

На правах рукописи

ОТДУШКИНА

Лариса Юрьевна

**БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЭНТЕРОКОККОВ В
КИШЕЧНОМ МИКРОБИОМЕ ПАЦИЕНТОВ С
ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ**

1.5.11. Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Кемерово - 2025

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор медицинских наук,
доцент

Захарова Юлия Викторовна

Официальные оппоненты:

Лазарева Анна Валерьевна - доктор медицинских наук, федеральное государственное автономное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения Российской Федерации, лаборатория экспериментальной иммунологии и вирусологии лабораторного отдела НИИ педиатрии, главный научный сотрудник

Подопригора Ирина Викторовна - кандидат медицинских наук, доцент, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», кафедра микробиологии им. В. С. Киктенко медицинского института, заведующий кафедры

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «__»_____2025 г. в «__» часов на заседании диссертационного совета Д 208.046.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, д.10, <http://www.gabrich.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 2025 года

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор

Борисова Ольга Юрьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Энтерококки являются постоянными представителями кишечного микробиома, обеспечивающие при эубиозе колонизационную резистентность слизистой, поддерживающие мукозальный иммунитет, синтезирующие антимикробные метаболиты, витамины, бактериоцины (Иванова Е. И. с соавт, 2017; Rahmania et al., 2020; Akbar A. et al, 2023). Они характеризуются высокими адаптивными свойствами, такими как устойчивостью к желчи и ее солей, высокому содержанию хлорида натрия, к широкому диапазону pH (Zhong Z. et al., 2019; Сычева М. В., 2021). Способность энтерококков к гомоферментативному молочнокислому брожению определяет их вклад в формировании общего пула молочной кислоты, как ключевого экзометаболита доминантной микробиоты, регулирующего ассоциативных микросимбионтов, состояние слизистой кишечника (Затевалов А. М. и соавт., 2018; Z. Abdelghani et al., 2021). С другой стороны, энтерококки при микробиологических нарушениях способны вызывать патологические процессы воспалительного характера, что обусловлено наличием хорошо развитой системой адгезинов, широким диапазоном протеаз, природной и приобретенной устойчивостью к антибиотикам (Zheng J. et al. 2020; Габриелян Н.И. с соавт., 2020; Афанасова Е.Н. и соавт., 2022).

У пациентов с туберкулезом легких формируются длительные и стойкие микробиологические нарушения, что связывают с широкой распространенностью мультирезистентных микобактерий, многокомпонентной и длительной более 18 месяцев противотуберкулезной химиотерапией, коморбидностью (Wang J. et al., 2020; Huang Y. et. al., 2023). Диспептический синдром занимает ведущее место в структуре побочных эффектов при противотуберкулезном лечении и часто является причиной отказа пациентов от этиотропной терапии. На фоне диспепсии у 81% пациентов развивается синдром мальадсорбции, что приводит к снижению концентрации противотуберкулезных препаратов в сыворотке крови и способствует селекции устойчивых штаммов микобактерий (Родина О. В. с соавт., 2020). Поэтому фтизиатрические пациенты нуждаются в коррекции кишечного микробиома с целью повышения эффективности этиотропной терапии основного заболевания, а также для снижения рисков формирования лекарственной устойчивости возбудителя туберкулеза.

Данные о состоянии резидентных микросимбионтов у фтизиатрических пациентов немногочисленны и противоречивы. Чаще всего речь идет об изменении количественного содержания микроорганизмов – бифидобактерий, лактобацилл, в том числе и энтерококков (Комиссарова В. А. с соавт., 2022; Zhuo Q et al., 2023). При этом исследования видового состава и биологических свойств, факторов межмикробных взаимодействий энтерококков довольно ограничены, что не позволяет оценить вклад этих бактерий в функционирование кишечного микробиома, определить их роль при микробиологических нарушениях, оценить целесообразность пробиотикотерапии и ее влияние на функциональные свойства энтерококков.

Степень разработанности темы исследования

Информационный поиск показал возрастающий интерес научного сообщества к оценке влияния кишечного микробиома на характер течения и эффективность лечения туберкулеза легких (Белова И.В. и соавт., 2016; Беляев В.С. и соавт., 2022; Комиссарова О.Г. и соавт., 2022). Исследования в отношении фтизиатрических пациентов ведутся по следующим направлениям: оценка состава кишечного

микробиома у пациентов с учетом коморбидности (Комиссарова О.Г. и соавт., 2022), гендерной принадлежности, возраста (Быков И.А., 2022); изменения условно-патогенной микробиоты на фоне противотуберкулезной терапии (Ding X. et al., 2022; Холодов А. А. и соавт., 2023); эффективность пробиотикотерапии (Белова И. В. и соавт., 2016).

Немногочисленные данные демонстрируют, что у больных с легочным туберкулезом перед началом лечения антибиотиками в кишечнике выявлено повышение содержания анаэробов (*Anaerostipes*, *Blautia*, *Erysipelotrichaceae*) (Comberiat P. et al., 2021; Naidoo C. S. et al., 2021). Установлены связи между содержанием этих кишечных анаэробов с уровнем провоспалительных цитокинов (Foreman T. W. et al., 2022), а также тяжестью туберкулезной инфекции (Кайбышева В. О. с соавт., 2019; Комиссарова О.Г. и соавт., 2022).

Установлено, что при лечении у пациентов с туберкулезом легких и множественной лекарственной устойчивостью возбудителя развиваются дисбиотические нарушения кишечника II и III степени (Diallo D. et al. 2021; Мышкова Е. П. с соавт., 2022; Холодов А. А. с соавт., 2023). Дисбиоз у 90% пациентов сопровождается диспептическим синдромом, который проявляется в 23,5% - 44,9% случаев метеоризмом и диареей (Соловьева И.В. с соавт., 2017; Родина О.В. с соавт., 2020; Diallo D. et al. 2021). Нарушения кишечной микробиоты, которые сохраняются в течение 3-8 лет после прекращения приема противотуберкулезных препаратов, коррелируют с рецидивами туберкулеза (Somboro A.M. et al., 2021; Wang J. et al., 2022).

В микробиоме у пациентов с туберкулезом легких регистрируют снижение частоты обнаружения постоянных представителей: бифидобактерий, лактобацилл, энтерококков и типичных эшерихий (Белова И. В. с соавт., 2016; Соловьева И. В. с соавт., 2017; Комиссарова О. Г. с соавт., 2022). У пациентов увеличивается частота колонизации слизистой условно-патогенными микроорганизмами в значимых количествах (более 5 lg КОЕ/г): коагулазоотрицательными стафилококками, представителями рода *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, грибами рода *Candida* (Холодов А.А. с соавт., 2023; Юнусбаева, М. М. с соавт., 2023). У 33,3% пациентов условно-патогенные микроорганизмы формируют ассоциации из четырех и более представителей (Соловьева И. В. с соавт., 2017; Хохлова Я. Н. с соавт., 2023). Показана зависимость качественных изменений кишечной микробиоты при противотуберкулезной терапии от возраста (Comberiat P. et al., 2021). Независимо от возраста снижается биоразнообразие микробиоты в биотопе. У детей в большей степени, чем у взрослых угнетается колонизация слизистой лактобациллами и энтерококками (Юсубова А.Н. с соавт., 2015; Юнусбаева М.М. с соавт., 2023).

Энтерококки, как постоянные представители кишечного микробиома являются активными продуцентами бактериоцинов с широким спектром действия (Almeida-Santos A.C. et al., 2021; Akbar A. et al., 2023). Установлено, что бактериоцины энтерококков перспективны в предупреждении туберкулеза (Hu Y. et al. 2019; Fellag M. et al., 2020). Так бактериоцинпродуцирующие *Enterococcus casseliflavus* и *Enterococcus mundtii*, подавляют рост *Mycobacterium canettii* и *Mycobacterium tuberculosis*. Размножение *M. tuberculosis* подавляет также *Enterococcus faecalis* (Almeida-Santos A. C. et al. 2021; Achache W. et al., 2023). Штамм *Enterococcus italicus* BLN34, выделенный из коровьего молока, ингибирует рост *Mycobacterium kansasii*, а *Enterococcus hirae* проявляет антагонистические эффекты в отношении *Mycobacterium smegmatis* Mc155 (Fellag M. et al., 2020).

Очевидно, что пациенты при противотуберкулезной терапии нуждаются в мониторинге состояния кишечной микробиоты и своевременной ее коррекции. Немногочисленные исследования демонстрируют, что использование пробиотиков во время этиотропной терапии повышает эффективность лечения туберкулезного процесса (Белова И.В. и соавт., 2016; Савинцева Е.В. и соавт., 2019).

Таким образом, не рассмотрены механизмы функционирования кишечного микробиоценоза в условиях длительной противотуберкулезной терапии, биохимическая активность микросимбионтов, их роль в формировании метаболома, межмикробные взаимодействия. Особый интерес представляет исследование при микрoэкологических нарушениях функциональной активности и свойств бактерий рода *Enterococcus*, как резидентов кишечного биотопа, способных при определенных условиях проявлять вирулентность. Все это является основополагающим для разработки пробиотических композиций в рамках персонализированной комбинированной терапии фтизиатрических пациентов с целью повышения эффективности лечения и снижения резистентности микобактерий к противотуберкулезным препаратам.

Цель исследования

Оценка роли энтерококков при микрoэкологических нарушениях кишечного микробиома у пациентов с туберкулезом легких при противотуберкулезной терапии.

