодефицита человека
ВОЗ	–	Всемирная организация здравоохранения
ВПГ-1,2	–	Вирус простого герпеса-1,2
ВЭБ	–	Вирус Эпштейна-Барра
ЖКТ	–	Желудочно-кишечный тракт
ИИН	–	Индивидуальный инвентарный номер
ИКД	–	Инфекция *Clostridioides difficile*
ИМО	–	Изомальтоолигосахариды
ИМТ	–	Индекс массы тела
ИФА	–	Иммуноферментный анализ
КМЗ	–	Кардиометаболические заболевания
КОС	–	Ксилоолигосахариды
КР	–	Колоректальный рак
КЦЖК	–	Короткоцепочечные жирные кислоты
КМ	–	Кишечная микробиота
НАЖБП	–	Неалкогольная жировая болезнь печени
НАСГ	–	Неалкогольный стеатогепатит
ОАК	–	Общий анализ крови
ОБМ	–	Общая бактериальная масса

ПЦР – Полимеразная цепная реакция

ПЦР-РВ – Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

РАС – Расстройство аутистического спектра

СД2 – Сахарный диабет 2 типа

СИБР – Синдром избыточного бактериального роста

СПИД – Синдром приобретенного иммунодефицита

СРК – Синдром раздраженного кишечника

ТКМ – Трансплантация кишечной микробиоты

ТЭТ – Трансэндоскопическая энтеральная трубка

УПБ – Условно-патогенные бактерии

УПМ – Условно-патогенные микроорганизмы

ФОС – Фруктоолигосахариды

ЦМВ – Цитомегаловирус

ЦНС – Центральная нервная система

ЧЭГ – Чрескожной эндоскопическая гастроеюностомия

ASV – *amplicon sequence variants*, варианты ампликонной последовательности

CDI – *Clostridioides difficile infection*, инфекция *Clostridioides difficile*

CMV – Cytomegalovirus, цитомегаловирус

CRC – Colorectal cancer, колоректальный рак

EBV – Epstein-Barr virus, вирус Эпштейна-Барра

EFSA – European Food Safety Authority, Европейское управление по безопасности пищевых продуктов

FDA – Food and Drug Administration, Управление по контролю за продуктами питания и лекарствами США

FMT – Fecal mass transplantation, трансплантация фекальный масс

GMP – Good Manufacturing Practices, надлежащая производственная практика

HSV-1,2 − Herpes simplex virus-1,2; вирус простого герпеса-1,2

IBD − Inflammatory Bowel Disease, воспалительные заболевания кишечника

IBS − Irritable Bowel Syndrome, синдром раздраженного кишечника

ISAPP − International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics, Международная научная ассоциация пробиотиков и пребиотиков

LAB − Lactic acid bacteria, молочнокислые бактерии

QPS − Qualified Presumption of Safety, Квалифицированная презумпция безопасности

rCDI − *recurrent Clostridioides difficile infection,* рецидивирующей инфекции *Clostridioides difficile*

TMAO − N−оксид триметиламина

XOS − *Xylooligosaccharides,* ксилоолигосахариды

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Власов, В. В. Российский опыт трансплантации фекальной микробиоты / В. В. Власов, В. В. Морозов // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2023. – т. 212. - № 4. – С. 113–120.

2. Иммунобиологические препараты и перспективы их применения в инфектологии / под ред. Г. Г. Онищенко, В. А. Алешкина, С. С. Афанасьева, В. В. Поспеловой. – Москва : ГОУ ВУНМЦ МЗ РФ, 2002. – 608 с.

3. Карпухин, О. Ю. Трансплантация фекальной микробиоты в современной клинической практике / О. Ю. Карпухин, Э. Р. Хасанов, Б. Ш. Бикбов // Практическая медицина. – 2017. – № 6 (107). – С. 7–12.

4. Кебу, Т. И. Сравнительное изучение кишечного биоценоза у обезьян в норме и при патологии / Т. И. Кебу, Э. К. Джикидзе, З. К. Стасилевич // Организм и окружающая среда: жизнеобеспечение и защита человека в экстремальных условиях : тез. докл. Рос. конф., 26–29 сент. 2000 г. – М., 2000. – С. 233–235.

5. Кебу, Т. И. Условно-патогенные энтеробактерии у здоровых и больных острыми кишечными инфекциями обезьян / Т. И. Кебу, Э. К. Джикидзе, З. К. Стасилевич, В. А. Калашникова // Baltic J. Lab. Anim. Sci. – 1998. – № 8. – С. 177–182.

6. Кишечная микрофлора: роль в поддержании здоровья и развитии патологии, возможности коррекции : учеб.-метод. пособие / Р. В. Хурса, И. Л. Месникова, Я. С. Микша. – Минск : БГМУ, 2017. – 36 с.

7. Корниенко, Е. А. Пробиотики, постбиотики и парапробиотики / Е. А. Корниенко // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2022. – № 9 (205). – С. 240–250.

8. Кузнецова, Э. Э. Микробиота кишечника. Роль в развитии различных патологий / Э. Э. Кузнецова, В. Г. Горохова, С. Л. Богородская // Клиническая лабораторная диагностика. – 2016. – т. 61. - № 10. – С. 723–726.

9. Лапин, Б. А. [Глава] / Б. А. Лапин // Руководство по медицинской приматологии / Б. А. Лапин, Э. К. Джикидзе, Э. П. Фридман. – М., 1987. – С. 188.

10. Лапин, Б. А. Применение бактерийных биопрепаратов при клинически выраженных дисбактериозах у обезьян в условиях питомников и зоопарков : методические рекомендации / Б. А. Лапин, Э. К. Джикидзе, С. А. Шагинян, В. В. Поспелова, Ф. Л. Вильшанская и др. – Сухуми, 1986. – 14 с.

11. Литусов, Н. В. Род Bacteroides : иллюстрированное учебное пособие / Н. В. Литусов. – Екатеринбург : ФГБОУ ВО УГМУ, 2017. – 17 с.

12. Микробиота : монография / под ред. Е. Л. Никонова, Е. Н. Поповой. – М., 2019. – 255 с.

13. МР 1.3.0012/1-13 Болезни обезьян, опасные для человека. Правила содержания и работы с обезьянами в карантине при поступлении животных из внешних источников, а также при экспериментальном инфицировании. – М., 2013. – 45 с.

14. МУ 1.3.2569-09 Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности. – М., 2009. – 60 с.

15. Онищенко, Г. Г. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам (методические указания МУК 4.2.1890-04) / Г. Г. Онищенко, Н. А. Семина, С. П. Резван, Л. С. Страчунский, Е. А. Ведьмина, З. С. Середа и др. // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2004. – т. 6. - № 4. – С. 306–359.

16. Попенко, А. С. Биоинформационное исследование таксономического состава кишечной микробиоты человека : диссертация … кандидата биологических наук : 03.01.09 / А. С. Попенко. – М., 2015. – 140 с.

17. Прохорова Н.Д. Микробиота кишечника: роль в здоровье человека и потенциал для персонализированной медицины / Н.Д. Прохорова, А.В. Господарик, Ю.А. Беспятых // Доказательная гастроэнтерология. – 2024. – Т. 13, № 4. – С. 81–88. – DOI 10.17116/dokgastro20241304181.

18. Прощенко, Д. А. Результаты оценки кишечной микробиоты людей разных возрастных групп с использованием ПЦР-системы «Колонофлор-16» / Д. А. Прощенко, Д. Л. Зорников, Е. С. Ворошилина // Актуальные вопросы

современной медицинской науки и здравоохранения : материалы VII Междунар. науч.-практ. конф. молодых ученых и студентов, Екатеринбург, 17–18 мая 2022 г. – Екатеринбург : УГМУ, 2022. – С. 1843–1848.

19. Сафина, Д. Д. Микробиота кишечника и ее значение для здоровья человека / Д. Д. Сафина, С. Р. Абдулхаков, Н. Б. Амиров // Вестник современной клинической медицины. – 2021. – т. 14. - № 5. – С. 81–94.

20. Стасилевич, З. К. Изучение роли анаэробных бактерий в кишечной патологии обезьян / З. К. Стасилевич, Э. К. Джикидзе, В. А. Калашникова, О. А. Султанова // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2013. – т. 156. - № 8. – С. 215–218.

21. Шагинян, С. А. Дисбактериоз у обезьян, его профилактика и лечение бактерийными препаратами : автореферат диссертации … кандидата медицинских наук / С. А. Шагинян. – М., 1971. – 22 с.

22. Шелыгин, Ю. А. Трансплантация фекальной микробиоты – перспективы применения при заболеваниях кишечника (обзор литературы) / Ю. А. Шелыгин, О. В. Головенко, А. О. Головенко и др. // Колопроктология. – 2015. – № 4 (54). – С. 65–73.

23. Шрайнер, Е. В. Трансплантация кишечной микробиоты: терапевтический потенциал при болезнях органов пищеварения / Е. В. Шрайнер, С. А. Курилович, М. Ф. Осипенко и др. // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии. – 2014. – № 5. – С. 63–67.

24. Aachary, A. A. Xylooligosaccharides (XOS) as an emerging prebiotic: microbial synthesis, utilization, structural characterization, bioactive properties, and applications / A. A. Aachary, S. G. Prapulla // Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. – 2011. – Vol. 10, № 1. – P. 2–16.

