

**федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Кемеровский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации**

На правах рукописи

Отдушкина Лариса Юрьевна

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

1.5.11. Микробиология

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук,
доцент Ю. В. Захарова

Кемерово – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|--|----|
| ВВЕДЕНИЕ | 4 |
| Актуальность темы исследования | 4 |
| Степень разработанности темы исследования | 5 |
| Цель исследования | 7 |
| Задачи исследования | 7 |
| Научная новизна | 8 |
| Теоретическая и практическая значимость | 9 |
| Методология и методы исследования | 11 |
| Предмет изучения | 11 |
| Материал исследования..... | 11 |
| Микробиологические методы исследования | 12 |
| Физико-химические методы исследования | 18 |
| Статистические методы исследования | 20 |
| Личное участие автора в получении результатов | 21 |
| Положения, выносимые на защиту | 22 |
| Степень достоверности и апробация результатов | 22 |
| ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ | 24 |
| 1.1. Энтерококки в многокомпонентном кишечном сообществе: биологические свойства, взаимоотношения с другими представителями микробиоты кишечника. | 24 |
| 1.2. Современные достижения в исследовании кишечного микробиома пациентов с туберкулезом легких | 32 |
| 1.3. Коррекция нарушений микробиоты кишечника при туберкулезе: персонификация, средства, результаты | 39 |
| 1.4. Заключение по главе «Обзор литературы»..... | 42 |
| РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ | |
| ГЛАВА 2. КИШЕЧНЫЙ МИКРОБИОМ ПАЦИЕНТОВ С ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ | 44 |
| 2.1. Кишечный микробиом пациентов с туберкулезом легких в зависимости от ВИЧ-статуса | 44 |
| 2.2. Влияние противотуберкулезной терапии на кишечную микробиоту пациентов с туберкулезом легких | 50 |
| 2.3. Заключение по главе «Кишечный микробиом пациентов с туберкулезом легких»..... | 57 |
| ГЛАВА 3. БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЭНТЕРОКОККОВ. ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С КИШЕЧНЫМИ МИКРОСИМБИОНТАМИ ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ | 58 |
| 3.1. Качественная и количественная характеристика энтерококков у | |

| | |
|---|------------|
| пациентов с туберкулезом легких | 58 |
| 3.2. Биологические свойства энтерококков при микрoэкологических нарушениях, ассоциированных с противотуберкулезной терапией..... | 60 |
| 3.3. Метаболические взаимодействия <i>E.faecalis</i> и <i>E.faecium</i> в ассоциациях при ферментации глюкозы | 65 |
| 3.4. Трофические взаимоотношения энтерококков с бифидобактериями при ферментации белков | 71 |
| 3.5. Механизмы и факторы взаимодействия энтерококков с грибами рода <i>Candida</i> | 76 |
| 3.6. Заключение по главе «Биологические свойства энтерококков. Взаимодействия с кишечными микросимбионтами при туберкулезной инфекции»..... | 79 |
| ГЛАВА 4. ЭНТЕРОКОККИ, КАК ИНДИКАТОРЫ ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ ЭФФЕКТОВ КОРРЕКЦИИ КИШЕЧНОГО МИКРОБИОМА ПРОБИОТИЧЕСКИМИ БАКТЕРИЯМИ | 81 |
| 4.1. Влияние приема пробиотических бактерий на качественный и количественный состав кишечной микробиоты | 82 |
| 4.2. Изменение жирнокислотного состава мембраны энтерококков | 86 |
| 4.3. Влияние приема пробиотических штаммов на микроэлементный состав клеток энтерококков..... | 89 |
| 4.4. Заключение по главе «Энтерококки, как индикаторы положительных эффектов коррекции кишечного микробиома пробиотическими бактериями» | 93 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ | 94 |
| ВЫВОДЫ | 104 |
| ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ | 106 |
| ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ | 107 |
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ | 108 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | 109 |

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Энтерококки являются постоянными представителями кишечного микробиома, обеспечивающие при эубиозе колонизационную резистентность слизистой, поддерживающие мукозальный иммунитет, синтезирующие антимикробные метаболиты, витамины, бактериоцины [22, 61, 108]. Они характеризуются высокими адаптивными свойствами, такими как устойчивостью к желчи и ее солей, высокому содержанию хлорида натрия, к широкому диапазону pH [45, 129]. 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 [19, 59]. С другой стороны, энтерококки при микроэкологических нарушениях способны вызывать патологические процессы воспалительного характера, что обусловлено наличием хорошо развитой системой адгезинов, широким диапазоном протеаз, природной и приобретенной устойчивостью к антибиотикам [3, 13, 127].

У пациентов с туберкулезом легких формируются длительные и стойкие микроэкологические нарушения, что связывают с широкой распространенностью мультирезистентных микобактерий, многокомпонентной и длительной более 18 месяцев противотуберкулезной химиотерапией, коморбидностью [85, 121]. 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 мальдсорбции, что приводит к снижению концентрации противотуберкулезных препаратов в сыворотке крови и способствует селекции устойчивых штаммов микобактерий [41]. Поэтому пациенты с туберкулезом легких нуждаются в коррекции кишечного микробиома для 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 [27, 130]. При этом исследования видового состава и биологических свойств, факторов межмикробных взаимодействий энтерококков довольно ограничены, что не позволяет оценить вклад этих бактерий в функционировании кишечного микробиома, определить их роль при микрoэкологических 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 [4, 5, 27]. Исследования в отношении пациентов с туберкулезом легких ведутся по следующим направлениям: оценка состава кишечного микробиома у пациентов с учетом коморбидности [27], гендерной принадлежности, возраста [9]; изменения условно-патогенной микробиоты на фоне противотуберкулезной терапии [51, 75]; эффективность пробиотикотерапии [4].

Немногочисленные данные демонстрируют, что у больных с легочным туберкулезом перед этиотропной терапией в кишечнике повышено содержание анаэробов (*Anaerostipes*, *Blautia*, *Erysipelotrichaceae*) [72, 103]. Установлены связи между количеством этих кишечных анаэробов и уровнем провоспалительных цитокинов [79], а также тяжестью туберкулезной инфекции [24, 27, 31].

Установлено, что при лечении у пациентов с туберкулезом легких и множественной лекарственной устойчивостью возбудителя развиваются дисбиотические нарушения кишечника II и III степени [35, 51, 74]. Дисбиоз у 90% пациентов сопровождается диспептическим синдромом, который

проявляется в 23,5% - 44,9% случаев метеоризмом и диареей [41, 43, 74]. Нарушения кишечной микробиоты, которые сохраняются в течение 3-8 лет после прекращения приема противотуберкулезных препаратов, коррелируют с рецидивами туберкулеза [116, 120].

В микробиоме у пациентов с туберкулезом легких регистрируют снижение частоты обнаружения постоянных представителей: бифидобактерий, лактобацилл, энтерококков и типичных эшерихий [4, 27, 43]. 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* [51, 57]. У 33,3% пациентов условно-патогенные микроорганизмы формируют ассоциации из четырех и более представителей [43, 52]. Показана зависимость качественных изменений кишечной микробиоты при противотуберкулезной терапии от возраста [72]. Независимо от возраста снижается биоразнообразие микробиоты в биотопе. У детей в большей степени, чем у взрослых угнетается колонизация слизистой лактобациллами и энтерококками [57, 58].

Энтерококки, как постоянные представители кишечного микробиома, являются активными продуцентами бактериоцинов с широким спектром антибактериального действия [61, 62]. Установлено, что бактериоцины энтерококков эффективно предупреждают развитие туберкулеза [78, 84]. Так бактериоцинпродуцирующие *Enterococcus casseliflavus* и *Enterococcus mundtii* подавляют рост *Mycobacterium canettii* и *Mycobacterium tuberculosis*. Размножение *M. tuberculosis* подавляет также *Enterococcus faecalis* [60, 62]. Штамм *Enterococcus italicus* BLN34, выделенный из коровьего молока, ингибирует рост *Mycobacterium kansasii*, а *Enterococcus hirae* проявляет антагонистические эффекты в отношении *Mycobacterium smegmatis* Mc155 [78].

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 [4, 42].

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 бактерии 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 ($23,2^{\circ}\text{T}$) 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 функционировании 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 экзометаболома.

Теоретическая и практическая значимость

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).

Предмет изучения

Биологические свойства и взаимосвязи энтерококков с резидентными и факультативными микросимбионтами кишечного микробиома пациентов туберкулезного стационара при противотуберкулезной терапии.

Материал исследования

Материалами для исследования послужили изолированные от пациентов с туберкулезом легких кишечные микросимбионты, а также коммерческие и коллекционные штаммы. Набор пациентов с соблюдением принципов добровольности осуществляли на базе ГБУЗ "Кузбасский клинический фтизиопульмонологический медицинский центр имени И. Ф. Копыловой" при участии ассистента кафедры фтизиатрии Холодова А. А. В исследование были включены пациенты с туберкулезом легких, вызванным возбудителем с множественной лекарственной устойчивостью. Выделение, идентификацию микобактерий и верификацию множественной лекарственной устойчивости у возбудителей проводила Самоделкина Е. В. - врач бактериолог клинической диагностической бактериологической лаборатории ГБУЗ "Кузбасский клинический фтизиопульмонологический медицинский центр имени И.Ф. Копыловой" с использованием молекулярно-генетических и культуральных методов исследования.

Штаммы кишечных микроорганизмов выделяли в научной лаборатории кафедры микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Минздрава РФ. В работе были использованы 491 штамм фекальных изолятов микроорганизмов: *Enterococcus spp.* - 198, *Staphylococcus* - 76, *Candida* - 91, *Enterobacteriaceae* - 126 штаммов.

В качестве коммерческих и коллекционных штаммов микроорганизмов использовали *Bifidobacterium bifidum* 791 из Государственной коллекции нормальной микрофлоры ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора; *B. bifidum* ВВ-Bf, *Bifidobacterium animalis* ВВ-An, *Lactobacillus casei* LB-Cs, *Lactobacillus plantarum* LB-Pl, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* LB-Ac *Propionibacterium freudenreichii* из синбиотического препарата «Панбиолакт» (ООО «Артлайф», Россия).

Микробиологические методы исследования

Микробиологические методы, включающие классический бактериологический и экспериментальные исследования, применялись для изучения кишечного микробиома, биологических свойств энтерококков, межмикробных взаимодействий.

Биоматериал для бактериологического исследования кишечной микробиоты

Фекалии забирали у пациентов (n=135) ГБУЗ «Кузбасский клинический фтизиопульмонологический медицинский центр имени И.Ф. Копыловой» под контролем ассистента кафедры фтизиатрии Холодова А. А.

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 сформирована группа сравнения (n=37). Третью группу составили пациенты (n=35), которые с

противотуберкулезными препаратами получали синбиотический препарат «Панбиолакт» (ООО «Артлайф», Россия).

Сбор биобразцов в количестве 1-3 грамма проводили утром, в день исследования в стерильные одноразовые контейнеры (Полимерные изделия, Россия). Доставку в 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 лаборатории проводили титрование материала в стерильном физиологическом растворе от 10^{-1} до 10^{-9} , измерение pH осуществляли с помощью индикаторной универсальной бумаги (Lachema, Чехия).

Выделение и идентификация чистых культур кишечных микроорганизмов

Энтеробактерии выделяли на среде Эндо (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск), для энтерококков использовали энтерококк-агар (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск), для грибов рода *Candida* - HiChrome *Candida* Agar (HIMEDIA, Индия), стафилококки выделяли с помощью селективного желточно-солевого агара (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск). Для изоляции анаэробных представителей кишечного микробиоценоза использовали селективные питательные среды, в частности для бифидобактерий применяли Бифидум –среду (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск), для лактобацилл – MRS (de Man, Rogosa and Sharpe) бульон (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск), сульфитредуцирующие клостридии выделяли на среде Вильсона – Блэра (НИЦФ, Санкт-Петербург).

До рода идентифицировали бифидобактерий и лактобацилл с использованием коммерческой тест-системы API 20 A (bioMerieux, Франция). Видовую принадлежность энтерококков, стафилококков, энтеробактерий и микромицетов определяли с использованием следующих коммерческих тест-систем: EnCoccus-Test 8 (Erba Lachema, Чехия); STAPHYtest 16 (Lachema diagnostica s.r.o, Чехия); ENTEROtest 24 (Lachema diagnostica s.r.o, Чехия), ПБДЭ (НПО «Диагностические системы», Россия); «AuxaColor 2 (Bio-Rad, Франция). Идентифицировано до вида 491 культура кишечных изолятов, из них

198 – это энтерококки. Оценку состояния кишечного микробиоценоза вели согласно [37].

Изучение биологических свойств кишечных изолятов

Активность адгезии энтерококков (по В.И. Брилису, 1986) [6]

Исследование способности энтерококков к адгезии проводили *in vitro*, на модели эритроцитов 0 (I) группы Rh+, имеющие сходные гликопротеиновые рецепторы, что и энтероциты. В 0,5 мл эритроцитарной массы человека вносили 2 мл стерильного изотонического раствора NaCl (pH=7,2). Таким образом, содержание эритроцитов составило 10^8 КОЕ в 1 мл. Из бактерий, прокультивированных 24 часа, по стандарту мутности MacFarland готовили взвесь с содержанием равным $1,5 \times 10^9$ бактериальных клеток в 1 мл. В пробирки «Эппендорф» помещали по 50 мкл эритроцитарной массы и бактериальной взвеси и перемешивали на микроцентрифуге Vortex (ООО «Биоком», Россия). При постоянном встряхивании смесь инкубировали при 37° С в течение 60 минут. Далее делали мазок «толстая капля». Фиксацию мазков осуществляли химическим способом – 96% спиртом. Мазки окрашивали по Романовскому-Гимзе и микроскопировали под иммерсией, просматривали 50 полей зрения на микроскопе Primo Star Zeiss (Carl Zeiss, Германия). Определяли индекс адгезии микроорганизмов (ИАМ):

ИАМ – среднее число бактерий на одном эритроците, вычисляли следующим образом:

$$\text{ИАМ} = (\text{СПА} \times 100) / \text{КУЭ}.$$

СПА – средний показатель адгезии – это среднее количество бактерий, прикрепившихся на одном эритроците,

КУЭ – коэффициент участия эритроцитов – это количество эритроцитов, на которых произошла адгезия бактерий.

Бактерии относили к неадгезивным при $\text{ИАМ} \leq 1,75$; к низкоадгезивным при $\text{ИАМ}=1,76-2,5$; к среднеадгезивным при $\text{ИАМ}=2,51 - 4,0$; к высокоадгезивным при $\text{ИАМ} \geq 4,0$.

Изучение типа взаимоотношений энтерококков и кишечных микросимбионтов

Тип взаимодействия энтерококков с представителями кишечной микробиоты определяли двумя методами: методом перпендикулярных штрихов для оценки отсроченного антагонизма и методом натекания бляшек для изучения прямого антагонизма.

Метод перпендикулярных штрихов: суточные культуры энтерококков высевали штрихом на середину чашки со средой Мюллера-Хинтона (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) с последующей суточной инкубацией при 37⁰ С. Далее перпендикулярно первому посеву делали штрихи других культур микроорганизмов, выделенных из того же кишечного микробиома. Посевы культивировали при 37 °С в течение 24 - 48 ч, в зависимости от ростовых свойств микроорганизмов. Результат учитывали по зоне задержки роста культур в мм. Антагонизм регистрировали при наличии задержки роста подсеянной культуры микроорганизмов 10 мм и более.

Метод натекания бляшек: на среду Мюллера-Хинтона (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) бактериологической петлей d=3 мм наносили суточную бульонную культуру бактерий и оставляли в условиях комнатной температуры до полного впитывания. Вторую испытуемую культуру наносили, отступив 1-2 мм от края первой капли. Растекаясь, капля затекала на первую культуру, покрывая часть ее диаметра. Таким образом, получали модель, где микроорганизмы развивались в ассоциации. Чашки с посевами инкубировали в течение 24-48 часов, с учетом типа дыхания и ростовых свойств микроорганизмов. Контролем служили музейные культуры, изолированные от неинфекционных пациентов с микрoэкологическими кишечными нарушениями, с заведомо известным типом взаимоотношений.

Взаимоотношения между микроорганизмами считали симбиотическими при обнаружении роста двух исследуемых бактерий в ассоциациях. При отсутствии роста одной из культур или ее задержке роста взаимоотношения между бактериями расценивали как антагонистические.

Изучение ферментов вирулентности энтерококков

Фосфолипазную активность исследовали путем посева чистых культур микроорганизмов «бляшками» на Tributryn Agar Base (HIMEDIA, Индия). Результаты оценивали по образованию прозрачной зоны вокруг колоний на фоне опалесцирующей питательной среды. Выделение бактериями цитолизина изучали на 5% кровяном МПА (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) по образованию зон гемолиза вокруг культуры микроорганизмов.

Исследование способности продуцировать цинкзависимую металлопротеазу (желатиназу) проводили с помощью набора Микро-ЖЕЛАТИНАЗА (НИЦФ, Санкт-Петербург). Среду готовили согласно инструкции производителя. Посев изучаемой культуры проводили в столбик желатина уколом и помещали в термостат при 37⁰ С на 3-5 суток. Далее посеvy охлаждали в холодильнике в течение 30 минут и визуальнo учитывали результаты путем наклона пробирок с последующим сравнением с контролем. Положительной реакцией (наличие желатиназы) считали расплавление среды и образование воронки. Отрицательная реакция (отсутствие желатиназы) – расплавление среды отсутствовало.

Определение антикаталазной активности энтерококков

Исследовали влияние экзометаболитов энтерококков на каталазную активность грибов рода *Candida* по модифицированной методике [70]. Использовали стабильный молибдат аммония вместо нестойкого йодида калия.

Энтерококки культивировали на МПБ двое суток, далее бульонную культуру двукратно центрифугировали 15 мин при 300 об/мин. Отделение надосадочной культуральной жидкости (супернатанта) от бактериальной массы проводили с помощью фильтров MF-Millipore MCE membrane (Merс Millipore ltd, США) с диаметром пор 0,45 μm с последующим высевом супернатанта на МПА для контроля стерильности. Из грибов *C.albicans* готовили взвесь, стандартизировали ее по Мак-Фарланду (0,5 ед.), что соответствовало $1-5 \times 10^6$ КОЕ/мл. В опытных пробирках смешивали 0,3 мл супернатантов бульонных культур энтерококков, 0,1 мл взвеси грибов *C.albicans* и 2,6 мл бульона Сабуро

(ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск). В качестве контроля использовали показатели каталазной активности интактных грибов (0,1 мл стандартизированной взвеси *Candida* и 2,9 бульона). Субстратом для каталазы служил 0,0125 М раствор пероксида водорода, который добавляли в объеме 1 мл. Реакцию останавливали 1 мл 4 % раствора молибдата аммония через 10 минут. Неинактивированный пероксид водорода образовывал с молибдатом аммония окрашенные комплексы. Оптическую плотность (ОП) окрашенных комплексов измеряли спектрофотометрически на приборе «СФ 2000» (ОКБ «Спектр», Россия) при длине волны 550 нм против питательной среды. Активность каталазы рассчитывали по формуле согласно методике [70]. Полученные результаты сравнивали с каталазной активностью культур *S.albicans*, не экспонированных супернатантами энтерококков.

Изучение трофических взаимодействий энтерококков с бифидобактериями на белоксодержащих субстратах

В качестве белоксодержащего субстрата использовали казеин (ООО «Бригантина», Санкт-Петербург). По 3 г навески казеина помещали в конические колбы объемом 250 мл и добавляли 50 мл 0,02 М фосфатного буфера рН 7,6 для α -химотрипсина и бактериальных супернатантов и 50 мл 0,02М фосфатного буфера рН 7,8 для трипсина. В две колбы вносили по 10 мг трипсина (HiMedia, Индия) и α -химотрипсина (Sigma-Aldrich, США) и 3 мл супернатантов энтерококков с протеолитической активностью.

Ферментативную обработку казеина осуществляли в течение 24 часов с применением шейкер – инкубатора Orbital shaker – Incubator ES -20/60 (Biosan, Латвия) при температуре 37⁰С с числом качаний 55 раз/мин.

Исследование ферментативных гидролизатов проводили с использованием тонкослойной хроматографии (ТСХ). Анализ проводили на пластинках Sorbfil PTS-AF-A (ООО «ИМИДЪ», Россия). Гидролизат, после центрифугирования при 3 тыс об./мин. наносили на линию старта, растворитель отдували азотом, затем пластину помещали в хроматографическую камеру. Для хроматографирования использовали подвижную фазу, состоящую из смеси: н-

бутанол – уксусная кислота – вода (60-15-25). Проявляющий реактив - 1% раствор нингидрина в ацетоне. Хроматограмму опрыскивали реактивом, нагревали 5 – 10 мин при 100 °С и исследовали в видимом свете. Денситометрический анализ пластины проводили с использованием денситометра с системой фотофиксации Sony (Handycam HDR-CX405), ООО “ИМИДЪ”, Россия).

Определение утилизации глюкозы микросимбионтами

Из суточных культур микроорганизмов готовили взвеси по стандарту MacFarland плотностью $1,5 \times 10^9$ бактериальных клеток в 1 мл. В 5,5 мл МПБ (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск), содержащего 5 % глюкозы (Sigma-Aldrich, США) добавляли по 0,5 мл стандартизированной бактериальной взвеси. Культивировали пробирки при 37 °С, показания снимали через 1 ч, 2 ч, 4 ч, 6 ч, 12 ч, 24 ч от начала культивирования на приборе «СФ 2000» (ОКБ «Спектр», Россия) при длине волны 550 нм против питательной среды, содержащей 5% раствор глюкозы.

Физико-химические методы исследования

Использованы физико-химические методы: спектральные (фотометрия, спектроскопический, атомно-эмиссионная спектроскопия) и хроматографические (газовая хроматография с масс-спектрометрическим детектированием, высокоэффективная жидкостная хроматография).

Определение активности кислотообразования [39]

Активность образования энтерококками органических кислот определяли методом титрования. Взвесь энтерококков плотностью 10^8 КОЕ в объеме 1 мл вносили в 10 мл сахарного бульона (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск), инкубацию осуществляли 24 часа при 37°С. Далее добавляли две капли фенолфталеина и проводили титрование 0,1 н раствором NaOH до появления стойкого, не исчезающего в течение 3 минут слабо-розового окрашивания. Исследование проводили в двух повторностях, вычисляли среднее количество щелочи, пошедшее на титрование культуральной жидкости энтерококков. Далее вычисляли кислотность в градусах Тернера ($^{\circ}$ T) по формуле:

$$T = A \times K \times 10$$

где A - количество 0,1 н раствора NaOH, пошедшее на титрование 10 мл исследуемой культуральной жидкости,

K - поправка к титру, определяемая при титровании 0,1 н раствора NaOH 0,1 н раствором серной кислоты (H_2SO_4).

10 – поправочный коэффициент на массу анализируемой пробы.

При кислотности $> 50^0$ Т кислотопродуцирующую активность считали низкой; при $51-100^0$ Т - средней; при 101^0 Т и $>$ высокой.

Анализ наличия органических кислот в экзометаболитах проводили хроматографически на Shimadzu LC-20 Prominence с диодно-матричным детектированием SPD20MA (Shimadzu, Япония). Использовалась хроматографическая колонка Kromasil (MZ Analysentechnik, Германия) 5 мкм C18, 110 А, $250 \times 4,6$ мм, объем инъекции 20 мкл. Температура колонки 25^0 С. Все испытания проводили в трехкратном воспроизведении. Общая методология анализа органической кислоты выполнена согласно [15].

Определение жирных кислот клеточных стенок энтерококков

Для исследования жирных кислот в клеточных стенках энтерококков использовали газовую хроматографию с масс-спектрометрическим детектированием.

Для выделения липидов из клеточных стенок бактерий использовали бульонную культуру энтерококков, отмытую физиологическим раствором. Липидные фракции экстрагировали смесью хлороформ:*n*-гексан (1:1). Для метилирования жирных кислот образец высушивали в токе азота, смешивали в вials 1 мл образца с 0,5 мл смеси 3% раствора H_2SO_4 в MeOH. Ундеценовую кислоту использовали в качестве внутреннего стандарта, ее добавляли в количестве 0,01 мг и нагревали до 90^0 С. Метилированные жирные кислоты экстрагировали 0,7 мл гексана. Гексановую фракцию отдували азотом до 0,2 мл. Исследования проводили на хроматографе Agilent 7000 В (Agilent Technologies, Германия) с использованием колонки ZB-WAX (Agilent Technologies, США), $30m \times 0,25mm \times 0,25\mu m$. Объем вводимой пробы составил

2 мкл, ввод осуществляли с температурой термостата 50 °С при повышении 8 °С/мин до 260 °С в течение 5 мин.

Исследование микроэлементного состава клеточного матрикса и метаболитов энтерококков

Элементный анализ выполнен с использованием атомно-эмиссионного спектрометра с индуктивно связанной плазмой ISP-AES 9820 (Shimadzu, Япония). Перед проведением анализа образцы подвергались минерализации в условиях микроволновой станции пробоподготовки TOPEX+ (PreeKem Ltd, КНР). Точная навеска 0,2 г образца помещалась в полимерную емкость из тетрафторэтилена (PTFE), а затем добавляли 4 мл концентрированной азотной кислоты. Процедура минерализации была следующей: (1) при 70 °С в течение 5 мин, (2) при 160 °С в течение 10 мин, (3) при 180 °С в течение 2 мин при давлении 6 атм. Охлажденные образцы фильтровали через фильтр «желтая лента» в полиэтиленовую пробирку объемом 10 мл, и разбавляли водой деионизированной (1:10об/об). Регистрация пламени – аксиальная. Обработка полученных результатов исследования выполнена 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 проведения 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.

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

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. Было 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 микроорганизмов рода *Enterococcus* и взаимодействий с представителями микробиома. В работе применяли количественный бактериологический метод, метод эксперимента *in vitro*, а также хроматографические (ГХ-МС, ВЭЖХ, ТСХ), спектральные (АЭС-ИСП, 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, инфекционных болезней и дерматовенерологии; 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).

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Энтерококки в многокомпонентном кишечном сообществе: биологические свойства, взаимоотношения с другими представителями микробиоты кишечника

Представители рода *Enterococcus* входят состав нормальной микробиоты человека, некоторых животных, птиц, насекомых и даже рептилий [45, 87]. Их используют для получения ферментированных продуктов, а также в составе пробиотиков [33, 128]. У человека энтерококки обнаруживают в составе микробиоты кишечника, женского генитального тракта, уретры у мужчин. Они колонизируют кожу и слизистые оболочки полости рта. Все сказанное свидетельствует о том, что энтерококки играют важную роль в микробиомах человека и животных [18, 22, 50]. В настоящее время в составе рода *Enterococcus* известно более 36 видов, которые являются каталазоотрицательными микроорганизмами. Они объединены в 6 групп на основании сходства фенотипических свойств. Выделяют *Enterococcus faecium* group, *Enterococcus avium* group, *Enterococcus faecalis* group, *Enterococcus gallinarum* group, *Enterococcus cecorum* group, *Enterococcus italicus* group. Для дифференциации микроорганизмов внутри групп используются молекулярно-генетические методы исследования. В кишечном микробиоме человека чаще обитают *E.faecalis* с количественным уровнем 10^7 - 10^8 КОЕ/г, *E.faecium*, но с меньшими титрами 10^4 – 10^5 КОЕ/г [88], иногда выделяют *E.cecorum* и *E.durans*, *E.caseliflavus*, *E.hirae*, *E.gallinarum* и *E.avium* [45]. Энтерококки *E.faecalis* и *E.faecium*, наряду с бифидобактериями, лактобациллами и типичными кишечными палочками колонизируют пищеварительную систему здоровых детей, находящихся на грудном вскармливании в первые 7-10 дней после рождения [53].