Задачи исследования:

1. Охарактеризовать кишечный микробиом у пациентов с туберкулезом легких и множественной устойчивостью возбудителя до начала противотуберкулезной терапии и при появлении клинических симптомов микрoэкологических нарушений, ассоциированных с приемом этиотропных средств.
2. Сравнить видовой состав и биологические свойства (адгезивная активность, кислотообразование, вирулентные свойства) энтерококков до начала лечения и во время приема противотуберкулезных препаратов.
3. Определить метаболические взаимоотношения бактерий в парах «*E.faecalis* - *E.faecium*» при гомоферментативном молочно-кислом брожении.
4. Исследовать *in vitro* синтрофные связи в парах «*Bifidobacterium-Enterococcus*» на белоксодержащем субстрате.
5. Установить характер межмикробных связей между энтерококками и грибами *Candida albicans*, изучить *in vitro* влияние экзометаболитов энтерококков на активность каталазы грибов.
6. Оценить эффективность коррекции кишечного микробиома пациентов с туберкулезом легких пробиотическими бактериями и влияние их приема на структурно-функциональные свойства энтерококков.

Научная новизна

Впервые у пациентов с туберкулезом легких охарактеризованы биологические свойства и характер межбактериальных метаболомных взаимодействий доминирующих видов энтерококков с помощью хроматографических и спектральных методов, выявлена их аддитивность с видовой принадлежностью и характером этиотропного влияния на кишечный микробиом (противотуберкулезные препараты и пробиотические штаммы).

До начала химиотерапии туберкулеза выявлено преобладание среднеадгезивных (73%) штаммов с низкой инвазивностью (5-12%) и кислотообразованием (23,2⁰T) и повышение при противотуберкулезном лечении

среди *E.faecalis* числа биовариантов с фосфолипазой ($p=0,03$) и протеазой ($p=0,02$), что свидетельствует об инфекционном потенциале данного вида энтерококка.

Получены данные об антикаталазной активности экзометаболитов энтерококков, снижающих на 46,1% продукцию антиоксидантного фермента у *Candida albicans* ($p=0,041$), что демонстрирует механизмы регуляции энтерококками факультативной кишечной микробиоты.

Показаны синтрофные связи между энтерококками и бифидобактериями на белоксодержащих субстратах, основанные на продукции энтерококками метаболитов с протеазной активностью, по спектральным характеристикам имеющие схожесть с ферментами группы сериновых протеаз, продукты ферментации которых обладают бифидогенным эффектом. При ферментации углеводов между *E.faecalis* и *E.faecium* формируются партнерские взаимоотношения, проявляющиеся сходной скоростью утилизации субстрата ($p=0,06$) и уровнем лактатпродуцирующей активности ($p=0,82$), что дополняет данные о вкладе энтерококков в функционирование кишечного микробиома и метаболома.

Предложена возможность оценки положительных эффектов коррекции микробиома пробиотическими бактериями у больных с туберкулезом легких на основе исследования у энтерококков химического состава клеточной стенки, в которой увеличивается в 10-11 раз ($p<0,01$) содержание ненасыщенных жирных кислот и в 3 раза содержание Ca^{2+} ($p<0,05$) и Na^{2+} ($p<0,001$). Рост синтеза энтерококками лактата в 1,5 раза ($p<0,01$) указывает на значительный вклад жирных кислот и минеральных элементов в функциональную активность бактерий при формировании экзометабола.

Теоретическая и практическая значимость работы

Представлены новые данные о межмикробных трофических и метаболомных взаимодействиях, о роли энтерококков в многокомпонентном кишечном сообществе при микрoэкологических нарушениях, что дополняет знания о механизмах функционирования микробиома кишечника при различных заболеваниях и о вкладе отдельных симбионтов и их экзометаболитов в жизнедеятельность микробного сообщества.

На основе изучения состава жирных кислот и минеральных элементов энтерококков получены новые знания о взаимосвязи химического состава бактериальных клеток и активностью катаболизма углеводов, что имеет значение для разработки новых подходов для скрининга штаммов с биотехнологическим потенциалом.

Результаты по исследованию биологических свойств (адгезия, кислотообразование, факторы инвазии) микроорганизмов рода *Enterococcus* у пациентов с туберкулезом легких и множественной лекарственной устойчивостью, могут служить основой для разработки системы мониторинга вирулентности штаммов (биомаркирование) при противотуберкулезной терапии и оценки типа симбиотических связей с макроорганизмом.

На кафедре микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО КемГМУ сформирована коллекция энтерококков от пациентов с туберкулезом легких, позволяющая осуществлять дальнейшие фундаментальные и прикладные исследования микробиома при инфекционной патологии.

Разработаны методические рекомендации «Комплексная оценка функциональных свойств энтерококков в кишечном микробиоме», где предложены критерии и методика оценки их роли в кишечном микробиоме (утвержденные

16.11.2021 г. Министром здравоохранения Кемеровской области – Кузбасса). Методические рекомендации внедрены в работу лаборатории иммунохимии Федерального исследовательского центра угля и углехимии Сибирского отделения Российской Академии наук «Институт экологии человека» (акт внедрения от 15.05.2023).

Предложения по предупреждению развития гастроинтестинального синдрома у пациентов с туберкулезом легких и множественной лекарственной устойчивостью возбудителя, основанные на персонифицированном исследовании микробиома и назначении при противотуберкулезной терапии бактериальных препаратов, корректирующих микробиоту, внедрены в работу ГБУЗ «Кузбасский клинический фтизиопульмонологический медицинский центр имени И. Ф. Копыловой» (акт внедрения в работу от 03.06.2024).

Штаммы *Enterococcus faecalis* ККМЧ № 48, *Enterococcus faecium* ККМЧ № 84 используются для проведения практических занятий по направлениям подготовки «Медико-профилактическое дело», «Лечебное дело», «Педиатрия» (акт внедрения от 29.09.2023).

Материалы диссертации внедрены в образовательный процесс кафедры микробиологии, вирусологии ФГБОУ ВО КемГМУ Минздрава России и используются при чтении лекций при изучении дисциплины «Микробиология, вирусология» по направлениям подготовки «Медико-профилактическое дело», «Лечебное дело», «Педиатрия» (акт внедрения от 06.06.2023 г.).

Методология и методы исследования

Методология данной работы заключается в фундаментальных исследованиях биологических свойств энтерококков в кишечном микробиоме при туберкулезном процессе с использованием комплекса микробиологических, физико-химических, экспериментальных и статистических методов. Теоретической основой выбранных подходов исследования являются современные представления о симбиотических связях микроорганизмов в многокомпонентных микробных сообществах. На проведение исследования получено заключение Этического комитета ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Минздрава РФ (протокол № 260/к от 20.01.2021).

Образцы биоматериалов

Изучены образцы фекалий от 135 пациентов, поступивших на лечение и проходивших противотуберкулезную терапию в ГБУЗ «Кузбасский клинический фтизиопульмонологический медицинский центр имени И. Ф. Копыловой» (ГБУЗ ККФПМЦ им. И.Ф. Копыловой). Пациентов с впервые выявленным туберкулезом легких и множественной лекарственной устойчивостью возбудителя было 64 человека, из них 31 человек – группа больных с моноинфекцией (туберкулез – ТБ), 33 человека – с сочетанной патологией (ТБ/ВИЧ). Основную группу составили 36 пациентов с диспептическим синдромом, ассоциированным с противотуберкулезной терапией. В соответствии с возрастно-половой и клинической характеристикой основной группы из числа впервые выявленных пациентов была сформирована группа сравнения (n=37). Третью группу составили пациенты (n=35), которые с противотуберкулезными препаратами получали синбиотический препарат «Панбиолакт» (ООО «Артлайф», Россия).

При исследовании соблюдали Хельсинскую декларацию Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения медицинских исследований с участием человека в качестве субъекта исследования» (1964 г. с

поправками от 2013 г.). Сбор биобразцов в количестве 1-3 грамма проводили утром, в день исследования, в стерильные одноразовые контейнеры. Доставку в научную лабораторию кафедры микробиологии и вирусологии осуществляли не позднее 2 часов после получения материала в стабильных температурных условиях с использованием медицинского термоконтейнера (НПФ-Медтехника, Россия). В рамках преаналитического внутрилабораторного этапа измеряли pH фекалий, готовили разведения биоматериала от 10^{-1} до 10^{-9} для последующих посевов.

Микробиологические методы исследования

Выделение кишечных микросимбионтов осуществляли на селективных и дифференциально-диагностических средах: бифидобактерий на Бифидум-среде (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск); *Lactobacillus* на среде MRS (de Man, Rogosa and Sharpe) (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск); представителей семейства *Enterobacteriaceae* на среде Эндо (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск), *Enterococcus* на Энтерококк-агаре (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск), *Staphylococcus* на желточно-солевом агаре, приготовленного на основе ГРМ-агара (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск), сульфитредуцирующие клостридии на среде Вильсона-Блера (НИЦФ, Санкт-Петербург), грибы на среде HiChrome Candida Agar (HIMEDIA, Индия).

Идентификацию микроорганизмов осуществляли на основании фенотипических свойств с использованием коммерческих тест-систем: EnCoccus-Test 8 (Erba Lachema, Чехия) для видовой идентификации энтерококков, STAPHYtest 16 (Lachema diagnostica s.r.o, Чехия) для стафилококков, ENTEROtest 24 (Lachema diagnostica s.r.o, Чехия), ПБДЭ (НПО «Диагностические системы», Россия) – для энтеробактерий; АухаColor 2 (Bio-Rad, Франция) - для микромицетов.