25. Abt, M. C. Clostridium difficile colitis: pathogenesis and host defence / M. C. Abt, P. T. McKenney, E. G. Pamer // Nature Reviews Microbiology. – 2016. – Vol. 14, № 10. – P. 609–620.

26. Acuña, L. Development of wide-spectrum hybrid bacteriocins for food biopreservation / L. Acuña, R. D. Morero, A. Bellomio // Food and Bioprocess Technology. – 2011. – Vol. 4. – P. 1029–1049.

27. Adair, K. L. Making a microbiome: the many determinants of host-associated microbial community composition / K. L. Adair, A. E. Douglas // Current Opinion in Microbiology. – 2017. – Vol. 35. – P. 23–29.

28. Adriansjach, J. Age-related differences in the gut microbiome of rhesus macaques / J. Adriansjach, K. E. Baum, C. L. M. S. M. [et al.] // The Journals of Gerontology: Series A. – 2020. – Vol. 75, № 7. – P. 1293–1298.

29. Aiello, A. Immunosenescence and its hallmarks: how to oppose aging strategically? A review of potential options for therapeutic intervention / A. Aiello, G. Ligotti, G. Accardi [et al.] // Frontiers in Immunology. – 2019. – Vol. 10. – P. 2247.

30. Allegretti, J. R. The 5D framework: a clinical primer for fecal microbiota transplantation to treat Clostridium difficile infection / J. R. Allegretti, K. R. Kelly, M. Fischer // Gastrointestinal Endoscopy. – 2018. – Vol. 87, № 1. – P. 18–29.

31. Amato, K. R. The gut microbiota appears to compensate for seasonal diet variation in the wild black howler monkey (Alouatta pigra) / K. R. Amato, S. R. Leigh, A. Kent, R. M. Mackie, C. J. Yeoman, P. A. Garber // Microbial Ecology. – 2015. – Vol. 69. – P. 434–443.

32. Arora, U. The practice of fecal microbiota transplantation in inflammatory bowel disease / U. Arora, S. Kedia, V. Ahuja // Intestinal Research. – 2024. – Vol. 22, № 1. – P. 44.

33. Arumugam, M. Enterotypes of the human gut microbiome / M. Arumugam, J. Raes, E. Pelletier [et al.] // Nature. – 2011. – Vol. 473, № 7346. – P. 174–180.

34. Bäckhed, F. Defining a healthy human gut microbiome: current concepts, future directions, and clinical applications / F. Bäckhed, C. M. Fraser, Y. Ringel [et al.] // Cell Host & Microbe. – 2012. – Vol. 12, № 5. – P. 611–622.

35. Backhed, F. Host-bacterial mutualism in the human intestine / F. Backhed, R. E. Ley, J. L. Sonnenburg, D. A. Peterson, J. I. Gordon // Science. – 2005. – Vol. 307, № 5717. – P. 1915–1920.

36. Bakken, J. S. Treating Clostridium difficile infection with fecal microbiota transplantation / J. S. Bakken, T. Borody, L. J. Brandt [et al.] // Clinical Gastroenterology and Hepatology. – 2011. – Vol. 9, № 12. – P. 1044–1049.

37. Bambi, M. Gut microbiome dynamics in primates across a tropical ecosystem : doctoral thesis / M. Bambi. – Parma : Università degli Studi di Parma, 2024. – 121 p.

38. Barcenilla, C. Application of lactic acid bacteria for the biopreservation of meat products: a systematic review / C. Barcenilla, M. Ducic, M. López, M. Prieto, A. Alvarez-Ordóñez // Meat Science. – 2022. – Vol. 183. – P. 108661.

39. Benech, N. Update on microbiota-derived therapies for recurrent Clostridioides difficile infections, 2023 / N. Benech, P. A. S. R. [et al.] // Clinical Microbiology and Infection. – 2023. – Vol. 30, № 4. – P. 462–468.

40. Benítez-Páez, A. Depletion of Blautia species in the microbiota of obese children relates to intestinal inflammation and metabolic phenotype worsening / A. Benítez-Páez, M. Gómez del Pugar, E. M. Gómez, Y. Sanz // mSystems. – 2020. – Vol. 5, № 2. – P. e00857-19.

41. Biedrzycka, E. Prebiotic effectiveness of fructans of different degrees of polymerization / E. Biedrzycka, M. Bielecka // Trends in Food Science & Technology. – 2004. – Vol. 15, № 3–4. – P. 170–175.

42. Bielecka, M. Selection of probiotics and prebiotics for synbiotics and confirmation of their in vivo effectiveness / M. Bielecka, E. Biedrzycka, A. Majkowska // Food Research International. – 2002. – Vol. 35, № 2–3. – P. 125–131.

43. Blekhman, R. Common methods for fecal sample storage in field studies yield consistent signatures of individual identity in microbiome sequencing data / R. Blekhman, R. Blekhman, E. A. A. [et al.] // Scientific Reports. – 2016. – Vol. 6, № 1. – P. 31519.

44. Borody, T. J. Bacteriotherapy using fecal flora: toying with human motions / T. J. Borody, E. F. Warren, S. M. Leis, R. Surace, O. Ashman // Journal of Clinical Gastroenterology. – 2004. – Vol. 38, № 6. – P. 475–483.

45. Brandt, L. J. Long-term follow-up of colonoscopic fecal microbiota transplant for recurrent Clostridium difficile infection / L. J. Brandt, O. C. Aroniadis, M. Mellow, A. Kanatzar, C. Kelly, T. Park, N. Stollman, F. Rohlke, C. Surawicz // American Journal of Gastroenterology. – 2012. – Vol. 107, № 7. – P. 1079–1087.

46. Bruno, F. A. Growth, viability and activity of Bifidobacterium spp. in skim milk containing prebiotics / F. A. Bruno, W. E. V. Lankaputhra, N. P. Shah // Journal of Food Science. – 2002. – Vol. 67, № 7. – P. 2740–2744.

47. Cammarota, G. European consensus conference on faecal microbiota transplantation in clinical practice / G. Cammarota, G. Ianiro, H. Tilg [et al.] // Gut. – 2017. – Vol. 66, № 4. – P. 569–580.

48. Cha, R. R. Fecal microbiota transplantation: present and future / R. R. Cha, I. Sonu // Clinical Endoscopy. – 2025. – Vol. 58, № 3. – P. 352–359.

49. Chen, T. Gut microbiota of provisioned and wild rhesus macaques (Macaca mulatta) living in a limestone forest in southwest Guangxi, China / T. Chen, Y. Li, J. Liang, Y. Huang, X. Wang // MicrobiologyOpen. – 2020. – Vol. 9, № 3. – P. e981.

50. Chen, X. YbfA regulates the sensitivity of Escherichia coli K12 to plantaricin BM-1 via the BasS/BasR two-component regulatory system / X. Chen, Y. Du, M. Zhang, H. Zhang, Y. Luo // Frontiers in Microbiology. – 2021. – Vol. 12. – P. 659198.

51. Cheng, J. Discordant temporal development of bacterial phyla and the emergence of core in the fecal microbiota of young children / J. Cheng, M. Ringel-Kulka, Y. Ringel, I. Carroll, D. C. Zee // The ISME Journal. – 2016. – Vol. 10, № 4. – P. 1002–1014.

52. Choi, H. H. Fecal microbiota transplantation: current applications, effectiveness, and future perspectives / H. H. Choi, Y. S. Cho // Clinical Endoscopy. – 2016. – Vol. 49, № 3. – P. 257.

53. Cicero, A. F. G. Impact of a short-term synbiotic supplementation on metabolic syndrome and systemic inflammation in elderly patients: a randomized placebo-controlled clinical trial / A. F. G. Cicero, M. Fogacci, A. Bove, F. Fogacci, C. Borghi // European Journal of Nutrition. – 2021. – Vol. 60. – P. 655–663.

54. Clayton, J. B. The gut microbiome of nonhuman primates: lessons in ecology and evolution / J. B. Clayton, A. Gomez, K. Amato [et al.] // American Journal of Primatology. – 2018. – Vol. 80, № 6. – P. e22867.

55. Coussement, P. Pre- and synbiotics with inulin and oligofructose: promising developments in functional foods / P. Coussement. – 1996. – P. 102–104.

56. Cummings, J. H. Prebiotic digestion and fermentation / J. H. Cummings, G. T. Macfarlane, H. N. Englyst // The American Journal of Clinical Nutrition. – 2001. – Vol. 73, № 2. – P. 415s–420s.

57. Dahiya D. Antibiotic-Therapy-Induced Gut Dysbiosis Affecting Gut Microbiota-Brain Axis and Cognition: Restoration by Intake of Probiotics and Synbiotics / D. Dahiya, P.S. Nigam // International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – Vol. 24, No. 4. – P. 3074. – DOI 10.3390/ijms24043074.

58. Dai, M. A novel bacteriocin from Lactobacillus pentosus ZFM94 and its antibacterial mode of action / M. Dai, Y. Li, L. Xu, D. Wu, Q. Zhou, J. Zhang, H. Chen // Frontiers in Nutrition. – 2021. – Vol. 8. – P. 710862.

59. Desai, A. R. Strain identification, viability and probiotics properties of Lactobacillus casei : dissertation / A. R. Desai. – Victoria University, 2008.

60. Drekonja, D. Fecal microbiota transplantation for Clostridium difficile infection: a systematic review / D. Drekonja, J. Reich, S. Gezahegn, N. Greer, K. Shaukat, R. MacDonald, I. Rutks, T. J. Wilt // Annals of Internal Medicine. – 2015. – Vol. 162, № 9. – P. 630–638.