Чтобы говорить об энтерококках в составе многокомпонентного микробиома, необходимо отметить их свойства, определяющие их пластичность и адаптивный потенциал. Энтерококки - факультативные анаэробы, но отдают предпочтение анаэробным условиям.

Они не способны синтезировать порфирины, не имеют цитохромных пигментов, но у них могут быть флавинодержащие пероксидазы НАДФ. Супероксиддисмутаза, индуцируемая молекулярным кислородом, обеспечивает выживание *E.faecalis* в аэробных условиях. Деметилменахинон с девятью изопреноидными единицами может функционировать в качестве нецитохромных носителей электронов у *E.faecalis*, в то время как менахиноны с восемью изопреноидными субъединицами были обнаружены у *Enterococcus casseliflavus* [67].

Оптимальная температура роста 35-37⁰ С. Многие энтерококки способны расти при 42, даже при 45 °С и медленно при 10 °С. Очень устойчивы к высушиванию. Хемоорганотрофы. Метаболизм окислительно-восстановительного типа. Характерно гомоферментативное молочнокислое брожение, преобладающим конечным продуктом ферментации глюкозы является L-молочная кислота. Дополнительными продуктами ферментации глюкозы у энтерококков в присутствии кислорода является уксусная кислота, ацетон и углекислый газ. Различие продуктов ферментации глюкозы может обуславливать разное значение рН среды. Молочная кислота из пирувата синтезируется *E.faecalis* при рН 5,0–6,0, формиат, этанол и ацетат - при нейтральном или слабощелочном рН. При дефиците питательных веществ пируват метаболизируется в этанол и ацетат. *E.faecalis* метаболизирует малат индуцибельным НАД-специфическим ферментом и в присутствии субстрата образуется малат-пермеаза. *E.faecalis* фосфорилирует глюконат до 6-фосфоглюконата с последующей его диссимиляцией до лактата и СО₂ [16, 56].

Энтерококки, как большинство комменсалов желудочно-кишечного тракта, имеют хорошо развитую систему адгезинов и способны образовывать биопленки [87, 117, 126]. В связи с тем, что исследования биологических свойств энтерококков особенно активно начались при росте значимости этих бактерий, как возбудителей внутрибольничных инфекций, то большинство исследователей рассматривают факторы колонизации и биопленкообразования, как факторы вирулентности энтерококков [80, 127]. В настоящее время эти

взгляды пересматриваются. На примере клинических штаммов *E.faecalis* 2A(XJ05), несущих 7 генов устойчивости к антибиотикам, показано, что геном госпитальных штаммов заметно меньше, чем геном кишечного симбионта *E.faecalis* V583. Отмечают различия в размерах геномов и у *E.faecium* в зависимости от происхождения: у резидентов кишечного биотопа геном больше, чем у энтерококков из пищевых продуктов и окружающей среды. При этом изоляты, у которых были обнаружены многочисленные гены, кодирующие факторы инвазии, в экспериментах не обладали большей инвазией, чем энтерококки с меньшим количеством генов [67, 118].

Способность адгезироваться и колонизировать клетки кишечного эпителия хозяина является важной характеристикой, играющей определенную роль в ингибировании колонизации слизистой человека патогенными штаммами. В качестве факторов адгезии у энтерококков изучены капсульные полисахариды, гликолипиды, поверхностные белки адгезии, такие как Asc у *E.faecium*, Ace у *E.faecalis*, агрегативные субстанции AS (AS- aggregation substances), Ebp -пили, белок биопленкообразования ESP (extracellular surface protein). Установлено, что агрегирующие вещества AS представляя собой кодируемые плазмидами белки, связанные с клеточной стенкой бактерий. Наиболее известными конъюгационными плазмидами, содержащими гены, кодирующие эти белки, являются плазида *pPDI*, кодирующая белок Asp1, плазида pCF10—белок Asc10 и плазида pAD1— белок Asa1 [89]. Эти белки позволяют не только образовывать конгломераты бактерий во время конъюгации, но они также имеют сродство к интегринам кишечного эпителия. В связи с этим их рассматривают как факторы колонизации, перспективные даже для конструирования пробиотических штаммов с высокоадгезивными свойствами. Агрегирующая субстанция энтерококков способствует их коагрегации с патогенными бактериями и элиминацию последних из кишечника, из полости рта [124]. В опытах *in vitro* установлено, что коагрегация наблюдалась между *E.faecalis* KGPMF 49 и *Klebsiella ornithinolytica* PMFKG, *Serracia odorifera* KGPMF и *E.coli* KGPMF.

В качестве лиганда для агрегирующей субстанции выступают липотейхоевые кислоты бактерий [67].

Другим фактором адгезии у энтерококков в кишечном микробиоме является белок ESP. Он представляет собой экзометаболит, состоящий из β -1,6-связанного поли-N-ацетилглюкозамина (полиGlcNAc). Анализ протеома при биопленкообразовании у штаммов энтерококков показал повышенную экспрессию гликолитических путей, факторов стрессовой реакции, сигнальной системы кворума LuxS, синтеза полисахаридов и феромон-ассоциированных белков. У энтерококков идет усиленная экспрессия ферментов биосинтеза ароматических аминокислот. Гликолитический путь является одним из важнейших факторов, определяющих формирование биопленки. В три раза усиливается биосинтез рамнозы, которая является основным компонентом внеклеточного матрикса. Кроме того, в его состав входит глюкоза, N-ацетилгалактозамин, галактоза и фосфат. Известно, что биопленки, ассоциированные с ESP белком, у клинических изолятов и кишечных микросимбионтов отличаются. Клинические штаммы *E. faecalis* проявляют более высокую метаболическую активность в биопленках и имеют более низкую биомассу (меньшее количество клеток на той же площади), чем энтерококки-симбионты [63]. Экзополисахариды биопленок у энтерококков проявляют антагонистическую активность в отношении грамположительных и грамотрицательных патогенных бактерий [126]. Предполагается, что во внеклеточном матриксе накапливаются метаболиты, которые нарушают структуру пептидогликана и блокируют рецепторы и каналы на наружной мембране грамотрицательных бактерий. Способность к биопленкообразованию встречается чаще у штаммов *E. faecalis* (80%), чем у *E. faecium* (48%), что, по мнению части исследователей, ведет к более высокой частоте обнаружения в кишечном биотопе человека именно вида *E. faecalis* [108].

Штаммы энтерококков проявляют протеолитическую активность, продуцируя внеклеточные протеиназы (цинк-зависимая протеаза или желатиназа, сериновая протеаза - SprE) и внутриклеточные пептидазы [22, 40].

Внеклеточные протеолитические ферменты традиционно рассматривают как патогенетические факторы, обеспечивающие транслокацию энтерококков через стенку кишечника, что обуславливает развитие эндокардитов, сепсиса, поражений мочевыводящих путей [3, 13, 107]. Желатиназа (Gel) представляет собой внеклеточную цинк-зависимую металлопротеазу, гидролизующую большое количество белков - желатину, коллаген, гемоглобина и других белков. Установлено, что ген протеазы (*gelE*) обычно присутствует не только у госпитальных изолятов, но и у фекальных изолятов *E.faecalis* [89]. Однако даже при наличии гена *gel* может отсутствовать фенотипическое его проявление - синтез желатиназы. Протеолитические свойства энтерококков широко используются для приготовления ферментированных продуктов (молочно-кислых, сыров, мясных полуфабрикатов) и отмечают, что энтерококки обладают меньшей протеолитической активностью по сравнению с другими бактериями, такими как *Lactobacillus* и *Lactococcus* [81]. При этом продукты протеолиза энтерококков стимулирует их рост и размножение, являясь источником аминокислот для синтетических процессов энтерококков. В результате работы пептидаз происходит разложение некоторых аминокислот, таких как аргинин, тирозин, серин, агматин, фенилаланин и энтерококки получают энергию. Учитывая, что в составе кишечного микробиома есть некоторые микроорганизмы, не обладающие протеолитической активностью, то энтерококки могут вступать в синтрофные связи с ними, подготавливая субстраты для питания [87].

Синтез энтерококками антимикробных веществ является фактором их выживания в составе мультивидовых популяций и составляет, наряду с факторами врожденного и адаптивного иммунитета хозяина, основу механизма колонизационной резистентности биотопов [29, 30, 31]. Энтерококки способны продуцировать ряд соединений, способных влиять на другие бактерии. Так они относятся к молочнокислым бактериям, антагонизм которых традиционно ассоциируют с синтезом молочной кислоты, которая снижает рН среды и подавляет рост бактерий [127]. Органические кислоты, продуцируемые

энтерококками, влияют на экспрессию факторов вирулентности микроорганизмов, а также блокируют работу белков-пермеаз наружной мембраны грамотрицательных бактерий, что нарушает поступление в клетки необходимых факторов роста [93]. В целом бактерии рода *Enterococcus* являются слабыми кислотообразователями, и поэтому антагонистическую активность энтерококков в большей степени связывают с синтезом бактериоцинов [73, 112]. Бактериоцины энтерококков (энтероцины) – это низкомолекулярные антимикробные вещества, участвующие в регуляции кишечного микробиома, как микробного сообщества и обеспечивающие устойчивость слизистой кишечника к экзогенному заселению микроорганизмами. Известно, что энтероцины могут быть пептидами или их комплексами, белками, отличающимися молекулярной массой и физико-химическими свойствами [62]. Выделяют четыре класса продуцируемых энтерококками бактериоцинов: лантибиотики, семейство педиоцинов, циклические антибактериальные пептиды, крупные белки. Лантибиотики (цитолизин и энтероцин W) обладают противобактериальной активностью по отношению к *Listeria spp.*, *Pediococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Lactococcus spp.* Энтероцины II класса (энтероцин А, энтероцин Р, энтероцин В, энтероцин L-50, энтероцин AS-48) ингибируют рост и размножение грамположительных *Listeria spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Pediococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Carnobacterium spp.*, *Lactococcus spp.*, *Clostridium spp.*, *Bacillus spp.* и грамотрицательных бактерий *Salmonella spp.*, *Providencia spp.*, *E.coli*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.* Известно, что доставка бактериоцинов в клетки грамотрицательных бактерий достигается за счет синтеза липазы, которая создает поры в клеточной стенке. На стенки микроорганизмов-конкурентов энтерококки воздействуют активными формами кислорода - супероксидным анионом, перекисью водорода, гидроксильными радикалами - которые образуются при метаболизме глицерина или как у *E.faecalis* в результате активности мембраносвязанного деметилменахинона. Рост энтерококков, педиококков, лактококков эффективно ингибируют энтеролизины III класса, представляющие собой чувствительный к

температуре антимикробный белок с молекулярной массой 35 кДа. Новый бактериоцин E20 с молекулярной массой 6,5 кДа был получен из пробиотического штамма *E.hirae*, который ранее был выделен из вагинальных образцов здоровых женщин, обладал бактериоцидной активностью в отношении грамотрицательных микроорганизмов с множественной лекарственной устойчивостью [112]. Сканирующая электронная микроскопия показала, что E20с убивает клетки *Salmonella enterica*, образуя ионопроницаемые каналы в клеточной мембране, что приводит к повышению проницаемости клеточной мембраны. Очищенный E20с обладал антимикробными свойствами в отношении микроорганизмов с разными типами клеточной стенки, а именно *Shigella flexneri*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes* и *Listeria monocytogenes*. С другой стороны, он не ингибировал ни одну из тестируемых индигенных лактобацилл, выделенных из образцов фекалий здоровых детей. Бактериоцин E20с обладает синергическим взаимодействием с такими антибиотиками, как ампициллин, пенициллин, цефтриаксон и ципрофлоксацин, в отношении ципрофлоксацин и пенициллинорезистентного штамма *S.enterica* [112]. Комбинацию «бактериоцин-антибиотик» рассматривают как инновационный подход к снижению дозы антибиотиков, тем самым снижая селективное давление, которое приводит к появлению резистентных штаммов бактерий [44].

Бактериоцин-продуцирующие штаммы энтерококков активно изучаются, как средство борьбы с ванкомицинрезистентными штаммами (VRE). Так Gui G. et al. протестировали эффективность энтероцина P (EntP) против 14 штаммов *E. faecium* и *E. faecalis* и пришли к выводу, что все изоляты VRE чувствительны к бактериоцину [73]. Fu et al. сообщили, что *E. faecium* ST651ea, несущие гены *entB* и *entP*, и *E. faecium* ST7119ea и ST7319ea, содержащие гены *entA* и *entB* проявляли сильную антимикробную активность в отношении большинства протестированных клинических изолятов VRE [81, 86].

В настоящее время бактериоцины энтерококков рассматриваются как перспектива в предупреждении туберкулеза. В исследовании Achache W et al.

(2023) выявлены *E.casseliflavus* и *E.mundtii*, которые встречались исключительно в фекалиях пациентов без туберкулеза легких. Опыты *in vitro* показали, что эта ассоциация энтерококков подавляла рост *Mycobacterium canettii* и *M.tuberculosis*. Авторы предполагают, что в основе подавления роста микобактерий лежит либо продукция бактериоцинов, либо иммуномодулирующий эффект энтерококков [60, 83]. Действительно о противотуберкулезной активности бактериоцинов энтерококков уже сообщалось в других работах. Штамм *E.italicus* BLN34, выделенный из коровьего молока, ингибировал рост *Mycobacterium kansasii* [69], а *E.hirae* проявлял антагонистические эффекты в отношении *M.smegmatis* Mc155 [76, 78]. Наконец, *E.faecalis* характеризуется своей способностью подавлять размножение *M.tuberculosis* [61, 75].

Сообщается и об антагонизме *E.faecalis* к *C.albicans* [18, 20]. Выделен анти-кандидозный белок, активный против 6 лекарственно-устойчивых штаммов *C.albicans*: *C.albicans* МТСС 183, МТСС 7315, МТСС 3958, NCIM 3557, NCIM 3471 и DI. Этот бактериоцин чувствителен к протеиназе К и полностью ей инактивируется, к проназе Е - инактивируется ею частично. Он сохраняет биологическую стабильность при 90°C на протяжении 20 мин, активен при рН от 6 до 10 и не чувствителен к обработке α-амилазой, липазой, органическими растворителями и детергентами. Противокандидозную активность штамм *E.faecalis* проявляет в поздней логарифмической фазе роста [1]. Пептид обладает низкой гемагглютинацией и гемолитической активностью для эритроцитов человека [63, 113].

Таким образом, энтерококки в кишечном биотопе являются микросимбионтами с большим адаптивным потенциалом, формирующими положительные связи с макроорганизмом за счет обеспечения колонизационной резистентности, антимикробной и синтетической активности, обладающие далеко идущими перспективами как «средство» управления микробиотой кишечника, предупреждающие развитие туберкулеза, кандидоза и, возможно, других широко распространенных заболеваний.

1.2. Современные достижения в исследовании кишечного микробиома пациентов с туберкулезом легких

Две фазы Международного проекта «Микробиом человека» благодаря метагеномным и омиксным технологиям показал сложность микробных сообществ человеческого тела, их значение для здоровья и жизнедеятельности, роль микробов в патогенезе сердечно-сосудистых, онкологических, эндокринных заболеваний. Это связано с активным воздействием микробиоты на иммунную систему [53], реализацию генетической программы человека [92], клеточную дифференцировку, все виды обмена веществ человека [8, 50, 98]. В связи с этим исследования влияния микробиоты на риски возникновения заболеваний, выявление маркерных микросимбионтов и связь состояния микробиоты с тяжестью течения патологических процессов, с эффективностью лечения до сих пор является предметом активного изучения в контексте предупреждения их развития и разработки новых подходов в комплексной терапии заболеваний [42, 48, 54, 64].

Туберкулез является широко распространенным заболеванием не только в России, но и в мире, сопровождающимся высокой смертностью, что связывают не только со снижением расходов на противотуберкулезное лечение в связи с тяжелой экономической ситуацией, вызванной пандемией COVID-19, но и ростом устойчивости возбудителя к противотуберкулезным антибиотикам, опять же в результате активного использования антимикробных средств при лечении осложнений новой коронавирусной инфекции [10, 35]. За период 2018-2022 по данным доклада Всемирной Организации Здравоохранения возросла заболеваемость лекарственно устойчивым туберкулезом [49]. Согласно Клиническим рекомендациям «Туберкулез легких у взрослых» лечение туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) возбудителя должно длиться не менее 18 месяцев с использованием в интенсивной фазе не менее пяти-шести противотуберкулезных препаратов и антибиотиков (фторхинолонов, бедаквилина, линезолида, циклосерина или теризидона). Такая длительная и агрессивная терапия антибактериальными препаратами

не может не повлиять на микробиом пациентов, поэтому в литературных источниках все чаще появляются данные о микробиоте фтизиатрических пациентов – микробиоте кишечника, легких и их взаимосвязи в рамках метаболомной оси «кишечник-легкие» [6, 43, 97].

Основной предпосылкой исследования микробиома кишечника у пациентов с туберкулезом легких с МЛУ возбудителя является острая необходимость повышения эффективности терапии и предупреждения формирования широкой лекарственной устойчивости у микобактерий, так как уже в течение месяца после старта комбинированной противотуберкулезной терапии у пациентов возникают побочные явления – гастроинтестинальный синдром, который в 23,5-44,9% случаев проявляется антибиотик-ассоциированной диареей, болями в животе, метеоризмом, тошнотой и рвотой и синдром мальдсорбции, который развивается у 81% пациентов [4, 51]. С одной стороны это часто является причиной прерывания курса противотуберкулезной терапии со стороны пациентов, с другой стороны, нарушение процессов всасывания в кишечнике снижает концентрацию препаратов в сыворотке крови и способствует селекции устойчивых штаммов микроорганизмов.

Немногочисленные исследования кишечной микробиоты у пациентов с туберкулезом органов дыхания до назначения противотуберкулезной терапии демонстрируют преобладание в структуре микрoэкологических нарушений III степени (75,7-77,7%) [27, 43]. Наличие дисбиоза у впервые выявленных пациентов связывают с такими факторами как возраст, ко-инфекции (ВИЧ-инфекция, хеликобактериоз), приемом алкоголя, наркотиков, с погрешностями в питании [9]. Так, у пациентов с ко-инфекцией (ВИЧ/туберкулез) независимо от возраста регистрируют не только более тяжелое течение туберкулеза, развитие осложнений и более высокую смертность, но и более глубокие изменения кишечной микробиоты, которые, прежде всего, выражаются в снижении биоразнообразия микробного сообщества [21, 26]. На животных моделях показано, что потеря разнообразия микробного сообщества кишечника

сопровождается инфекционной диареей, ассоциированной с *Clostridium difficile* или *Salmonella spp.* Вследствие снижения количества CD 4⁺ Т-лимфоцитов при ВИЧ-инфекции нарушаются регуляторные механизмы, обеспечивающие иммунологическую толерантность нормобиоты [48, 79].

Однако, в настоящее время состояние кишечного микробиома рассматриваются с других позиций – с позиции фактора, определяющего восприимчивость к туберкулезу и форму инфекции. На животных моделях показано, что при снижении альфа-разнообразия кишечной микробиоты повышается восприимчивость к *M.tuberculosis* [5]. Уже через 6 дней после инфицирования мышей возбудителем туберкулеза в кишечнике возникает снижение численности бактерий отрядов *Clostridiales* (семейств *Lachnospiraceae*, *Ruminococcus*) и *Bacteroidales*. В основе повышения восприимчивости лежит снижение экспрессии на дендритных клетках Mincle-рецепторов (macrophage-inducible C-type lectin), что уменьшает количество CD4⁺ Т-лимфоцитов, а также Т-клеток памяти и повышает количество специфичных Treg клеток в легких. А представители семейства *Clostridiaceae* в норме продуцируют индолпропионовую кислоту, которая воздействует через арилуглеводородный рецептор (aryl hydrocarbon receptor – AhR) и регулирует выработку противовоспалительных цитокинов IL-10, IL-17, IL-22; IFN- α [5, 102]. При туберкулезе легких у пациентов было выявлено, что еще до назначения им противотуберкулезной терапии в кишечнике повышено содержание анаэробов (*Anaerostipes*, *Blautia*, *Erysipelotrichaceae*). Содержание этих кишечных анаэробов коррелировало с количеством провоспалительных цитокинов [130]. В связи с этим регистрируют утяжеление туберкулезной инфекции, что дополнительно подтверждает роль кишечной микробиоты в патогенезе туберкулеза [72, 111].

В других недавних исследованиях у лиц с впервые выявленным и с рецидивирующим туберкулезом обнаружено снижение количества представителей рода *Lachnospira* и *Prevotella* [74]. Титры этих бактерий у впервые выявленных фтизиатрических пациентов прямо коррелировали с

количеством CD4⁺ лимфоцитов и имели обратную корреляцию с содержанием Т-лимфоцитов у лиц с рецидивирующим туберкулезом. При рецидивирующим туберкулезе по сравнению со здоровыми людьми наблюдали увеличение количества бактерий типов *Actinobacteria* и *Proteobacteria* [27, 110, 115].

Исследования кишечного микробиома у детей, заболевших туберкулезом, организованное по типу «случай-контроль» не выявило изменений биоразнообразия кишечной микробиоты до начала противотуберкулезной терапии. В другом исследовании из 142 детей раннего и дошкольного возраста с туберкулезом внутригрудных лимфатических узлов 45% имели дисбиоз I степени, а 26,8% детей - дисбиоз II степени [58]. У заболевших детей в кишечном содержимом выявили повышенное содержание бактерий рода *Prevotella*, которые ассоциируются с провоспалительным состоянием организма. Регистрировали высокие титры энтерококков при снижении уровня колонизации кишечника бактериями рода *Bifidobacterium*, семейства *Bacteroidaceae* и семейства *Ruminococcaceae*, в частности видов-продуцентов летучих жирных кислот - *Faecalibacterium ruminococcaceae* и *Faecalibacterium prausnitzii*. При приеме противотуберкулезных препаратов наблюдалось значительное снижение количества видов кишечной микробиоты [6, 58].

О влиянии состава и функциональной активности кишечной микробиоты на восприимчивость к туберкулезу свидетельствуют опыты на мышах по колонизации слизистой *Helicobacter hepaticus*. Под влиянием этого комменсала у мышей в кишечнике увеличивалось содержание бактерий *Bacteroides* и уменьшалось количество *Firmicutes*. Отмечали рост уровней IL-10, снижение активности формирования поствакцинального иммунитета, а при инфицировании мышей *M.tuberculosis* – обширные деструктивные процессы в легочной ткани. Напротив, установлена протекторная роль *Helicobacter pylori*, которыми заражали макаков с последующим аэрозольным инфицированием *M.tuberculosis*. У таких животных активные формы туберкулеза развивались значительно реже, чем в контрольной группе [121]. Эти опыты на животных моделях еще раз подтверждают влияние кишечного микробиома на риски

развития туберкулеза и определяют поиск новых способов предупреждения их развития и повышения эффективности лечения.

Многочисленные работы демонстрируют, что прием антибиотиков даже короткими курсами вызывает у человека изменения микробиоты любого биотопа [33, 44]. Чем больше количество применяемых антибиотиков и выше возраст пациента, тем больше изменений микробиоты регистрируют. Антибиотики влияют на микробиоту и иммунный ответ человека, вследствие чего заболевание, в том числе и туберкулез, прогрессирует и развиваются более тяжелые клинически выраженные формы болезней [99, 105]. На мышах показано, что уже после 8 недель приема изониазида и пипразинамида отмечается более высокая бактериальная нагрузка на легкие, что связывают с транслокацией микросимбионтов из кишечника, а также со снижением продукции TNF и IL-1 β , снижением экспрессии MHC II и нарушением контроля над *M.tuberculosis* [74, 77].

Противотуберкулезная терапия отличается своей длительностью, многокомпонентностью, что связано с особыми биологическими свойствами возбудителя туберкулеза [10, 12, 49]. При лечении туберкулеза глубокие микробиологические нарушения в кишечной микробиоте регистрируют как во время терапевтического цикла (острые эффекты), так и после прекращения терапии (долгосрочные эффекты). При туберкулезе ассоциированным с чувствительным к препаратам возбудителем дисбиоз кишечника сохраняется 1-3 года, при МЛУ возбудителя – до 3-8 лет [121]. Несколько независимых исследований демонстрируют, что стойкий дисбиоз кишечника у пациентов с туберкулезом легких характеризуется уменьшением частоты обнаружения и количества представителей типа *Firmicutes*, в частности родов *Faecalibacterium*, *Clostridiales*, *Ruminococcus*, *Blautia*, *Roseburia*, *Eubacterium*, *Coprococcus*, *Dorea*, что изменяет соотношение *Firmicutes/Bacteroides*. В норме представители типа *Firmicutes* составляют до 64% микроорганизмов кишечного микробиома [103]. Микроорганизмы этого филума являются активными продуцентами бутирата – короткоцепочечной жирной кислоты, играющей важную регуляторную

функцию в поддержании гомеостаза кишечника [64]. Бутират через G-связанные рецепторы приводит к увеличению количества Treg клеток и предшественников дендритных клеток, увеличивает экспрессию противовоспалительных цитокинов (IL-10), активирует активность макрофагов. Фенилбутират, как производное бутирата, индуцирует экспрессию противомикробных пептидов в эпителиальных клетках легких и напрямую ограничивает рост *M.tuberculosis in vitro*, даже внутри макрофагов [125]. Поэтому снижение числа микроорганизмов-продуцентов бутирата в кишечнике фтизиатрических пациентов сопровождается потенцированием провоспалительного статуса макроорганизма [95, 103].

Другим значимым таксоном, который определяет состояние макроорганизма, является бактерии типа *Bacteroidetes*. В большинстве исследований показано, что при туберкулезе легких снижаются титры микроорганизмов рода *Prevotella* и увеличивается содержание бактерий родов *Bacteroides* и *Parabacteroides*. Именно бактериоиды и парабактероиды являются продуцентами ацетата, который может играть двойственную роль в организме [7, 8, 104]. С одной стороны, ацетат может потенцировать выработку антимикробных пептидов на слизистых, в частности, дефензина-1 [122], который ингибирует внутриклеточный рост *M.tuberculosis* внутри гранулем; усиливает фагоцитарную активность макрофагов и нейтрофилов. С другой стороны, ацетат способен подавлять активность CD 4+ Т-лимфоцитов и изменять активность Th-1 Th17 иммунного ответа. Снижение количественных уровней превотелл позволяет нивелировать массивную деструкцию легочных тканей, так как *Prevotella spp.* индуцирует секрецию IL-6, IL-8 и CCL20 эпителиальными клетками, а также IL-1 β , IL-6 и IL-23 дендритными клетками. Эти цитокины могут вызывать Th17 иммунный ответ, рекрутирование нейтрофилов и нейтрофильную инфильтрацию тканей, что и ведет к значительному повреждению легких [77, 99]. Только в нескольких исследованиях говорится о противоположных тенденциях – о повышении

в кишечнике пациентов с туберкулезом количества бактерий родов *Bacteroides* и снижении титров *Prevotella* [103].

У пациентов при лечении туберкулеза легких увеличиваются титры *Proteobacteria* (*Escherichia*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Shigella*). Связывают эти тенденции со снижением колонизационной резистентности и уменьшением количества продуцируемых резидентами короткоцепочечных жирных кислот (ацетата, пропионата, бутирата) [114].

В работе И. В. Соловьевой и соавт. показано, что у пациентов с МЛУ возбудителя туберкулеза разнообразие видов и частота обнаружения условно-патогенных микроорганизмов была ниже, чем у пациентов с лекарственно-чувствительным туберкулезом. Однако у пациентов с резистентными микобактериями грибы рода *Candida* и бактерии рода *Bacillus* выделялись чаще [43]. У пациентов с МЛУ туберкулезом легких условно-патогенные микроорганизмы в 1,7 раз чаще формировали четырех-компонентные ассоциации [4].