Изучение биологических свойств энтерококков. Поставлено 1188 опытов *in vitro* по исследованию биологических свойств и межмикробных взаимодействий энтерококков. Показатели адгезии (индекс адгезии микроорганизмов) исследовали на модели эритроцитов 0 (I) группы Rh⁺ по В. И. Брилису (1986); активность продукции лактата по ОФС 1.7.2.0009-15: Общая фармакопейная статья. «Определение специфической активности пробиотиков» (М., 2015); факторы вирулентности изучали на питательных средах: синтез цитолизина (гемолизина) – на кровяном агаре на основе ГРМ - агара (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) с 5% взвесью эритроцитов, продукцию липазы и ДНКазы определяли на Tributyrin Agar Base without Tributyrin (HIMEDIA, Индия) и DNA Base Agar (HIMEDIA, Индия) соответственно; синтез цинкзависимой металлопротеазы (желатиназы) проводили с помощью набора Микро-ЖЕЛАТИНАЗА (НИЦФ, Санкт-Петербург).

Изучение характера взаимодействий энтерококков с кишечными микросимбионтами исследовали методом перпендикулярных штрихов для оценки отсроченного антагонизма и методом натекания бляшек для определения прямого антагонизма; изучение скорости утилизации глюкозы микроорганизмами рода *Enterococcus*, *Candida* и *Staphylococcus* проводили кинетически на МПБ (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) с 5% глюкозой (Sigma-Aldrich, США), показания снимали через 1 ч, 2 ч, 4 ч, 6 ч, 12 ч, 24 ч от начала культивирования на приборе «СФ 2000» (ОКБ «Спектр») при длине волны 550 нм. Антикаталазную активность экзометаболитов энтерококков в отношении грибов *Candida albicans* исследовали по методике О. В. Бухарина (2002) с модификациями. Оптическую плотность окрашенных комплексов измеряли на приборе «СФ 2000» (ОКБ «Спектр», Россия) при длине волны 550 нм.

Трофические взаимодействия энтерококков с бифидобактериями оценивали на продуктах гидролиза казеина (ООО «Бригантина», Санкт-Петербург).

Ферментативную обработку казеина экзометаболитами энтерококков осуществляли в течение 24 часов с применением шейкер – инкубатора Orbital shaker – Incubator ES - 20/60 (Biosan, Латвия) при температуре 37°C с числом качаний 55 раз/мин. В качестве ферментов сравнения использовали трипсин (HiMedia, Индия) и α -химотрипсин (Sigma-Aldrich, США). Оценку фракций казеина проводили тонкослойной хроматографией (ТСХ) на пластинках Sorbfil PTS-AF-A (ООО “ИМИДЪ”, Россия).

Физико-химические методы исследования

Состав и количество жирных кислот в клеточных стенках энтерококков определяли методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ-МС) на хроматомасс-спектрометре Agilent 7000В (Германия). Использовали колонку ZB-WAX, 30м*0.25мм*0.25мкм, объем вводимой пробы был 2 мкл, ввод осуществляли с температурой термостата 50 °С при повышении 8 °С/мин до 260 °С в течение 5 мин.

Синтез лактата энтерококками идентифицировали обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ-ОФ) на жидкостном хроматографе Shimadzu LC-20 Prominence, (Япония) с диодно-матричным детектированием согласно ГОСТ 33410-2015 «Определение содержания органических кислот методом высокоэффективной жидкостной хроматографии».

Исследование микроэлементного состава клеточного матрикса энтерококков, выполняли с использованием атомно-эмиссионного спектрометра (АЭС) с индуктивно связанной плазмой ISP-AES 9820 (Shimadzu, Япония). Минерализацию образцов осуществляли в условиях микроволновой станции пробоподготовки TOPEX+ (PreeKem Ltd.). Обработку полученных результатов исследования выполняли с использованием ПО ICPE -9800 Version 1.11.

Статистические методы исследования

Программа IBM SPSS Statistics / PS IMAGO («IBM/Predictive Solutions», США) была использована для статистической обработки материала. Критерий Шапиро-Уилка позволил оценить нормальность распределения данных. Для оценки соответствия достоверности полученных результатов позициям доказательной медицины использовали непараметрические методы статистики. Различия категориальных переменных установлены с помощью точного критерия Фишера, различия количественных показателей - с помощью критерия U Манна-Уитни. Критерий χ^2 Пирсона использовали для определения разницы между относительными показателями двух несвязанных групп. В виде медианы и интерквартильного размаха Me (Q1-Q3) приведены данные по количеству кишечных микросимбионтов в биотопе, содержанию жирных кислот и минеральных элементов. Статистические гипотезы считали приемлемыми при $p < 0,05$.

Личное участие автора в получении результатов

Автор лично участвовала в организации и проведении всех этапов научного исследования: разработала программу, план исследования, сформулировала цель и задачи, определила дизайн, тип и объем исследования, методологию и методы исследования. Автором лично проведен весь объем бактериологических исследований кишечного микробиома, освоены и применены все указанные в работе методики по изучению биологических свойств микроорганизмов и межмикробных взаимодействий, с последующим анализом, интерпретацией данных. Автор освоила работу компьютерного комплекса «IBM SPSS Statistics / PS IMAGO 5» («IBM/Predictive Solutions», США), что позволило обосновать результаты работы согласно принципам доказательной медицины.

Подбор пациентов, клинические исследования и организация терапии бактериальным препаратом проведены на базе ГБУЗ «Кузбасского клинического фтизиопульмонологического медицинского центра им. И.Ф. Копыловой» с участием ассистента кафедры фтизиатрии Холодова А. А. Выделение, идентификацию и определение лекарственной чувствительности/устойчивости *M.tuberculosis* проводили сотрудники клинической диагностической бактериологической лаборатории ГБУЗ "Кузбасский клинический фтизиопульмонологический медицинский центр имени И.Ф. Копыловой" под руководством врача бактериолога Самоделкиной Е.В.

Физико-химические исследования (ГХ-МС, ВЭЖХ, АЭС-ИСП, УФ-спектроскопия) осуществлялись совместно с заведующим лабораторией «Физико-химических исследований фармакологически активных и природных соединений» ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет», к.ф.н., доцентом Сухих А.С.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Энтерококки у пациентов с туберкулезом легких, независимо от приема противотуберкулезных препаратов, являются резидентными кишечными микросимбионтами, характеризуются стабильной видовой структурой и колонизационными свойствами, при коррекции микробиома пробиотическими штаммами, изменяющие микроэлементный и жирнокислотный состав клеточной стенки.
2. Энтерококки участвуют в регуляции кишечного микробиома, проявляют антикаталазную активность в отношении *Candida albicans*, формируют синтрофные связи с бифидобактериями при ферментации белков и образуют партнерские межвидовые взаимоотношения при продукции органических кислот.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

Достоверность результатов обусловлена соблюдением принципов доказательной медицины, что связано с тщательным планированием дизайна исследования, значительным объемом данных, использованием общепринятых и современных методов, поверенного и сертифицированного оборудования, владением автором микробиологическими, экспериментальными и статистическими методами исследования. Проведено 135 бактериологических исследований кишечной микробиоты. Выделены 491 кишечный микросимбионт, изучены биологические свойства у 198 культур энтерококков. Поставлено *in vitro* 1188 опытов по оценке комплекса фенотипических свойств и взаимодействий микроорганизмов рода *Enterococcus* с представителями микробиома. В работе применяли количественный бактериологический, метод эксперимента *in vitro*, а также хроматографические (ГХ-МС, ВЭЖХ, ТСХ), спектральные (АЭС, УФ-спектроскопия), статистические методы.

Работа выполнена в соответствии с реализуемой в ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Минздрава России комплексной научно-исследовательской темы «Исследование микрофлоры населения Кузбасса в норме и при патологических состояниях» (номер государственной регистрации 01200902450).

Апробация работы проведена на межкафедральном заседании при участии кафедр микробиологии и вирусологии; эпидемиологии и инфекционных болезней; нормальной физиологии; фтизиатрии; общей гигиены федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (протокол № 8 от 19.06.2024 г.).

Данные по исследованию доложены на 5 научно-практических конференциях и конгрессах: Международной научно-практической конференции молодых ученых и студентов «Проблемы фундаментальной медицины» (Кемерово, 2021, 2022), VI Национальном конгрессе бактериологов (Казань, 2021), XXIII Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 30-летию Центра охраны здоровья шахтеров «Многопрофильная больница: инновационные решения» (Ленинск-Кузнецкий, 2023), VIII Всероссийском конгрессе по медицинской микробиологии, клинической микологии и иммунологии (Санкт-Петербург, 2024).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 15 печатных работ, в том числе 9 публикаций в изданиях, включенных в перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий ВАК, 5 - тезисы конференций, 1 - методические рекомендации.