61. Eckburg, P. B. Diversity of the human intestinal microbial flora / P. B. Eckburg, E. M. Bik, C. N. Bernstein, E. Purdom, L. Dethlefsen, M. Sargent, S. R. Gill, K. E. Nelson, D. A. Relman // Science. – 2005. – Vol. 308, № 5728. – P. 1635–1638.

62. Eiseman, B. Fecal enema as an adjunct in the treatment of pseudomembranous enterocolitis / B. Eiseman, W. Silen, G. S. Bascom, A. J. Kauvar // Surgery. – 1958. – Vol. 44, № 5. – P. 854–859.

63. Fathizadeh, H. Bacteriocins: recent advances in its application as an antimicrobial alternative / H. Fathizadeh, M. Saffari, D. Esmaeili, S. M. R. Hashemi, M. A. Rezaei // Current Pharmaceutical Biotechnology. – 2022. – Vol. 23, № 8. – P. 1028–1040.

64. FDA Approves First Fecal Microbiota Product. – FDA, 2022. – URL: https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-fecal-microbiota-product (дата обращения: 15.02.2023).

65. FDA Approves First Orally Administered Fecal Microbiota Product for the Prevention of Recurrence of Clostridioides difficile Infection. – FDA, 2023. – URL: https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-orally-administered-fecal-microbiota-product-prevention-recurrence-clostridioides (дата обращения: 09.01.2024).

66. Fecal Microbiota Transplantation Standardization Study Group. Nanjing consensus on methodology of washed microbiota transplantation / Fecal Microbiota Transplantation Standardization Study Group // Chinese Medical Journal. – 2020. – Vol. 133, № 19. – P. 2330–2332.

67. Ferrecchia, C. E. Efficacy of oral fecal bacteriotherapy in rhesus macaques (Macaca mulatta) with chronic diarrhea / C. E. Ferrecchia, T. R. Hobbs // Comparative Medicine. – 2013. – Vol. 63, № 1. – P. 71–75.

68. Frank, D. N. Gastrointestinal microbiology enters the metagenomics era / D. N. Frank, N. R. Pace // Current Opinion in Gastroenterology. – 2008. – Vol. 24, № 1. – P. 4–10.

69. Gevers, D. The Human Microbiome Project: a community resource for the healthy human microbiome / D. Gevers, R. Knight, J. F. Petrosino, K. Huang, A. L. McGuire, B. W. Birren, K. E. Nelson, O. White, B. A. Methe, C. Huttenhower // PLoS Biology. – 2012. – Vol. 10, № 8. – P. e1001377.

70. Gibson, G. R. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics / G. R. Gibson, M. B. Roberfroid // The Journal of Nutrition. – 1995. – Vol. 125, № 6. – P. 1401–1412.

71. Gibson, G. R. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics / G. R. Gibson, R. Hutkins, M. E. Sanders, S. L. Prescott, R. A. Reimer, S. J. Salminen, K. Scott, C. Stanton, K. S. Swanson, P. D. Cani, K. Verbeke, G. Reid // Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology. – 2017. – Vol. 14, № 8. – P. 491–502.

72. Giles, K. Structure of a glycoside hydrolase family 50 enzyme from a subfamily that is enriched in human gut microbiome bacteroidetes / K. Giles, B. Pluvinage, A. B. Boraston // Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics. – 2017. – Vol. 85, № 1. – P. 182–187.

73. Gloux, K. Development of high-throughput phenotyping of metagenomic clones from the human gut microbiome for modulation of eukaryotic cell growth / K. Gloux, M. Leclerc, H. Blottière, J. Doré, P. Lepage, P. Langella // Applied and Environmental Microbiology. – 2007. – Vol. 73, № 11. – P. 3734–3737.

74. Gogineni, V. K. Probiotics: history and evolution / V. K. Gogineni, L. E. Morrow, M. A. Malesker // Journal of Ancient Diseases & Preventive Remedies. – 2013. – Vol. 1, № 2. – P. 1–7.

75. Gomez, A. Gut microbiome composition and metabolomic profiles of wild western lowland gorillas (Gorilla gorilla gorilla) reflect host ecology / A. Gomez, K. Petrzelkova, C. J. Yeoman, K. Vlckova, J. Mrázek, I. Koppova, A. G. Carbonero, A. Ulanov, M. Modry, A. Todd, M. Torralba, B. A. Wilson, K. E. Nelson, B. A. White, S. R. Leigh // Molecular Ecology. – 2015. – Vol. 24, № 10. – P. 2551–2565.

76. Goodman C. Probiotics for the prevention of antibiotic-associated diarrhoea: a systematic review and meta-analysis / C. Goodman, G. Keating, E. Georgousopoulou, C. Hespe, K. Levett // BMJ Open. – 2021. – Vol. 11, No. 8. – P. e043054. – DOI 10.1136/bmjopen-2020-043054.

77. Gough, E. Systematic review of intestinal microbiota transplantation (fecal bacteriotherapy) for recurrent Clostridium difficile infection / E. Gough, H. Shaikh, A. R. Manges // Clinical Infectious Diseases. – 2011. – Vol. 53, № 10. – P. 994–1002.

78. Guarino, M. P. L. Mechanisms of action of prebiotics and their effects on gastro-intestinal disorders in adults / M. P. L. Guarino, A. Altomare, S. Emerenziani, C. Di Rosa, M. Ribolsi, P. Balestrieri, M. Cicala // Nutrients. – 2020. – Vol. 12, № 4. – P. 1037.

79. Guinane, C. M. Role of the gut microbiota in health and chronic gastrointestinal disease: understanding a hidden metabolic organ / C. M. Guinane, P. D. Cotter // Therapeutic Advances in Gastroenterology. – 2013. – Vol. 6, № 4. – P. 295–308.

80. Gullón, P. Assessment on the fermentability of xylooligosaccharides from rice husks by probiotic bacteria / P. Gullón, P. Moura, M. P. Esteves, F. M. Girio, H. Dominguez, J. C. Parajó // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2008. – Vol. 56, № 16. – P. 7482–7487.

81. Halaweish, H. F. Encapsulated fecal microbiota transplantation: development, efficacy, and clinical application / H. F. Halaweish, S. Boatman, C. Staley // Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. – 2022. – Vol. 12. – P. 826114.

82. Hall, A. B. Human genetic variation and the gut microbiome in disease / A. B. Hall, A. C. Tolonen, R. J. Xavier // Nature Reviews Genetics. – 2017. – Vol. 18, № 11. – P. 690–699.

83. Harrison V. C. Serum cholesterol and bowel flora in the newborn / V. C. Harrison, G. Peat // American Journal of Clinical Nutrition. – 1975. – Vol. 28, No 12. – P. 1351–1355.

84. Hartemink, R. Gas formation from oligosaccharides by the intestinal microflora / R. Hartemink, F. M. Rombouts // International Symposium on Pre and Probiotics / ed. G. Boehm. – Wageningen : Wageningen Graduate School, 1997. – P. 57–66.

85. Hensley-McBain, T. Effects of fecal microbial transplantation on microbiome and immunity in simian immunodeficiency virus-infected macaques / T. Hensley-McBain, A. S. Zevin, J. Manuzak [et al.] // Journal of Virology. – 2016. – Vol. 90, № 10. – P. 4981–4989.

86. Herbin S.R. Breaking the Cycle of Recurrent Clostridioides difficile Infections: A Narrative Review Exploring Current and Novel Therapeutic Strategies / S.R. Herbin, H. Crum, K. Gens // Journal of Pharmacy Practice. – 2024. – Vol. 37, No. 6. – P. 1361–1373. – DOI 10.1177/08971900241248883.

87. Herrera G. Updating changes in human gut microbial communities associated with Clostridioides difficile infection / G. Herrera, D. Paredes-Sabja, M.A. Patarroyo, J.D. Ramírez, M. Muñoz // Gut Microbes. – 2021. – Vol. 13, No. 1. – DOI 10.1080/19490976.2021.1966277.

88. Hollister, E. B. Structure and function of the healthy pre-adolescent pediatric gut microbiome / E. B. Hollister, K. Riehle, R. A. Luna, E. M. Weidler, M. Rubio-Gonzales, T. A. Mistretta, S. Raza, H. K. Doddapaneni, G. A. Metcalf, D. M. Muzny, R. A. Gibbs, J. F. Petrosino, N. L. Shulman, J. Versalovic // Microbiome. – 2015. – Vol. 3. – P. 1–13.

89. Hooper, L. V. Commensal host-bacterial relationships in the gut / L. V. Hooper, J. I. Gordon // Science. – 2001. – Vol. 292, № 5519. – P. 1115–1118.

90. Hu, C. Microbes in health and disease: human gut microbiota / C. Hu, H. Shen // Applied Sciences. – 2024. – Vol. 14, № 23. – P. 11354.

91. Hunt, A. A review of fecal microbiota, live-jslm for the prevention of recurrent Clostridioides difficile infection / A. Hunt, S. T. R. [et al.] // American Journal of Health-System Pharmacy. – 2024. – P. zxae066.

92. Hvas, C. L. Fecal microbiota transplantation is superior to fidaxomicin for treatment of recurrent Clostridium difficile infection / C. L. Hvas, S. M. D. J. S. [et al.] // Gastroenterology. – 2019. – Vol. 156, № 5. – P. 1324–1332.e3.