Ассоциированные с противотуберкулезной терапией изменения микробиоты ведут к утяжелению течения и рецидивам туберкулеза, к селекции антибиотикорезистентных штаммов. В исследовании Huang et al. мышам, инфицированным *M.tuberculosis*, скармливали антибиотики широкого спектра действия [85]. На пятые сутки введения антибиотиков у мышей регистрировали снижение количественных уровней большинства микросимбионтов (*Bifidobacterium*, *Campylobacter*, *Lactobacillus*, *Bacteroides*), а на 42 сутки общее содержание микробов восстанавливались. Это было связано с тем, что сначала происходила гибель чувствительных штаммов бактерий, а затем на 42 сутки активно развивались устойчивые к антибиотикам популяции условно-патогенных микроорганизмов (*Staphylococcus aureus*, *E.faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*). Снижалось биоразнообразие таксонов, а в легких мышей гистологически регистрировали увеличение количества гранул, что говорит о диссеминации микобактерий туберкулеза. Это подтверждалось обнаружением *M.tuberculosis* также в печени и в селезенке мышей [85, 130]. О влиянии

микроэкологических нарушений кишечника на характер течения туберкулезного процесса свидетельствуют и данные А. Н. Юсубовой и соавт. Положительную рентгенологическую и клиническую динамику воспалительного процесса в легких у детей при проведении противотуберкулезной терапии регистрировали при развитии 1 степени дисбиоза, но не у лиц с 3 степенью нарушений [58].

Таким образом, сбалансированный по видовому и количественному составу кишечный микробиом имеет решающее значение для снижения тяжести туберкулезного процесса, для предупреждения развития осложнений, рецидивов, для повышения эффективности лечения туберкулеза.

1.3. Коррекция нарушений микробиоты кишечника при туберкулезе: персонификация, средства, результаты

Современные достижения в оценке влияния кишечного микробиома на восприимчивость, тяжесть течения и результаты лечения туберкулеза, убедительно демонстрируют функционирование оси «кишечник-легкие» посредством активного воздействия экзометаболитов кишечных микросимбионтов на иммунный гомеостаз [96, 102]. В связи с этим очевидна коррекция микроэкологических нарушений кишечного микробиома у всех фтизиатрических пациентов, не зависимо от устойчивости возбудителя.

В настоящее время активно ведется поиск штаммов с противотуберкулезной активностью с целью создания пробиотических композиций для когорты пациентов с туберкулезом [24, 94]. Так, пробиотики на основе штаммов *Lactobacillus* и *Bacteroides fragilis* являются препаратами для фтизиатрических пациентов [90]. Доказано, что *B.fragilis* оказывает противовоспалительное действие, снижая избыток IFN- γ и индуцируя секрецию IL-10 у мышей посредством продукции экзополисахарида [65].

Установлено, что *Lactobacillus plantarum*, *L.casei*, *L.salivarius* проявляли *in vitro* зависимую от кислотности среды ингибирующую активность в отношении *M.bovis*. В кислой среде все три вида лактобацилл оказывали бактерицидный эффект, но при нейтральном pH только у *L. plantarum* и *L.casei*

регистрировали антимикобактериальную активность [109]. В их геномах выявлено присутствие генов, экспрессирующих как бактериоцины, так и белок с антимикобактериальным, иммуномодулирующим действием. В исследовании Kuczkowska K. et al. сообщается об увеличении экспрессии МНС II на дендритных клетках легких и снижении количества *M.tuberculosis* в легочной ткани мышей после лечения *L. plantarum* [91]. При использовании *L.rhamnosus* РМС203 регистрировали прямое ограничение роста туберкулезных микобактерий. В другой работе приводятся данные об обнаружении 30 штаммов лактобацилл (*L.plantarum*, *L.cellobiosis*, *L.fermentum*), ингибирующих *M.bovis*. Эти штаммы были протестированы на чувствительность к противотуберкулезным препаратам в контексте возможности их использования для лечения туберкулеза с МЛУ возбудителя. Установлено, что все идентифицированные виды были чувствительны к рифампицину и устойчивы к противотуберкулезным химиопрепаратам [72]. Вопрос об антибиотикорезистентности пробиотических штаммов в настоящее время дискутируется в связи с возможностью горизонтального и вертикального переноса генетического материала другим бактериям, в том числе микросимбионтам человека [98, 120]. В связи с этим любой пробиотический консорциум тестируется на предмет отсутствия мобильных генетических элементов. Однако недавно был обнаружен штамм *Bifidobacterium adolescentis*, резистентный к рифампицину. Это связывают с мутацией в конститутивном гене *groβ*, ответственным за синтез белка, поэтому он не передается горизонтально. В настоящее время этот штамм бифидобактерий активно исследуется на предмет его использования для поддержания кишечного микробиома во время терапии туберкулеза с множественной устойчивостью возбудителя [94].

В исследовании И. В. Беловой и соавт. приводятся данные об эффективности биологически активной добавки к пище «LB-комплекс Л», включающий бифидобактерии и лактобациллы, иммобилизованные на цеолите [4]. Исследование проведено в группе пациентов с устойчивым возбудителем.

Курс приема препарата составил 50 дней. У пациентов регистрировали нормализацию уровня бифидобактерий и лактобацилл, снижение частоты выделения условно-патогенных микроорганизмов. В сыворотке крови уменьшилось содержание провоспалительного цитокина ИЛ-8. У больных в 1,4 раза снизилась частота интоксикации и на 23,5% сократилось время пребывания в стационаре. Аналогичные положительные результаты были получены и в группе детей, принимавших биологически активную добавку «LB-комплекс S», включающую три штамма лактобацилл (*L.plantarum*, *L.fermentum*) и три штамма бифидобактерий (*B.bifidum*, *B.longum*), обладающих неинвазивной плазмидой резистентности к антибиотикам [4].

Существуют данные об эффективности использования в составе комбинированной терапии фтизиатрических пациентов с инфильтративным туберкулезом пробиотика на основе *Bacillus subtilis*, которые пациенты принимали в течение всего курса противотуберкулезной химиотерапии. Регистрировали устранение клинических проявлений дисбиоза, повышение фагоцитарной активности макрофагов, увеличивалось число фагоцитирующих клеток, что сопровождалось снижением количества циркулирующих иммунных комплексов, также уменьшалась выработка Ig M. Пациентов из группы диспансерного наблюдения 1–«активный туберкулез», переводили в группы 2 и 3 («затухающий туберкулез» и «излеченный туберкулез»). Это является следствием не только иммунорегулирующего действия препарата, но и прямого антагонистического действия бацилл в отношении микобактерий. Прямой антагонизм отмечен в результате использования препарата «Сахабактисубтил» на основе двух штаммов *B.subtilis* ТНП-3, ТНП-5 для снижения контаминации почвы *M.bovis* в условиях вечной мерзлоты. Даже однократная обработка почвы препаратом «Сахабактисубтил» в количестве 5×10^9 КОЕ/г снижает в 2 раза выживаемость микобактерий [36].

Выпускается препарат Nyaditum resae® (NR), содержащий инактивированные нагреванием *M.manresensis*. Эта микобактерия относится к нетуберкулезным бактериям, обитает в воде, в том числе питьевой. Данный

пробиотик (именно так позиционируется препарат) вызывает блокирование активного туберкулезного процесса у мышей за счет активации T-reg клеток (CD 25⁺ CD39⁺). Оценка безопасности и иммуногенности пробиотика NR подтверждена в двойном слепом плацебо-контролируемом клиническом исследовании. Пациенты получали пробиотик в течение 14 дней. По результатам испытания установлено увеличение количества эффекторных клеток с фенотипом CD25⁺CD39⁻ и специфических Treg-клеток памяти (CD25⁺CD39⁺), что предупреждает у пациентов с латентным туберкулезом переход в активный туберкулез [101].

Перспективными для фтизиатрических пациентов являются постбиотики (метабиотики), в частности, индолпропионовая кислота и фенилпропионат. Индолпропионовая кислота на мышах продемонстрировала способность в 7 раз снижать микобактериальную нагрузку на внутренние органы. Эти экзометаболиты кишечных микросимбионтов уже прошли первые клинические испытания и продемонстрировали хороший клинический эффект по снижению диспептического синдрома у пациентов. Тем не менее, концентрация, особенно постбиотиков, должна быть индивидуализирована с учетом особенностей пациента и функциональной активности его микробиоты. Например, короткоцепочечные жирные кислоты оказывают положительные эффекты у пациентов с монотуберкулезной инфекцией, но вызывают усиление воспаления у пациентов с ко-инфекцией (туберкулез/ВИЧ). Активно ведутся исследования по использованию для подавления *M.tuberculosis* бактериоцинов нормобиоты – лактицина, низина [109].

1.4. Заключение по главе «Обзор литературы»

Анализ литературных данных выявил противоречие в общемировых и отечественных исследованиях микробиома пациентов с туберкулезом легких, определивших основную цель и задачи настоящего исследования: энтерококки являются постоянными микросимбионтами в кишечном микробиоме. Они обеспечивают колонизационную резистентность слизистой кишечника, активно продуцируют различные бактериоцины, молочную кислоту, проявляют

антагонизм к патогенным бактериям. Их нередко используют в составе пробиотиков и ферментированных продуктов. При этом в исследованиях кишечного микробиома пациентов с туберкулезом легких они рассматриваются как условно-патогенные микроорганизмы, вызывающие внекишечные инфекционные осложнения при дисбиотических нарушениях или показана их роль в формировании резистентности к антибиотикам. Поэтому требует ответа вопрос о том, какую функцию выполняют энтерококки у пациентов с МЛУ туберкулезом легких, особенно при микрoэкологических нарушениях. Для устранения этого противоречия необходимо изучить видовой состав энтерококков, выяснить биологические свойства (факторы колонизации, кислотообразующая, антагонистическая активность, факторы инвазии, антибиотикорезистентность) до начала и во время курса терапии антибиотиками и химиопрепаратами, оценить характер взаимоотношений в другими кишечными микросимбионтами, оценить влияние пробиотиков на структурно-функциональные особенности энтерококков, что позволит сделать вывод о возможных регуляторных механизмах и средствах, стабилизирующих кишечную микробиоту у пациентов с туберкулезом легких.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

ГЛАВА 2. КИШЕЧНЫЙ МИКРОБИОМ ПАЦИЕНТОВ С ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ

Кишечный микробиом определяет характер течения туберкулезного процесса и эффективность лечения [77, 125]. Главным неблагоприятным фактором, воздействующим на микробиоту, у пациентов с туберкулезом являются этиотропные препараты. При этом антибактериальное лечение сопровождается развитием диспептического синдрома, что часто ведет к отказу пациентов от терапии и прерыванию курса лечения [74]. Очень часто туберкулез у пациентов сочетан с ВИЧ-инфекцией, что также может влиять на микробиом. В связи с этим целесообразно выяснить характер микробных изменений в кишечном биотопе, которые сопровождаются синдромом диспепсии, а также установить вклад коморбидности в развитие микробиологических нарушений у пациентов с туберкулезом.

2.1. Кишечный микробиом пациентов с туберкулезом легких в зависимости от ВИЧ-статуса

Среди пациентов с туберкулезом отмечается доминирование ко-инфицированных лиц - туберкулез/ВИЧ-инфекция (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). Это, в свою очередь, соответствовало 58,8% от всего числа выделенных микобактерий с множественной лекарственной устойчивостью.

В литературе имеются ограниченные данные о состоянии микробиома у пациентов при сочетании ТБ/ВИЧ, что не позволяет говорить о

подходах при коррекции кишечной микробиоты – персонифицированных или унифицированных [9, 21, 51]. В связи с этим, нами была проведена сравнительная оценка состояния кишечной микробиоты у пациентов с моноинфекцией и с ко-инфекцией ТБ/ВИЧ до начала противотуберкулезной терапии.

Исследована кишечная микробиота 64 человек с туберкулезом легких и множественной лекарственной устойчивостью возбудителя. Из них 31 человек – группа пациентов с моноинфекцией (туберкулез – ТБ), 33 человека – с сочетанной патологией (ТБ/ВИЧ). Группы были сходны по возрасту, по полу: средний возраст составил $44,7 \pm 3$ и $42,5 \pm 2$ года соответственно ($U=421$; $p=0,26$); в группе с моноинфекцией было 28 (84,8%) мужчин, в группе с ко-инфекцией 26 (83,9%) мужчин ($\chi^2 = 0,273$, $df=1$, $p=0,28$). 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-инфекцией получали антиретровирусные препараты в соответствии с клиническими рекомендациями [11]. Группы пациентов были также сходными по клиническим формам туберкулеза. У 23 (74,2%) пациентов с моноинфекцией был диссеминированный туберкулез, у 6 (19,4%) – инфильтративный, у 2 человек (6,5%) казеозная пневмония. У коморбидных больных (ТБ/ВИЧ) диссеминированный туберкулез был диагностирован у 24 (72,7%) человек, инфильтративный у 7 (21,2%) больных, казеозная пневмония у 2 (6,1%) ($\chi^2 = 0,651$, $df=2$, $p=0,96$). Бактериовыделение было зарегистрировано у 23 (74,2%) пациентов с моноинфекцией (ТБ) и у 28 коморбидных (ТБ/ВИЧ) больных ($\chi^2 = 0,432$, $df=1$, $p=0,98$).

Данные о частоте обнаружения и количественном уровне кишечных микросимбионтов, а также значимость различий показателей представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Характеристика кишечной микробиоты у впервые выявленных больных туберкулезом в зависимости от ВИЧ статуса

| Микроорганизмы | Впервые выявленные пациенты с моноинфекцией (ТБ) n=31 | | Впервые выявленные пациенты с ко-инфекцией (ТБ/ВИЧ) n=33 | | Значимость различий p ₁ – p ₃ | Значимость различий p ₂ – p ₄ |
|--------------------------------|--|---|---|---|--|--|
| | Частота обнаружения, (%), p ₁ | Количественный уровень Me (Q ₁ ; Q ₃) (lg КОЕ/г), p ₂ | Частота обнаружения (%), p ₃ | Количественный уровень Me (Q ₁ ; Q ₃) (lg КОЕ/г), p ₄ | | |
| <i>Bifidobacterium spp.</i> | 100,0 | 8,0 (6; 8) | 96,97 | 8,0 (4; 9) | 0,98 | 0,28 |
| <i>Lactobacillus spp.</i> | 93,54 | 6,0 (4; 8) | 90,91 | 5,0 (4; 8) | 0,98 | 0,048 |
| <i>Escherichia coli lac+</i> | 96,77 | 5,0 (4; 6) | 81,82 | 5,0 (4; 7) | 0,98 | 0,42 |
| <i>Enterococcus spp.</i> | 93,54 | 6,0 (4; 7) | 90,91 | 6,0 (4; 8) | 0,55 | 0,49 |
| <i>Clostridium perfringens</i> | 41,94 | 2,5 (2; 4) | 39,39 | 4,0 (3; 5) | 0,67 | 0,005 |
| <i>Klebsiella spp.</i> | - | - | 18,18 | 5,5 (5; 6) | - | - |
| <i>Citrobacter spp.</i> | 6,45 | 5,0 (4; 6) | 9,09 | 5,0 (4; 6) | 0,82 | 0,69 |
| <i>Enterobacter spp.</i> | 16,13 | 4,0 (4; 6) | 9,09 | 5,0 (5; 7) | 0,34 | 0,07 |
| <i>Salmonella spp.</i> | 9,68 | 6,0 (5; 6) | 12,12 | 5,5 (5; 6) | 0,17 | 0,18 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 9,68 | 2,0 (2; 4) | 9,09 | 2,0 (1; 3) | 0,99 | 0,21 |
| <i>Staphylococcus spp.</i> | 77,42 | 3,0 (2; 5) | 63,64 | 3,0 (2; 6) | 0,16 | 0,12 |
| <i>Candida spp.</i> | 90,32 | 3,5 (2; 4) | 93,94 | 5,0 (2; 6) | 0,31 | 0,006 |

В целом кишечный микробиом пациентов с ко-инфекцией ТБ/ВИЧ качественно не отличался от микробиома пациентов с моноинфекцией. Так резидентная микробиота у пациентов с ВИЧ-статусом, представленная *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Escherichia*, *Enterococcus*, характеризовалась высокой частотой обнаружения в пределах 81,82-96,97%. Титры бифидобактерий, типичных кишечных палочек, энтерококков были снижены, но достоверно не отличались от титров этих микросимбионтов у пациентов с моноинфекцией туберкулеза (Таблица 1). Статистическая разница отмечалась между содержанием лактобацилл. У коморбидных пациентов титры *Lactobacillus spp.* составили 5 (4; 8) lg КОЕ/г против 6 (5; 8) lg у пациентов с туберкулезом легких без ВИЧ-статуса ($p=0,048$).

Микроорганизмы рода *Candida* и *Staphylococcus* независимо от ВИЧ-статуса пациентов были отнесены к группе постоянных микросимбионтов кишечного биотопа, что было связано с высокой частотой их обнаружения (Таблица 1). При этом если титры стафилококков в сравниваемых группах были сходными, то уровень колонизации грибами рода *Candida* был достоверно выше у пациентов с ко-инфекцией (Таблица 1) ($p=0,006$), что может быть результатом иммунной недостаточности пациентов с ВИЧ-статусом.

Высокое содержание и частота встречаемости грибов и стафилококков предопределяет возможность развития вторичных инфекций у иммунокомпрометированных пациентов, что утяжеляет течение основного заболевания. Поэтому у ВИЧ-положительных и ВИЧ-отрицательных пациентов с туберкулезом легких был проведен анализ видовой структуры этих микросимбионтов.

Отмечали большое количество идентифицированных видов. При моноинфекции у пациентов - 7 видов стафилококков, у коморбидных больных - 8 видов. Среди стафилококков у ТБ/ВИЧ пациентов преобладали *S.aureus* и *S.xylopus*, у больных без ВИЧ-статуса - *S.xylopus* (Рисунок 1). В целом структура представителей рода *Staphylococcus* была сходной ($\chi^2 = 3,87$, $df=6$, $p=0,7$) (Рисунок 1).

Как у пациентов с туберкулезом легких, так и у пациентов с туберкулезом легких и ВИЧ-статусом, в составе кишечного микробиома с одинаковой частотой и количественными уровнями обнаруживали условно-патогенные и патогенные энтеробактерии: *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Salmonella* (Таблица 1). Только у пациентов с сочетанием ТБ/ВИЧ в кишечном микробиоме регистрировали *Klebsiella spp.* Частота их обнаружения составила 18,1%, титры 5,5 (5; 6) lg КОЕ/г. Как показатель микрoэкологических нарушений у пациентов с туберкулезом легких независимо от наличия ВИЧ-инфекции регистрировали присутствие сапрофитических микроорганизмов, в частности *P. aeruginosa*.

У всех пациентов отмечается высокая частота колонизации слизистой кишечника сульфитредуцирующими клостридиями - 39,3 – 41,9%. Однако, у пациентов с ко-инфекцией ТБ/ВИЧ количественный уровень этих бактерий был достоверно выше ($p=0,005$).

Анализ степеней микрoэкологических нарушений в сравниваемых группах показал отсутствие значимых различий в структуре ($\chi^2 = 0,243$; $df=2$; $p=0, 256$). У пациентов с туберкулезом легких независимо от ВИЧ-статуса преобладали микрoэкологические нарушения III степени - 61,3% в группе пациентов с моноинфекцией и 69,7% среди больных с ко-инфекцией. У остальных пациентов отмечали II степень дисбиоза. Среди коморбидных пациентов 5 человек (15,2%) предъявляли жалобы на гастроинтестинальный синдром (тошнота и неустойчивый стул). Среди пациентов с моноинфекцией таковых было только 2 (6,5%) человека, они также отмечали у себя чередование поносов и запоров (OR= 2,59; ДИ 95% [0,464-14,462]).

Таким образом, в целом различий качественного состава кишечной микробиоты у пациентов с моноинфекцией туберкулеза и у коморбидных больных не регистрировали. При ВИЧ-статусе и туберкулезе легких нарушения характеризуются снижением содержания постоянных обитателей кишечного биотопа, таких как бифидобактерий, энтерококков, типичных кишечных палочек и ростом частоты выделения и уровней условно-патогенных микроорганизмов, что отражает единые механизмы развития дисбиоза,

независимо от заболевания, при котором возникли нарушения микробиома. В основе механизма лежит снижение колонизационной резистентности, что способствует формированию патоценозов, включающих формирование ассоциаций из условно-патогенных микросимбионтов, появление в кишечнике микроорганизмов из окружающей среды (сапрофитов) и/или патогенных бактерий. Иммунодефицит, как фактор, влияющий на микробиоту, предопределяет у коморбидных пациентов более выраженный недостаток уровней лактобацилл, высокие титры грибов рода *Candida* и бактерий рода *Clostridium*.

2.2. Влияние противотуберкулезной терапии на кишечную микробиоту пациентов с туберкулезом легких

Для выполнения поставленной задачи были сформированы две группы пациентов с туберкулезом легких и множественной устойчивостью возбудителя - основная группа (n=36) и группа сравнения (n=37). Структура клинических форм туберкулеза у пациентов представлена на рисунке 3.

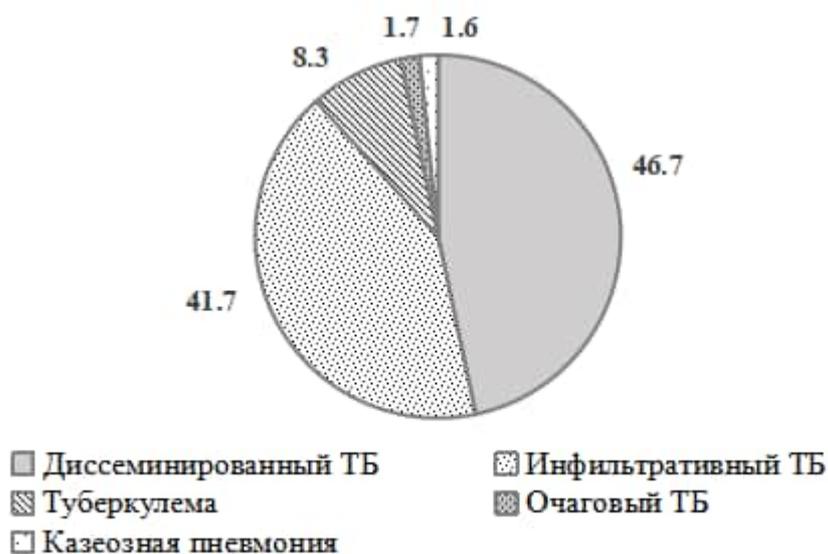


Рисунок 3 - Структура форм легочного туберкулеза у пациентов (в %)

Основная группа исследуемых включала пациентов с МЛУ туберкулезом легких, проходивших лечение во ГБУЗ «Кузбасский клинический фтизиопульмонологический медицинский центр имени И.Ф. Копыловой».

Лечение назначалось согласно действующим клиническим рекомендациям [49]. Основным признаком включения в основную группу было развитие диспептического синдрома в результате приема противотуберкулезных препаратов. В качестве группы сравнения выступали пациенты с туберкулезом легких, с впервые верифицированным диагнозом. Критерием, по которому отбирали в группу сравнения, было выявление множественной лекарственной устойчивости у возбудителя. Критерии, невключения в группы обследуемых:

- прием антибактериальных и химиотерапевтических противотуберкулезных препаратов или/и пробиотиков менее, чем за 2 месяца до начала исследования,
- заболевания кишечника и печени инфекционного и неинфекционного генеза,
- иммунодефицит – уровень CD 4+ менее 200 кл/мкл.

Все пациенты подписывали информированное добровольное согласие (протокол Этического комитета ФГБОУ ВО КемГМУ № 290/к от 20.01.2021). Клинические данные получены при выкопировке из формы 003/у «Медицинская карта стационарного больного». Группы были сопоставимы по возрастно-половым признакам, коморбидности и уровню иммуносупрессии. Основная группа включала 8 (22,2%) женщин и 28 (77,8%) мужчин, группа сравнения состояла из 9 (24,3%) – женщин, 28 (75,7%) – мужчин ($p=0,142$). Средний возраст пациентов составил 44 ± 3 и 42 ± 2 лет соответственно ($p=0,4$). Бактериовыделение установлено у 29 (80,5%) пациентов, принимающих противотуберкулезные препараты, и у 31 (83,8%) впервые выявленных пациентов ($p=0,17$). ВИЧ-инфицированных в основной группе было 20 (55,6%) человек и 22 (59,5%) в группе сравнения ($p=0,62$). Медиана содержания клеток CD 4+ в группах составила 292 (205; 387) и 336 (298; 342) кл/мкл соответственно ($p=0,68$).

Все пациенты получали фторированные хинолоны (Fq) и бедаквилин (Bq), 31 человек (86,1%) – аминогликозиды и столько же циклосерин (Cs), 26 пациентов (72,2%) - пиразинамид (Z); 8 (22,2%) человек получали пара-аминосалициловую кислоту (PAS), 5 (13,8%) - линезолид (Lzd) и

4 (11,1%)- этамбутол (Е). Среднее число принятых доз составило $34,4 \pm 2$. Все пациенты основной группы предъявляли жалобы на диспептический синдром в среднем через 29 ± 2 дней после начала курса противотуберкулезной терапии. Структура жалоб пациентов представлена на рисунке 4.

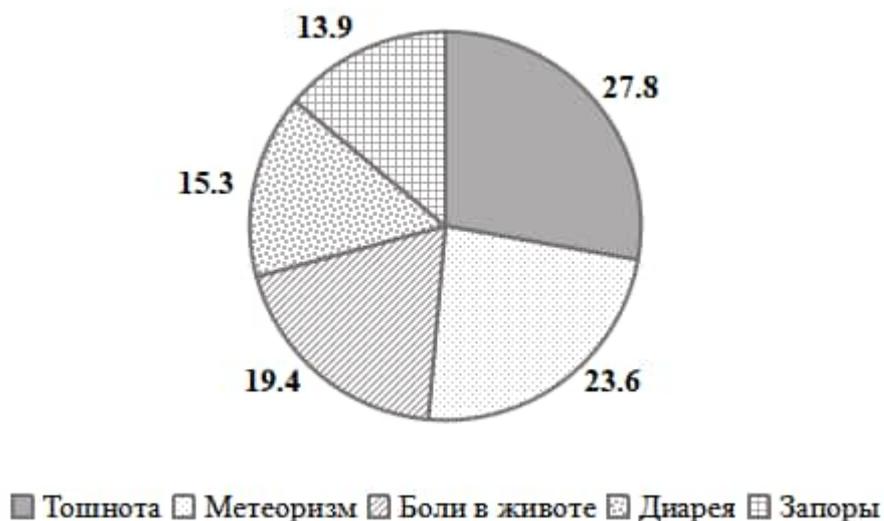


Рисунок 4 - Структура жалоб пациентов при развитии диспептического синдрома во время приема противотуберкулезных препаратов (в %)

По результатам исследования установлено, что постоянными представителями кишечного биотопа у пациентов, в сравниваемых группах, были микроорганизмы рода *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Escherichia*, *Enterococcus*, *Staphylococcus* и *Candida*. Бифидобактерии и лактобациллы колонизировали слизистую кишечника впервые выявленных пациентов с частотой 97%. Титры *Bifidobacterium* в среднем составили 7,6 (7; 9) lg КОЕ/г, лактобацилл 6,3 (6; 8) lg КОЕ/г, т.е. были ниже региональных значений нормы [23]. У пациентов, принимающих противотуберкулезные препараты, частота обнаружения бифидобактерий и лактобацилл осталась высокой и составила 100% и 89% соответственно. Не изменился относительно группы сравнения количественный уровень бифидобактерий – 7,4 (7; 8) lg КОЕ/г ($U=586,5$; $p=0,36$), что свидетельствует о значительной устойчивости этих микросимбионтов к воздействию химиотерапевтических средств. Статистически значимо снизились титры лактобацилл до 5,1 (4; 6) lg

($U=410$; $p=0,0002$). У 94,5% пациентов до старта этиотропной терапии в кишечном микробиоме обнаружены типичные эшерихии, их содержание составило 5,7 (5; 6) lg КОЕ/г. При приеме противотуберкулезных препаратов отмечали снижение частоты обнаружения *E.coli lac+* до 78% ($\chi^2 = 6,22$, $df=1$, $p=0,04$), их количественный уровень был 5,3 (4; 6) lg КОЕ/г ($U=578$; $p=0,31$).