Объем и структура диссертации

Материалы диссертационной работы изложены на 127 страницах, иллюстрированы 23 рисунками, 5 таблицами. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, 3 глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений и списка литературы, включающего 130 источников, из которых 58 отечественных, 72 – зарубежных авторов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Кишечный микробиом пациентов с туберкулезом легких

Среди пациентов с туберкулезом отмечается доминирование ко-инфицированных туберкулезом и ВИЧ-инфекцией лиц (ТБ/ВИЧ). За 2021-2022 год в ГБУЗ «Кузбасский клинический фтизиопульмонологический медицинский центр имени И.Ф. Копыловой» было впервые выявлено 1747 человек с туберкулезом легких, у 461 человека (26,5%) был верифицирован туберкулез с множественной лекарственной устойчивостью. При этом ко-инфицированных (ТБ/ВИЧ) пациентов среди поступивших в медицинский центр было 865 (49,5%) человек, частота выделения от них штаммов с множественной лекарственной устойчивостью достигала 31,3% (271 штамм). Проведена сравнительная оценка состояния кишечной микробиоты до начала противотуберкулезной терапии у пациентов с моноинфекцией туберкулеза (ТБ) (n=31) и с ко-инфекцией туберкулез+ВИЧ-инфекция (ТБ/ВИЧ) (n=33). Группы были сходные по возрастно-половым характеристикам. У лиц с сочетанной патологией отмечали иммунодефицит, так как уровень CD 4+ Т-клеток составил 239,3 (221,4; 274,5) клеток в 1 мкл. Пациенты с ВИЧ-статусом получали антиретровирусные препараты согласно действующим клиническим рекомендациям. Резидентная микробиота у пациентов с ВИЧ-статусом, представленная *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Escherichia*, *Enterococcus*, характеризовалась высокой частотой обнаружения в пределах 93,54-100%. Титры бифидобактерий, типичных кишечных палочек, энтерококков были снижены, но достоверно не отличались от титров этих микросимбионтов у пациентов с моноинфекцией ($p > 0,05$). Статистическую разницу отмечали в уровнях лактобацилл - у коморбидных пациентов их титры составили 5 (4; 8) lg КОЕ/г, у пациентов с моноинфекцией туберкулеза 6 (4; 8) lg ($p = 0,048$). Постоянными микросимбионтами кишечного биотопа у пациентов с туберкулезом легких независимо от ВИЧ-статуса были микроорганизмы рода *Candida* и *Staphylococcus*, так как частота их обнаружения в кишечном микробиоме составила 90,35-93,94% ($p = 0,31$) и 77,42-63,64% ($p = 0,16$) соответственно. При этом если титры стафилококков в сравниваемых группах были

сходными (3,0 lg, p=0,12), то уровень колонизации грибами рода *Candida* был достоверно выше у пациентов с ко-инфекцией ТБ/ВИЧ - 5,0 (2; 6) lg против 3,5 (2; 4) lg (p=0,006). Видовая структура представителей рода *Staphylococcus* у ВИЧ-позитивных и ВИЧ-негативных пациентов не отличалась ($\chi^2=3,87$, df=6, p=0,7), доминировали *S. aureus* и *S.xylosus*. Установлено также сходство видового состава грибов рода *Candida* ($\chi^2 = 3,88$, df=6, p=0,71), среди микромицетов преобладали *C.albicans*. Независимо от ВИЧ-статуса в составе кишечного микробиома пациентов с одинаковой частотой и количественными уровнями обнаруживали условно-патогенных и патогенных энтеробактерий: *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Salmonella*. Только у пациентов с сочетанием ТБ/ВИЧ в кишечном микробиоме регистрировали *Klebsiella spp.* с частотой 18,1% в титрах 5,5 (5; 6) lg КОЕ/г. У всех пациентов отмечали высокую частоту колонизации слизистой кишечника сульфитредуцирующими клостридиями - 39,39 – 41,94% (p=0,67). Однако, у пациентов с ко-инфекцией ТБ/ВИЧ количественный уровень этих бактерий был достоверно выше 4,0 (3; 5) против 2,5 (2; 4) (p=0,005). Таким образом, у ВИЧ-позитивных и ВИЧ-негативных пациентов с туберкулезом легких в целом отмечали снижение уровней резидентной микробиоты и увеличение титров факультативных микросимбионтов, что отражает единые механизмы развития дисбиоза, независимо от заболевания, при котором возникли нарушения микробиома.

Далее оценили влияние приема противотуберкулезных препаратов на кишечную микробиоту. В основную группу (n=36) вошли лица с туберкулезом легких и множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) возбудителя, получающих противотуберкулезную терапию, согласно действующим клиническим рекомендациям. Все пациенты получали фторированные хинолоны (Fq) и бедаквилин (Bq), 31 человек (86,1%) – аминогликозиды и столько же циклосерин (Cs), 26 пациентов (72,2%) - пипразинамид (Z), 8 (22,2%) – пара-аминосалициловую кислоту (PAS), 5 (13,8%) - линезолид (Lzd) и 4 (11,1%) - этамбутол (E). Среднее число принятых доз составило 34,4±2. Все пациенты основной группы предъявляли жалобы на диспептический синдром в среднем через 29±2 дней после начала курса противотуберкулезной терапии.

Группу сравнения (n=37) формировали из впервые выявленных пациентов с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя до старта противотуберкулезной терапии на основе принципа сопоставимости с основной группой. При приеме противотуберкулезных препаратов у пациентов статистически значимо снизились титры лактобацилл до 5,1 (4; 6) lg (U=410; p=0,0002), а также частота колонизации и количественное содержание *E.coli lac+*. Типичные эшерихии были выделены только у 78% пациентов основной группы ($\chi^2=6,22$, df=1, p=0,04) со средним количественным уровнем 5,3 (4; 6) lg КОЕ/г (U=578; p=0,31). У пациентов группы сравнения типичные кишечные палочки были обнаружены у 94,5% лиц, их количественный уровень составил 5,7 (5; 6) lg КОЕ/г. В сравниваемых группах отмечали статистически значимое изменение структуры энтеробактерий ($\chi^2 = 26,22$, df=5, p=0,001). У пациентов основной группы при развитии диспептического синдрома достоверно увеличивалась с 2,7 до 19,4% ($\chi^2=5,24$, df=1, p=0,05) частота колонизации лактозонегативными эшерихиями и их титры с 4 до 4,5 lg (U=537,5; p=0,02). При этом снижалась частота обнаружения представителей рода *Klebsiella spp.*, *Salmonella spp.*, *Enterobacter spp.*, что, видимо, ассоциировано с действием антибактериальных средств, которые входят в схемы противотуберкулезной терапии ($\chi^2 = 1,24$, df=2, p=0,07). До старта этиотропного лечения у 91% пациентов были

изолированы представители рода *Enterococcus*, уровень колонизации которыми составил 5,8 (5; 7) lg КОЕ/г. При приеме противотуберкулезных препаратов частота обнаружения и титры этих микросимбионтов не изменились и составили 93% ($\chi^2 = 0,67$, $df=1$, $p=0,14$) и 5,7 (5; 6) lg КОЕ/г ($U=617$; $p=0,71$) соответственно. Частота обнаружения, содержание грибов рода *Candida* и бактерий рода *Staphylococcus* в зависимости от приема противотуберкулезных препаратов не изменялись ($p>0,05$). Установлено, что у пациентов сравниваемых групп была схожей структура степеней дисбиоза, преобладала III степень микрoэкологических нарушений ($\chi^2=0,753$, $df=1$, $p=0,41$). При поступлении в стационар пациенты не предъявляли жалоб на гастроинтестинальный синдром, т.е. нарушения носили компенсированный характер. Противотуберкулезная терапия способствовала развитию декомпенсированного дисбиоза, который сопровождался в большинстве случаев тошнотой (27,8%), метеоризмом (23,6%), болями в животе (19,4%), диареей (15,3%), запорами (13,9%).

Биологические свойства энтерококков. Взаимодействия с кишечными микросимбионтами при туберкулезной инфекции

У пациентов, принимающих этиотропные препараты, и у впервые выявленных больных до начала лечения не выявлено отличий видового состава энтерококков ($\chi^2 = 0,13$, $df=5$, $p=0,78$). До старта этиотропной терапии были выделены *E.faecium* (45%), *E.faecalis* (38%), *E.durans* (4,5%), *E.gallinarum* (4,5%), *E.solitarius* (3%), *E.hirae* (2%). У пациентов, принимающих противотуберкулезные препараты, в структуре доминировал *E.faecalis* (40,3%). Также были идентифицированы *E.faecium* (36%), *E.solitarius* (7,5%), *E.gallinarum* (6%), *E.durans* (4,5%), *E.mundtii* (3%), *E.raffinosis* (1,5%), *E.casseliflavus* (1,5%), т.е. регистрировали те виды энтерококков, которые встречаются не только у человека, но и у животных, птиц, в окружающей среде. Такой разнообразный видовой состав может быть следствием дисбиотических нарушений кишечного микробиома, поэтому происходит замещение «человеческих» видов энтерококков на виды – сапрофиты и животного происхождения. Количественные уровни и титры доминирующих видов энтерококков в сравниваемых группах пациентов не отличались и составили 5,7 lg КОЕ/г и 89-94% у *E.faecalis*, 5,6 – 5,8 lg КОЕ/г и 92% у *E.faecium* ($p=0,75$). Таким образом, на фоне противотуберкулезной терапии энтерококки сохраняли исходные количественные уровни и колонизировали кишечник 92-94% пациентов, что позволяет говорить о них как о резидентах кишечного микробиома.