93. Inoue, T. Assessment of fecal microbiota transplantation therapy using spontaneous disease models of common marmosets : project report / T. Inoue. –

KAKEN, 2018. – URL: https://kaken.nii.ac.jp/en/grant/KAKENHI-PROJECT-16K18407/ (дата обращения: 04.10.2025).

94. Johanesen P.A. Disruption of the Gut Microbiome: Clostridium difficile Infection and the Threat of Antibiotic Resistance / P.A. Johanesen, K.E. Mackin, M.L. Hutton, M.M. Awad, S. Larcombe, J.M. Amy, D. Lyras // Genes. – 2015. – Vol. 6, No. 4. – P. 1347–1360. – DOI 10.3390/genes6041347.

95. Kanauchi, O. Probiotics and paraprobiotics in viral infection: clinical application and effects on the innate and acquired immune systems / O. Kanauchi, A. Andoh, S. AbuBakar, N. Yamamoto // Current Pharmaceutical Design. – 2018. – Vol. 24, № 6. – P. 710–717.

96. Kang, P. Comprehensive effects of fecal microbiota transplantation on cynomolgus macaques across various fecal conditions / P. Kang, G. S. Bae, E. Jeon [et al.] // Frontiers in Microbiology. – 2024. – Vol. 15. – P. 1458923.

97. Kassam, Z. Fecal microbiota transplantation for Clostridium difficile infection: systematic review and meta-analysis / Z. Kassam, C. H. Lee, Y. Yuan, R. H. Hunt // American Journal of Gastroenterology. – 2013. – Vol. 108, № 4. – P. 500–508.

98. Kaur, S. Gut microbiota and inflammatory bowel disease: mechanisms, clinical implications, and future directions / S. Kaur, R. Thakur // Molecular Biology Reports. – 2025. – Vol. 53, № 1. – P. 47.

99. Keller, J. J. Stool for fecal microbiota transplantation should be classified as a transplant product and not as a drug / J. J. Keller, E. van Nood, J. G. H. Speelman, J. T. van Dissel // United European Gastroenterology Journal. – 2019. – Vol. 7, № 10. – P. 1408–1410.

100. Kelly, C. R. Guidance on preparing an investigational new drug application for fecal microbiota transplantation studies / C. R. Kelly, S. S. Kunde, A. Khoruts // Clinical Gastroenterology and Hepatology. – 2014. – Vol. 12, № 2. – P. 283–288.

101. Kesavelu D. Current understanding of antibiotic-associated dysbiosis and approaches for its management / D. Kesavelu, P. Jog // Therapeutic Advances in

Infectious Disease. – 2023. – Vol. 10. – P. 20499361231154443. – DOI 10.1177/20499361231154443.

102. Khanna S. Clinical implications of antibiotic impact on gastrointestinal microbiota and Clostridium difficile infection / S. Khanna, D.S. Pardi // Expert Review of Gastroenterology & Hepatology. – 2016. – Vol. 10, No. 10. – P. 1145–1152. – DOI 10.1586/17474124.2016.1158097.

103. Khanna, S. A clinician's primer on the role of the microbiome in human health and disease / S. Khanna, P. K. Tosh // Mayo Clinic Proceedings. – 2014. – Vol. 89, № 1. – P. 107–114.

104. Kim, S.-H. The effect of fecal material transplantation on hepatic and brain diseases in a non-human primate model: several considerations for future application to liver disease patients / S.-H. Kim // Annals of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery. – 2023. – Vol. 27, suppl. 1. – P. S308.

105. Kohl, K. D. Gut microbial communities of American pikas (Ochotona princeps): evidence for phylosymbiosis and adaptations to novel diets / K. D. Kohl, A. W. Miller, J. E. Marvin, R. Mackie, M. D. Dearing // Journal of Animal Ecology. – 2018. – Vol. 87, № 2. – P. 323–330.

106. Kohmoto, T. Effect of isomalto-oligosaccharides on human fecal flora / T. Kohmoto, F. Fukui, H. Takaku, Y. Machida, M. Arai, T. Mitsuoka // Bifidobacteria and Microflora. – 1988. – Vol. 7, № 2. – P. 61–69.

107. Koopman, N. History of fecal transplantation; camel feces contains limited amounts of Bacillus subtilis spores and likely has no traditional role in the treatment of dysentery / N. Koopman, L. van Leeuwen, J. G. H. Speelman, E. van Nood // PLoS One. – 2022. – Vol. 17, № 8. – P. e0272607.

108. Korhonen, J. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria / J. Korhonen. – Itä-Suomen yliopisto, 2010.

109. Kragsnaes, M. S. How do I establish a stool bank for fecal microbiota transplantation within the blood-and tissue transplant service? / M. S. Kragsnaes, T. B. A. [et al.] // Transfusion. – 2020. – Vol. 60, № 6. – P. 1135–1141.

110. Kwon J. Gastrointestinal Microbiome Disruption and Antibiotic-Associated Diarrhea in Children Receiving Antibiotic Therapy for Community-Acquired Pneumonia / J. Kwon, Y. Kong, M. Wade [et al.] // The Journal of Infectious Diseases. – 2022. – Vol. 226, No. 6. – P. 1109–1119. – DOI 10.1093/infdis/jiac082.

111. Lai Y. Polysaccharides of natural products alleviate antibiotic-associated diarrhea by regulating gut microbiota: a review / Y. Lai, X. Lan, Y. Qin, Y. Wei, X. Li, J. Feng, J. Jiang // Archives of Microbiology. – 2024. – Vol. 206, No. 12. – P. 461. – DOI 10.1007/s00203-024-04184-0.

112. Lee A. Gut Microbiota and New Microbiome-Targeted Drugs for Clostridioides difficile Infections / A. Lee, J.S. Yoo, E.J. Yoon // Antibiotics. – 2024. – Vol. 13, No. 10. – P. 995. – DOI 10.3390/antibiotics13100995.

113. Lee, C. H. Frozen vs fresh fecal microbiota transplantation and clinical resolution of diarrhea in patients with recurrent Clostridium difficile infection: a randomized clinical trial / C. H. Lee, T. Steiner, E. O. Petrof, M. Smieja, D. Roscoe, A. Nematallah, J. D. Weese, S. Collins, P. Moayyedi, M. Crowther, M. J. Ropeleski, P. Jayaratne, D. Higgins, Y. Li, N. V. Rau, P. T. Kim // JAMA. – 2016. – Vol. 315, № 2. – P. 142–149.

114. Lee, Y. K. Handbook of probiotics and prebiotics / Y. K. Lee, S. Salminen. – Hoboken : John Wiley & Sons, 2009. – 612 p.

115. Levy, J. The effects of antibiotic use on gastrointestinal function / J. Levy // The American Journal of Gastroenterology. – 2000. – Vol. 95, № 1. – P. 8–10.

116. Ley, R. E. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine / R. E. Ley, D. A. Peterson, J. I. Gordon // Cell. – 2006. – Vol. 124, № 4. – P. 837–848.

117. Ley, R. E. Human gut microbes associated with obesity / R. E. Ley, P. J. Turnbaugh, S. Klein, J. I. Gordon // Nature. – 2006. – Vol. 444, № 7122. – P. 1022–1023.

118. Li, J. An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome / J. Li, H. Jia, X. Cai, H. Zhong, Q. Feng, S. Sunagawa, M. Arumugam, J. R. Kultima, E. Prifti, T. Nielsen, A. S. Juncker, C. Manichanh, B. Chen, W. Zhang, F.

Levenez, J. Wang, X. Xu, L. Xiao, S. Liang, D. Zhang, Z. Zhang, W. Chen, H. Zhao, J. Y. Al-Aama, S. Edris, H. Yang, J. Wang, T. Hansen, H. B. Nielsen, S. Brunak, K. Kristiansen, F. Guarner, O. Pedersen, J. Doré, S. D. Ehrlich, O. Bork, J. Wang // Nature Biotechnology. – 2014. – Vol. 32, № 8. – P. 834–841.

119. Li, Y. Seasonal variation in the gut microbiota of rhesus macaques inhabiting limestone forests of southwest Guangxi, China / Y. Li, T. Chen, J. Liang, Y. Huang, X. Wang // Archives of Microbiology. – 2021. – Vol. 203. – P. 787–798.

120. Liu, G. Heterologous extracellular production of enterocin P in Lactococcus lactis by a food-grade expression system / G. Liu, Y. Wang, Y. Zhang, Y. Ma, M. Li, H. Zhang, W. Chen // European Food Research and Technology. – 2011. – Vol. 233. – P. 123–129.

121. Lobionda, S. The role of gut microbiota in intestinal inflammation with respect to diet and extrinsic stressors / S. Lobionda, P. Sittipo, H. Y. Kwon, Y. K. Lee // Microorganisms. – 2019. – Vol. 7, № 8. – P. 271.

122. Louis, P. How to manipulate the microbiota: prebiotics / P. Louis, H. J. Flint, C. Michel // Microbiota of the human body: implications in health and disease / ed. A. M. Grumezescu. – Cham : Springer, 2016. – P. 119–142.