Установлено, что у 51,4% впервые выявленных пациентов в кишечном микробиоме вегетировали условно-патогенные представители семейства *Enterobacteriaceae* с титрами 4,3 (4; 6) lg КОЕ/ г. После начала противотуберкулезной химиотерапии их частота обнаружения не изменилась, так как эти микросимбионты были выделены у 50% пациентов основной группы в титрах 4,2 (4; 8) lg КОЕ/г. В сравниваемых группах отмечали статистически значимое изменение структуры энтеробактерий ($\chi^2 = 26,22$, $df=5$, $p=0,001$) (Рисунок 5).

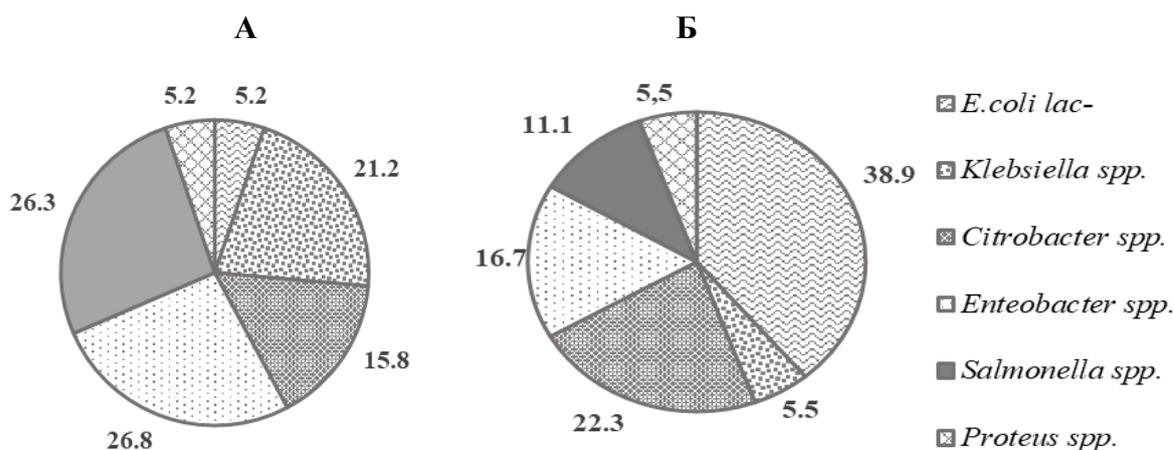


Рисунок 5 - Структура энтеробактерий в кишечном микробиоме впервые выявленных пациентов с туберкулезом легких (А) и пациентов, во время этиотропной терапии (Б) (в %)

До старта этиотропного лечения у 91% пациентов были изолированы представители рода *Enterococcus*, уровень колонизации которыми составил 5,8 (5; 7) lg КОЕ/г. У пациентов основной группы частота обнаружения и плотность колонизации этими микросимбионтами не изменилась и составила 93 % ($\chi^2 = 0,67$, $df=1$, $p=0,14$) и 5,7 (5; 6) lg КОЕ/г ($U=617$; $p=0,71$) соответственно.

У пациентов основной группы при развитии диспептического синдрома достоверно увеличивается с 2,7 до 19,4 % ($\chi^2 = 5,24$, $df=1$, $p=0,05$) частота колонизации лактозонегативными палочками и их титры с 4 до 4,5 lg ($U=537,5$; $p=0,02$). При этом снижается частота обнаружения представителей рода *Klebsiella spp.*, *Salmonella spp.*, *Enterobacter spp.*, что, видимо, ассоциировано с действием антибиотиков, которые входят в схемы противотуберкулезной терапии ($\chi^2 = 1,24$, $df=2$, $p=0,07$).

В 92% случаях до начала терапии в составе кишечной микробиоты пациентов регистрировали присутствие грибов рода *Candida*. Их содержание составило 3,6 (2; 4) lg КОЕ/г. В группе пациентов, принимающих противотуберкулезные препараты частота обнаружения микромицетов была ниже - 82% ($\chi^2 = 0,19$, $df=1$, $p=0,2$), а количественный уровень остался прежним и составил 3,7 (3; 5) lg КОЕ/г ($U=635$; $p=0,72$). У 8,8% впервые выявленных пациентов из кишечного биотопа выделяли по два вида грибов рода *Candida*, в группе пациентов на противотуберкулезной терапии таковых уже было 12,5% ($\chi^2 = 0,26$, $df=1$, $p=0,19$). Видовая структура грибов в сравниваемых группах не отличалась ($\chi^2 = 0,21$, $df=5$, $p=0,27$). *C.albicans* был доминирующим видом микромицетов в основной группе и в группе сравнения (72% и 77% соответственно). У больных до начала лечения 10,2% приходилось на *C.neoformans*, 5% - это были грибы *C.kefyr*. По 2,6% приходилось на *C.famata*, *C.parapsilosis*, *C.glabrata*. У пациентов на этиотропной терапии были идентифицированы *C.glabrata* (8% в структуре), *C.kefyr* (5,5%), *C.ciferri* (5,5%), *C.krusei* (3%), *C parapsilosis* (3%) и *C. neoformans* (3%).

С высокой частотой слизистую кишечника у впервые выявленных больных колонизировали представители рода *Staphylococcus* (62%), но количественный уровень этих микросимбионтов был низким и составил 2,4 (1; 3) lg. После старта противотуберкулезной терапии их частота и титры не изменились и составили 64% ($\chi^2 = 0,01$, $df=1$, $p=0,98$) и 3 (1; 4) lg КОЕ/г ($U=748$; $p=0,9$) соответственно. По два вида стафилококков выделяли из микробиома 17% пациентов до лечения и у 12,5% на фоне терапии ($\chi^2 = 0,11$,

df=1, p=0,04). Видовая структура включала по 11 видов стафилококков и неидентифицированные до вида штаммы. У пациентов основной группы (принимающих противотуберкулезные препараты) лидирующие позиции в структуре занимали *S.epidermidis* (22%), *S.xylosum* (14%), *S.lentus* (11%). По 7,4% приходилось на *S.warneri*, *S.intermedius*, *S.aureus*, *S.simulans* и на неидентифицированные штаммы *Staphylococcus spp.* Были также выделены *S.auricularis*, *S.pestifermentas*, *S.urealiticum*, доля каждого составила по 5 %. У впервые выявленных пациентов в структуре стафилококков доминировали *S.xylosum* (28,5%) и *S.epidermidis* (18%). Отмечали значительную долю неидентифицированных до вида стафилококков – 14%, на *S.warneri* приходилось 10,7%. В единичных случаях выделяли следующие виды: *S.lentus*, *S.intermedius*, *S.auricularis*, *S.simulans*, *S.galinarum*, *S.haemolyticus*, *S.cohnii*, *S.piscifermentas*. Доля каждого вида составила 3,6%. Достоверной разницы в видовой структуре стафилококков обнаружено не было ($\chi^2=0,156$, df=10, p=0,9).

Обращает внимание высокая частота обнаружения в кишечном микробиоме фтизиатрических больных спорообразующих микроорганизмов. Так *Clostridium perfringens* как у впервые выявленных пациентов, так и у пациентов при противотуберкулезной терапии обнаруживались в 39,4% случаев ($\chi^2=0,01$, df=1, p=0,12) с количественным уровнем 2 (1; 7) lg КОЕ/г (U=664; p=0,98). До старта противотуберкулезной терапии от 11% пациентов выделяли *Bacillus spp.* с гемолитической активностью в титрах 4,1 (4; 6) lg, после начала противотуберкулезной терапии частота колонизации бациллами снизилась до 5,5% ($\chi^2=0,73$, df=1, p=0,8). Кроме того, у пациентов, принимавших противотуберкулезные препараты, не выделяли сапрофит окружающей среды *P. aeruginosa*, которая регистрировалась у впервые выявленных больных в 11% случаев с титрами 4 lg (3; 5).

Обнаружение у пациентов с туберкулезом легких до старта противотуберкулезной терапии низкой частоты колонизации и уровней анаэробной и факультативно-анаэробной резидентной микробиоты (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Escherichia*), высокая частота обнаружения

условно-патогенных микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae*, рода *Staphylococcus*, микромицетов рода *Candida*, появление патогенных бактерий рода *Salmonella* и аэробных сапрофитов окружающей среды (*Pseudomonas*, *Bacillus*) свидетельствует о выраженных микрoэкологических нарушениях кишечной микробиоты. Это подтверждается тем, что среди впервые выявленных туберкулезных больных преобладал дисбиоз кишечника II-III степени (32,4% и 67,6% соответственно). Развитие дисбиоза, вероятно, связано с действием токсических компонентов клеточной стенки *Mycobacterium* [12, 66], иммунодефицитом, наличием у пациентов таких вредных привычек, как курение, алкоголизм, наркомания. Несмотря на это, клинического проявления дисбиоза у пациентов не было, т.е. микрoэкологические нарушения были компенсированными.

Прием противотуберкулезных препаратов приводил к достоверному снижению титров лактобацилл и частоты колонизации лактозопозитивной *E.coli*. Лактобациллы и лактозопозитивные кишечные палочки являются активными продуцентами органических кислот [8, 34], поэтому их дефицит в кишечном микробиоме ведет к развитию бродильных и гнилостных процессов. Этому также способствуют микроорганизмы с выраженной протеолитической активностью - клостридии, бациллы, которые часто обнаруживаются в кишечном микробиоме больных. Поэтому пациенты предъявляют жалобы на метеоризм, боли в животе и тошноту, т.е. развивается декомпенсированный дисбиоз кишечника.

При этом прием этиотропных противотуберкулезных средств сопровождался изменением структуры условно-патогенных энтеробактерий, в частности снижением частоты обнаружения клебсиелл, энтеробактеров. Также уже не выделяли из кишечного биотопа сальмонелл и обитателей окружающей среды – псевдомонад и бацилл, что согласуется с данными литературы о возможности изменения числа патогенных и условно-патогенных микроорганизмов кишечного микробиома под влиянием противотуберкулезных схем лечения [41, 105]. Однако структура микрoэкологических нарушений не

изменилась относительно группы сравнения, так как у пациентов на противотуберкулезной терапии оставалась доминировать III степень дисбиоза (77,8%) ($\chi^2 = 0,753$, $df=1$, $p=0,41$).

2.3. Заключение по главе «Кишечный микробиом пациентов с туберкулезом легких»

По результатам исследования установлено, что у пациентов с туберкулезом легких и множественной лекарственной устойчивостью возбудителя еще до начала проведения противотуберкулезной терапии регистрируются микрoэкологические нарушения кишечного микробиома в стадии компенсации. У коморбидных (ТБ/ВИЧ) пациентов регистрировали выраженное снижение титров лактобацилл и высокие титры *S.perfringens* и грибов *Candida*. В связи с этим, всем пациентам с туберкулезом легких и лекарственной устойчивостью возбудителя еще до старта противотуберкулезной терапии целесообразно назначать бифидо-лактосодержащие пробиотические препараты. Пациенты с ко-инфекцией ТБ/ВИЧ нуждаются в дополнительном восполнении титров лактобацилл и в снижении уровней грибов рода *Candida*.

Противотуберкулезная терапия способствует усугублению микрoэкологических нарушений, что характеризуется снижением титров лактобацилл до $5,1 \lg$ КОЕ/г, типичных кишечных палочек до $5,3 \lg$ КОЕ/г и ростом уровней лактозонегативных эшерихий. Микрoэкологические нарушения сопровождаются развитием диспептического синдрома, проявляющегося тошнотой, метеоризмом и болями в животе.

ГЛАВА 3. БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЭНТЕРОКОККОВ. ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С КИШЕЧНЫМИ МИКРОСИМБИОНТАМИ ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ

Полученные данные у пациентов с туберкулезом легких и множественной устойчивостью возбудителя свидетельствуют о высокой частоте обнаружения энтерококков, независимо от наличия ко-инфекции, от приема противотуберкулезных препаратов, что подтверждает данные о том, что данные бактерии являются постоянными обитателями кишечного биотопа [43]. При развитии как компенсированных, так и декомпенсированных микрoэкологических нарушений их количественный уровень был ниже минимальной границы нормы [32], как и у других постоянных представителей кишечного микробиома. Это отражает однонаправленность изменений кишечных резидентов и косвенно свидетельствует об участии энтерококков в обеспечении колонизационной резистентности. Однако, для того чтобы говорить о роли энтерококков в кишечном микробиоме при микрoэкологических нарушениях, необходимо оценить их функциональную активность и характер взаимодействий с другими кишечными микросимбионтами, чему и посвящена данная глава.

3.1. Качественная и количественная характеристика энтерококков у пациентов с туберкулезом легких

Основным биотопом, в котором обитает *E.faecalis* является толстая кишка человека [56], *E.faecium* значительно чаще обнаруживают у животных, причем с небольшими количественными уровнями [45].

По результатам исследования данные виды энтерококков вегетировали в кишечнике пациентов как до старта терапии, так и во время лечения. Энтерококки в 86,5% и 89% случаев образовывали ассоциации «*E.faecalis*-*E.faecium*» ($\chi^2=0,01$, $df=1$, $p=0,8$).

Количественные уровни и частота колонизации в сравниваемых группах пациентов не отличались ($p=0,75$). Данные представлены на рисунке 6.

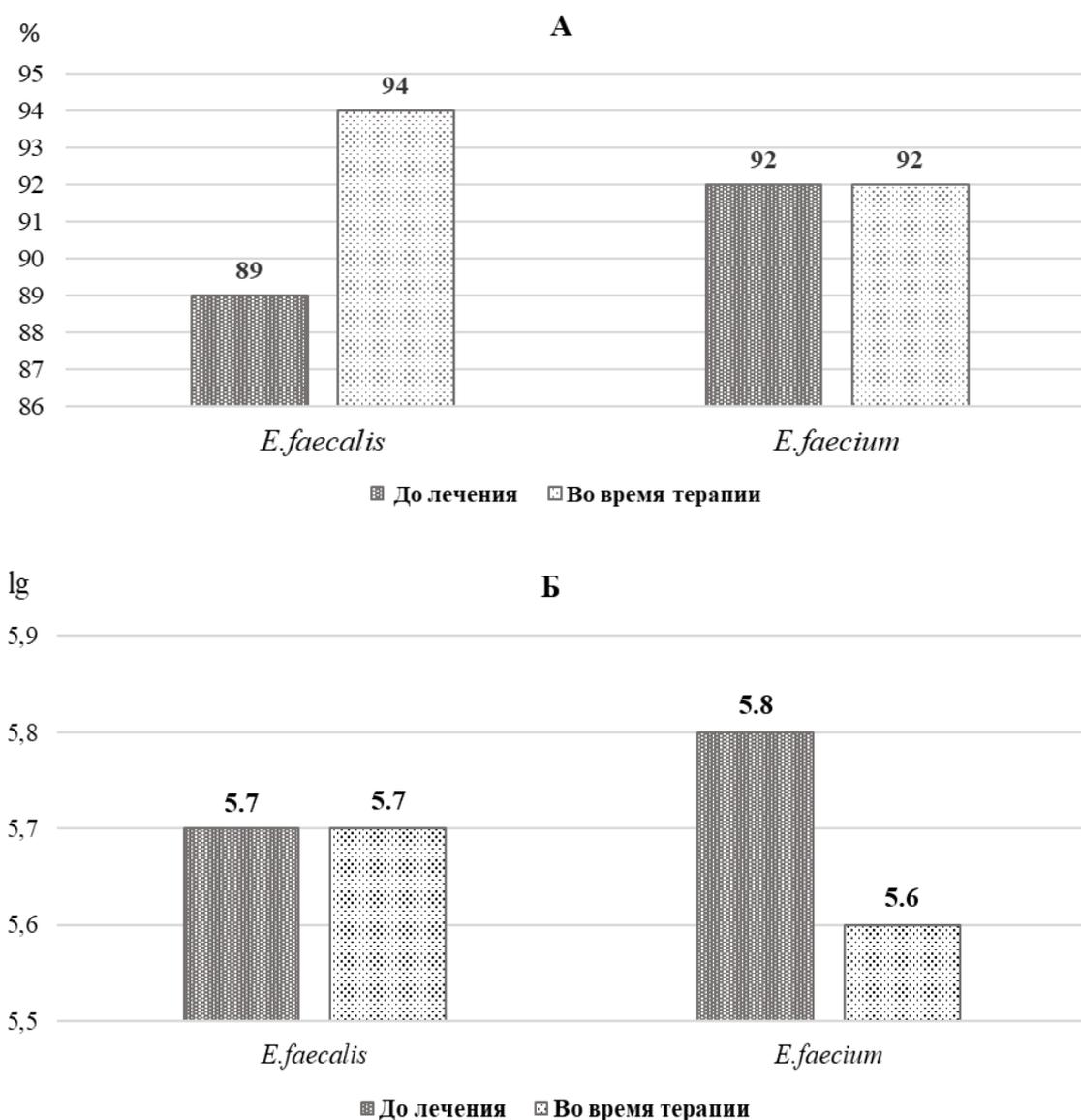


Рисунок 6 - Частота колонизации (А) и титры энтерококков (Б) в кишечном микробиоме впервые выявленных пациентов с туберкулезом легких до лечения и пациентов, во время этиотропной терапии

У пациентов сравниваемых групп не было выявлено отличий по видовому составу энтерококков ($\chi^2=0,13$, $df=5$, $p=0,78$). У больных 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%), т.е. регистрировали те виды энтерококков, которые встречаются не только у человека, но и у животных, птиц и в окружающей среде. Такой разнообразный видовой состав может быть следствием дисбиотических нарушений кишечного микробиома, происходит замещение «человеческих» видов энтерококков на виды – сапрофиты и

животного происхождения. Так как на фоне противотуберкулезной терапии происходит дальнейшее изменение качественного состава микробиоты, увеличивается частота и уровни колонизации условно-патогенными микроорганизмами, то и видовой состав энтерококков становится более разнообразным. У пациентов уже были идентифицированы 8 видов данных кокков. Доминировал в структуре *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%).

Таким образом, на фоне противотуберкулезной терапии энтерококки сохраняют исходные количественные уровни и колонизируют кишечник 92-94% пациентов, что позволяет говорить о них, как о резидентах кишечного биотопа. Их видовая структура не зависит от приема противотуберкулезных средств. У пациентов фтизиатрического профиля с множественной устойчивостью возбудителя вегетируют энтерококки различного происхождения, обеспечивая видовое разнообразие популяции этих микроорганизмов. Колонизация кишечника обеспечивается формированием ассоциации «*E.faecalis-E.faecium*».

3.2. Биологические свойства энтерококков при микрoэкологических нарушениях, ассоциированных с противотуберкулезной терапией

Основная функция резидентной микробиоты в многокомпонентном кишечном сообществе микроорганизмов – это обеспечение колонизационной резистентности слизистой кишечника, формирование антагонистических взаимоотношений с добавочной и транзитной микробиотой [69, 71]. Большую значимость в этом играют факторы адгезии резидентов, поэтому нами была изучена адгезивная активность энтерококков. Установлено, что у впервые выявленных пациентов с туберкулезом легких, несмотря на высокую частоту микрoэкологических нарушений, энтерококки обладали высокими или средними показателями адгезией, что подтверждает данные литературы о значимом вкладе энтерококков в обеспечении колонизации слизистой кишечника. У пациентов, принимающих противотуберкулезные препараты,

снижалось число штаммов *Enterococcus spp.* со средней адгезией и выделялись штаммы с низкой адгезией, доля которых в структуре достигала 36% ($\chi^2 = 24,5$, $df=2$, $p=0,04$) (Рисунок 7).

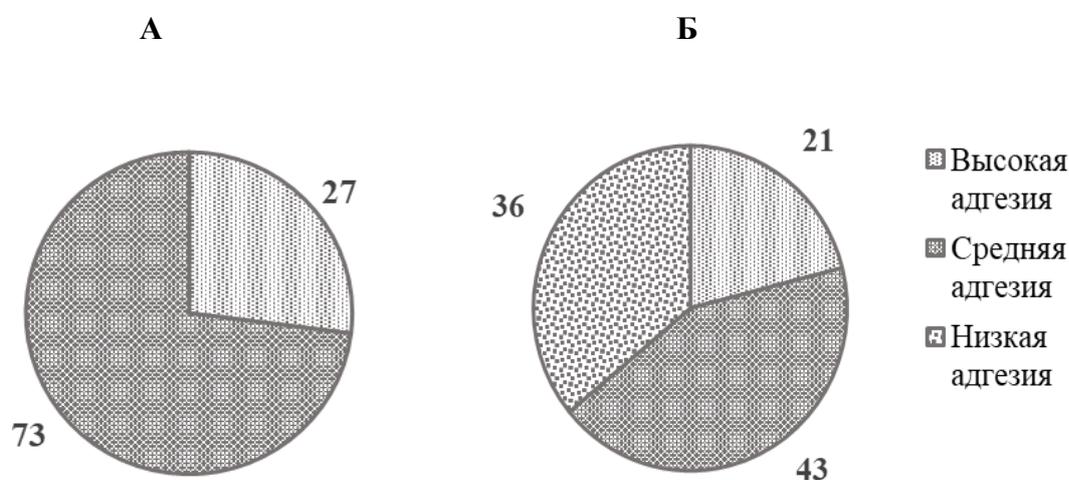


Рисунок 7 - Характеристика энтерококков по адгезивной активности, выделенных от впервые выявленных больных туберкулезом (А) и от пациентов, принимающих противотуберкулезные препараты (Б) (в %)

Средние показатели адгезии у энтерококков, изолированных от пациентов до лечения, составили 3,5 (2,9; 4,8), тогда как на противотуберкулезной терапии адгезивная способность была ниже 2,8 (1,02; 2,9) ($U=138$; $p=0,06$). Установлено, что *E.faecium* до старта терапии характеризовался более высоким показателем индекса адгезии, который составил 4,03 (2,6; 5,6) против 3,7 (2,94; 4,08) у *E.faecalis* ($U=0,89$; $p=0,23$). После развития декомпенсированных нарушений эти тенденции сохранились, т.е. более высокой адгезией обладали *E.faecium* (ИАМ=3,4 (2,7; 4,07), нежели *E.faecalis* (ИАМ = 2,93 (2,22; 3,96) ($U=1,22$; $p=0,34$), что свидетельствует о более выраженных адаптивных способностях вида *E.faecium* в условиях противотуберкулезной терапии. Адгезивная активность в зависимости от вида энтерококков до старта терапии и на фоне противотуберкулезного лечения достоверно не изменялась ($U=2,56$; $p=0,72$), что позволяет говорить о сохранении способности энтерококков обеспечивать колонизационную

резистентность слизистой кишечника у пациентов при микробиологических нарушениях (Рисунок 8).

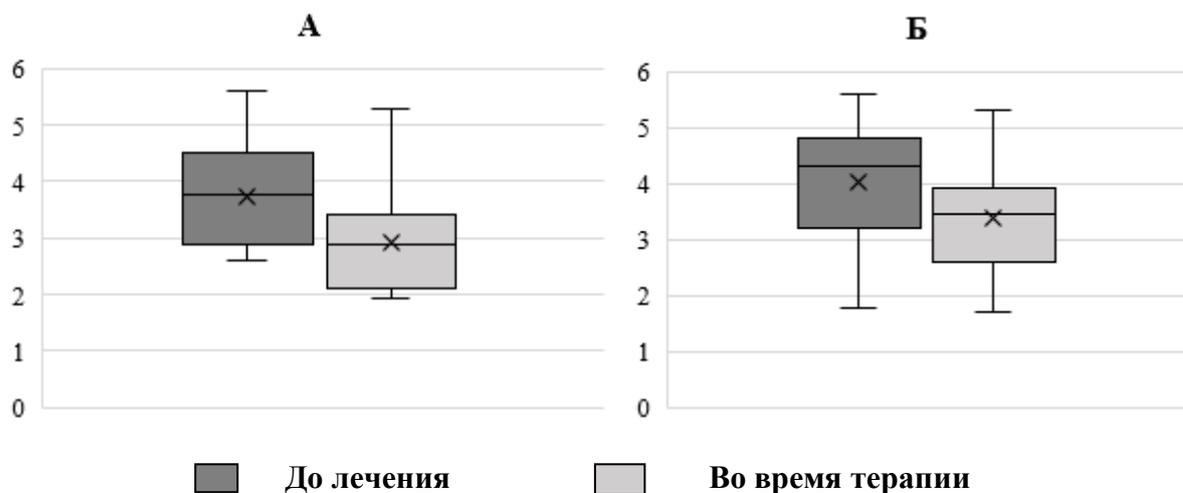


Рисунок 8 – Индексы адгезии *E. faecalis* (А) и *E. faecium* (Б), выделенных от пациентов до лечения и во время противотуберкулезной терапии

Распространенным осложнением туберкулеза легких является эмпиема плевры [49]. Возбудителями данного гнойно-септического процесса являются условно-патогенные представители микробиома человека, которые в условиях иммунодефицита и микробиологических нарушений начинают проявлять свой патогенный потенциал и распространяться за пределы биотопов их обитания [13, 52], поэтому основными патогенетическими факторами возникновения инфекционных осложнений являются факторы инвазии бактерий. У энтерококков основными ферментами инвазии являются цинк-зависимая протеаза, липаза и цитолизин. В связи с этим была изучена распространенность этих ферментов у энтерококков.

До старта терапии у пациентов вегетируют симбиотические штаммы энтерококков, о чем свидетельствует низкая частота обнаружения у бактерий ферментов инвазии. Так только 5% энтерококков продуцировали фосфолипазу и 12% цитолизин (гемолизин). Не было выделено энтерококков, синтезирующих цинкзависимую металлопротеиназу (желатиназу). У энтерококков от пациентов, находящихся на противотуберкулезной терапии, повышалась частота обнаружения ферментов инвазии. 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) ($\chi^2 = 0,09$, $df=1$, $p=0,6$). Установлено, что среди *E.faecalis* до старта противотуберкулезной терапии чаще встречались гемолизинпродуцирующие культуры, чем среди *E.faecium* (25% против 6% соответственно, $p=0,01$) (Рисунок 9, 10).