Установлено, что у впервые выявленных пациентов с туберкулезом легких до начала лечения противотуберкулезными препаратами 27% энтерококков обладали высокой, а 73% средней адгезией, что подтверждает данные литературы о значимом вкладе энтерококков в обеспечении колонизации слизистой кишечника. У пациентов, принимающих противотуберкулезные препараты, регистрировали снижение до 43% числа *Enterococcus spp.* со средней адгезией, а также появлялись низкоадгезивные штаммы, доля которых достигала 36% ($\chi^2 = 24,5$, $df=2$, $p=0,04$). Средние показатели адгезии у энтерококков, изолированных от пациентов до лечения, составили 3,5 (2,9; 4,8), тогда как при противотуберкулезной терапии адгезивная способность была ниже 2,8 (1,02; 2,9) ($U=138$; $p=0,06$). Установлено, что *E.faecium* до старта терапии характеризовались (Рисунок 1 Б) более высокими показателями индекса адгезии, чем *E.faecalis* ($U=0,89$; $p=0,23$) (Рисунок 1 А). После развития декомпенсированных микрoэкологических нарушений эти тенденции сохранились, т.е. более высокой адгезией обладали *E.faecium* (Рисунок 1 Б), нежели *E.faecalis* ($U=1,22$; $p=0,34$)

(Рисунок 1 А), что свидетельствует о более выраженных адаптивных способностях вида *E.faecium*.

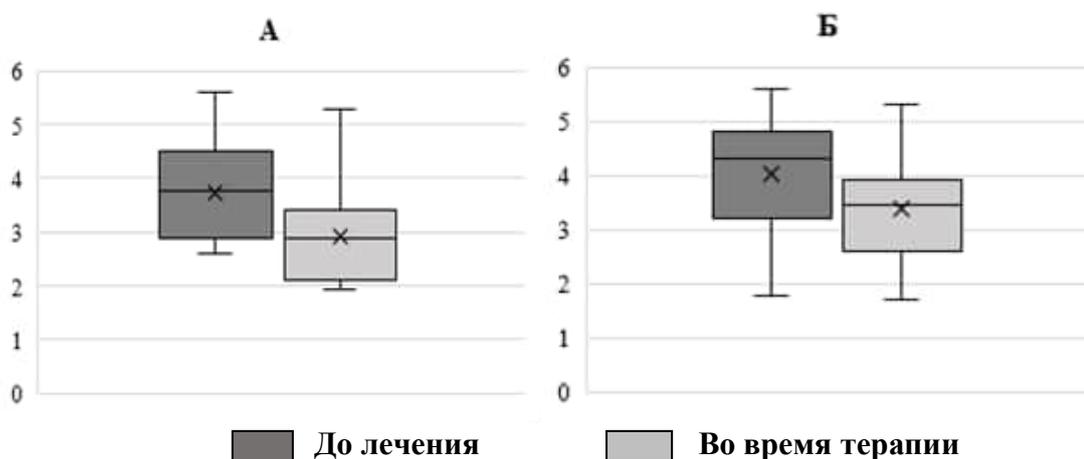


Рисунок 1 – Индексы адгезии *E.faecalis* (А) и *E.faecium* (Б), выделенных от пациентов до лечения и во время противотуберкулезной терапии

Распространенным осложнением туберкулеза легких является эмпиема плевры. Возбудителями данного гнойно-септического процесса являются условно-патогенные представители микробиома человека, в том числе энтерококки, которые за счет факторов инвазии распространяются за пределы биотопов их обитания. До терапии только 5% энтерококков продуцировали фосфолипазу, 12% продуцировали цитолизин (гемолизин). У популяции энтерококков от пациентов, находящихся на противотуберкулезной терапии, частота обнаружения факторов инвазии повышалась. Так уже 18% штаммов продуцировали фосфолипазу ($\chi^2 = 7,98$, $df=1$, $p=0,03$), 7,5% культур синтезировали желатиназу ($\chi^2 = 6,55$, $df=1$, $p=0,02$), 10% - цитолизин (гемолизин) ($\chi^2 = 0,09$, $df=1$, $p=0,6$).

При сравнении распространенности факторов инвазии в зависимости от вида энтерококков установлено, что среди штаммов *E.faecalis* (Рисунок 2 А), до старта противотуберкулезной терапии чаще, чем среди *E.faecium* (Рисунок 2 Б), встречались гемолизинпродуцирующие культуры ($p=0,01$).



Рисунок 2 – Частота обнаружения штаммов *E.faecalis* (А) и *E.faecium* (Б) обладающих ферментами инвазии

Примечание: * - достигнутый уровень значимости различий $p=0,003$

Однако после начала приема противотуберкулезных средств среди *E.faecalis* в 4,5 раза увеличивалось число штаммов с липазной активностью ($\chi^2 = 5,11$, $df=1$, $p=0,003$) (Рисунок 2 А), среди *E.faecium* достоверных изменений по частоте продукции факторов инвазии не отмечалось ($p>0,05$) (Рисунок 2 Б). Изменения биологических свойств энтерококков при противотуберкулезной терапии (Рисунок 2

А и 2 Б), возможно, обусловлено появлением субстрата для этих индуцибельных ферментов – это продуктов распада микобактерий.

Роль энтерококков при микрoэкологических нарушениях, ассоциированными с противотуберкулезной терапией, обусловлена не только способностью поддерживать колонизацию биотопа, но и их участием в формировании пула экзометаболитов с различными биологическими эффектами. Установлено, что кислотообразование энтерококков от пациентов до старта этиотропной терапии было низким и составило 23,2 (20,2; 31,06)⁰Т. После начала противотуберкулезной терапии уровень продукции органических кислот незначительно изменялся до 34,3 (16,4; 40,2)⁰Т (U=302; p=0,14). Это свидетельствует о сохранении биохимической активности энтерококков в условиях декомпенсированного дисбиоза и определенном вкладе их метаболома в регуляцию кислотности среды кишечного биотопа. По данным ВЭЖХ в составе культуральной жидкости *E.faecalis* (Рисунок 3 А) и *E.faecium* (Рисунок 3 Б) обнаружена молочная кислота (Rf=12,5), 2-оксо-3-фенилпропионовая (Rf=19,7) и 4-аминобензойная кислоты (Rf=31,32).

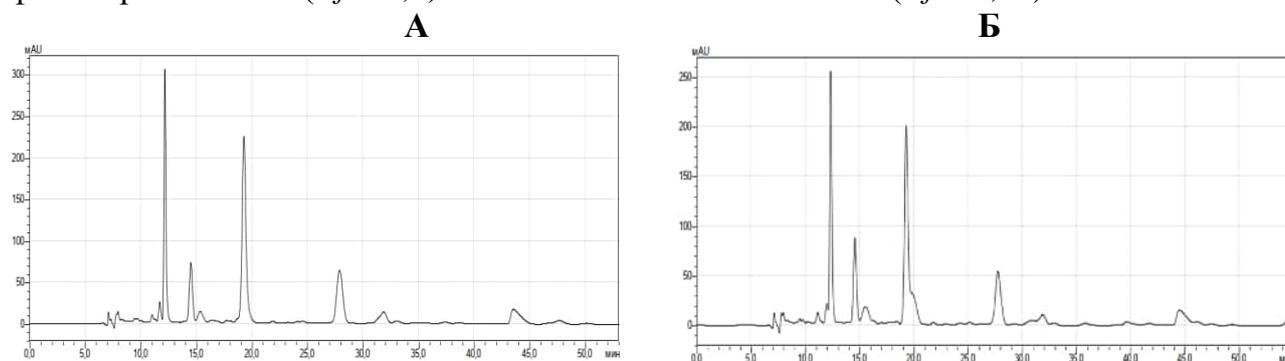


Рисунок 3 – Интегрированные хроматограммы культуральной жидкости *E.faecalis* (А), *E.faecium* (Б)

Обнаруженная в экзометаболитах 4-аминобензойная кислота (Рисунок 3 А, 3Б) обладает амфифильными свойствами за счет наличия центров кислотности и основности, что позволяет энтерококкам регулировать рН среды, кроме того, она рассматривается как предшественник тетрагидрофолата и может стимулировать рост бифидо- и лактобактерий (Бухарин О.В. с соавт., 2020). Экзометаболит 2-оксо-3-фенилпропионовая кислота бактериального происхождения, по данным литературы, проявляет бактерицидные свойства к представителям грамположительной и грамотрицательной биоты, также к некоторым видам грибов (Chenga X. A. et al., 2020).

Скорость утилизации питательных веществ играет значительную роль в жизнедеятельности микроорганизмов и может обеспечить доминирование бактериальной популяции в биотопе. Поэтому для решения вопроса о метаболических взаимоотношениях *E.faecalis* и *E.faecium* при использовании одного и того же источника энергии в условиях дисбиоза *in vitro* была проведена оценка скорости утилизации глюкозы и уровень продукции лактата. Установлено, что энтерококки не зависимо от вида имели одинаковую скорость утилизации глюкозы, которая составила у *E.faecalis* 0,01 ед. оп.пл. в час, у *E.faecium* 0,02 ед.оп.пл. в час (p=0,06). Сходство метаболической активности в отношении углеводов у энтерококков разных видов демонстрирует также уровень кислотообразования, который у *E.faecalis* составил 50,38 (10,6; 80,4)⁰Т, у *E. faecium* 51,06 (15,15; 78,42)⁰Т (U=157; p=0,82). При формировании ассоциаций средний показатель кислотности составлял только 42,3⁰Т, т.е. при совместном вегетировании «*E.faecalis* - *E.faecium*»

не происходит механического сложения уровня продуцируемой органической кислоты. Полученные результаты демонстрируют адаптивные возможности монокультур энтерококков и взаиморегулирование кислотообразования при формировании ассоциаций.