123. Lu, G. Washed preparation of faecal microbiota changes the transplantation related safety, quantitative method and delivery / G. Lu, C. Zhang, F. Zhang, W. Yang, Z. Li, S. Ding, L. Wang, H. Liu, Y. Wang, P. Li, X. Chen, Q. Li, J. Ren // Microbial Biotechnology. – 2022. – Vol. 15, № 9. – P. 2439–2449.

124. Luckey, T. D. Introduction to intestinal microecology / T. D. Luckey // The American Journal of Clinical Nutrition. – 1972. – Vol. 25, № 12. – P. 1292–1294.

125. Ma, Z. F. The role of the gut microbiota in health, diet, and disease with a focus on obesity / Z. F. Ma, Y. Y. Lee // Foods. – 2025. – Vol. 14, № 3. – P. 492.

126. Mackowiak, P. A. Recycling Metchnikoff: probiotics, the intestinal microbiome and the quest for long life / P. A. Mackowiak // Frontiers in Public Health. – 2013. – Vol. 1. – P. 56101.

127. Mann, G. V. Studies of a surfactant and cholesteremia in the Maasai / G. V. Mann, A. Spoerry // The American Journal of Clinical Nutrition. – 1974. – Vol. 27, № 5. – P. 464–469.

128. Marcella, C. Systematic review: the global incidence of faecal microbiota transplantation-related adverse events from 2000 to 2020 / C. Marcella, B. Cui, C. R. Kelly, G. Ianiro, G. Cammarota, F. Zhang // Alimentary Pharmacology & Therapeutics. – 2021. – Vol. 53, № 1. – P. 33–42.

129. Markowiak, P. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health / P. Markowiak, K. Śliżewska // Nutrients. – 2017. – Vol. 9, № 9. – P. 1021.

130. Martínez-Villaluenga, C. Characterization of bifidobacteria as starters in fermented milk containing raffinose family of oligosaccharides from lupin as prebiotic / C. Martínez-Villaluenga, R. Gómez // International Dairy Journal. – 2007. – Vol. 17, № 2. – P. 116–122.

131. Martyniak, A. Prebiotics, probiotics, synbiotics, paraprobiotics and postbiotic compounds in IBD / A. Martyniak, A. M. K. [et al.] // Biomolecules. – 2021. – Vol. 11, № 12. – P. 1903.

132. Masood, M. I. Beneficial effects of lactic acid bacteria on human beings / M. I. Masood, M. I. Qadir, J. H. Shirazi, I. U. Khan // Critical Reviews in Microbiology. – 2011. – Vol. 37, № 1. – P. 91–98.

133. McFarland L.V. Antibiotic-associated diarrhea: epidemiology, trends and treatment / L.V. McFarland // Future Microbiology. – 2008. – Vol. 3, No. 5. – P. 563–578. – DOI 10.2217/17460913.3.5.563.

134. McKenzie, V. J. The effects of captivity on the mammalian gut microbiome / V. J. McKenzie, S. J. Song, F. Delsuc, T. L. Prest, J. M. Oliver, R. M. Korpita, A. Alexiev, K. R. Amato, J. A. Metcalf, M. Kowalewski, N. L. Avenant, A. E. Zuniga, K. E. Nelson, R. Knight // Integrative and Comparative Biology. – 2017. – Vol. 57, № 4. – P. 690–704.

135. Mekonnen S.A. Molecular mechanisms of probiotic prevention of antibiotic-associated diarrhea / S.A. Mekonnen, D. Merenstein, C.M. Fraser, M.L.

Marco // Current Opinion in Biotechnology. – 2020. – Vol. 61. – P. 226–234. – DOI 10.1016/j.copbio.2020.01.005.

136. Miller, T. L. Isolation of Methanobrevibacter smithii from human feces / T. L. Miller, M. J. Wolin, E. A. de Macario, A. J. Macario // Applied and Environmental Microbiology. – 1982. – Vol. 43, № 1. – P. 227–232.

137. Moore J.H. Correlating Antibiotic-Induced Dysbiosis to Clostridioides difficile Spore Germination and Host Susceptibility to Infection Using an Ex Vivo Assay / J.H. Moore, A. Salahi, C. Honrado, C. Warburton, S. Tate, C.A. Warren, N.S. Swami // ACS Infectious Diseases. – 2023. – Vol. 9, No. 10. – P. 1878–1888. – DOI 10.1021/acsinfecdis.3c00192.

138. Morniroli, D. Postbiotic supplementation for children and newborn's health / D. Morniroli, M. L. S. [et al.] // Nutrients. – 2021. – Vol. 13, № 3. – P. 781.

139. Motamedi H. A worldwide systematic review and meta-analysis of bacteria related to antibiotic-associated diarrhea in hospitalized patients / H. Motamedi, M. Fathollahi, R. Jafari [et al.] // PLoS One. – 2021. – Vol. 16, No. 12. – P. e0260667. – DOI 10.1371/journal.pone.0260667.

140. Nelson, T. M. Diet and phylogeny shape the gut microbiota of Antarctic seals: a comparison of wild and captive animals / T. M. Nelson, T. L. Rogers, M. V. Brown // Environmental Microbiology. – 2013. – Vol. 15, № 4. – P. 1132–1145.

141. Oksanen, P. J. Prevention of travellers diarrhoea by Lactobacillus GG / P. J. Oksanen, S. Salminen, M. Saxelin, P. Hämäläinen, A. Ihantola-Vormisto, L. Muurasniemi-Isoviita, S. Nikkari, T. Oksanen, I. Pörsti, E. Salminen, S. Siitonen, H. Stuckey, A. Toppila, H. Vapaatalo // Annals of Medicine. – 1990. – Vol. 22, № 1. – P. 53–56.

142. Oleskin, A. V. Microbial communication and microbiota-host interactivity: neurophysiological, biotechnological, and biopolitical implications / A. V. Oleskin, B. A. Shenderov. – New York : Nova Science Publishers, 2020. – 389 p.

143. Orrhage, K. Effect of supplements with Bifidobacterium longum and Lactobacillus acidophilus on the intestinal microbiota during administration of

clindamycin / K. Orrhage, B. Brismar, C. E. Nord // Microbial Ecology in Health and Disease. – 1994. – Vol. 7, № 1. – P. 17–25.

144. Panda, S. Structure and functions of the gut microbiome / S. Panda, F. Guarner, C. Manichanh // Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets. – 2014. – Vol. 14, № 4. – P. 290–299.

145. Paramsothy, S. Donor recruitment for fecal microbiota transplantation / S. Paramsothy, T. J. Borody, G. J. Lin, S. Leis, M. O. S. // Inflammatory Bowel Diseases. – 2015. – Vol. 21, № 7. – P. 1600–1606.

146. Paramsothy, S. Multidonor intensive faecal microbiota transplantation for active ulcerative colitis: a randomised placebo-controlled trial / S. Paramsothy, M. A. Kamm, N. O. Kaakoush, J. J. Walsh, J. van den Bogaerde, D. Samuel, R. W. Leong, S. Connor, W. Ng, R. Paramsothy, W. Xuan, E. Lin, H. M. Mitchell, T. J. Borody // The Lancet. – 2017. – Vol. 389, № 10075. – P. 1218–1228.

147. Parvez, S. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health / S. Parvez, K. A. Malik, S. A. Kang, H. Y. Kim // Journal of Applied Microbiology. – 2006. – Vol. 100, № 6. – P. 1171–1185.

148. Patel, S. P. Gut microbiota and its impact on chronic diseases: a comprehensive review / S. P. Patel, S. J. Bhoraniya, S. D. Kalola [et al.] // Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences. – 2025. – Vol. 17, suppl. 2. – P. S1080–S1082.

149. Peng, Z. Colonic transendoscopic enteral tubing: a novel way of transplanting fecal microbiota / Z. Peng, C. Zhang, F. Zhang, L. Xiao, Y. Wang, B. Cui, Q. Li, W. Yang, G. Lu, H. Liu, P. Li, Z. Li, J. Ren // Endoscopy International Open. – 2016. – Vol. 4, № 6. – P. 610–613.

150. Perrin, S. Fermentations of fructo-oligosaccharides and their components by Bifidobacterium infantis ATCC 15697 on batch culture in semi-synthetic medium / S. Perrin, C. J. Fougnies, J. P. Grill, H. Jacobs, F. Schneider // Journal of Applied Microbiology. – 2001. – Vol. 90, № 6. – P. 859–865.

151. Pimentel, M. Gas and the microbiome / M. Pimentel, R. Mathur, C. Chang // Current Gastroenterology Reports. – 2013. – Vol. 15. – P. 1–6.

152. Qi X. Rebuilding the gut ecosystem: Emerging strategies targeting the microbiota in antibiotic-associated diarrhea / X. Qi, Y. Li, Y. Zhu, R. Shen, Z. Xie // Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica. – 2025. – Vol. 72, No. 4. – P. 287–295. – DOI 10.1556/030.2025.02690.

153. Qin, J. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing / J. Qin, R. Li, J. Raes, M. Arumugam, K. S. Burgdorf, C. Manichanh, T. Nielsen, N. Pons, F. Levenez, T. Yamada, D. R. Mende, J. Li, J. Xu, S. Li, D. Li, J. Cao, B. Wang, H. Liang, H. Zheng, Y. Xie, J. Tap, P. Lepage, M. Bertalan, J. M. Batto, T. Hansen, D. Le Paslier, A. Linneberg, H. B. Nielsen, E. Pelletier, P. Renault, T. Sicheritz-Ponten, K. Turner, H. Zhu, C. Yu, S. Li, M. Jian, Y. Zhou, Y. Li, X. Zhang, S. Li, N. Qin, H. Yang, J. Wang, S. Brunak, J. Doré, F. Guarner, K. Kristiansen, O. Pedersen, J. Parkhill, J. Weissenbach, P. Bork, S. D. Ehrlich, J. Wang // Nature. – 2010. – Vol. 464, № 7285. – P. 59–65.