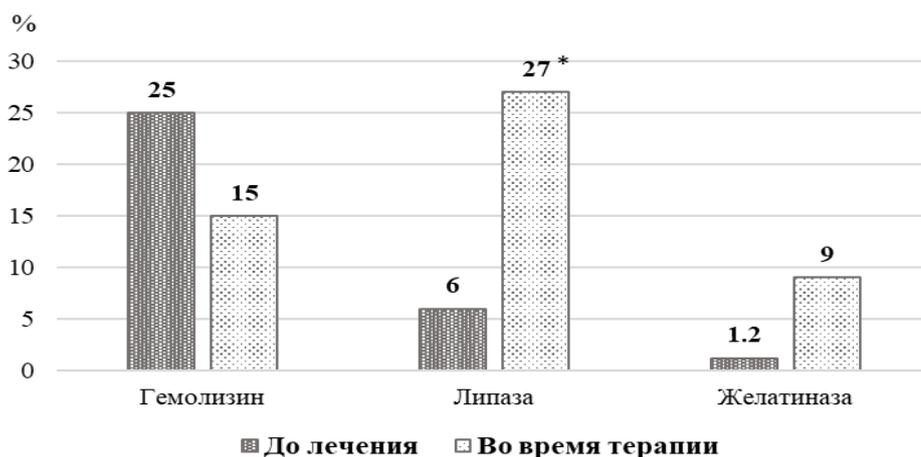


Рисунок 9 – Частота обнаружения штаммов *E.faecalis*, обладающих ферментами инвазии

Примечание: * - достигнутый уровень значимости различий $p<0,05$

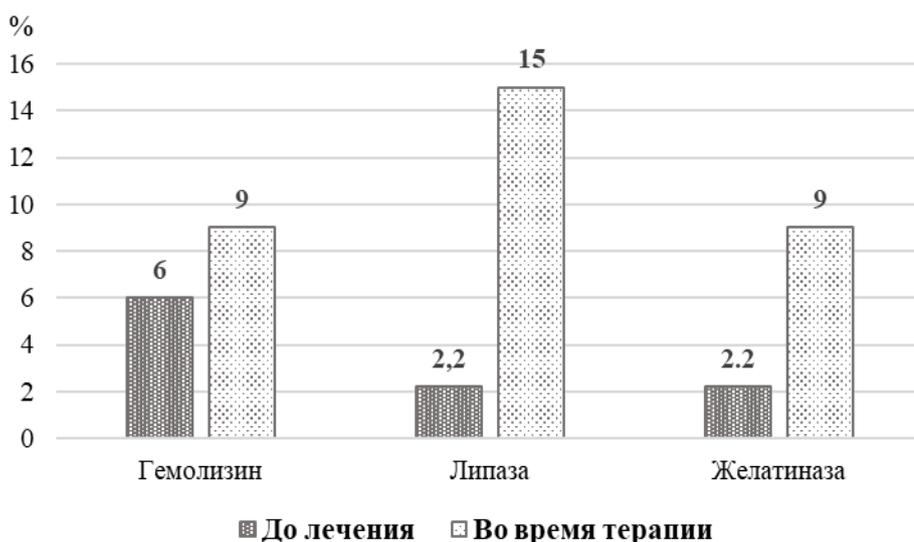


Рисунок 10 – Частота обнаружения штаммов *E.faecium*, обладающих факторами вирулентности

По остальным ферментам инвазии энтерококки разных видов не отличались друг от друга (Рисунок 9, 10). Однако после начала противотуберкулезной терапии среди *E.faecalis* в 4,5 раза увеличивалось число штаммов с липазной активностью ($\chi^2 = 5,11$, $df=1$, $p=0,003$). Среди *E.faecium* на фоне противотуберкулезной терапии появлялись штаммы, обладающие липазой, желатиназой активностью ($\chi^2 = 1,06$, $df=2$, $p=0,07$).

При оценке характера взаимоотношений энтерококков с условно-патогенными микросимбионтами, которые постоянно присутствуют у пациентов с туберкулезом легких в кишечном микробиоме – это грибы *Candida spp.* и бактерии рода *Staphylococcus spp.* – установлено отсутствие прямого антагонизма к этим представителям со стороны энтерококков. При этом декомпенсация микрoэкологических нарушений сопровождается увеличением синтеза этими микроорганизмами липаз, что подтверждает предположение о прямой зависимости между синтезом этих ферментов и эффектами противотуберкулезной терапии [2, 12, 35]. Так, у пациентов, принимающих противотуберкулезные препараты, увеличивалась в 5 раз (с 7,7 % и 39,5 %) частота обнаружения грибов, продуцирующих липазу ($\chi^2 = 11,85$, $df=1$, $p=0,001$).

Среди стафилококков регистрировали обратную тенденцию, т.е. если до лечения липазопродуцирующие штаммы *Staphylococcus* обнаруживали в 89% случаев, то при приеме противотуберкулезных препаратов, их частота обнаружения достоверно снизилась до 14% ($\chi^2 = 9,34$, $df=1$, $p=0,002$). В сравниваемых группах не установлено достоверной разницы между частотой обнаружения стафилококков, продуцирующих гемолизин и ДНКазу. У пациентов до старта противотуберкулезной терапии гемолизин продуцировали 57 % штаммов, ДНКазу – 3,6%. При развитии синдрома диспепсии у пациентов, находящихся на этиотропном лечении *Staphylococcus spp.* продуцировали гемолизин в 56 % случаев ($\chi^2 = 0,01$, $df=1$, $p=0,98$), штаммов, продуцирующих ДНКазу, выделено не было.

Таким образом, при приеме противотуберкулезных препаратов у энтерококков сохраняются симбиотические связи с макроорганизмом за счет

адгезивной способности, но появляются штаммы с факторами инвазии – продуцирующие фосфолипазу и цинк-зависимую металлопротеиназу. Так как эти ферменты являются индуцибельными, то их активная продукция может быть обусловлена наличием субстрата – липидно-протеиновых комплексов – компонентов клеточной стенки микобактерий, количество которых при проведении этиотропной терапии увеличивается. Среди *E.faecalis* чаще обнаруживаются вирулентные штаммы как до старта этиотропной терапии, так и после ее начала.

3.3. Метаболические взаимодействия *E.faecalis* и *E.faecium* в ассоциациях при ферментации глюкозы

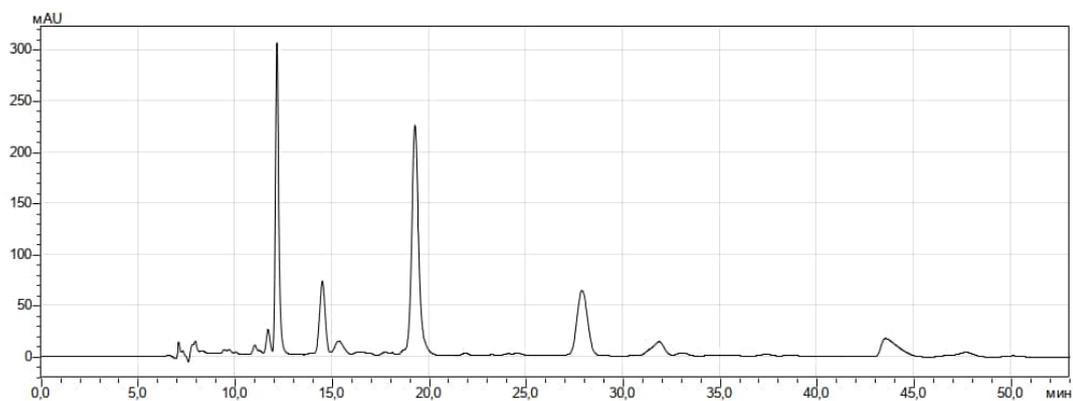
Энтерококки, как большинство кишечных микросимбионтов, в качестве источника энергии используют углеводы [8, 71]. Для них характерно гомоферментативное молочно-кислое брожение, где конечным продуктом является молочная кислота [71]. Однако энтерококки нельзя назвать «сильными» кислотообразователями [129], поэтому этот признак не рассматривается у них как фактор антибактериальной активности в отношении добавочной микробиоты. По нашему мнению, уровень продукции органических кислот при ферментации углеводов у энтерококков можно рассматривать как индикатор их биохимической активности, которая может изменяться при микрoэкологических нарушениях.

Установлено, что кислотообразование энтерококков от пациентов до старта этиотропной терапии было низким и составило 23,2 (20,2; 31,06) ° Т. После старта противотуберкулезной терапии уровень продукции органических кислот увеличился до 34,3 (16,4; 40,2) ° Т, но достоверная разница в значениях отсутствовала (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. Действительно, разницы в рН фекалий выявлено не было, так как у впервые выявленных пациентов этот показатель был 6,5 (6; 6,5),

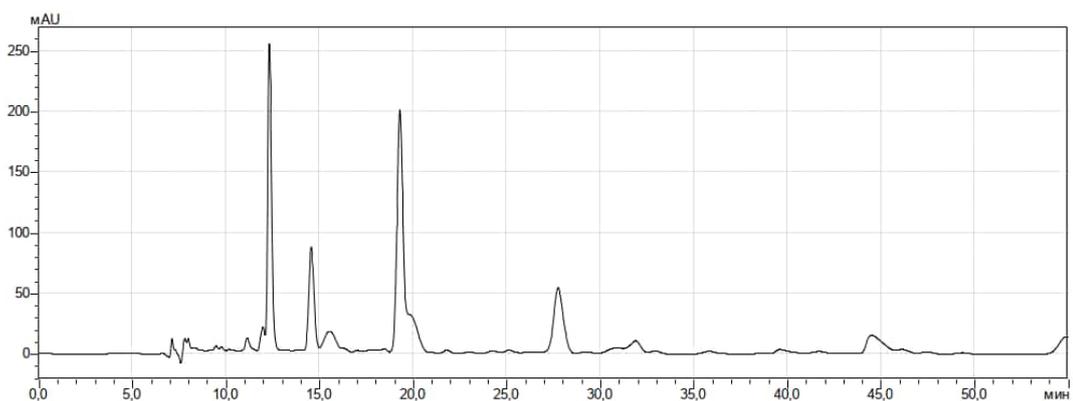
а при приеме противотуберкулезных препаратов, не смотря на развитие синдрома диспепсии составил 6,0 (6; 6,8) ($U=21$; $p=0,78$).

Установлено, что молочная кислота присутствует в культуральной жидкости как *E.faecalis*, так и *E.faecium* (Рисунок 11).

А



Б



В

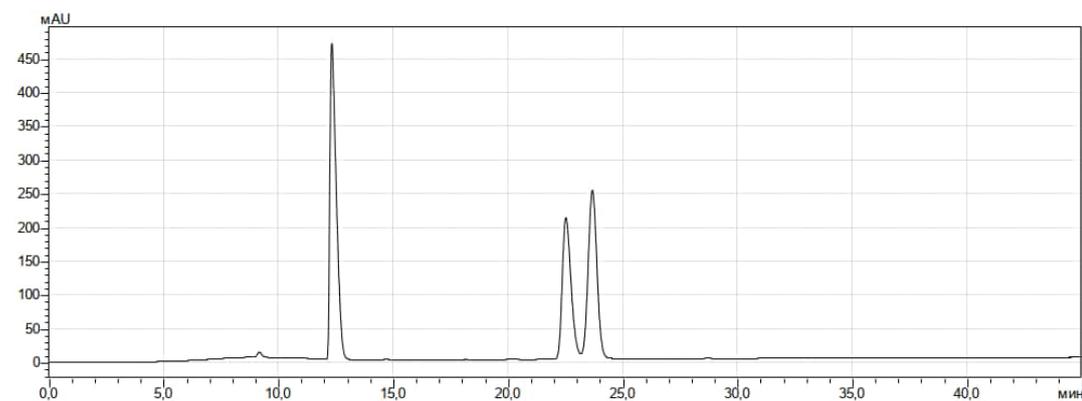


Рисунок 11 – Интегрированные хроматограммы культуральной жидкости энтерококков

Примечание: А- *E.faecalis*; Б-*E.faecium*, В – стандарт молочной кислоты

Согласно стандарту лактат элюируется с колонки между 10 и 15 минутой. Однако кроме лактата в экзометаболитах энтерококков обнаруживаются 2-оксо-3-фенилпропионовая ($R_f=19,7$) и 4 - аминобензойная кислоты ($R_f=31,32$). Известно, что 2-оксо-3-фенилпропионовая кислота является биохимическим предшественником фенилаланина, а с точки зрения межмикробных взаимоотношений данная кислота проявляет бактерицидные свойства к представителям грамположительной и грамотрицательной биоты, также к некоторым видам грибов. В большом количестве данный метаболит присутствует в культуральной жидкости *E.faecalis* (Рисунок 11).

Обнаруженная в экзометаболитах 4-аминобензойная кислота обладает амфифильными свойствами, за счет наличия центров кислотности и основности. Молекула способна к активной буферизации, так как по карбоксильной группе pK_a составляет 2,38, а по аминогруппе 4,85. Поэтому, за счет центра основности, данное соединение в первую очередь проявляет основные свойства, затем кислотные. Водный раствор 4-аминобензойной кислоты проявляет значения $pH = 3,5$, т.е. это соединение способствует поддержанию кислотности экзометаболита бактерий на определенном уровне, что обеспечивает стабильность бактериальной популяции. Кроме того, известно, что 4-аминобензойная кислота рассматривается как предшественник тетрагидрофолата и способствует стимулированию роста бифидо- и лактобактерий, что дополняет данные о роли энтерококков в микробных сообществах.

Скорость утилизации питательных веществ играет значительную роль в жизнедеятельности микроорганизмов и может обеспечить доминирование бактериальной популяции в биотопе. Так у фтизиатрических пациентов в кишечном микробиоме энтерококки обнаруживаются в большинстве случаев в составе ассоциации «*E.faecalis-E.faecium*» и не отличаются друг от друга по показателям адгезии, количественному содержанию. При этом возникает вопрос о метаболических взаимоотношениях при использовании одного и того же источника энергии, в частности, глюкозы.

В опытах были использованы по 50 штаммов *E.faecalis* и *E.faecium*, которые были выделены из кишечника пациентов с синдромом диспепсии. Критерием включения энтерококков в эксперименты *in vitro* было выделение энтерококков в ассоциациях друг с другом.

Установлено, что энтерококки не зависимо от вида имеют одинаковую скорость потребления глюкозы, которая составила у *E.faecalis* 0,01 ед. оп.пл. в час, у *E.faecium* 0,02 ед.оп.пл. в час ($p=0,06$). Через два часа культивирования *E.faecalis* на глюкозосодержащем субстрате отмечается некоторое увеличение оптической плотности бульона, что, вероятнее всего, связано с образованием микроорганизмами экзополисахаридов, являющихся основой биопленок. В состав большинства биопленок входят углеводы, поэтому оптическая плотность бульона увеличилась. Так, как энтерококки у фтизиатрических больных встречались в парах, то было проанализировано количество продуцируемой кислоты каждым из них.

Установлено, что 20% энтерококков в ассоциациях продуцировали молочную кислоту с одинаковым уровнем, в 44% случаев больше в количественном выражении кислоты синтезировали *E.faecium*, в 36% случаев – более высокий уровень кислотообразования имели *E.faecalis* (Рисунок 12).

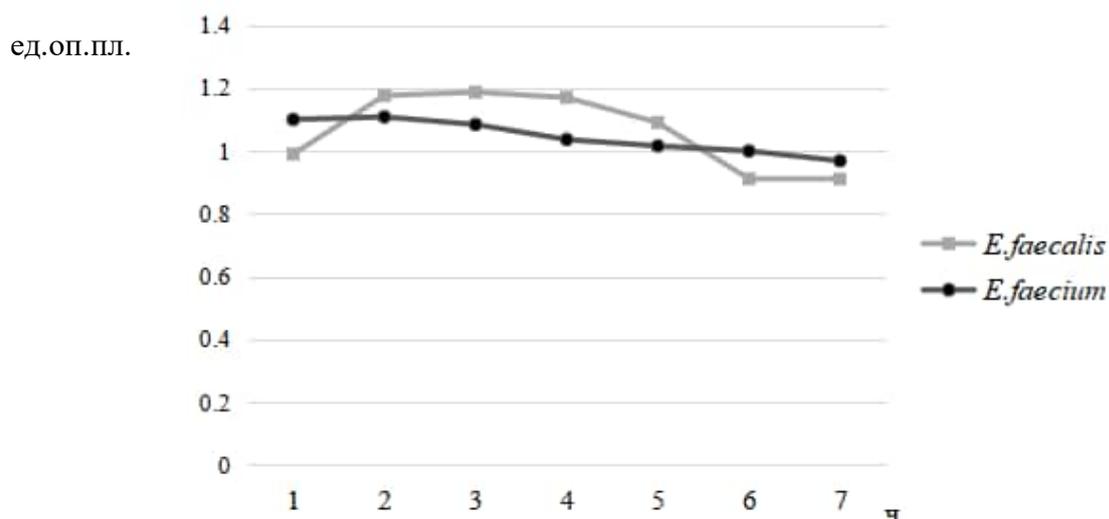


Рисунок 12 – Динамика изменений средних значений оптической плотности глюкозы при утилизации ее *in vitro* энтерококками

Сходство метаболической активности при катаболизме углеводов, в частности глюкозы, у энтерококков разных видов демонстрирует уровень кислотообразования, который у *E.faecalis* составил 50,38 (10,6; 80,4) °Т, у *E.faecium* 51,06 (15,15; 78,42) °Т (U=157; p=0,82) (Рисунок 13).

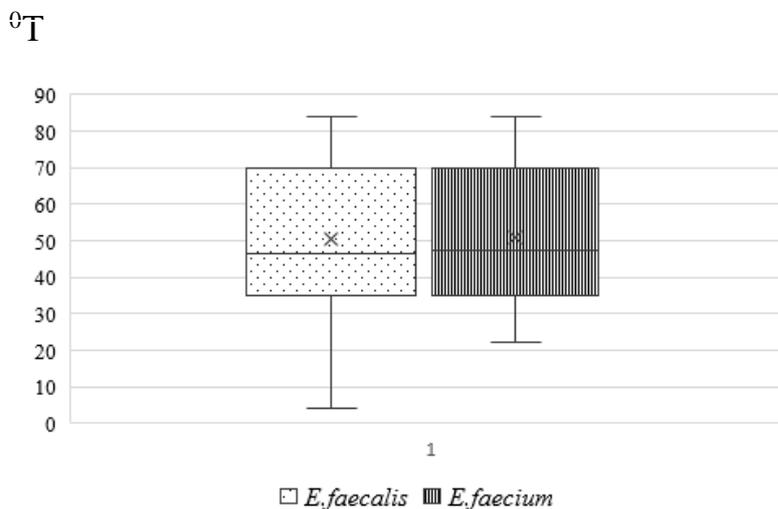


Рисунок 13 – Уровень кислотообразования при ферментации глюкозы у *E. faecalis* и *E. faecium* при количественном содержании бактерий 8 lg КОЕ/мл

При этом у монокультур энтерококков уровень кислотообразования был выше, чем и в ассоциациях «*E. faecalis* - *E. faecium*», что обусловлено, видимо, необходимостью поддержания определенного уровня кислотности среды в условиях вегетирования одного вида энтерококков. Эти данные демонстрируют видовую роль, функциональные и адаптационные возможности микроорганизмов в многокомпонентных микробных сообществах.

При совместном культивировании энтерококков средний показатель кислотности составляет 42,3 (39,4; 44,8) °Т, т.е. в ассоциации «*E. faecalis* - *E. faecium*» не происходит механического сложения уровня продуцируемой органической кислоты, а происходит регулирование, направленное на формирование оптимального для популяции энтерококков значения уровня кислотности среды. В этом основную роль, по нашему мнению, играет продукция амфифильных соединений, например 4-аминобензойной кислоты, которая проявляет основные или кислотные свойства, в зависимости от рН

среды. На рисунке 14 уровень кислотообразования у монокультур выше средних значений этого показателя в ассоциациях.

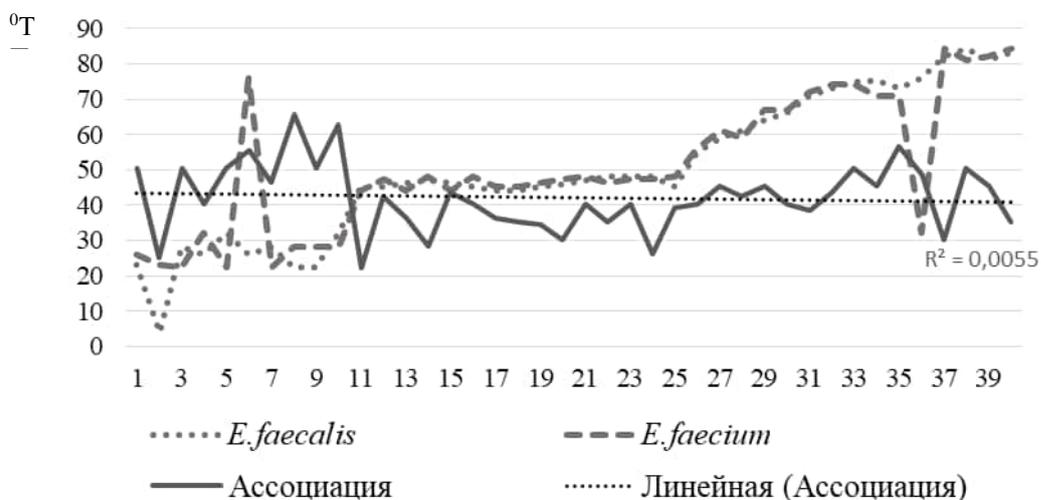


Рисунок 14 – Титруемая кислотность у монокультур и ассоциаций энтерококков (n=40)

Далее в опытах *in vitro* сравнили динамику утилизации глюкозы энтерококков и патогенных *S.aureus*. В опыт брали культуры, если они выделялись из кишечного микробиома от одного пациента (n=12 ассоциаций). Установлено, что при одинаковом количественном уровне энтерококков и стафилококков скорость ферментации глюкозы у *S.aureus* такая же, что и у энтерококков разных видов и составляет 0,01 ед.оп.пл. (U=278; p=0,46) (Рисунок 15).

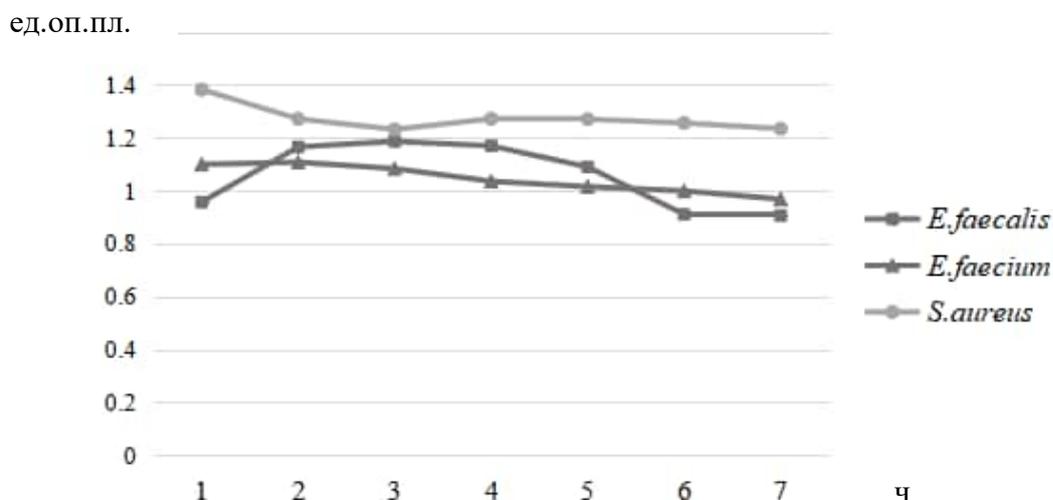


Рисунок 15 – Динамика средних значений оптической плотности глюкозы при утилизации ее *in vitro* энтерококками и *S.aureus*

Таким образом, энтерококки не формируют конкурентных метаболических отношений, как межвидовых, так и с патогенными представителями кокковой микробиоты, в частности с *S.aureus*. В ассоциациях между *E.faecalis* и *E. faecium* регистрируются партнерские межвидовые взаимоотношения, которые обусловлены сходной динамикой употребления глюкозы и уровнем продукции молочной кислоты.

3.4. Трофические взаимоотношения энтерококков с бифидобактериями при ферментации белков

В многокомпонентных микробных сообществах очень часто формируются различные трофические связи между микроорганизмами [14, 98, 100]. Это позволяет микробам использовать различные субстраты в качестве источников энергии. Способность энтерококков к молочно-кислому брожению свидетельствует об их принадлежности к одной из функциональных групп «филометаболического ядра микробиома», в частности к лактат-продуцирующим бактериям [53, 69]. Однако, у них также хорошо выражены протеолитические ферменты, которые нашли широкое применение в пищевой промышленности [14]. Представители рода *Bifidobacterium* протеолитическими свойствами не обладают, но, в тоже время, известно, что белковые гидролизаты способны стимулировать их рост и размножение, т.е. рассматриваются как «бифидогенные факторы» [38]. В связи с этим были проведены эксперименты *in vitro*, позволяющие изучить роль протеолитических ферментов энтерококков в подготовке субстрата для бифидобактерий. В качестве белоксодержащего субстрата был выбран казеин. Это обусловлено его наличием во всех молочных продуктах, широким его применением в медицине для парентерального питания, в том числе в спортивной, высоким содержанием казеина в грудном молоке. Сравнение протеолитической активности энтерококков проводили с трипсином и α -химотрипсином.

Трипсин — фермент класса гидролаз, расщепляющий пептиды и белки; обладает также эстеразной (гидролиз сложных эфиров) активностью. Трипсин

селективно гидролизует связи между остатками положительно заряженных аминокислот лизина и аргинина

α -Химотрипсин - пищеварительный фермент панкреатического сока, действующий в двенадцатиперстной кишке. Химотрипсин преимущественно расщепляет пептидные амидные связи, где боковая цепь аминокислоты (тирозин, триптофан и фенилаланин). Эти аминокислоты содержат ароматическое кольцо в своей боковой цепи, которое помещается в гидрофобный карман (положение S1) фермента.

Установлено, что под влиянием супернатантов *E.faecalis* казеин подвергался гидролизу, при этом формировались 9 фракций (Рисунок 16).

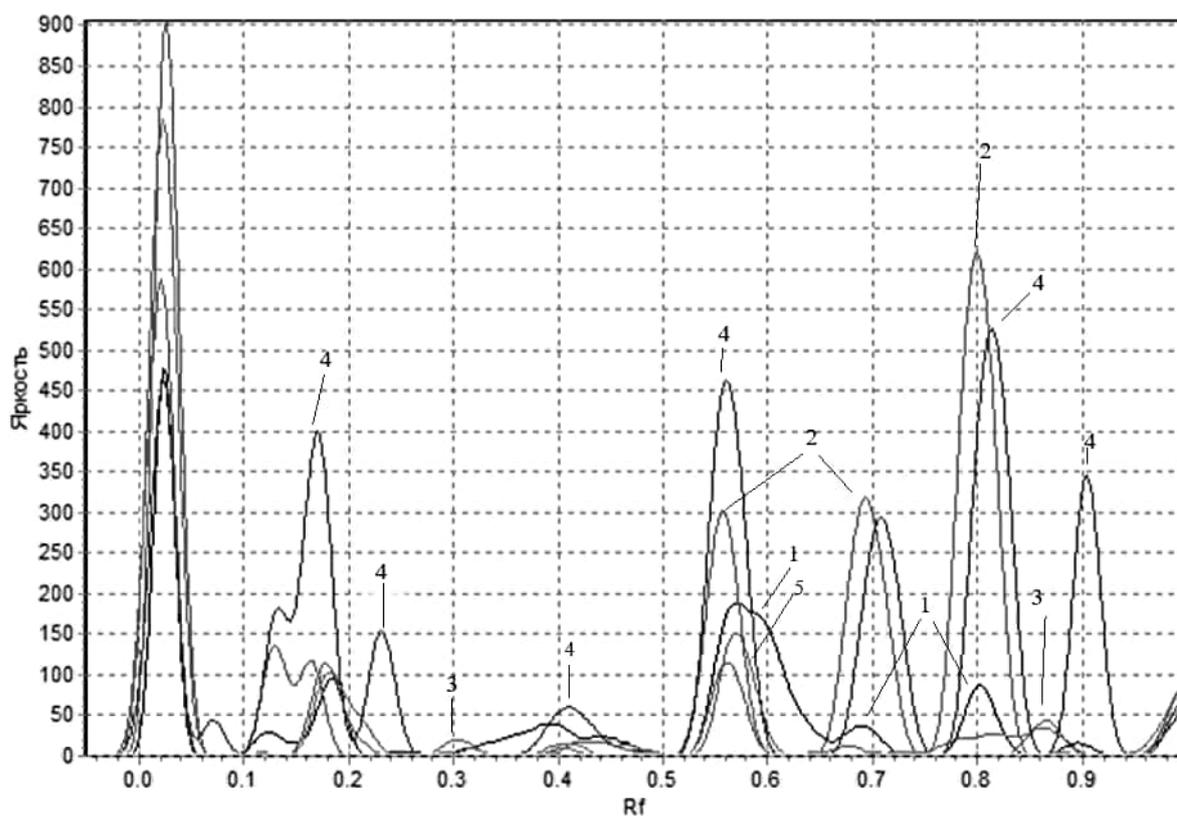


Рисунок 16 - Денситограмма казеина, подвергнутого ферментативному гидролизу

Примечание: 1 контроль; 2 – α -химотрипсин; 3 – гидролиз ферментами *E.faecium* штамм 60; 4 – гидролиз ферментами *E.faecalis* штамм 64; 5 – трипсин

Действие 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 появляются пики продуктов гидролиза 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.