Способность энтерококков к молочнокислому брожению свидетельствует об их принадлежности к «филлометаболическому ядру микробиома». Однако у них также хорошо выражены протеолитические ферменты. Представители рода *Bifidobacterium* не обладают протеолитическими свойствами, но в тоже время известно, что белковые гидролизаты способны стимулировать их рост и размножение (Остроумов А.Ю. с соавт, 2010; Глаголева Л.Э. с соавт., 2016). В связи с этим были проведены эксперименты *in vitro*, позволяющие изучить роль протеолитических ферментов энтерококков в «подготовке» белкового субстрата для питания бифидобактерий. В качестве белок-содержащего субстрата был выбран казеин. Протеолитическую активность энтерококков сравнивали с трипсином и α -химотрипсином. Установлено, что под влиянием супернатантов *E.faecalis* казеин подвергался гидролизу, при этом формировались 9 фракций (Рисунок 4).

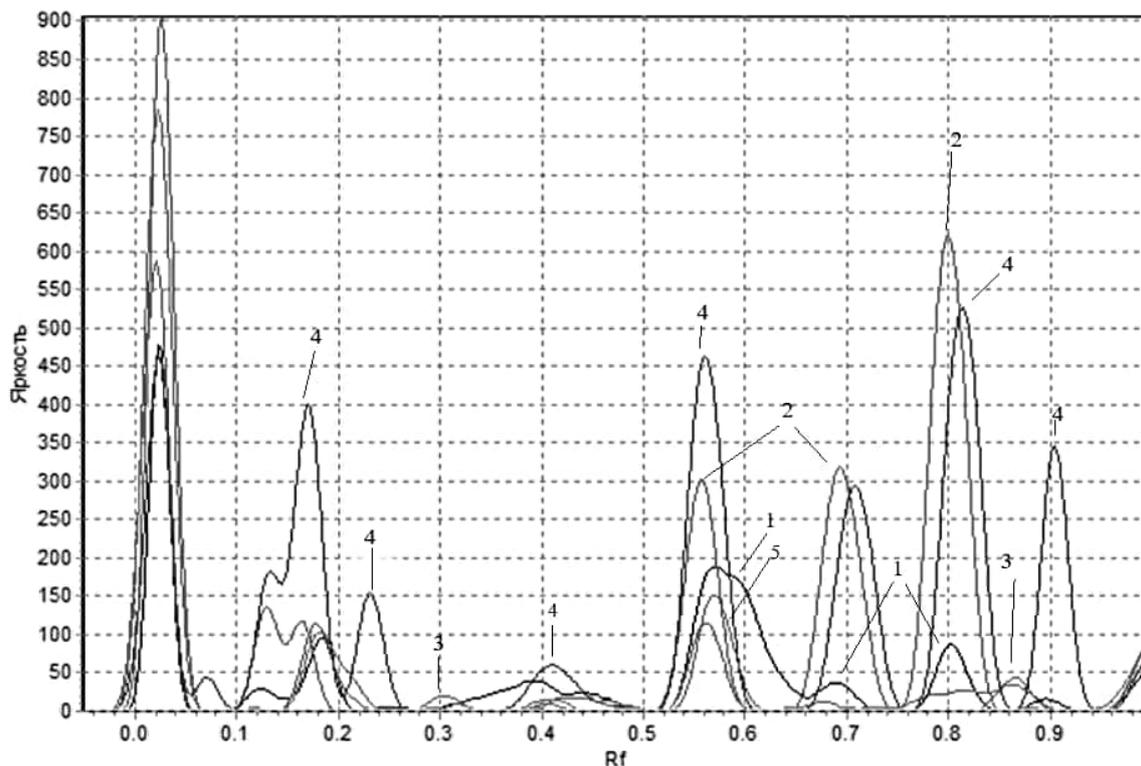


Рисунок 4 – Денситограмма казеина, подвергнутого ферментативному гидролизу
Примечание: 1 контроль; 2 – α -химотрипсин; 3 – гидролиз ферментами *E.faecium* штамм 60; 4 – гидролиз ферментами *E.faecalis* штамм 64; 5 – трипсин

Воздействие протеолитических ферментов фекального энтерококка по количеству фракций и оптической плотности продуктов гидролиза была похожа на активность α -химотрипсина, который относится к сериновым протеазам. Однако, бактериальные ферменты характеризовались специфичностью, так как хроматографически регистрируются дополнительные пики с временем удерживания Rf 0,25; 0,4 и 0,9, чего не наблюдается при обработке казеина α -химотрипсином. Под влиянием ферментов *E.faecium* отмечается формирование 8 фракций белкового гидролизата, но активность протеолитических ферментов была ниже, чем активность протеаз *E.faecalis* и α -химотрипсина. По времени удерживания и оптической плотности продуктов гидролиза протеазы *E.faecium* схожи с действием трипсина

(Рисунок 4). Продукты гидролиза казеина, полученные при обработке субстрата экзометаболитами *E.faecalis* (Рисунок 5 А), стимулировали размножение *Bifidobacterium bifidum* 791 с той же интенсивностью, что и продукты гидролиза казеина, полученного при использовании α -химотрипсина. Аналогичные тенденции наблюдали в отношении белковых гидролизатов, полученных при использовании протеаз *E.faecium* (Рисунок 5 Б).

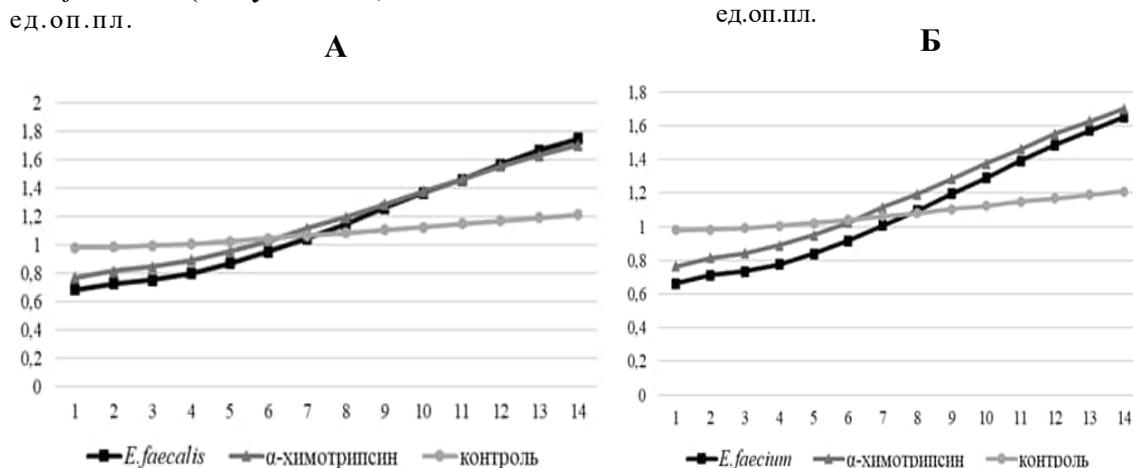


Рисунок 5 – Кинетика роста оптической плотности бульонной культуры *B. bifidum* 791 на гидролизате казеина, полученного при использовании α -химотрипсина и ферментов *E. faecalis* (А) и *E. faecium* (Б)

Таким образом, показано, что протеазы энтерококков обладают α -химотрипсиновой активностью, они способны гидролизовать казеин, продукты расщепления которого используется бифидобактериями как дополнительный источник питания.

В кишечном микробиоме пациентов с туберкулезом легких отмечается высокая частота встречаемости грибов рода *Candida*, что обуславливает у них высокие риски развития кандидоза. В опытах установлено, что энтерококки по отношению к *Candida spp.* не проявляют прямого антагонизма. Также они не являются конкурентами грибов в отношении углеводов-содержащих питательных субстратов, так как средняя скорость утилизации глюкозы у грибов составила 0,23 ед. оп. пл., что в 11,5-23 раза выше, чем у *E. faecium* и *E. faecalis* ($U=534,5$ $p=0,001$). Выявлен непрямой антагонизм энтерококков к *Candida spp.* Грибы рода *Candida* являются аэробными микроорганизмами, поэтому они обладают ферментами антиоксидантной защиты, в частности каталазой. Были проведены опыты по оценке влияния супернатантов (экзометаболитов) доминирующего вида энтерококков ($n=26$) на активность каталазы грибов *S. albicans* ($n=26$). Выявлено три типа воздействия экзометаболитов энтерококков на каталазу грибов *S. albicans*: ингибирование, стимуляция выработки и нейтральное воздействие. В большинстве случаев – в 65,4% - экзометаболиты *E. faecalis* ингибировали каталазу микромицетов, у 19,2% штаммов *S. albicans* каталазная активность не изменялась и только в 15,4% случаев продукция антиоксидантного фермента увеличивалась. Отмечали достоверные различия в уровнях каталазы у интактных и обработанных экзометаболитами культур *S. albicans*. Так до воздействия экзометаболитов активность каталазы у грибов составила 1,03 (0,88; 1,14) мкмоль/мин оп. пл., после воздействия экзометаболитов *E. faecalis* продукция каталазы была на уровне 0,55 (0,36; 0,73) мкмоль/мин оп. пл. ($U= 237$; $p=0,03$). В среднем каталазная активность у *S. albicans* снижалась на 46,1% ($p=0,041$).