154. Ramirez J. Antibiotics as Major Disruptors of Gut Microbiota / J. Ramirez, F. Guarner, L. Bustos Fernandez, A. Maruy, V.L. Sdepanian, H. Cohen // Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. – 2020. – Vol. 10. – P. 572912. – DOI 10.3389/fcimb.2020.572912.

155. Ray, K. Bacterial histamine and abdominal pain in IBS / K. Ray // Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology. – 2022. – Vol. 19, № 10. – P. 623.

156. Rinninella, E. What is the healthy gut microbiota composition? A changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases / E. Rinninella, P. Raoul, M. Cintoni, F. Franceschi, G. A. D. Miggiano, A. Gasbarrini, M. C. Mele // Microorganisms. – 2019. – Vol. 7, № 1. – P. 14.

157. Risso, D. Social complexity as a driving force of gut microbiota exchange among conspecific hosts in non-human primates / D. Risso, J. C. [et al.] // Frontiers in Integrative Neuroscience. – 2024. – Vol. 18. – P. 1423567.

158. Roberfroid, M. B. Prebiotics and probiotics: are they functional foods? / M. B. Roberfroid // The American Journal of Clinical Nutrition. – 2000. – Vol. 71, № 6. – P. 1682S–1687S.

159. Roberfroid, M. The biochemistry of oligofructose, a nondigestible fiber: an approach to calculate its caloric value / M. Roberfroid, G. R. Gibson, N. Delzenne // Nutrition Reviews. – 1993. – Vol. 51, № 5. – P. 137–146.

160. Rothschild, D. Environment dominates over host genetics in shaping human gut microbiota / D. Rothschild, O. Weissbrod, E. Barkan, A. Kurilshikov, A. Korem, D. Zeevi, P. I. Costea, A. Godneva, I. N. Kalka, N. Bar, S. Shilo, D. Lador, A. V. Vila, N. Zmora, M. Pevsner-Fischer, D. Israeli, N. Kosower, G. Malka, B. C. Wolf, T. Avnit-Sagi, M. Lotan-Pompan, A. Weinberger, A. B. Halpern, S. Carmi, J. Fu, C. Wijmenga, A. Zhernakova, E. Elinav, E. Segal // Nature. – 2018. – Vol. 555, № 7695. – P. 210–215.

161. Salminen, S. The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics / S. Salminen, M. C. Collado, A. Endo, C. Hill, S. Lebeer, E. M. M. Quigley, M. E. Sanders, R. Shamir, K. S. Swanson, H. Szajewska, G. Vinderola // Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology. – 2021. – Vol. 18, № 9. – P. 649–667.

162. Sarowska, J. The therapeutic effect of probiotic bacteria on gastrointestinal diseases / J. Sarowska, B. Choroszy-Król, M. Frej-Mądrzak, A. Jama-Kmiecik, I. Ziółko // Advances in Clinical and Experimental Medicine. – 2013. – Vol. 22, № 5. – P. 759–766.

163. Saulnier, D. M. Gastrointestinal microbiome signatures of pediatric patients with irritable bowel syndrome / D. M. Saulnier, K. Riehle, T. A. Mistretta, M. A. Diaz, D. Mandal, S. Raza, E. M. Weidler, X. Qin, C. Coarfa, A. Milosavljevic, J. F. Petrosino, S. Highlander, R. Gibbs, N. L. Shulman, J. Versalovic // Gastroenterology. – 2011. – Vol. 141, № 5. – P. 1782–1791.

164. Sayols-Baixeras, S. Streptococcus species abundance in the gut is linked to subclinical coronary atherosclerosis in 8973 participants from the SCAPIS cohort / S. Sayols-Baixeras, J. C. [et al.] // Circulation. – 2023. – Vol. 148, № 6. – P. 459–472.

165. Scheeler, A. Where stool is a drug: international approaches to regulating the use of fecal microbiota for transplantation / A. Scheeler // Journal of Law, Medicine & Ethics. – 2019. – Vol. 47, № 4. – P. 524–540.

166. Schulze, J. Yeasts in the gut: from commensals to infectious agents / J. Schulze, U. Sonnenborn // Deutsches Ärzteblatt International. – 2009. – Vol. 106, № 51–52. – P. 837.

167. Seekatz A.M. The role of the gut microbiome in colonization resistance and recurrent Clostridioides difficile infection / A.M. Seekatz, N. Safdar, S. Khanna // Therapeutic Advances in Gastroenterology. – 2022. – Vol. 15. – DOI 10.1177/17562848221134396.

168. Selvaraj V. Antibiotic-Associated Diarrhea Beyond C. Difficile: A Scoping Review / V. Selvaraj, M.A. Alsamman // Brown Journal of Hospital Medicine. – 2022. – Vol. 2, No. 1. – P. 39745. – DOI 10.56305/001c.39745.

169. Semjonovs, S. P. Development of Bifidobacterium lactis Bb12 on β-(2,6)-linked fructan-containing substrate / S. P. Semjonovs, M. A. A. [et al.] // Engineering in Life Sciences. – 2004. – Vol. 4, № 5. – P. 433–437.

170. Sharma, M. Metabiotics: one step ahead of probiotics; an insight into mechanisms involved in anticancerous effect in colorectal cancer / M. Sharma, G. Shukla // Frontiers in Microbiology. – 2016. – Vol. 7. – P. 215207.

171. Sharma, P. Anticancer and antimicrobial potential of enterocin 12a from Enterococcus faecium / P. Sharma, S. K. Tiwari, A. K. Singh, M. K. Singh // BMC Microbiology. – 2021. – Vol. 21. – P. 1–14.

172. Shenderov, B. A. Metabiotics: novel idea or natural development of probiotic conception / B. A. Shenderov // Microbial Ecology in Health and Disease. – 2013. – Vol. 24, № 1. – P. 20399.

173. Sheoran, P. Enterocin LD3 from Enterococcus hirae LD3 causing efflux of intracellular ions and UV-absorbing materials in Gram-negative bacteria / P. Sheoran, S. K. Tiwari // Journal of Applied Microbiology. – 2019. – Vol. 126, № 4. – P. 1059–1069.

174. Sheoran, P. Synergistically-acting enterocin LD3 and plantaricin LD4 against Gram-positive and Gram-negative pathogenic bacteria / P. Sheoran, S. K. Tiwari // Probiotics and Antimicrobial Proteins. – 2021. – Vol. 13, № 2. – P. 542–554.

175. Shim, Y. H. Antimicrobial activity of lactobacillus strains against uropathogens / Y. H. Shim, S. J. Lee, J. W. Lee // Pediatrics International. – 2016. – Vol. 58, № 10. – P. 1009–1013.

176. Shin, H. S. Growth and viability of commercial Bifidobacterium spp in skim milk containing oligosaccharides and inulin / H. S. Shin, J. H. Lee, J. J. Pestka, Z. Ustunol // Journal of Food Science. – 2000. – Vol. 65, № 5. – P. 884–887.

177. Singh, A. Current perspectives on fecal microbiota transplantation in inflammatory bowel disease / A. Singh, S. K. [et al.] // Indian Journal of Gastroenterology. – 2024. – P. 1–16.

178. Smits, L. P. Therapeutic potential of fecal microbiota transplantation / L. P. Smits, K. E. Bouter, W. M. de Vos, T. J. Borody, M. Nieuwdorp // Gastroenterology. – 2013. – Vol. 145, № 5. – P. 946–953.

179. Socransky, S. S. The microbiota of the gingival crevice area of man– I: total microscopic and viable counts and counts of specific organisms / S. S. Socransky, R. J. Gibbons, A. C. Dale, L. Bortnick, E. Rosenthal, J. B. Macdonald // Archives of Oral Biology. – 1963. – Vol. 8, № 3. – P. 275–280.

180. Sokol, H. Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients / H. Sokol, B. Pigneur, L. Watterlot, O. Lakhdari, L. G. Bermúdez-Humarán, J. J. Gratadoux, S. Blugeon, C. Bridonneau, J. P. Furet, G. Corthier, C. Grangette, N. Vasquez, P. Pochart, G. Trugnan, G. Thomas, H. M. Blottière, J. Doré, P. Marteau, P. Seksik, P. Langella // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2008. – Vol. 105, № 43. – P. 16731–16736.

181. Somashekaraiah, R. Probiotic and antifungal attributes of Levilactobacillus brevis MYSN105, isolated from an Indian traditional fermented food Pozha / R. Somashekaraiah, B. Shruthi, M. Y. Sreenivasa // Frontiers in Microbiology. – 2021. – Vol. 12. – P. 696267.

182. Song, Y. The effect of gut microbiome-targeted therapies in nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review and network meta-analysis / Y. Song, S. Liu, L. Zhang [et al.] // Frontiers in Nutrition. – 2025. – Vol. 11. – P. 1470185.

183. Strati, F. New evidences on the altered gut microbiota in autism spectrum disorders / F. Strati, D. Cavalieri, D. Albanese, C. De Felice, C. Donati, J. Hayek, O. Jousson, S. Leoncini, D. Renzi, A. Calabro, C. De Filippo // Microbiome. – 2017. – Vol. 5. – P. 1–11.

184. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome / The Human Microbiome Project Consortium // Nature. – 2012. – Vol. 486, № 7402. – P. 207–214.

185. Sudo, N. Microbiome, HPA axis and production of endocrine hormones in the gut / N. Sudo // Microbial endocrinology: the microbiota-gut-brain axis in health and disease / ed. M. Lyte, J. F. Cryan. – New York : Springer, 2014. – P. 177–194.

186. Swanson, K. S. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of synbiotics / K. S. Swanson, G. R. Gibson, R. Hutkins, R. A. Reimer, G. Reid, K. Verbeke, K. P. Scott, W. L. Holzapfel, M. E. Sanders // Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology. – 2020. – Vol. 17, № 11. – P. 687–701.

187. Taverniti, V. The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics: proposal of paraprobiotic concept) / V. Taverniti, S. Guglielmetti // Genes & Nutrition. – 2011. – Vol. 6, № 3. – P. 261–274.

188. Teame, T. Paraprobiotics and postbiotics of probiotic Lactobacilli, their positive effects on the host and action mechanisms: a review / T. Teame, A. Wang, M. Xie, Z. Zhang, Y. Yang, Q. Ding, C. Gao, R. E. Olsen, S. J. Ran, G. Yang, Z. Wang, Z. Yu // Frontiers in Nutrition. – 2020. – Vol. 7. – P. 570344.

189. Thanush, D. Fecal microbiota transplantation: history, procedure and regulatory considerations / D. Thanush, M. P. Venkatesh // La Presse Médicale. – 2023. – P. 104204.

190. Tharmaraj, N. Antimicrobial effects of probiotics against selected pathogenic and spoilage bacteria in cheese-based dips / N. Tharmaraj, N. P. Shah // International Food Research Journal. – 2009. – Vol. 16, № 1. – P. 261–276.

191. Turnbaugh, P. J. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest / P. J. Turnbaugh, R. E. Ley, M. A. Mahowald, V. Magrini, E. R. Mardis, J. I. Gordon // Nature. – 2006. – Vol. 444, № 7122. – P. 1027–1031.

192. Turnbaugh, P. J. The human microbiome project / P. J. Turnbaugh, R. E. Ley, M. Hamady, C. M. Fraser-Liggett, R. Knight, J. I. Gordon // Nature. – 2007. – Vol. 449, № 7164. – P. 804–810.

193. Tzounis, X. Prebiotic evaluation of cocoa-derived flavanols in healthy humans by using a randomized, controlled, double-blind, crossover intervention study / X. Tzounis, J. A. Rodriguez-Mateos, I. Istas, S. Heiss, R. Rodriguez-Mateos, C. Heiss, M. Kelm, H. Schroeter, J. P. E. Spencer // The American Journal of Clinical Nutrition. – 2011. – Vol. 93, № 1. – P. 62–72.

194. Van der Meulen, R. Short fractions of oligofructose are preferentially metabolized by Bifidobacterium animalis DN-173 010 / R. Van der Meulen, L. Avonts, L. De Vuyst // Applied and Environmental Microbiology. – 2004. – Vol. 70, № 4. – P. 1923–1930.

195. Vangay, P. US immigration westernizes the human gut microbiome / P. Vangay, A. J. Johnson, T. L. Ward, G. A. Al-Ghalith, R. R. Shields-Cutler, B. M. Hillmann, S. K. Lucas, L. K. Beura, E. A. Thompson, L. M. Till, R. Batres, B. Paw, S. L. Pergament, P. Saenyakul, M. Xiong, A. D. Kim, G. Kim, D. J. Masopust, V. B. Martens, C. Angkurawaranon, R. J. T. R. McGue, D. S. K. S. P. T. P. S. V. J. S. R. C. J. K. S. D. Knights // Cell. – 2018. – Vol. 175, № 4. – P. 962–972.e10.

196. Vazquez, M. J. Xylooligosaccharides: manufacture and applications / M. J. Vazquez, J. L. Alonso, H. Dominguez, J. C. Parajo // Trends in Food Science & Technology. – 2000. – Vol. 11, № 11. – P. 387–393.

197. Vergin, F. Antibiotics and probiotics / F. Vergin // Hippokrates. – 1954. – Bd. 25, № 4. – S. 116–119.

198. Waller, A. S. Classification and quantification of bacteriophage taxa in human gut metagenomes / A. S. Waller, T. Yamada, K. Kristiansen, J. R. Kultima, S. Sunagawa, M. K. S. J. B. // The ISME Journal. – 2014. – Vol. 8, № 7. – P. 1391–1402.

199. Wang, J. W. Fecal microbiota transplantation: review and update / J. W. Wang, C. H. Kuo, F. C. Kuo, Y. K. Wang, W. H. Hsu, F. J. Yu, H. M. Hu, Y. C. Su, Y. H. Hsieh, D. C. Wu // Journal of the Formosan Medical Association. – 2019. – Vol. 118. – P. 23–31.

200. Wang, Y. Encyclopedia of fecal microbiota transplantation: a review of effectiveness in the treatment of 85 diseases / Y. Wang, S. Zhang, T. J. Borody, F. Zhang // Chinese Medical Journal. – 2022. – Vol. 135, № 16. – P. 1927–1939.

201. Yadav, M. K. Probiotics, prebiotics and synbiotics: safe options for next-generation therapeutics / M. K. Yadav, I. Kumari, B. Singh, K. K. Sharma, S. K. Tiwari // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2022. – Vol. 106, № 2. – P. 505–521.

202. Yan, Y. The lumenal microbiota varies biogeographically in the gastrointestinal tract of rhesus macaques / Y. Yan, T. T. [et al.] // Microbiology Spectrum. – 2022. – Vol. 10, № 3. – P. e00343-22.

203. Yang S. Prevention and treatment of antibiotics-associated adverse effects through the use of probiotics: A review / S. Yang, J. Qiao, M. Zhang, L.Y. Kwok, B.B. Matijašić, H. Zhang, W. Zhang // Journal of Advanced Research. – 2025. – Vol. 71. – P. 209–226. – DOI 10.1016/j.jare.2024.06.006.

204. Yang, S. C. Effect of synbiotics on intestinal microflora and digestive enzyme activities in rats / S. C. Yang, J. Y. Chen, H. F. Shang, T. Y. Cheng, S. Y. Tsai, J. R. Chen, H. J. Liang, C. C. Hsu // World Journal of Gastroenterology. – 2005. – Vol. 11, № 47. – P. 7413.

205. Yasuda, K. Biogeography of the intestinal mucosal and lumenal microbiome in the rhesus macaque / K. Yasuda, K. Oh, B. Ren, T. L. Tickle, E. A. Franzosa, L. M. Wachtman, A. D. Miller, L. A. Westmoreland, J. A. Mansfield, E. A. Vallender, A. L. Schmitz, P. B. Eckburg, R. J. Xavier, J. L. Dutton, C. Huttenhower // Cell Host & Microbe. – 2015. – Vol. 17, № 3. – P. 385–391.

206. Yatsunenko, T. Human gut microbiome viewed across age and geography / T. Yatsunenko, F. E. Rey, M. J. Manary, I. Trehan, M. G. Dominguez-Bello, M. Contreras, M. Magris, G. Hidalgo, R. N. Baldassano, A. P. Anokhin, A. C. Heath, B. Warner, J. Reeder, J. Kuczynski, J. G. Caporaso, C. A. Lozupone, C. Lauber, J. C.

Clemente, D. Knights, R. Knight, J. I. Gordon // Nature. – 2012. – Vol. 486, № 7402. – P. 222–227.

207. Yen, C. H. Long-term supplementation of isomalto-oligosaccharides improved colonic microflora profile, bowel function, and blood cholesterol levels in constipated elderly people a placebo controlled, diet-controlled trial / C. H. Yen, Y. L. Tseng, Y. W. Kuo, M. C. Lee, H. L. Chen // Nutrition. – 2011. – Vol. 27, № 4. – P. 445–450.

208. Zeng, H. Properties of xylanolytic enzyme system in bifidobacteria and their effects on the utilization of xylooligosaccharides / H. Zeng, S. Z. Li, Q. L. Li, S. H. Song // Food Chemistry. – 2007. – Vol. 101, № 3. – P. 1172–1177.

209. Zhang, F. Evolution of fecal microbiota transplantation in methodology and ethical issues / F. Zhang, B. Cui, X. He, Y. Nie, G. Lu, W. Yang, L. Wang, Q. Li, P. Li // Current Opinion in Pharmacology. – 2019. – Vol. 49. – P. 11–16.

210. Zhang, F. Microbiota transplantation: concept, methodology and strategy for its modernization / F. Zhang, W. Luo, Y. Shi, Z. Fan, G. Ji // Protein & Cell. – 2018. – Vol. 9, № 5. – P. 462–473.

211. Zhang, F. Should we standardize the 1,700-year-old fecal microbiota transplantation? / F. Zhang, B. Cui, X. He, Y. Nie, G. Lu, L. Wang, W. Yang, Q. Li, P. Li // American Journal of Gastroenterology. – 2012. – Vol. 107, № 11.