Далее изучали влияние продуктов протеолиза казеина на бифидобактерии, так как по данным литературы аминокислоты могут использоваться этими бактериями как источники питания [94]. В экспериментах в качестве источников энергии использовали только продукты протеолиза казеина, без добавления углеводовсодержащих субстратов. Установлено, что продукты гидролиза казеина, полученные при обработке субстрата экзометаболитами *E. faecalis*, стимулировали размножение *Bifidobacterium bifidum* 791 с той же интенсивностью, что и продукты гидролиза казеина при использовании α -химотрипсина (Рисунок 17).

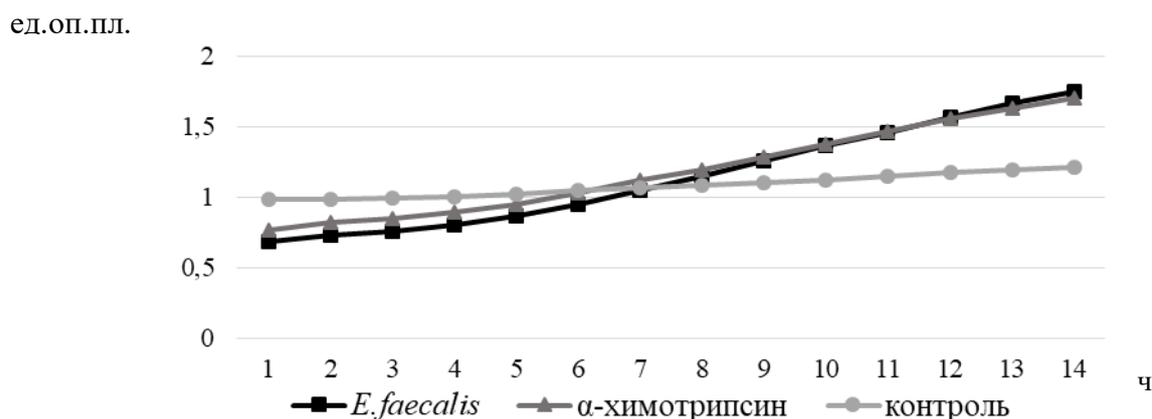


Рисунок 17 – Кинетика роста оптической плотности бульонной культуры *B. bifidum* 791 на гидролизате казеина, полученного при использовании α -химотрипсина и ферментов *E. faecalis*

Динамика нарастания оптической плотности бульонной культуры бифидобактерий под влиянием продуктов гидролиза трипсина была выше, чем при использовании ферментов *E.faecalis* (Рисунок 18).

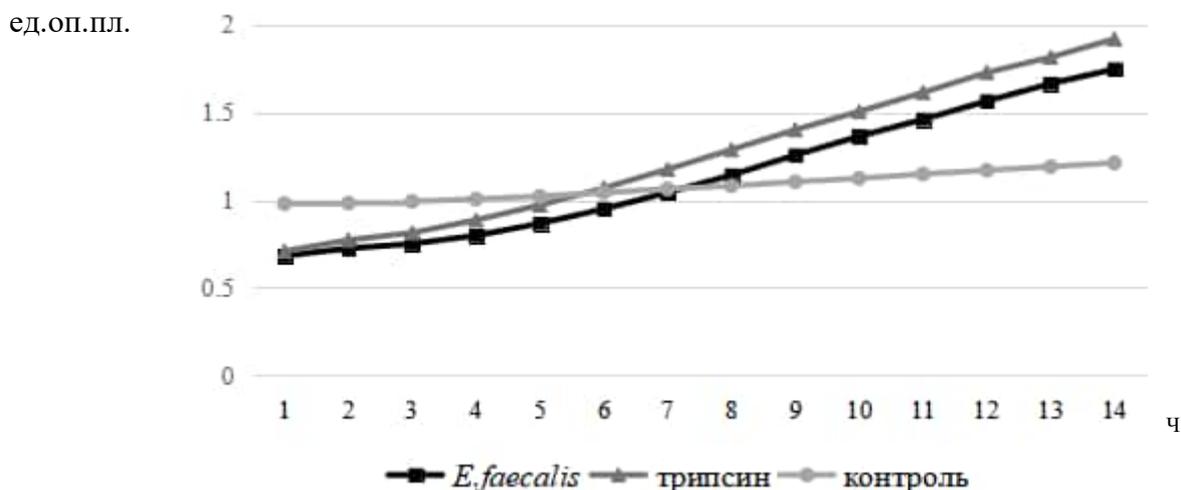


Рисунок 18 – Кинетика роста оптической плотности бульонной культуры *B. bifidum* 791 на гидролизате казеина, полученного при использовании трипсина и ферментов *E. faecalis*

Аналогичные тенденции наблюдали в отношении белковых гидролизатов, полученных при использовании пищеварительных ферментов и протеаз *E. faecium* (Рисунок 19).

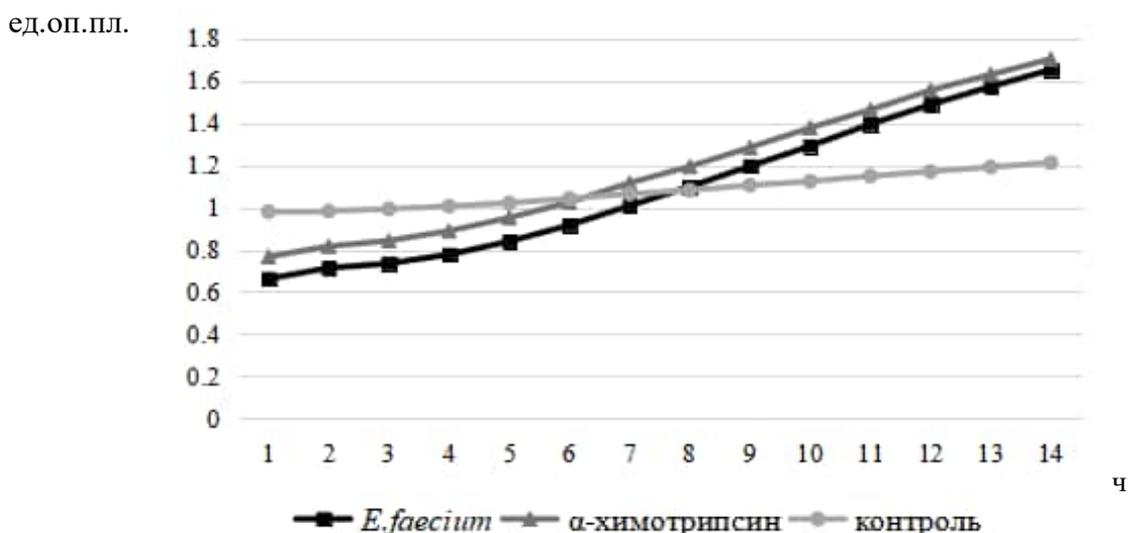


Рисунок 19 – Кинетика роста оптической плотности бульонной культуры *B. bifidum* 791 на гидролизате казеина, полученного при использовании α -химотрипсина и ферментов *E. faecium*

Однако, относительно контроля (рост в среде без добавления белковых гидролизатов), во всех экспериментальных образцах отмечали более быстрое нарастание оптической плотности бульонной культуры, что, видимо, обусловлено способностью бифидобактерий использовать аминокислоты в качестве источников энергии (Рисунок 20).

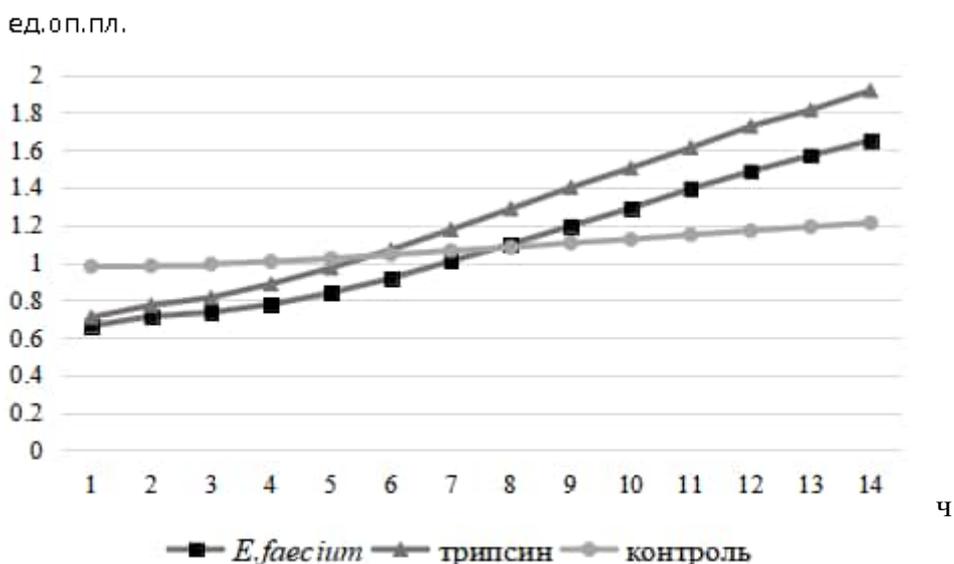


Рисунок 20 – Кинетика роста оптической плотности бульонной культуры *B. bifidum* 791 на гидролизате казеина, полученного при использовании трипсина и ферментов *E. faecium*

Отсутствие на графиках кривой экспоненциального роста обусловлено, вероятно, тем, что аминокислоты и пептиды не являются основным энергетическим субстратом для бифидобактерий, поэтому скорость роста низкая. Если учесть, что в условиях микробиоценоза бифидобактерии используют «смешанные» субстраты, включающие различные углеводы, то наличие дополнительного источника энергии в виде белкового гидролизата позволяет им достигать высоких количественных уровней и конкурировать с условно-патогенной микробиотой.

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

3.5. Механизмы и факторы взаимодействия энтерококков с грибами рода *Candida*

В кишечном микробиоме пациентов с туберкулезом легких отмечается высокая частота встречаемости грибов рода *Candida*, что обуславливает у них высокие риски развития кандидоза. Однако у пациентов с монотуберкулезной инфекцией количественный уровень грибов невысокий и составляет 3,6-3,7 lg КОЕ/г, что, возможно, обусловлено регулирующим влиянием на популяцию грибов доминантной бактериальной микробиоты. В настоящее время характер взаимодействия и факторы антагонизма бифидобактерий и лактобацилл в отношении грибов известны [31, 106, 123], активно изучаются взаимоотношения грибов с условно-патогенными энтеробактериям [17, 20, 82], но роль энтерококков в контроле над популяцией грибов *Candida* еще изучена недостаточно [18, 63]. В связи с этим были изучены взаимодействия энтерококков с грибами рода *Candida*.

В целом при изучении антагонистической активности энтерококков по отношению к *Candida spp.* установлено отсутствие прямого антагонизма, тогда была исследована скорость утилизации глюкозы - основного энергетического субстрата для микроорганизмов, так как конкуренция за пищевые субстраты и скорость их утилизации являются одной из форм взаимодействия в многокомпонентных микробных сообществах. Так как регистрацию оптической плотности глюкозы в растворе начинали через час, после инокуляции микроорганизмов в бульон скорость выделения гликолитических ферментов у энтерококков выше, чем у грибов, так как оптическая плотность субстрата через час от начала опыта составила 0,96 ед.оп.пл. у *E.faecalis*, 1,1 ед. оп.пл. у *E.faecium* и 1,38 у грибов *C. albicans*.

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).

Поэтому через 6 часов культивирования оптическая плотность раствора глюкозы в присутствии *C.albicans* падала до нуля, т.е. энтерококки не являлись

конкурентами для микромицетов в утилизации углеводсодержащих субстратов (Рисунок 21).

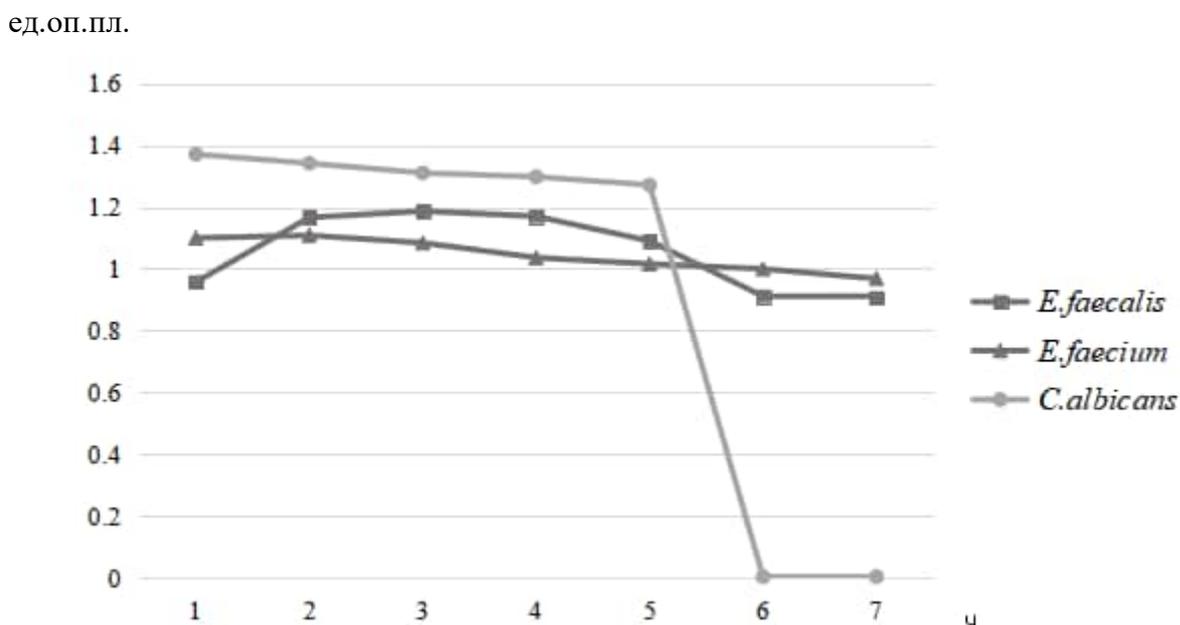


Рисунок 21 – Динамика средних значений оптической плотности глюкозы при утилизации ее *in vitro* энтерококками и *C. albicans*

Однако необходимо отметить, что размер клеток грибов рода *Candida* в зависимости от условий и фазы жизненного цикла в 3-10 раз больше, чем клетки энтерококков, поэтому при одинаковых количественных уровнях микросимбионтов скорость утилизации глюкозы и количество продуцируемых ферментов будет выше у грибов.

Грибы рода *Candida* являются аэробными микроорганизмами, поэтому они обладают ферментами антиоксидантной защиты, в частности каталазой. В настоящее время известна способность индигенной лакто- и бифидобиоты подавлять активность каталазы у *S. aureus* [70], что препятствует образованию ими биопленок. В нашем исследовании были поставлены эксперименты *in vitro* по оценке влияния супернатантов (экзометаболитов) энтерококков (n=26) на активность каталазы грибов *C. albicans* (n=26), как доминирующего вида в структуре микромицетов у пациентов с туберкулезом легких. Качественные и количественные изменения каталазной активности у грибов *C. albicans* показаны в таблице 2.

Таблица 2 - Изменения каталазной активности у *C.albicans* под влиянием экзометаболитов *E.faecalis* (M±SD)

| № | Исходный уровень каталазы, микромоль/мин ОД, контроль | Уровень каталазы после обработки экзометаболитами, микромоль/мин ОД, опыт | Изменение каталазной активности (Δ) в % |
|--|---|---|--|
| Уменьшение активности каталазы | | | |
| 1. | 1,09±0,03 | 0,57±0,02 | 47,7 |
| 2. | 1,26±0,04 | 0,53±0,02 | 57,9 |
| 3. | 0,56±0,05 | 0,25±0,03 | 55,4 |
| 4. | 1,42 ±0,03 | 0,75±0,02 | 47,2 |
| 5. | 1,28±0,05 | 0,65±0,03 | 49,2 |
| 6. | 0,93±0,05 | 0,37±0,04 | 60,2 |
| 7. | 1,07±0,04 | 0,47±0,02 | 56,1 |
| 8. | 1,05±0,04 | 0,65±0,08 | 38,1 |
| 9. | 0,87±0,05 | 0,35±0,02 | 59,8 |
| 10. | 1,41±0,02 | 0,74±0,03 | 47,5 |
| 11. | 1,14±0,05 | 1,09±0,01 | 4,40 |
| 12. | 1,11±0,05 | 0,75±0,03 | 32,4 |
| 13. | 0,90±0,07 | 0,72±0,02 | 20,0 |
| 14. | 0,86±0,04 | 0,43±0,02 | 50,0 |
| 15. | 0,77±0,03 | 0,33±0,02 | 57,1 |
| 16. | 0,87±0,03 | 0,23±0,02 | 73,6 |
| 17. | 1,06±0,03 | 0,26±0,05 | 75,5 |
| Повышение активности каталазы | | | |
| 18. | 0,57±0,31 | 1,17±0,07 | 105,3 |
| 19. | 0,78±0,08 | 1,16±0,04 | 48,7 |
| 20. | 0,74±0,07 | 1,09±0,03 | 47,3 |
| 21. | 0,13±0,02 | 0,57±0,09 | 338,5 |
| Активность каталазы не изменялась | | | |
| 22. | 0,78±0,01 | 0,78±0,03 | 0,00 |
| 23. | 1,17±0,05 | 1,18±0,03 | 0,00 |
| 24. | 0,98±0,03 | 0,97±0,03 | 0,00 |
| 25. | 0,56±0,11 | 0,45±0,01 | 0,00 |
| 26. | 0,42±0,02 | 0,43±0,02 | 0,00 |

В опытах были использованы пары «*E.faecalis-C.albicans*», полученные от одного пациента, для того, чтобы нивелировать эффект «свой-чужой». Выявлено три типа воздействия экзометаболитов энтерококков на каталазу грибов *C.albicans*: ингибирование, повышение активности и нейтральное воздействие. Экзометаболиты *E.faecalis* у 65,4% штаммов грибов ингибировали каталазу, у 19,2% *C.albicans* каталазная активность не изменялась и только у 15,4% культур микромицетов активность антиоксидантного фермента

возрастала. Отмечали достоверные различия в уровнях каталазы у интактных и обработанных экзометаболитами культур *C.albicans* (Таблица 2). Так до воздействия экзометаболитов активность каталазы у грибов составила 1,03 (0,88; 1,14) мкмоль/мин оптической плотности (ОП), после воздействия экзометаболитов *E. faecalis* продукция каталазы была на уровне 0,55 (0,36; 0,73) мкмоль/мин ОП (U= 237; p=0,03). В среднем каталазная активность у *C. albicans* снижалась на 46,1% (p=0,041).

Таким образом, при равных количественных уровнях энтерококки не являются метаболическими конкурентами грибов рода *Candida* в связи с более низкой скоростью утилизации глюкозы бактериями. *E.faecalis* проявляют непрямой антагонизм по отношению к микромицетам, так как под влиянием их экзометаболитов у грибов на 46,1% снижается уровень продукции основного антиоксидантного фермента - каталазы, что можно рассматривать как способ регуляции энтерококками грибковой популяции в многокомпонентном микробном сообществе.

3.6. Заключение по главе «Биологические свойства энтерококков. Взаимодействия с кишечными микросимбионтами при туберкулезной инфекции»

У пациентов с туберкулезом легких в кишечном микробиоме вегетируют ассоциация «*E.faecalis-E.faecium*». Они колонизируют слизистую кишечника с частотой 89-94% с титрами 5,7 lg КОЕ. Колонизационный потенциал после развития декомпенсированных микроэкологических нарушений у энтерококков не изменяется, т.е. сохраняются высокая частота их обнаружения и исходные показатели количественных уровней. Как до старта этиотропной терапии, так и после назначения противотуберкулезных препаратов энтерококки проявляют преимущественно среднюю адгезивную активность. Штаммы энтерококков, фенотипически проявляющие ферменты инвазии, чаще встречаются среди *E.faecalis*, особенно при развитии декомпенсированных микроэкологических нарушений.

Показано, что протеазы *E.faecalis* и *E.faecium* способны расщеплять казеин, подобно пищеварительному ферменту α -химотрипсину и трипсину. Продукты энтерококкового протеолиза казеина стимулируют размножение *in vitro* *B. bifidum*, что свидетельствует о синтрофных связях энтерококков и бифидобактерий в многокомпонентном кишечном сообществе микроорганизмов.

В опытах *in vitro* показано, что при метаболизме глюкозы энтерококки разных видов вступают в партнерские взаимоотношения, имея одинаковую скорость ее утилизации, а также в ассоциациях они продуцируют сходное количество молочной кислоты, направленное на поддержание кислотности среды. На примере глюкозы установлено наличие метаболической конкуренции за углеводсодержащие субстраты между энтерококками и грибами *C.albicans*. При равных количественных уровнях микросимбионтов глюкозу быстрее утилизируют грибы. Однако, на примере *E.faecalis*, установлена их способность изменять уровень продукции каталазы у *C.albicans*. В большинстве случаев экзометаболиты *E.faecalis* ингибируют каталазную активность микромицетов в среднем на 46%, это можно расценивать как вариант непрямого антагонизма со стороны энтерококков.

ГЛАВА 4. ЭНТЕРОКОККИ, КАК ИНДИКАТОРЫ ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ ЭФФЕКТОВ КОРРЕКЦИИ КИШЕЧНОГО МИКРОБИОМА ПРОБИОТИЧЕСКИМИ БАКТЕРИЯМИ

В настоящее время про- синбиотические препараты широко используются в составе комбинированной терапии многих инфекционных и неинфекционных заболеваний [23, 24]. Это обусловлено тем, что про- синбиотики устраняют побочные явления антибактериальной, противоопухолевой терапии, снижают риск осложнений, значительно улучшая результаты лечения [109, 119]. В рандомизированных контролируемых исследованиях показано, что пробиотики способны снизить частоту и продолжительность COVID-19, других респираторных инфекций и пневмоний [64, 122]. Кроме того, пробиотические бактерии рассматриваются как иммунокорректоры, так как под их влиянием изменяются показатели врожденного иммунитета, прежде всего мукозального [29], они оказывают выраженное противовоспалительное действие [5, 65].

Исследования показали, что пациенты с туберкулезом легких и множественной лекарственной устойчивостью возбудителя, еще до назначения им противотуберкулезного лечения имеют глубокие дисбиотические нарушения кишечного микробиома, но эти изменения микробиоты клинически не проявляются, т.е. имеет место компенсированные микрoэкологические расстройства. Прием этиотропных препаратов очень быстро приводит к развитию декомпенсации нарушений, что сопровождается развитием диспептического синдрома. Иногда диспепсия настолько выражена, что это приводит к отказу от противотуберкулезной терапии. Это свидетельствует о целесообразности введения в схемы лечения фтизиатрических пациентов биопрепаратов на основе живых микроорганизмов, восстанавливающих микробиом, с последующей оценкой эффективности их применения.

Настоящая глава посвящена микробиологической и клинической оценке результатов коррекции микробиома пациентов с туберкулезом легких

препаратом, содержащим пробиотические бактерии и оценке биологических свойств энтерококков.

4.1. Влияние приема пробиотических бактерий на качественный и количественный состав кишечной микробиоты

Для оценки влияния приема пробиотических бактерий на результаты лечения больных с туберкулезом легких 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, *P.freudenreichii*. Также в состав препарата входил пребиотический компонент - инулин.

Сопоставимость групп пациентов по возрасту, полу, клинико-лабораторным данным представлена в таблице 3.

Таблица 3 - Характеристика групп пациентов при оценке эффективности приема синбиотического препарата для коррекции микробиома

| Признак | Основная группа (ПТП*+синбиотик) n=35 | Группа сравнения (ПТП) n=36 | Достоверность достигнутых различий |
|---|---|-----------------------------------|--|
| Мужчины, абс. ч (отн. %) | 23 (65,7) | 28 (77,8) | p=0,12 |
| Женщины, абс. ч (отн. %) | 12 (34,3) | 8 (22) | p=0,13 |
| Средний возраст (г) (M±m) | 40±2 | 44±3 | p=0,87 |
| Бактериовыделение абс.ч (отн.%) | 29 (82,9) | 29 (80,5) | p=0,89 |
| ВИЧ+, абс. ч (отн. %) | 20 (57,1) | 20 (55,6) | p=0,92 |
| Уровень CD 4+ (Me (25; 75)) | 268 (232; 311) | 292 (205; 387) | p=0,16 |
| Количество принятых доз ПТП (M±m) | 37,6±5 | 34,4±2 | p=0,126 |

Примечание: * ПТП – противотуберкулезные препараты

В структуре клинических форм преобладал диссеминированный туберкулез – он был диагностирован у 14 человек (40%) в основной группе и

у 16 человек (44%) в группе сравнения; инфильтративный туберкулез у 13 человек (37%) и 15 человек (42%) соответственно; туберкулез внутригрудных лимфоузлов был у 2 человек (6 % и 5 %) в каждой группе; казеозная пневмония у 3 человек (8%) в основной группе и единичный случай (3%) в группе сравнения; у 2 (6%) человек основной группы фиброзно-кавернозный туберкулез легких в и у 1 человека (3%) в группе сравнения; туберкулома была выявлена у 1 человека (3%) в каждой группе. В сравниваемых группах отсутствовала статистическая разница в структуре клинических форм туберкулеза ($\chi^2 = 0,587$, $df=5$, $p=0,31$).

Назначение этиотропных препаратов пациентам осуществлялось согласно Клиническим рекомендациям [49]. Это были препараты II ряда, назначались по IV режиму, все схемы лечения подбирались персонализировано на основании исследования генотипической и фенотипической лекарственной чувствительности выделенного возбудителя туберкулеза. В схемах химиотерапии присутствовали следующие ПТП: фторхинолоны (спарфлоксацин – 200 мг) принимали 35 человек (100%) в основной группе, 24 человека (70%) в группе сравнения; протионамид (15-20 мг/кг) 29 человек (82%) основной группы и 28 человек (84%) в группе сравнения; бедаквилин (400 мг) ежедневно в течение 2 недель, затем по схеме - 20 человек (66%) и 22 (61%) человека соответственно; капреомицин (15-20 мг/кг) 20 человек (57%) и 21 человек (58%) соответственно; циклосерин (10-15 мг/кг) по 19 человек в каждой группе (54%) и (58%) соответственно; пипразинамид (20-30 мг/кг) 10 (28,6 %) человек в основной группе и 11 (30,5 %) человек в группе сравнения; аминосалициловую кислоту (по 8000 мг) 8 человек (23%) основной группы и 9 человек (27 %) группы сравнения, теризидон (10-15 мг/кг) 6 человек (17%) и 7 человек (19%) соответственно, линезолид (600 мг/кг) по 6 человек в каждой группе (17%); этамбутол (15-25 мг/кг) по 3 человека (9%) в сравниваемых группах.

Прием синбиотического консорциума пациенты осуществляли под контролем медицинского персонала. Режим приема - по 1 капсуле 2 р/сут

в течение 21 дня. При выборе мультиштаммового синбиотика руководствовались рекомендациями Российской гастроэнтерологической ассоциации [23] для коррекции микробиоценоза при приеме антимикробных препаратов. Биологические свойства пробиотических бактерий: количественное содержание: *Bifidobacterium spp.* - $2,2 \times 10^9$ КОЕ/г, *Lactobacillus spp.* - $2,6 \times 10^9$ КОЕ/г; *Propionibacterium spp.* - 8×10^8 КОЕ/г; адгезивная активность (ИАМ) - 2,2 ед.; титруемая кислотность - 111,4⁰Т. Прямой антагонизм к условно-патогенным бактериям отсутствовал. Выбор препарата базировался на метаболических эффектах синбиотического консорциума, реализующегося через стимуляцию микробиоты пациента и создающего благоприятную среду для функционирования кишечных микросимбионтов больных туберкулезом легких.