Таким образом, *E.faecalis* проявляют непрямой антагонизм к микромицетам, так как под влиянием их экзометаболитов у грибов снижается уровень продукции каталазы.

Энтерококки, как индикаторы положительных эффектов коррекции микробиома пробиотическими бактериями

Пациенты с туберкулезом легких еще до назначения им лечения имели глубокие дисбиотические нарушения кишечного микробиома, но эти изменения были компенсированными. Прием этиотропных препаратов быстро приводил к декомпенсации нарушений и развитию диспептического синдрома. Это свидетельствует о необходимости введения в схемы лечения пациентов биопрепаратов на основе живых пробиотических бактерий, с последующей оценкой эффективности их применения. Была сформирована группа добровольцев (n=35), которые на фоне этиотропной терапии при развитии диспептического синдрома принимали синбиотический препарат, состоящий из 7 коммерческих пробиотических штаммов: *B.bifidum* BB-Bf, *B.animalis* BB-An, *L.casei* LB-Cs, *L.plantarum* LB-Pl, *L.delbrueckii subsp.bulgaricus*, *L.acidophilus* LB-Ac, *Propionibacterium freudenreichii*. Также в состав препарата входил пребиотический компонент – инулин. Прием препарата осуществляли по 1 капсуле 2 р/сут в течение 21 дня. Результаты приема препарата у пациентов, принимающих комбинированную терапию (противотуберкулезные препараты II ряда + синбиотик) (основная группа) сравнивали с группой пациентов (n=36), которые принимали только этиотропные препараты. После курса терапии синбиотиком отмечали увеличение содержания бифидобактерий (с 7,4 до 7,9 lg КОЕ/г) (U=587, p=0,07), типичных кишечных палочек (с 5,3 до 5,6 lg КОЕ/г) (U=654, p=0,08), лактобацилл с 5,1 до 6 lg КОЕ (U=449; p=0,05). Уменьшался уровень грибов рода *Candida*, снижалась частота их встречаемости. *Candida* колонизировали кишечник 54,3% пациентов основной группы с титрами 2,7 (1; 5) lg КОЕ/г, в группе сравнения - 82% ($\chi^2 = 10,5$, df=1, p=0,04) с титрами 3,7 (3; 5) lg (U=449,5; p=0,03) соответственно. Регистрировали клиническую эффективность приема синбиотика. Среди пациентов, принимавших препарат, отмечали более низкую частоту жалоб на диарею (25% против 32,1% ($\chi^2 = 6,6$, df=1, p=0,01), на тошноту и рвоту (10,7% против 17,9% ($\chi^2 = 5,5$, df=1, p=0,019).

Большое значение в жизнедеятельности микроорганизмов играет состояние клеточной мембраны, которое определяется преимущественно жирными кислотами (Андрюков Б. Г. и соавт., 2020). Состав и свойства мембран кишечных микросимбионтов регулируется биоактивными молекулами экзометаболизма бифидобактерий, лактобацилл, пропионибактерий (Ashique, S. et al., 2022), которые и входили в состав синбиотического препарата. После приема пациентами синбиотиков в составе клеточной стенки у *E.faecalis* повышалось в 10 раз содержание маргариновой кислоты (C17:0) (p=0,04), достоверно увеличилась масса олеиновой жирной кислоты (9-C18:1) (p=0,03). У *E. faecium* регистрировали увеличение в 11 раз содержания предельной лауриновой кислоты (C12:0) (p=0,001) и в 10 раз массы длинноцепочечной лигноцериновой кислоты (C24:0) (p=0,02). При этом увеличивалась в 2 раза масса жирных кислот с ненасыщенными алкильными цепями: цис-7-пальмитолеиновой (C 7-C16:1) и олеиновой (9-C18:1) (p=0,05). Содержание линолевой (C18:2) кислоты возросло в 4 раза (p=0,04). Увеличение содержания ненасыщенных и длинноцепочечных кислот сопровождалось достоверным увеличением продукции молочной кислоты. Титруемая кислотность культуральной жидкости у *E.faecalis* до приема пациентами синбиотика была 28,9⁰T (20,2; 36,4), далее увеличилась до 44,5⁰T (40,2;45,4) (p=0,007). Среднее значение

кислотообразования у *E.faecium* до приема синбиотика составило 27,4⁰T (17,7; 37,9), после окончания курса 42,4⁰T (40,3; 44,6) (p=0,001). При терапии пробиотическими бактериями среди энтерококков также регистрировали более низкое число штаммов с факторами инвазии - продуцирующих липазу (8,8% против 18,6%, p=0,05), протеолитические ферменты - 2% против 12% (p=0,005).

Различные элементы играют важную роль для микроорганизмов, так как участвуют в построении органоидов и являются кофакторами ферментных систем (Кузин А.А. и соавт., 2010). В данной работе определение содержания минералов у энтерококков проводилось с целью оценки влияния средств коррекции микробиоты на химический состав бактерий. После окончания приема пациентами синбиотика в составе клеток энтерококков в 1,3 раза увеличилась общая масса минеральных элементов (Таблица 1).

Таблица 1- Содержание минеральных элементов в клетках энтерококков

№	Элемент	Название элемента	<i>Enterococcus faecalis</i> (n=12)		<i>Enterococcus faecium</i> (n=10)	
			До ПТ, мкг/г	После ПТ, мкг/г	До ПТ, мкг/г	После ПТ, мкг/г
1	Ca	Кальций	74,0 (56,0; 87,0)	150* (98;152)	56 (49; 158)	150* (56; 154)
2	Cu	Медь	-	-	20 (18; 22,4)	16 (15; 21,0)
3	Er	Эрбий	2,0 (1,0; 2,2)	2,0 (1,5; 2,5)	1,8 (1,1; 2,3)	2,1 (1,5; 2,4)
4	Fe	Железо	20 (18,0; 22,4)	20,0 (18; 25,2)	18 (16,0;18,4)	20 (16,4; 21,5)
5	Li	Литий	0,73 (0,5; 0,9)	0,54 (0,4; 0,7)	0,56 (0,31; 0,67)	0,83 (0,21; 0,12)
6	Mg	Магний	70 (63,0; 72,2)	82 (75,0; 84,0)	79 (75,4; 85,8)	74 (73,0; 78,0)
7	Na	Натрий	2,1 (2,4; 4,5)	5,2* (5,1; 5,9)	1,6 (1,1; 1,9)	5,9* (3,5; 6,2)
8	S	Сера	110 (100; 130)	120 (110; 150)	130 (100; 134)	130 (120; 130)
9	Si	Кремний	11 (9,0; 11,4)	11 (10,0; 13,4)	8,9 (7,2; 9,7)	11 (6,7; 13,1)
10	Sr	Стронций	0,27 (0,03; 0,32)	0,09* (0,06; 0,1)	0,17 (0,12; 0,18)	0,29 (0,27; 0,34)
11	Ti	Титан	1,1 (0,8; 1,5)	1,1 (0,79; 1,45)	1,0 (0,9; 1,1)	1,0 (0,95; 1,1)
12	Zn	Цинк	1,9 (1,1; 2,1)	2,1 (1,3; 2,4)	1,9 (1,5; 2,0)	2,3 (1,9; 2,5)
Средняя масса микроэлементов			293,1	394,03	318,93	413,42

Примечание: ПТП – противотуберкулезные препараты; * - достигнутый уровень значимости различий p<0,05

У *E.faecalis* количество кальция (Ca) в клетках повысилось в 2 раза (p=0,021), у *E.faecium* в 3 раза (p=0,01) (Таблица 1). Увеличение содержания натрия (Na) произошло в 2,5 раза (p=0,019) и в 3,7 раз (p=0,001) соответственно (Таблица 1). Таким образом, после терапии синбиотическим препаратом у энтерококков регистрировали увеличение содержания тех минеральных элементов, которые участвуют в делении, росте бактерий, в транспорте веществ.

ВЫВОДЫ

1. Кишечный микробиом у больных туберкулезом легких до начала противотуберкулезной терапии в 67,6% случаев характеризуется компенсированным дисбиозом III степени, что обусловлено низкими титрами резидентных бактерий, высокой частотой колонизации *Candida spp.* (92%) и *Staphylococcus spp.* (62%). При приеме противотуберкулезных препаратов развивается декомпенсированный дисбиоз, проявляющийся снижением титров лактобацилл до 5,1 (4; 6) lg КОЕ/г ($p=0,0002$), увеличением в 7 раз частоты выделения *E.coli lac-* ($p=0,05$), появлением тошноты (27,8%), метеоризма (23,6%) и абдоминальных болей (19,4%).

2. Видовая структура энтерококков у пациентов до начала лечения и при противотуберкулезной терапии была схожей ($p=0,78$), доминировали *E.faecalis* и *E.faecium*, характеризующиеся средними показателями адгезии (ИАМ=3,5), низким кислотообразованием (23,2 (20,2; 31,06)⁰T), 5% штаммов обладали фосфолипазной активностью, 12% продуцировали цитолизин (гемолизин). На фоне противотуберкулезной терапии, увеличивалось число биовариантов с фосфолипазой (18%, $p=0,03$) и продуцирующих цинкзависимую металлопротеиназу (7,5%, $p=0,02$), чаще среди штаммов *E.faecalis*.

3. При микрoэкологичеcких нарушениях между симбиотическими штаммами *E.faecalis* и *E.faecium* формируются партнерские межвидовые взаимоотношения, которые обусловлены сходной скоростью употребления глюкозы ($p=0,06$) и уровнем продукции молочной кислоты ($p=0,82$).