212. Zhao, J. Characterization of the gut microbiota in six geographical populations of Chinese rhesus macaques (Macaca mulatta), implying an adaptation to high-altitude environment / J. Zhao, T. Yao, Y. Li, Y. Zhang, Y. Hu, S. Zhao, T. Liu, Y. Li, D. Zhang, M. Li // Microbial Ecology. – 2018. – Vol. 76. – P. 565–577.

213. Zhong, M. Awareness and attitude of fecal microbiota transplantation through transendoscopic enteral tubing among inflammatory bowel disease patients / M. Zhong, H. Sun, Y. Wang, Q. Li, F. Zhang, W. Yang, G. Lu, B. Cui, L. Wang // World Journal of Clinical Cases. – 2020. – Vol. 8, № 17. – P. 3786.

214. Zhong, M. Colonic transendoscopic enteral tubing: route for a novel, safe, and convenient delivery of washed microbiota transplantation in children / M. Zhong,

Y. Wang, Q. Li, F. Zhang, W. Yang, G. Lu, B. Cui, L. Wang, H. Sun // Gastroenterology Research and Practice. – 2021. – Vol. 2021, № 1. – P. 6676962.

215. Zhou, Y. Are there potential applications of fecal microbiota transplantation beyond intestinal disorders? / Y. Zhou, H. Xu, J. Huang, Y. Li, Y. Wang, F. Zhang // BioMed Research International. – 2019. – Vol. 2019. – P. 1–11.

216. Zhu, L. B. Prospects for clinical applications of butyrate-producing bacteria / L. B. Zhu, Y. C. Xu, Y. Z. Zhang, H. M. Chen, J. L. Ren // World Journal of Clinical Pediatrics. – 2021. – Vol. 10, № 5. – P. 84.

217. Zhu, L. Characterization of gut microbiomes in nonalcoholic steatohepatitis (NASH) patients: a connection between endogenous alcohol and NASH / L. Zhu, S. S. Baker, C. Gill, W. Liu, R. Alkhouri, R. D. Baker, S. R. Gill // Hepatology. – 2013. – Vol. 57, № 2. – P. 601–609.

218. Zimin, A. V. A new rhesus macaque assembly and annotation for next-generation sequencing analyses / A. V. Zimin, A. S. Cornish, M. D. Maudhoo, R. M. Gibbs, X. Zhang, S. Pandey, D. T. Meehan, K. W. W. V. R. A. H. L. C. P. K. S. L. S. R. A. G. // Biology Direct. – 2014. – Vol. 9. – P. 1–15.

СПИСОК НАУЧНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ, В КОТОРЫХ ИЗЛОЖЕНЫ ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах:

1. **Полякова, В. И.** Исследования микробиоты кишечника у обезьян разного возраста / В. И. Полякова, И. М. Аршба // Бактериология. – 2024. – Т. 9. – № 1. – С. 46-51. DOI:10.20953/2500-1027-2024-1-46-51

2. Melikhova, A. V. Biotechnological and microbiological aspects of development of capsule form for fecal microbiota transplantation / A. V. Melikhova, E. N. Ilina, D. Y. Mokhirev, Y. D. Benediktova, A. V. Pavlenko, **V. I. Polyakova**, E. V. Cherkashina, K. V. Simavonyan, I. M. Arshba // World Journal of Advanced Research and Reviews. – 2024. – Vol. 24. – № 2. – P. 682 - 689. – DOI: 10.30574/wjarr.2024.24.2.3290

3. **Полякова, В. И.** Возрастные особенности композиции микробиоты кишечника макак резусов, содержащихся в условиях неволи / В. И. Полякова, Д. В. Кривонос, К. М. Климина и др. // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2024. – Т. 42. – № 3. – С. 22 - 28. – DOI:10.17116/molgen20244203122

4. **Полякова, В. И.** Референсные значения показателей кишечной микробиоты макак резусов, установленные методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени / В. И. Полякова, А. П. Пушкарев, А. В. Демерчян, И. М. Аршба, А. В. Попов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2026. – Т. 103. – № 2. – С. 279-289. – DOI: 10.36233/0372-9311-793

5. **Полякова, В. И.** Применение кишечнорастворимых капсул для пероральной трансплантации микробиоты кишечника на макаках резусах (*Macaca mulatta*) / В.И. Полякова, А.В. Демерчян, Е.И. Мухаметзянова, М.А. Котова, И.М. Аршба. // Бактериология. – 2026. – Т. 11. – № 2. – С.30-38. – DOI:10.20953/2500-1027-2026-2-30-38

Тезисы докладов в материалах конференций:

6. **Полякова, В. И.** Микробиота толстого кишечника здоровых макак резусов / В. И. Полякова, И. М. Аршба, Е. Н. Ильина, С. В. Орлов // Материалы Юбилейной научно-практической конференции: «ИЭПиТ 2022. Вчера, сегодня, завтра». Актуальные вопросы экспериментальной биологии и медицины, 26‑28 нояб. 2022 г. – Сухум, 2022. – С. 263‑268.

7. **Полякова, В. И.** Изучение микробиоты толстого кишечника на модели макак резус / В. И. Полякова, И. М. Аршба, Е. Н. Ильина // Сборник тезисов научно-практической конференции «Биоресурсные коллекции. Современное состояние и потенциал для создания новых технологий и инновационной продукции в Российской Федерации», 23‑25 нояб. 2022 г. – Сочи, 2022. – С. 34.

8. **Полякова, В. И.** Изучение микробиоты кишечника методом 16S рРНК метагеномного секвенирования на модели макак-резус / В. И. Полякова, Д. В. Кривонос, Е. В. Корнеенко, Л. Н. Пенкин, А. С. Сперанская, И. М. Аршба, Е. Н. Ильина // Материалы VIII Национального конгресса бактериологов, 27‑28 сент. 2023 г. – Москва, 2023. – С. 102‑103.

9. **Полякова, В. И.** Возрастные особенности микробиоты кишечника макак резусов / В. И. Полякова, И. М. Аршба, Е. Н. Ильина, А. В. Демерчян // Материалы II Научно-практической конференции «Биоресурсные коллекции: современное состояние и потенциал для создания новых технологий и инновационной продукции в Российской Федерации»: сборник трудов Курчатовского геномного форума. – Москва, 2023. – С. 145-146.

10. Мелихова, А. В. Биотехнологические и микробиологические аспекты разработки капсульной формы для трансплантации кишечной микробиоты / А. В. Мелихова, Е. Н. Ильина, Д. Ю. Мохирев, Я. Д. Бенедиктова, **В. И. Полякова**, Е. В. Черкашина, К. В. Симавонян, И. М. Аршба //

Жизнеобеспечение при критических состояниях: сборник тезисов XXVI Всероссийской конференции с международным участием. – Москва, 2024. – С. 134-135.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение №1

Анализ частоты обнаружения микроорганизмов, выявленных у здоровых особей макак резусов

№ п/п	Показатель	**Группа I (До 1 года)**	**Группа II (1-3 лет)**	**Группа III (4-7 лет)**	**Группа IV (8-14 лет)**	**Группа V (15-20 лет)**	**Группа VI (21-25 лет)**	**Группа VII (от 26 лет)**	***χ2, p****
1	*Lactobacillus spp.*	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	1,000
2	*Bifidobacterium spp.*	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	1,000
3	*Escherichia coli*	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	1,000
4	*Bacteroides spp.*	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	1,000
5	*Faecalibacterium prausnitzii*	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	1,000
6	*Bacteroides thetaiotaomicron*	-	-	8,3%	-	4,2%	-	-	0,074
7	*Akkermansia muciniphila*	-	2,8%	-	16,7%	25,0%	50,0%	25,0%	0,006
8	*Enterococcus spp.*	25,0%	33,3%	33,3%	16,7%	25,0%	8,3%	25,0%	0,035
9	*Escherichia coli enteropathogenic*	16,7%	16,7%	8,3%	-	-	-	8,3%	0,126
10	*Klebsiella pneumoniae*	8,3%	-	-	-	4,2%	-	16,7%	0,515
11	*Klebsiella oxytoca*	8,3%	-	8,3%	-	25,0%	8,3%	16,7%	0,341
12	*Candida spp.*	8,3%	-	-	8,3%	-	-	8,3%	0,493
13	*Staphylococcus aureus*	66,7%	33,3%	8,3%	33,3%	29,2%	25,0%	33,3%	0,861
14	*Clostridium difficile*	8,3%	-	-	-	-	-	-	0,603
15	*Clostridium perfringens*	33,3%	11,1%	8,3%	-	29,2%	25,0%	-	0,292

Продолжение приложения 1

16	*Proteus vulgaris/mirabilis*	25,0%	16,7%	-	16,7%	25,0%	25,0%	8,3%	0,705
17	*Citrobacter spp.*	16,7%	5,6%	-	-	-	-	-	0,460
18	*Enterobacter spp.*	75,0%	11,1%	8,3%	50,0%	41,7%	41,7%	50,0%	0,334
19	*Fusobacterium nucleatum*	16,7%	2,8%	-	-	4,2%	-	41,7%	0,044
20	*Parvimonas micra*	50,0%	22,2%	-	8,3%	16,7%	16,7%	66,7%	0,460
21	*Salmonella spp.*	-	-	-	-	-	-	-	-
22	*Shigella spp.*	-	-	-	-	-	-	-	-
Примечание – * $p < 0,05$, критерий $\chi 2$ (достоверность различий по частоте обнаружения микроорганизмов в отдельных возрастных группах)									