Результаты приема синбиотика у пациентов, принимающих комбинированную терапию (противотуберкулезные препараты II ряда + синбиотик) (основная группа) сравнивали с пациентами (группа сравнения), которые принимали только противотуберкулезные препараты. Установлено, что у пациентов, принимавших синбиотик, частота обнаружения резидентной кишечной микробиоты не изменилась. Так, бифидобактерии выделяли у всех пациентов, лактобациллы у 91,5%, типичные кишечные палочки у 80%, энтерококки у 89% пациентов основной группы. У пациентов, принимавших только противотуберкулезные препараты, эти показатели были 100%, 89%, 78%, 93% соответственно ($p > 0,05$). После курса пробиотикотерапии отмечали тенденцию к увеличению среднего содержания бифидобактерий ($U=587$, $p=0,07$), типичных кишечных палочек ($U=654$, $p=0,08$), но достоверно увеличились только титры лактобацилл ($U=449$; $p=0,05$). Это показывает быстрое ингибирование количественного уровня *Lactobacillus* под влиянием неблагоприятных факторов, в частности, противотуберкулезных средств, и возможность быстрого восстановления их титров с помощью бактериальных биопрепаратов. Такие микросимбионты, как бифидобактерии, энтерококки являются более устойчивыми к действию противотуберкулезных препаратов,

но и для восстановления их количественного содержания одного курса пробиотикотерапии недостаточно (Рисунок 22).

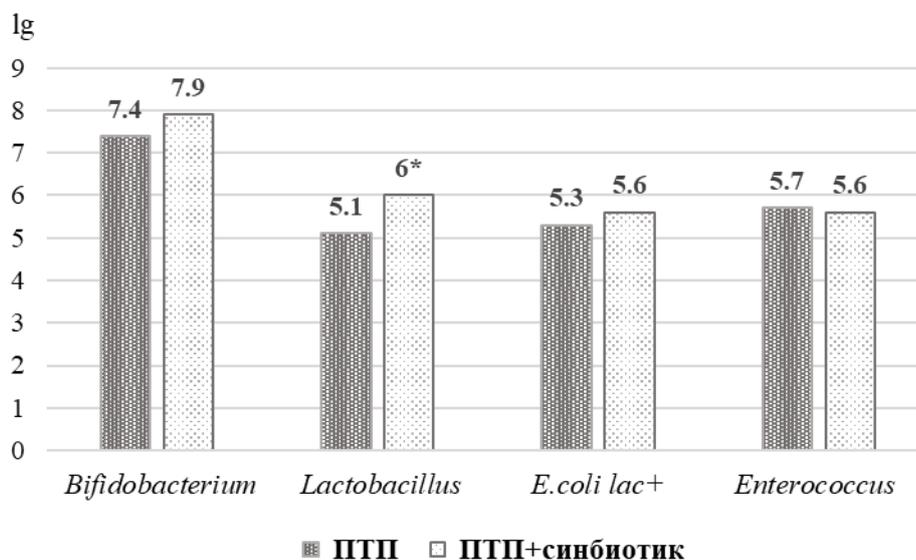


Рисунок 22 – Средние титры постоянной кишечной микробиоты у пациентов с туберкулезом легких при использовании разных схем лечения

Примечание: * - достигнутый уровень значимости различий $p=0,02$

После курса терапии пробиотическими штаммами была низкой частота обнаружения большинства патогенных и условно-патогенных энтеробактерий ($p>0,05$) (Рисунок 23).

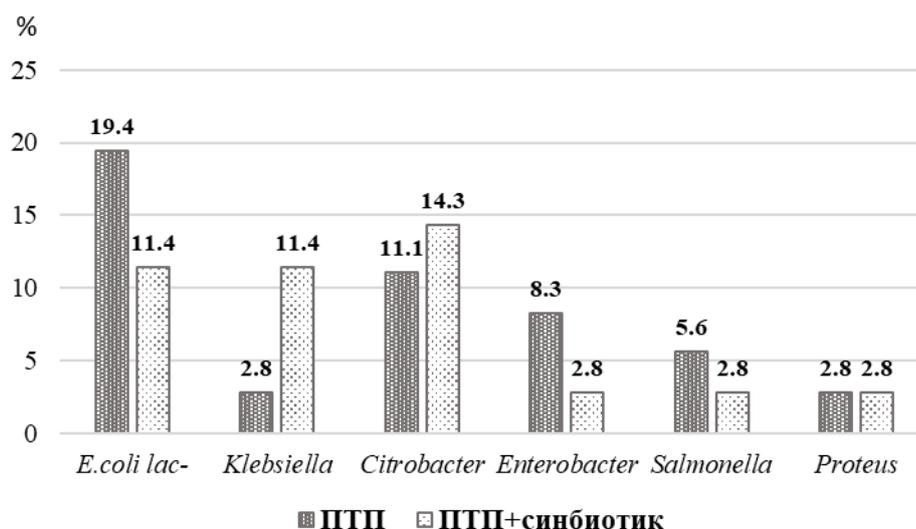


Рисунок 23 – Частота обнаружения патогенных и условно-патогенных энтеробактерий у пациентов с туберкулезом легких при использовании разных схем лечения

Средние значения количественного содержания представителей семейства *Enterobacteriaceae* у пациентов, находящихся на комбинированной терапии, составили 4 (4; 6) lg КОЕ/г. Отмечали также более низкие частоты и уровни *Staphylococcus*: 64% и 51,5% ($\chi^2 = 1,13$, $df=1$, $p=0,89$) и 3 (1; 4) lg КОЕ/г и 2,2 (1; 3) lg КОЕ/г ($U=711$; $p=0,38$) соответственно.

Установлено, что у больных, принимавших синбиотический препарат, достоверно уменьшался уровень грибов рода *Candida*, снижалась частота встречаемости этих микромицетов. У пациентов, принимавших противотуберкулезные препараты+синбиотик, эти микромицеты колонизировали кишечник 54,3% пациентов 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.

Далее оценили клиническую эффективность приема синбиотического препарата. Среди пациентов, принимавших синбиотик, 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% ($\chi^2 = 5,5$, $df=1$, $p=0,019$)). Частота жалоб на метеоризм ($p=0,483$), запор ($p=0,289$) и болевой синдром ($p=0,188$) не отличалась.

Таким образом, назначение пациентам курса синбиотических бактерий при терапии противотуберкулезными препаратами второго ряда, способствует формированию более высоких титров лактобацилл, снижению частоты и уровней колонизации грибами рода *Candida*, что клинически сопровождается уменьшением числа жалоб пациентов на диарею, тошноту/рвоту.

4.2. Изменение жирнокислотного состава мембраны энтерококков

В литературе описано немного случаев по использованию синбиотических препаратов в комплексном лечении больных с туберкулезом с множественной лекарственной устойчивостью микобактерий [4, 42].

При этом чаще упоминаются клинические эффекты коррекции кишечного микробиома пробиотическими штаммами в данной когорте пациентов, но не показаны молекулярные критерии эффективности проводимой терапии, не

выделены микроорганизмы, которые могли бы использоваться как индикаторы положительных эффектов терапии. Для понимания характера воздействия пробиотических штаммов на состав и функциональное состояние всей индигенной микробиоты проведена оценка структурно-функциональных свойств энтерококков, как резидентов фекального биотопа.

В целом количественный уровень энтерококков разных видов не отличался. В группе пациентов, не принимавших синбиотический препарат, количественный уровень *E.faecalis* составил 5,5 (5,0; 6,0) lg КОЕ/г, *E.faecium* 5,6 (5,0; 6,0) lg КОЕ/г. В группе сравнения, титры энтерококков составили 5,3 (4,0; 7,0) lg КОЕ/г ($p=0,81$) и 5,7 (5,0; 7,0) lg КОЕ/г ($p=0,95$) соответственно.

После приема синбиотика среди энтерококков регистрируется более низкое число штаммов с ферментами инвазии. У больных, принимавших только противотуберкулезные препараты, 10% штаммов были цитолизинпродуцирующими, у пациентов с комбинированной терапией (ПТП+синбиотик) энтерококков с цитолизинами выделено не было. После синбиотика регистрировали низкое число штаммов энтерококков, продуцирующих липазу (8,8% против 18,6%, $p=0,05$) и с протеолитической активностью (2% против 12%, $p=0,005$).

Большое значение в жизнедеятельности любого микроорганизма играет состояние клеточной мембраны, которое определяется преимущественно жирными кислотами – составом и содержанием [2, 55]. Состав и свойства кишечных микросимбионтов регулируется биоактивными молекулами экзометаболизма резидентов кишечного биотопа – бифидобактериями и лактобациллами, пропионибактериями [65]. Эти анаэробные бактерии входили в состав синбиотического препарата, поэтому была проведена оценка их влияния на биологические свойства энтерококков. Состав и содержание жирных кислот бактериальной мембраны у представителей рода *Enterococcus* стали предметом исследования на данном этапе (Таблица 4).

Таблица 4 – Характеристика жирных кислот у *Enterococcus spp.* от пациентов с туберкулезом легких (в мкг на 0,01 г сухого остатка)

| Химическая формула | Название жирной кислоты (тривиальное) | <i>Enterococcus faecalis</i> (n=5) | | <i>Enterococcus faecium</i> (n=5) | |
|------------------------------------|---|------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|
| | | ПТП | ПТП +синбиотик | ПТП | ПТП +синбиотик |
| Насыщенные жирные кислоты | | 0,06851 | 0,0712 | 0,0780 | 0,0737 |
| C12:0 | Лауриновая | 0,0012 (0,001; 0,002) | 0,0011 (0,0008; 0,0013) | 0,0013 (0,0007; 0,002) | 0,011** (0,009; 0,013) |
| C14:0 | Миристиновая | 0,0137 (0,009; 0,0016) | 0,0237 (0,020; 0,028) | 0,0203 (0,016; 0,028) | 0,010 (0,006; 0,014) |
| C15:0 | Пентадециловая | 0,0011 (0,0007; 0,0015) | 0,0010 (0,0007; 0,001) | 0,0021 (0,001; 0,003) | 0,0021 (0,001; 0,003) |
| C16:0 | Пальмитиновая | 0,0422 (0,021; 0,046) | 0,0332 (0,027; 0,035) | 0,0394 (0,021; 0,042) | 0,0321 (0,028; 0,04) |
| C17:0 | Маргариновая | 0,00011 (0,000; 0,0001) | 0,0011* (0,0005; 0,0013) | 0,0012 (0,0008; 0,002) | 0,0021 (0,001; 0,004) |
| C18:0 | Стеариновая | 0,0079 (0,006; 0,009) | 0,0069 (0,005; 0,008) | 0,0101 (0,005; 0,024) | 0,0142 (0,011; 0,016) |
| C22:0 | Бегеновая | 0,0011 (0,0005; 0,002) | 0,0019 (0,001; 0,004) | 0,0012 (0,0009; 0,0025) | 0,0011 (0,0008; 0,0012) |
| C23:0 | Трикоциловая | 0,0012 (0,00098; 0,002) | 0,0011 (0,0008; 0,002) | 0,0023 (0,001; 0,003) | - |
| C24:0 | Лигноцериновая | - | 0,0012 (0,0006; 0,002) | 0,00011 (0,0001; 0,0002) | 0,0011* (0,0007; 0,0015) |
| Ненасыщенные жирные кислоты | | 0, 0546 | 0,0787 | 0,074 | 0,0775 |
| C14:1 | Миристолеиновая | 0,0012 (0,0008; 0,0012) | 0,0023 (0,001; 0,004) | 0,0011 (0,0007; 0,002) | 0,0012 (0,0008; 0,002) |
| 7-C16:1 | <i>Цис</i> -7-Пальмитолеиновая | 0,0013 (0,0009; 0,001) | 0,0011 (0,0008; 0,002) | 0,0033 (0,001; 0,004) | 0,0064* (0,005; 0,0068) |
| 9-C16:1 | <i>Цис</i> -9-Пальмитолеиновая | 0,0121 (0,010; 0,014) | 0,010 (0,007; 0,02) | 0,0084 (0,006; 0,009) | 0,0011** (0,0007; 0,002) |
| 7-C18:1 | <i>Цис</i> 7-вакценовая | 0,0024 (0,0017; 0,0022) | 0,0031 (0,001; 0,004) | 0,0042 (0,003; 0,0045) | - |
| 9-C18:1 | Олеиновая | 0,0023 (0,001; 0,0023) | 0,0231* (0,01; 0,031) | 0,0272 (0,01; 0,032) | 0,0552* (0,042; 0,065) |
| C18:1 | Элаидиновая | 0,010 (0,0095; 0,012) | 0,0074 (0,005; 0,008) | 0,0082 (0,006; 0,009) | 0,0041 (0,001; 0,0047) |
| C18:2 | Линолевая | - | 0,0012 (0,001; 0,002) | 0,0011 (0,0006; 0,002) | 0,0042* (0,003; 0,005) |
| C19:1 | <i>Цис</i> -нонадекаен-10,13-овая | 0,0232 (0,01; 0,028) | 0,0294 (0,01; 0,035) | 0,0194 (0,007; 0,023) | 0,0031** (0,001; 0,005) |
| C19:2 | <i>Цис,цис</i> -нонадекадиен-10,13-овая | 0,0021 (0,001; 0,0025) | 0,0011 (0,0007; 0,002) | 0,0011 (0,0005; 0,003) | 0,0022 (0,001; 0,003) |
| Общая масса | | 0,12311 | 0,1499 | 0,1520 | 0,1512 |

Примечание: * - $p < 0,05$; ** $p \leq 0,01$

В составе липидов энтерококков детектировали по 9 ненасыщенных и насыщенных жирных кислот. Общее содержание жирных кислот энтерококков, изолированных от пациентов основной группы и группы сравнения, было сходным ($p > 0,05$). У *E.faecalis* от пациентов с комбинированной терапией в составе мембраны 10 раз больше содержалось маргариновой кислоты (C17:0) ($p = 0,002$) и олеиновой жирной кислоты (9-C18:1) ($p = 0,003$). У *E.faecium* в 8 раз больше содержалось насыщенной лауриновой кислоты (C12:0) ($p = 0,001$) и в 10 раз больше длинноцепочечной насыщенной лигноцериновой кислоты (C24:0) ($p = 0,02$). В 2 раза больше было содержание жирных кислот с ненасыщенными алкильными цепями: цис-7-пальмитолеиновой (C7-C16:1) и олеиновой (9-C18:1) ($p = 0,05$) (Таблица 4). Содержание линолевой (C18:2) кислоты было выше в 4 раза ($p = 0,04$), тогда как цис-нонадекаен-10,13-овой (C19:1) и цис -9-пальмитолеиновой (9-C16:1) кислот было ниже в 6 и 8 раз соответственно, чем у штаммов от пациентов, получающих только этиотропную терапию ($p = 0,001$).

Различие состава и содержания жирнокислотного состава в сторону ненасыщенных и длинноцепочечных кислот сказывается на функциональной активности энтерококков, о чем свидетельствует достоверно более высокая продукция энтерококками молочной кислоты. Титруемая кислотность культуральной жидкости у *E.faecalis* от больных, принимавших только противотуберкулезные препараты, была в 1, 5 раза ниже ($28,9^{\circ}\text{T}$ (20,2; 36,4) против $44,5^{\circ}\text{T}$ (40,2; 45,4), чем в основной группе ($p = 0,007$). Кислотность культуральной жидкости *E.faecium* от пациентов, принимавших только этиотропную терапию, составила $27,3^{\circ}\text{T}$ (17,7; 37,9), от пациентов после пробиотикотерапии $42,3$ (40,3; 44,6) ($p = 0,001$).

4.3. Влияние приема пробиотических штаммов на микроэлементный состав клеток энтерококков

Минеральные элементы выполняют важную роль в жизнедеятельности микроорганизмов, так как участвуют в построении органоидов бактерий и являются кофакторами ферментных систем, участвующих в метаболизме, в дыхании и инактивации токсических форм кислорода,

в транспорте веществ микроорганизмов [28]. Однако, в настоящее время элементный состав, как клеток микроорганизмов, так и их экзометаболитов используется для биопрофилирования штаммов с целью оценки их происхождения, идентичности и для оценки их функциональной активности. В данной работе определение содержания минералов у энтерококков проводилось с целью оценки влияния средств коррекции кишечной микробиоты на основе комплекса пробиотических штаммов бифидобактерий, лактобацилл и пропионибактерий на состав и функциональные свойства энтерококков.

Анализ микроэлементного состава клеточного матрикса энтерококков позволил верифицировать наличие 11 минеральных элементов у *E.faecalis* и 12 – у *E.faecium*. В целом у штаммов, выделенных от пациентов основной группы и группы сравнения, средняя масса микроэлементов у энтерококков разных видов не отличалась ($p=0,12$) и составила у *E.faecalis* 293,1 мкг/г, у *E.faecium* 318,93 мкг/г сухого вещества. У *E.faecalis* в структуре микроэлементов 37,5% приходилось на содержание серы (S), 25,2% на кальций (Ca) и 23,8% - на магний (Mg). Ранжированный ряд по убыванию содержания микроэлементов у *E.faecalis*, отражающий биопрофиль популяции данного вида энтерококков у пациентов до пробиотикотерапии представляет собой следующую цепочку: S>Ca>Mg>Fe>Si>Er>Na>Zn>Ti>Li>Sr.

У *E.faecium* от пациентов, не принимавших пробиотические штаммы, в структуре микроэлементов также преобладала сера (S), доля которой составила 40,7%, 24,8% на магний (Mg), 17,6% приходилось на кальций (Ca). Ряд по убыванию содержания микроэлементов в 1 г сухого клеточного вещества *E.faecium* составляет S>Mg>Ca>Cu>Fe>Si>Zn>Er>Na>Ti>Li>Sr, т.е. он характеризуется видоспецифичностью.

У штаммов, выделенных от пациентов, принимавших комбинированную терапию (ПТП+синбиотик), независимо от вида в 1,3 раза выше была общая масса минеральных элементов. Достоверная разница была зарегистрирована в отношении содержания кальция (Ca) и натрия (Na) (Таблица 5).

Таблица 5 - Содержание микроэлементов в клетках энтерококков

| № | Элемент | Название элемента | <i>Enterococcus faecalis</i> (n=12) | | <i>Enterococcus faecium</i> (n=10) | |
|------------------------------|-----------|-------------------|-------------------------------------|-----------------------|------------------------------------|-----------------------|
| | | | ПТП, мкг/г | ПТП+ синбиотик, мкг/г | ПТП, мкг/г | ПТП+ синбиотик, 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 было выше в 2 раза ($p=0,021$), у *E.faecium* в 3 раза ($p=0,01$). Натрия (Na) содержалось в 2,5 раза ($p=0,019$) и в 3,7 раз ($p=0,001$) больше соответственно. Увеличение содержания натрия (Na) в клетках энтерококков может быть результатом повышения количества Na-каналов и/или сахаролитических ферментов у бактерий, что косвенно свидетельствует об изменении функциональных свойств клеточной стенки и активности метаболизма у энтерококков. Более высокое содержание кальция (Ca) в цитозоле у бактерий по данным литературы коррелирует с ростом и размножением микроорганизмов, посредством участия этих ионов в фосфолировании белков, участвующих в инициации хромосом [46].

Кроме того, рост концентрации кальция способствует активизации восприятия сигналов из внешней среды (Ca-сигнальная система) и активизации метаболизма фосфолипидов [2, 46].

Обращает внимание факт низкого содержания стронция (Sr) в составе бактериальной массы *E.faecalis* после терапии синбиотиком. Энтерококки накапливают этот микроэлемент, получая его из пищи, в составе загрязняющих веществ, поступающих в желудочно-кишечный тракт из окружающей среды. После приема биопрепарата для коррекции микробиоты содержание стронция в клетках *E.faecalis* в 3 раза ниже (Таблица 5) ($p=0,032$), у *E.faecium* содержание стронция достоверно не отличается. Эти результаты требуют дальнейших исследований, вследствие возможных перспектив использования синбиотиков для выведения радиоактивных изотопов стронция (Sr) из организма человека.

При этом у *E.faecalis* после приема синбиотика отличается только ранговое место кальция (Ca), который возглавляет ряд микроэлементов, а сера (S) занимает второе место, в остальном ряд содержания микроэлементов по убыванию был такой же, как у штаммов от пациентов, не принимавших синбиотик: Ca>S>Mg>Fe>Si>Na>Er>Zn>Ti>Li>Sr.

У *E.faecium* кальций (Ca) тоже занимает первое место среди микроэлементов, второе место по содержанию – сера (S), третье – магний (Mg). В целом ряд содержания микроэлементов у *E.faecium* у пациентов, принимавших комбинированную терапию, похож на биофильный профиль минеральных элементов *E.faecalis*: Ca>S>Mg>Fe>Cu>Si>Na>Zn>Er>Ti>Li>Sr.

Таким образом, у энтерококков от пациентов с туберкулезом легких, находящихся на этиотропной терапии препаратами второго ряда, после приема синбиотика регистрировали высокое содержание минеральных элементов участвующих в делении, росте бактерий (колониционные свойства), а также в процессах транспорта и метаболизма.

4.4. Заключение по главе «Энтерококки, как индикаторы положительных эффектов коррекции кишечного микробиома пробиотическими бактериями»

Результатом курса приема пациентами мультиштаммового синбиотика параллельно с противотуберкулезными препаратами является восстановление количественного содержания лактобацилл и уменьшение содержания грибов рода *Candida*. На фоне изменений микробиоты регистрировали положительный клинический эффект, который заключается в нивелировании у пациентов диареи, тошноты и рвоты.

Установлены различия химического состава клеток энтерококков, которые заключаются в достоверно высоком содержании ненасыщенных и длинноцепочечных жирных кислот, придающих пластичность цитоплазматической мембране бактерий, а также в 2-3 раза более высоком содержании кальция (Ca), в 3-4 раза большим содержании натрия (Na), что косвенно свидетельствует об активных транспортных и биосинтетических процессах в клетках. Различия состава бактериальных клеток сопровождается ростом продукции молочной кислоты, что позволяет говорить о возможности использования мониторинга химического состава клеток для оценки функционального состояния бактерий после коррекции микробиоты мультиштаммовыми препаратами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Современные достижения в изучении роли кишечного микробиома для человека демонстрируют его значимый вклад в обеспечении гомеостаза макроорганизма, влияние на характер течения патологических процессов (тяжесть, возникновение рецидивов и т.д.) и эффективность лечения. Растет список заболеваний, ассоциированных с нарушениями микробиоты: сахарный диабет, гипертоническая болезнь, атеросклероз, ожирение, рак толстой кишки, дегенеративные заболевания нервной системы, что предопределяет пристальное внимание в вопросах коррекции микробиоты [53]. В настоящее время перечень заболеваний и состояний, при которых уже применяются иммунобиологические препараты на основе нормобиоты и стимулирующие ее рост, увеличивается.

Туберкулез – это социально-значимое заболевание, имеющее тенденцию к росту распространенности, вследствие снижения иммунологической реактивности населения (приобретенные и врожденные иммунодефициты) и повышения устойчивости возбудителя к этиотропной терапии [49], что ведет к снижению эффективности лечения и увеличению экономических затрат. Верификация у пациента возбудителя с множественной или широкой лекарственной устойчивостью требует назначения многокомпонентной терапии, включающей 4-5 противотуберкулезных средств, длительность приема, которых составляет в среднем 18 месяцев [49, 121]. Кроме этиотропной терапии факторами, способствующими изменению кишечной микробиоты у фтизиатрических пациентов, являются токсические продукты распада микобактерий и тканей макроорганизма. Поэтому коррекция микроэкологических нарушений у пациентов с туберкулезом легких является актуальным вопросом, но для патогенетически обоснованных подходов и разработки новых способов управления микробиомом целесообразно определение роли отдельных резидентных бактерий в многокомпонентном микробном сообществе. Если о положительных функциях бифидобактерий и лактобацилл накоплено много информации, то в отношении энтерококков

информация спорная [25, 47, 57, 89]. Они являются резидентами кишечного биотопа, продуцирующими биологически активные молекулы - бактериоцины, молочную кислоту - обеспечивающие колонизационную резистентность слизистой кишечника. С другой стороны, при иммунологической недостаточности они являются возбудителями оппортунистических инфекций [13, 54].

Целью исследования стала оценка роли энтерококков при микрoэкологических нарушениях кишечного микробиома у пациентов с туберкулезом легких при противотуберкулезной терапии.

Исследование включало 2 организационных уровня исследования:

1. работа с пациентами фтизиатрического стационара (n=135): исследовали качественный и количественный состав кишечной микробиоты у впервые выявленных пациентов (n=64) и у пациентов с декомпенсированным дисбиозом (n=36), у пациентов после синбиотикотерапии (n=35). В группы включали пациентов с туберкулезом, вызванным МЛУ микобактериями. Формирование групп пациентов осуществляли на основании молекулярно-генетического подтверждения МЛУ у возбудителя.

2. работа с культурами микроорганизмов: *Enterococcus spp.* (n=198), *Staphylococcus* (n=76), *Candida* (n=91), *Enterobacteriaceae* (n=126). Проведено 1188 опытов по изучению биологических свойств энтерококков (адгезивная, лактатпродуцирующая активность, вирулентность) и 96 опытов по межбактериальным взаимодействиям энтерококков с грибами рода *Candida* и *Bifidobacterium*.

Были использованы количественный бактериологический метод, экспериментальные исследования по изучению биологических свойств и межбактериальных взаимодействий, а также хроматографические (ГХ-МС, ВЭЖХ), спектральные (АЭС-ИСП, УФ-спектроскопия), статистические методы исследования.

В нашем исследовании основное внимание было уделено лицам с множественной устойчивостью возбудителя, что связано с назначением таким

пациентам длительной противотуберкулезной терапии, включающей 4-5 препаратов. Это позволяет рассматривать данную когорту, больных туберкулезом легких, как группу риска по развитию стойких и длительных микробиологических нарушений. Однако по результатам исследования установлено, что еще до начала этиотропной терапии пациенты в 67,6% случаев имеют нарушения кишечного микробиома III степени, что согласуется с данными литературы [6, 57]. Нарушения микробиоты у впервые выявленных пациентов характеризуются низкими титрами бифидобактерий 7,6 (7; 9) lg КОЕ, лактобацилл 6,3 (6; 8) lg КОЕ, типичных кишечных палочек 5,7 (5; 6) lg КОЕ и энтерококков 5,8 (5; 7) lg КОЕ. Всех вышеназванных бактерий рассматривают как резидентов кишечного микробиома, поэтому снижение количественного уровня данных микросимбионтов ведет к нарушению колонизационной резистентности и к увеличению условно-патогенных представителей. Частота обнаружения грибов рода *Candida* у впервые выявленных пациентов достигает 92%, у 62% регистрируются представители рода *Staphylococcus*, у 51,4% - условно-патогенные и патогенные (род *Salmonella*) бактерии семейства *Enterobacteriaceae*. Очень часто ВИЧ-инфекция манифестируется туберкулезным процессом, при этом сочетание двух нозологических форм приводит к утяжелению протекания каждого заболевания и к более глубоким микробиологическим нарушениям [51]. Исследования продемонстрировали, что нарушения кишечного микробиома у пациентов с коморбидной патологией не отличаются от группы пациентов с моноинфекцией ($p > 0,05$), за исключением лактобацилл, клостридий и грибов рода *Candida*. У коморбидных пациентов (ТБ/ВИЧ) количественный уровень *Lactobacillus* был в 10 раз ниже, чем у больных без ВИЧ-статуса (5,0 (4; 8) против 6,0 (4; 8) lg КОЕ/г ($p = 0,05$), титры *Clostridium perfringens* наоборот были достоверно выше (4 (3; 5) против 2,5 (2; 4) lg КОЕ/г, ($p = 0,005$), уровни микромицетов достигали 5,0 (2; 6) lg КОЕ/г против 3,5 (2; 4) lg КОЕ/г ($p = 0,006$). Это может быть результатом иммунодефицита у пациентов с ВИЧ-инфекцией, так как средний уровень CD4+ лимфоцитов составил 239,3 (221,4; 274,5) клеток в 1 мкл и

приема антиретровирусных препаратов. Жалоб на гастроинтестинальный синдром предъявляли несколько ВИЧ-инфицированных пациентов, большинство больных даже при выраженных микрoэкологических нарушениях не имели жалоб, что можно расценить, как компенсированный дисбиоз.