4. Установлены синтрофные взаимодействия энтерококков с бифидобактериями, обусловленные α -химотрипсинподобной активностью протеаз энтерококков на казеиновом субстрате, продукты расщепления которого используется бифидобактериями как источник питания.

5. *E.faecalis* проявляют непрямой антагонизм к грибам *C.albicans* обусловленный антикаталазной активностью экзометаболитов, снижающих активность антиоксидантного фермента у грибов на 46,1 % ($p=0,041$), что дополняет данные о роли энтерококков в многокомпонентном микробном сообществе.

6. У пациентов после коррекции микробиома пробиотическими бактериями отмечали более высокое количественное содержание лактобацилл - 6 (5; 7) lg КОЕ/г ($p=0,02$) и низкие титры грибов рода *Candida* - 2,7 (1; 5) lg КОЕ/г ($p=0,03$), достоверно низкую частоту жалоб на диарею ($p=0,01$), тошноту и рвоту ($p=0,019$). У энтерококков в 10-11 раз было выше содержание ненасыщенных и длинноцепочечных жирных кислот ($p<0,001$), в 2-3 раза содержание кальция ($p<0,05$), в 3-4 раза содержание натрия ($p<0,001$), что сопровождалось высокой продукцией лактата ($p<0,001$).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Впервые выявленным пациентам с туберкулезом легких и множественной лекарственной устойчивостью возбудителя до старта противотуберкулезной терапии целесообразно исследование состояния кишечного микробиома для оценки степени нарушений. Наличие III степени микрoэкологичеcких нарушений позволяет прогнозировать развитие синдрома диспепсии при приеме в среднем $34,4\pm 2$ доз противотуберкулезных препаратов.

2. При развитии декомпенсированных микрoэкологичеcких нарушений при противотуберкулезной терапии пациентам рекомендуется назначать комплексные мультиштаммовые синбиотические препараты, содержащие бифидобактерии и

лактобациллы, что устранил необходимость прерывания курса этиотропной терапии, вследствие побочных эффектов противотуберкулезных препаратов.

3. Микробиологическую оценку эффективности коррекции кишечного микробиома при противотуберкулезной терапии можно проводить на основе изучения у энтерококков жирнокислотного, минерального состава клеток и уровня продукции лактата.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Для повышения эффективности лечения туберкулезной инфекции, снижения распространенности туберкулеза с множественной или/и широкой устойчивостью возбудителя перспективными представляются следующие направления исследований кишечного микробиома и энтерококков у фтизиатрических больных:

- состав, биологические свойства, факторы межмикробных взаимодействий кишечной микробиоты при других формах туберкулезной инфекции; влияние про- и синбиотикотерапии на тяжесть, длительность течения, рецидивы основного заболевания, эффективность этиотропной терапии;

- дальнейшее изучение состава и физико-химических свойств экзометаболических энтерококков, определение роли их экзометаболических в регуляции кишечного микробиома; выделение, очистка, определение природы и свойств компонентов экзометаболизма энтерококков с антикаталазной активностью, что позволит разработать метабиотики с антигрибковой активностью;

- изучение участия энтерококков в метаболизме противотуберкулезных препаратов, что позволит разработать средства или/и схемы лечения, повышающие эффективность противотуберкулезной терапии и снижающие риски формирования резистентных штаммов микобактерий.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Отдушкина, Л. Ю. Энтерококки в кишечном микробиоме больных туберкулезом / Л. Ю. Отдушкина, А. А. Холодов // Бактериология: материалы VI Национального конгресса бактериологов, 14-16 сентября 2021 г., Казань. – 2021.- № 3 (6). – С. 59.

2. Отдушкина, Л. Ю. Комплексная оценка функциональных свойств энтерококков в кишечном микробиоме: методические рекомендации / Л. Ю. Отдушкина, Ю. В. Захарова, Л. А. Леванова. – 2021: Кемерово. - 40 с.

3. Отдушкина, Л. Ю. Видовая структура энтерококков в кишечном микробиоме больных туберкулезом / Л. Ю. Отдушкина, А. А. Холодов // Проблемы фундаментальной медицины: материалы Международной научно-практической конференции молодых ученых и студентов, 23-24 декабря 2021 г., Кемерово. – 2021. - С. 148-150.

4. Захарова, Ю. В. Исследование *in vitro* механизмов взаимодействия грибов *Candida albicans* с *Klebsiella pneumoniae* и *Enterococcus faecalis*, выделенных из кишечного микробиома ВИЧ-инфицированных пациентов / Ю. В. Захарова, Л. Ю. Отдушкина, А. А. Марковская, Ю. В. Несвижский, С. С. Афанасьев, Л.А. Леванова // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2022. - № 4 (99). – С. 420-427.

5. Отдушкина, Л. Ю. Кишечный микробиом ВИЧ-инфицированных пациентов с туберкулезом легких / Л. Ю. Отдушкина, Ю. В. Захарова, А. А. Холодов, Л. А. Леванова, Т. В. Пьянзова, А. А. Марковская // Фундаментальная и клиническая медицина. – 2022. - № 4 (7). – С. 83-90.

6. Холодов, А. А. Микробиоценоз кишечника у больных туберкулезом с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя с синдромом кишечной диспепсии, возникшим в условиях противотуберкулезной терапии / А. А. Холодов, Ю. В. Захарова, Л. Ю. Отдушкина, Н. М. Галайда, Т. В. Пьянзова // Вестник Центрального научно-исследовательского института туберкулеза. – 2022. - № 1. – С. 79-86.
7. Холодов, А. А. Особенности структуры сообщества грибов рода *Candida* в кишечном биотопе больных туберкулезом / А. А. Холодов, Ю. В. Захарова, Л. Ю. Отдушкина, Е. О. Брюхачева, Т. В. Пьянзова // Инфекция и иммунитет. – 2022. - № 6 (12). – С. 1169-1174.
8. Отдушкина, Л. Ю. Антикатазная активность энтерококков, выделенных от ВИЧ-инфицированных пациентов / Л. Ю. Отдушкина // Проблемы фундаментальной медицины: материалы Международной научно-практической конференции молодых ученых и студентов, 22-23 декабря 2022 г., Кемерово. – 2022. – С. 97.
9. Холодов, А. А. Результаты применения комбинированной пробиотической терапии для коррекции нарушений микробиоценоза кишечника больных туберкулезом с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя / А. А. Холодов, Е. О. Брюхачева, Л. Ю. Отдушкина, Ю. В. Захарова, М. В. Примкулова, Т. В. Пьянзова // Вестник современной клинической медицины. – 2022. - № 2 (15). – С. 81-88.
10. Отдушкина, Л. Ю. Характеристика энтерококков в кишечном микробиоценозе пациентов с туберкулезом легких / Л. Ю. Отдушкина, Ю. В. Захарова, А. А. Холодов, Л. А. Леванова, Т. В. Пьянзова, А. А. Марковская // Фундаментальная и клиническая медицина. – 2022. - № 2 (7). – С. 20-28.
11. Брюхачева, Е. О. Характеристика кишечной микрофлоры у детей, получающих противотуберкулезную терапию / Е. О. Брюхачева, Ю. В. Захарова, Л. Ю. Отдушкина, Т. В. Пьянзова // Инфекция и иммунитет. – 2023. - № 1 (13). – С. 156-160.
12. Отдушкина, Л. Ю. Микробиологическая оценка результатов пробиотикотерапии у пациентов с туберкулезом легких / Л. Ю. Отдушкина, Ю. В. Захарова, А. А. Холодов, Т. В. Пьянзова // Инфекция и иммунитет. – 2023. - № 3 (13). – С. 517-525.
13. Отдушкина, Л. Ю. Влияние экзометаболитов энтерококков на активность каталазы *Candida albicans* / Л. Ю. Отдушкина // Многопрофильная больница: инновационные решения: материалы XXIII Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 30-летию Центра охраны здоровья шахтеров, 19-20 мая 2023 г., Ленинск-Кузнецкий. – 2023. – С. 195-196.
14. Отдушкина, Л. Ю. Микроэлементный профиль кишечных энтерококков при терапии туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью / Л. Ю. Отдушкина // Проблемы медицинской микологии: материалы Всероссийского конгресса по медицинской микробиологии, клинической микологии, иммунологии, 5-7 июня 2024 г., Санкт-Петербург. – 2024. - Т. 26, № 2. – С. 179-180.
15. Отдушкина, Л. Ю. Особенности кишечной микробиоты у впервые выявленных больных туберкулезом лёгких с ВИЧ-инфекцией / Л. Ю. Отдушкина, А. Ю. Миронов, А. А. Марковская, Е. В. Самоделкина, Ю. В. Захарова, С. С. Афанасьев, Л. А. Леванова // Клиническая лабораторная диагностика. – 2025. - № 70 (1). – С. 52-58.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АЭС-ИСП	– атомно-эмиссионная спектроскопия с индуктивно связанной плазмой
ВИЧ	– вирус иммунодефицита человека
ВЭЖХ	высокоэффективная жидкостная хроматография
ГОСТ	– Государственный стандарт
ГХ-МС	–газовая хроматография с масс-спектрометрическим детектированием
ККМЧ	– коллекция кишечной микробиоты человека
оп.	– оптическая плотность
ТСХ	– тонкослойная хроматография
КОЕ/г	–колониеобразующие единицы на грамм
УФ	– ультрафиолетовый