При приеме противотуберкулезных средств (фторхинолонов, протионамида, бедаквилина, капреомицина, циклосерина, пипразинамида, аминосалициловой кислоты, теризидона, линезолида, этамбутола), в среднем $34,4 \pm 2$ доз, у пациентов развивается гастроинтестинальный синдром. Среди жалоб доминируют тошнота (27,8%), метеоризм (23,6%), боли в животе (19,4%). Диареею отмечают 15,3% пациентов, запоры 13,9%, т.е. наблюдают декомпенсацию микрoэкологических нарушений, что согласуется с литературными данными [27, 51]. По результатам бактериологического исследования у пациентов, получающих этиотропную противотуберкулезную терапию, установлено достоверное снижение уровня лактобацилл до $5,1 (4; 6) \lg \text{ КОЕ}$ ($p=0,0002$) и частоты колонизации кишечника типичной кишечной палочкой до 78% ($p=0,04$). Титры бифидобактерий и энтерококков тоже снижались, но изменения были не значимы ($p>0,05$). При глубоком дефиците лактобацилл и снижении частоты обнаружения лактозопозитивных эшерихий отмечали высокую частоту колонизации (38,9%) слизистой кишечника лактозонегативными кишечными палочками, титры которых составили в среднем $4,5 \lg \text{ КОЕ}$ ($p=0,02$). Сохранялись высокими частота и количественные уровни стафилококков и грибов *Candida*, но различия не достигали уровня значимости ($p>0,05$).

Высокая частота обнаружения энтерококков в кишечном микробиоме, как до старта противотуберкулезной терапии (в 89-94%), так и после развития микрoэкологических нарушений (в 92%), позволяет говорить о них как о резидентных бактериях. Отсутствие различий по видовой структуре энтерококков ($p=0,78$), а также сходство количественных уровней ($5,6-5,7 \lg \text{ КОЕ/г}$) этих бактерий у впервые выявленных больных и при развитии декомпенсированного дисбиоза демонстрирует относительную стабильность их

популяции к негативному воздействию противотуберкулезной терапии. Это подтверждается также расчетными методами – вычислениями отношений шансов. Среди видов энтерококков доминировали *E.faecium* и *E.faecalis*, на долю которых у впервые выявленных пациентов приходилось 76,3%, а у пациентов, принимающих противотуберкулезные препараты – 83%. Также в кишечном микробиоме пациентов регистрировали энтерококки, которые по данным литературы чаще обнаруживают у животных - *E.durans*, *E.gallinarum*, *E.solitarius*, *E.hirae*, *E.solitarius*, *E.raffinusus*, *E.casseliflavus* [45]. Доминирующие виды энтерококков формируют ассоциации «*E.faecium-E.faecalis*», что, видимо, является основой стабильности их популяции.

У впервые выявленных пациентов энтерококки формируют симбиотические связи с макроорганизмом, так как они обеспечивают колонизационную резистентность слизистой и обладают низкой вирулентностью. До лечения пациентов *Enterococcus spp.* характеризовались средними и высокими показателями адгезии, медиана значений ИАМ составила 3,5 (2,9; 4,8) ед. Лактатпродуцирующая активность была низкой, так как титруемая кислотность составила 23,2 (20,2; 31,06) °Т, однако, энтерококки всегда рассматриваются как слабые кислотообразователи, поэтому они только дополняют функции «филометаболического» бактериального ядра микробиома, где главными кислотопродуцентами являются лакто- и бифидобактерии [7, 8].

Только 12% энтерококков обладали цитолизинпродуцирующей активностью (гемолизином), у 5% энтерококков выявлена фосфолипаза. После развития декомпенсированного дисбиоза среди энтерококков регистрируются низкоадгезивные штаммы, а среднее значение ИАМ снижается до 2,8 (1,02; 2,9) ед. ($p=0,06$). В то же время у энтерококков увеличивается продукция лактата до 34,3 (16,4; 40,2) °Т ($p=0,14$), что направлено на поддержание рН биотопа, которое меняется вследствие изменения биологических свойств анаэробной резидентной микробиоты [21]. Увеличивается частота обнаружения энтерококков с ферментами инвазии: уже 18% штаммов продуцировали фосфолипазу ($p=0,03$), 7,5% культур синтезировали желатиназу ($p=0,02$)

($p=0,6$). Изменения биологических свойств энтерококков, возможно, обусловлено модификацией микроокружения (изменением состава микробиома, метаболома и т.д.), возникшего под влиянием противотуберкулезных средств, что подтверждает данные литературы о роли антибиотиков и химиопрепаратов не только в количественных изменениях микробиома, но и качественных [66]. С другой стороны, синтез фосфолипаз и протеаз энтерококками может увеличиваться в результате появления субстрата для этих индуцибельных ферментов – продуктов распада микобактерий и может косвенно свидетельствовать об эффективности проводимой терапии.

У доминирующих видов энтерококков регистрировали сходство адгезивных свойств, кислотообразующей активности как до этиотропной терапии ($p=0,23$), так и во время приема противотуберкулезных препаратов ($p=0,34$), что можно объяснить партнерскими взаимоотношениями микроорганизмов при формировании ассоциаций. В опытах *in vitro* установлено, что *E.faecalis* и *E.faecium* имеют сходную скорость утилизации глюкозы ($p=0,06$), а также сходные показатели продукции лактата - $50,38 (10,6)^{\circ} \text{T}$ и $51,06 (15,15; 78,42)^{\circ} \text{T}$ соответственно ($p=0,82$). Энтерококки не вступают в конкуренцию за источник энергии с *S.aureus*, так как утилизируют глюкозу с такой же скоростью, что и стафилококки ($p=0,46$).

Установлено, что у впервые выявленных пациентов среди *E.faecalis* чаще, чем среди *E.faecium* встречались штаммы с гемолитическими свойствами (25% против 6%, $p=0,01$). После старта противотуберкулезной терапии именно среди *E.faecalis* регистрировали достоверное увеличение штаммов с липазной активностью ($p=0,003$). О более высокой вирулентности у *E.faecalis* свидетельствуют многочисленные исследования, демонстрирующие роль этих бактерий в возникновении гнойно-воспалительных заболеваний [47]. Однако, изменение фенотипических проявлений ферментов инвазии чаще связывают с получением плазмид или островов патогенности, где гены, кодирующие ферменты инвазии сцеплены [45]. Поэтому рост числа штаммов только с липазной активностью (при отсутствии появления других вирулентных

свойств) укладывается в концепцию синтеза фермента при появлении липидсодержащего субстрата в микросреде, как следствия этиотропной терапии [17].

Очень часто протеазную активность энтерококков рассматривают как фермент, играющий важную роль в инвазии бактерий [20, 40]. Учитывая, что в сложном кишечном микробном сообществе между микросимбионтами формируются многочисленные трофические связи, мы предположили, что протеазы энтерококков могут участвовать в подготовке белоксодержащих субстратов для непротеолитических микроорганизмов, например бифидобактерий. Установлено, что *E.faecalis* продуцирует протеазы, которые по специфичности своего действия схожи с работой фермента α -химотрипсина, расщепляющего амидные связи с боковыми аминокислотами - тирозином, триптофаном, фенилаланином. Протеолитическая активность *E.faecium* соответствует ферменту трипсину, который осуществляет гидролиз связей между лизином и аргинином. В связи с тем, что энтерококки в кишечном микробиоме туберкулезных больных формируют ассоциации «*E.faecalis-E.faecium*», совместное выделение различающихся по каталитической активности протеаз, способствует при расщеплении белок-содержащих субстратов формированию большого количества пептидов и аминокислот. Пептиды и аминокислоты используются бифидобактериями в качестве дополнительных источников энергии. Мониторинг динамики роста бифидобактерий на питательной среде с продуктами гидролиза казеина, полученными при обработке субстрата экзометаболитами энтерококков, показал достоверное нарастание плотности бактериальной культуры в течение 13-14 часов культивирования, по сравнению с контролем. Таким образом, *in vitro* показаны синтрофные связи энтерококков с бифидобактериями, которые реализуются в условиях многокомпонентного микробного сообщества, т.е. энтерококки участвуют в поддержании количественных уровней бифидобактерий на слизистой кишечника за счет формирования для них дополнительного энергетического субстрата в виде аминокислот и пептидов.

У фтизиатрических пациентов отмечается высокая частота обнаружения грибов рода *Candida*, что может быть следствием иммунологической недостаточности у данной когорты пациентов. Однако количественное содержание грибов было не высоким и составило 3,6-3,7 lg КОЕ/г. В литературных источниках отмечается значительная роль бифидобактерий и лактобацилл в регуляции количественного уровня микромицетов рода *Candida* [18, 20]. В настоящем исследовании показано, что энтерококки, как резиденты кишечного биотопа, также участвуют в управлении количественного содержания грибов. При этом энтерококки не проявляют прямого антагонизма к грибам и не являются конкурентами *Candida* за углеводсодержащие субстраты. Основным фактором, позволяющим энтерококкам влиять на микромицетов, является их экзометаболиты, которые подавляют каталазу грибов – ключевой фермент антиоксидантной защиты. Антикаталазной активностью обладали 65,4% штаммов *E.faecalis*. Они снижали активность фермента у *Candida* на 46,1% ($p=0,041$). Однако, взаимодействие энтерококков с грибами *Candida* характеризуется штаммоспецифичностью. В 19,2% случаев *E.faecalis* не изменяли каталазную активность *S.albicans*, а в 15,4% случаев продукция антиоксидантного фермента у грибов под влиянием метаболитов *E.faecalis* увеличивалась. Таким образом, установлен механизм непрямого антагонизма *E.faecalis* по отношению к *Candida*, что раскрывает перспективы разработки биотических средств на основе экзометаболитов энтерококков с антигрибковой активностью и поиска активных штаммов-продуцентов.

Последняя часть исследований была посвящена оценке эффективности приема синбиотика, содержащего пробиотические бактерии, во время противотуберкулезной терапии. Выбор препарата для коррекции базировался на принципах необходимости восстановления количественных уровней доминирующей микробиоты (бифидобактерий и лактобацилл), осуществляющей регуляцию состояния всего микробиома, поэтому был выбран комбинированный мультиштаммовый препарат. Штаммы пробиотического консорциума характеризовались низкими показателями адгезии, высоким

кислотообразованием и отсутствием прямого антагонизма по отношению к условно-патогенной микробиоте пациентов с туберкулезом легких. У пациентов, принимающих синбиотический препарат с противотуберкулезными средствами, достоверно реже регистрировали жалобы на диарею ($p=0,01$), тошноту и рвоту ($p=0,019$). В кишечном микробиоме у них регистрировали более высокие титры лактобацилл ($p=0,05$) и низкие по сравнению с лицами, принимающими только противотуберкулезную терапию, частоту колонизации ($p=0,04$) и уровни грибов рода *Candida* ($p=0,03$). Популяция энтерококков при приеме синбиотика количественно не изменялась ($p=0,95$), однако, отмечали изменения биологических свойств данных микроорганизмов после окончания курса коррекции микробиома. У больных туберкулезом легких, принимающих синбиотический препарат, реже выделяли энтерококки с ферментами инвазии – с липазной (8,8% против 18,6%, $p=0,05$), с протеолитической (2% против 12%, $p=0,005$) активностью; не обнаруживали штаммы с гемолитическими свойствами. Полученные результаты дополняют данные о механизмах действия препаратов на основе бифидобактерий и лактобацилл, которые отражают их влияние не только на состав микробиома, но и влияние на биологические свойства микросимбионтов и прежде всего, на снижение вирулентности микроорганизмов кишечного микробиома.

После приема пробиотических штаммов у энтерококков изменился качественный состав жирных кислот клеточной мембраны, которые определяют ее функциональную активность. Показано, что у *E.faecalis* значительно увеличилась масса ненасыщенной олеиновой (9-C18:1) ($p=0,003$) и маргаритиновой (C17:0) кислот ($p=0,002$). Более выраженные изменения жирнокислотного состава регистрировали у *E.faecium*. Увеличилась в 2 раза масса цис-7-пальмитолеиновой (C 7-C16:1) и олеиновой (9-C18:1) кислот ($p=0,05$). Возросло в 4 раза содержание линолевой (C18:2) кислоты ($p=0,04$), а также увеличилось в 6-8 раз содержание цис-разветвленных непредельных жирных кислот ($p=0,001$). Кроме жирнокислотного состава у энтерококков изменялся состав микроэлементов. После приема синбиотиков не зависимо от вида

энтерококков в 1,3 раза увеличивалось общее содержание микроэлементов. Повысилось в 2 раза в клетках *E.faecalis* ($p=0,021$) и в 3 раза у *E.faecium* ($p=0,01$) количество кальция (Ca). Увеличение содержания натрия (Na) произошло в 2,5 раза ($p=0,019$) и в 3,7 раз ($p=0,001$) соответственно. Известно, что увеличение содержания в мембране жирных кислот с ненасыщенными связями и с разветвленной цепью, а также натрия (Na) коррелирует с ростом активности мембраны, т.е. увеличивается работа транспортных систем микроорганизмов [28], изменяется пластичность мембраны [2], активизируется синтетическая функция. Наши исследования продукции лактата энтерококками до и после приема синбиотиков подтверждают эти данные, так как у *E.faecalis* ($p=0,007$) и *E.faecium* ($p=0,001$) кислотообразование увеличивается в 1,5 раза.

Таким образом, на примере энтерококков показано влияние препаратов, содержащих пробиотические бактерии, на структурно-функциональные характеристики представителей кишечного микробиома. В связи с тем, что энтерококки являются неприхотливыми микроорганизмами, не требующими особых методов выделения, их можно использовать, как индикаторы эффективности коррекции кишечного микробиома пробиотическими штаммами.

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) ° T), 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 микрoэкологических 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 микрoэкологических нарушений позволяет прогнозировать развитие синдрома диспепсии при приеме в среднем $34,4 \pm 2$ доз противотуберкулезных препаратов.
2. При развитии декомпенсированных микрoэкологических нарушений при противотуберкулезной терапии пациентам рекомендуется назначать комплексные мультиштаммовые синбиотические препараты, содержащие бифидобактерии и лактобациллы, что устранит необходимость прерывания курса этиотропной терапии, вследствие побочных эффектов противотуберкулезной терапии.
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 продуктов энтерококков, определение роли их экзометаболических продуктов 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 СОКРАЩЕНИЙ

| | |
|----------|--|
| АЭС-ИП | – атомно-эмиссионная спектроскопия с индуктивно-связанной плазмой |
| ВИЧ | – вирус иммунодефицита человека |
| ВЭЖХ | – высокоэффективная жидкостная хроматография |
| ГХ-МС | – газовая хроматография с масс-спектрометрическим детектированием |
| ККМЧ | – коллекция кишечной микробиоты человека |
| КОЕ/г | – колониеобразующие единицы на грамм |
| МЛУ | – множественная лекарственная устойчивость |
| НАДФ | – никотинамидадениндинуклеотидфосфат |
| ПТП | – противотуберкулезные препараты |
| ТСХ | – тонкослойная хроматография |
| УФ | – ультрафиолетовый |
| CD | – Cluster of differentiation, кластер дифференцировки |
| COVID-19 | – COronaVirus Disease 2019, болезнь, вызванная коронавирусом 2019 |
| IFN | – Interferons, интерфероны |
| IL | – Interleukin, интерлейкин |
| pKa | – показатель константы диссоциации |
| MTCC | – Microbial type culture collection, микробная коллекция типовых культур |
| SEM | – Standart error of the mean, стандартная ошибка среднего |
| SIV | – Simian immunodeficiency viruses, вирусы иммунодефицита обезьян |
| Th | – T-helper, Т-помощник |
| TNF | – tumor necrosis factor, фактор некроза опухолей |

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Александрова, Н. А. Влияние продуктов метаболизма энтерококков на образование гифальной формы *Candida albicans* / Н. А. Александрова, М. И. Заславская, Н. И. Игнатова, Т. В. Махрова, О. А. Лукова // Проблемы медицинской микологии. – 2020. - №4 (22). – С. 35-37.
2. Андрюков, Б. Г. Значение мембранных фосфолипидов в реализации защитных стратегий бактерий / Б. Г. Андрюков, И. Н. Ляпун, Е.В. Матросова // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2020. - № 6 (97). - С. 594-603.
3. Афанасова, Е. Н. Энтерококки: современное значение для медицинской практики / Е. Н. Афанасова, Е. Н. Бочанова, О. В. Гордина, Ш. А. Бердиев, О. В. Иванова // Современные проблемы науки и образования. – 2022. - № 2. – С. 144 – 155.
4. Белова, И. В. Профилактика формирования выраженных нарушений микробиоценоза толстой кишки у больных туберкулезом, в том числе с множественной лекарственной устойчивостью / И. В. Белова, С. Ф. Барболина, А. Г. Точилина, И. В. Соловьева, А. С. Шпрыков, Т. П. Иванова, В. А. Жирнов, И. Г. Шерстнев, Н. В. Васильева, О. А. Аникина // Медицинский альманах. – 2016. - № 3 (43). – С. 112-117.
5. Беляев, В. С. Ось кишечник–легкие / В. С. Беляев, В. М. Червинец, Ю. В. Червинец // Пульмонология. – 2022. - № 3 (53). – С. 1-7.
6. Брилис, В. И. Методика изучения адгезивного процесса микроорганизмов/ В. И. Брилис, Т. А. Брилине, Х. П. Лацнер // Лабораторное дело.-1986. - №4.- С. 210-212.
7. Бухарин, О. В. Механизмы персистенции индигенных бифидобактерий под действием ацетата в кишечном биотопе человека / О. В. Бухарин, С. В. Андрющенко, Н. Б. Перунова, Е. В. Иванова // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2021. - Т. 98, № 3. – С. 276-282.

8. Бухарин, О. В. Роль микробиоты в регуляции гомеостаза организма человека при инфекции / О. В. Бухарин, Н. Б. Перунова // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2020. - № 5 (97). – С. 456-467.
9. Быков, И. А. Социально-демографические факторы, способствующие распространению туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью в Российской Федерации // Туберкулез и болезни легких. – 2022. - № 6 (100). – С. 59-65.
10. Васильева, И. А. Химиотерапия туберкулеза в России – история продолжается / И. А. Васильева, А. Г. Самойлова, В. Н. Зимина, О. В. Ловачева, А. В. Абрамченко // Туберкулез и болезни легких. – 2023. - № 2 (101). – С. 8-12.
11. ВИЧ-инфекция у взрослых: клинические рекомендации / Министерство здравоохранения Российской Федерации. – Москва, 2024. – 143 с.
12. Вишневский, Б. И. Персистенция *Mycobacterium tuberculosis* – основа латентного туберкулеза / Б. И. Вишневский, П. К. Яблонский // Медицинский альянс. – 2020. - № 2 (8). – С. 14-20.
13. Габриелян, Н. И. Этиология энтерококковой бактериемии. Обзор литературы и собственные данные / Н. И. Габриелян, В. Г. Кормилицева, И. В. Драбкина, Р. Ш. Сайтгареев, В. М. Захаревич, О. В. Кисель, В. В. Малеев // Российский медицинский журнал. – 2020. - № 6 (26). – С. 412-420.
14. Глаголева, Л.Э. Исследование аминокислотной активности лакто- и бифидобактерий в процессе ферментации / Л.Э. Глаголева, М.И. Корыстин, А.А. Родионов, Н.А. Пастухова // Вестник Воронежского государственного университета инженерных технологий. – 2016. - № 4 (70). – С.160-165.
15. ГОСТ 33410-2015. Определение содержания органических кислот методом высокоэффективной жидкостной хроматографии: национальный стандарт Российской Федерации : издание официальное :

- утвержден и введен в действие Приказом Федерального агентства по техническому урегулированию и метрологии от 19 августа 2016 г. № 923-ст. : введен впервые: дата введения 2017-07-01 – Москва : Стандартиформ, 2016. – 19 с.
16. Домотенко, Л. В. Обнаружение энтерококков в воде: что изменилось после введения СанПиН 1.2-3685-21 / Л. В. Домотенко, Т. П. Морозова, А.П. Шепелин // Бактериология. – 2022 - № 2 (7). – С. 64–71.
17. Еноктаева, О. В. Клеточная стенка как медиатор патогенной активности грибов рода *Candida sp.* / О. В. Еноктаева, М. В. Николенко, Д. Ю. Трушников, Н. В. Барышникова // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2021. - № 4. – С. 60-64.
18. Заславская, М. И. Взаимоотношения энтерококков, кандид и лактобактерий на уровне вагинального биотопа у женщин репродуктивного возраста / М. И. Заславская, Н. А. Александрова // Медицинский академический журнал. – 2017. - № 4 (17). – С. 57-58.
19. Затевалов, А. М. Возрастная динамика продукции короткоцепочечных жирных кислот кишечной микробиотой у пациентов, не имеющих гастроэнтерологических заболеваний / А. М. Затевалов, Е. П. Селькова, Н. В. Гудова, А. С. Оганесян // Альманах клинической медицины. – 2018. № 2 (46). – С. 109–117.
20. Захарова, Ю. В. Взаимодействия грибов рода *Candida* с условно-патогенными бактериями при ВИЧ-инфекции // Успехи медицинской микологии. – 2016. – Т. 15. – С. 304-306.
21. Захарова, Ю. В. Характеристика биологических свойств бифидобактерий при микрoэкологических нарушениях кишечника у ВИЧ-инфицированных детей / Ю. В. Захарова, Л. А. Леванова, Т. А. Штернис, А. С. Сухих, А. А. Марковская // Журнал микробиологии, эпидемиологии, иммунобиологии. – 2019. - №3.- С. 3-9
22. Иванова, Е. И. Энтерококки желудочно-кишечного тракта: особенности, факторы патогенности, антибиотикорезистентность / Е. И. Иванова, Е. А.

- Кунгурцева, У. М. Немченко, Е. В. Григорова // Инфекционные болезни. – 2017. - № 3 (17). – С. 58–64.
23. Ивашкин, В. Т. Практические рекомендации Научного сообщества по содействию клиническому изучению микробиома человека (НСОИМ) и Российской гастроэнтерологической ассоциации (РГА) по применению пробиотиков, пребиотиков, синбиотиков и обогащенных ими функциональных пищевых продуктов для лечения и профилактики заболеваний гастроэнтерологического профиля у детей и взрослых / В. Т. Ивашкин, И. В. Маев, Д. И. Абдулганиева, С. А. Алексеенко, А. В. Горелов, И. Н. Захарова, О. Ю. Зольникова, Н. Ю. Ивашкина, Н. В. Корочанская, С. Н. Маммаев, Е. А. Полуэктова, А. С. Трухманов, Д. В. Усенко, Ю. П. Успенский // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. - 2021. - № 2 (31). - С. 65-91.
24. Кайбышева, В. О. Пробиотики с позиций доказательной медицины / О. В. Кайбышева, Е. Л. Никонов // Доказательная гастроэнтерология. – 2019. – Т. 8, № 3. – С. 45-54.
25. Козырев, Е. А. Современные аспекты изучения респираторной микробиоты и ее роль в развитии инфекций нижних дыхательных путей / Е. А. Козырев, И. В. Бабаченко, С. В. Сидоренко // Инфекционные болезни. – 2022. - № 20(1).- С. 99–106.
26. Комарова, М. В. Использование индексов биологического разнообразия для анализа микробиоты человека / М. В. Комарова, А. С. Кройдер // Universum: медицина и фармакология : электрон. научн. журн. - 2022. - № 3(86). URL: <https://7universum.com/ru/med/archive/item/13192>
27. Комиссарова, О. Г. Состояние кишечной микробиоты у впервые выявленных и ранее леченных больных туберкулезом легких / О. Г. Комиссарова, В. А. Шорохова, С. Н. Андреевская, Р. Ю. Абдуллаев // Бактериология. – 2022.- № 7(1).- С. 25–31.

28. Кузин, А. А. Микроэлементы – фактор эффективного культивирования молочнокислых бактерий на молоке / А. А. Кузин, В. Г. Куленко // Продукт. ВУ. – 2010. - № 11 (46). – С. 58.
29. Лахтин, М. В. Перспективы пробиотических лектинов, распознающих гликоконъюгаты в репродуктивной медицине и неонатологии: усиление мукозального иммунитета / М.В. Лахтин, В.М. Лахтин, С.С. Афанасьев, А.Л. Байракова, В.А. Алешкин, М.С. Афанасьев, В.Ф. Корсун // Акушерство и гинекология. – 2019. - № 4. – С. 39-41.
30. Лахтин, М. В. Взаимодействия белков и гликоконъюгатов против инфекций и патогенов: ключи к применению / М. В. Лахтин, В. М. Лахтин, А. В. Мелихова, И. Ю. Давыдкин, В. Ю. Давыдкин, В. А. Алешкин // Известия ГГТУ. Медицина, фармация. – 2022. - № 1 (9). – С. 8-13.
31. Лахтин, М. В. Вклад белков про/постбиотических метаболитов, распознающих и связывающих гликоконъюгаты в антигрибковую защиту человека / М. В. Лахтин, В. М. Лахтин, А. Л. Байракова, В. Ю. Давыдкин // Успехи медицинской микологии. – 2022. – Т.23. – С. 134-138.
32. Леванова, Л.А. Возрастные особенности микробиоценоза кишечника у жителей города Кемерово / Л. А. Леванова, В. А. Алешкин, А. А. Воробьев // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2001. - № 3. – С. 72-75.
33. Машарова, А. А. Современные критерии выбора эффективной пробиотикотерапии / А. А. Машарова, Н. Н. Данилевская // Медицинский совет. – 2018. - № 12. – С. 52-59.
34. Михайлова, Н. А. Современные представления о про-/эукариотических взаимодействиях организма человека – основа создания нового поколения пробиотических препаратов / Н. А. Михайлова, Д. А. Воеводин, С. А. Лазарев // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2020. - № 4 (97). - С. 346-355.

35. Мышкова, Е. П. Сравнительный анализ эффективности и безопасности различных схем противотуберкулезной терапии больных с МЛУ/ШЛУ-туберкулезом / Е. П. Мышкова, Т. И. Петренко, Т. А. Колпакова // Туберкулёз и болезни лёгких. – 2022. – № 5 (100). – С. 35 - 40.
36. Обоева, Н. А. Влияние пробиотика «Сахабактисубтил» на выживаемость микобактерий туберкулеза в почве / Н. А. Обоева Н. П. Тарабукина, Г. П. Протодьяконова, М. П. Неустроев // Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии. – 2015. - № 4 (16). – С. 55-59.
37. ОСТ 91500.11.0004-2003. Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника : издание официальное: утвержден и введен в действие Приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации 9 июня 2003 г. № 231: введен впервые / разработан Московской медицинской академией имени И. М. Сеченова Минздрава России. - Москва, 2003. – 74 с.
38. Остроумов, Л. А. Питательные среды для бифидобактерий / Л. А. Остроумов, А. Ю. Просеков, М. Г. Курбанова, О. В. Козлова // Молочная промышленность. – 2010. - № 1. – С. 20-21.
39. ОФС 1.7.2.0009-15. Определение специфической активности пробиотиков: издание официальное: утверждено Министерством здравоохранения Российской Федерации от 31 октября 2018 № 749 : вводится впервые : дата введения 2016-01-01 / разработан 2015-10-29 / Фармакопейным комитетом Министерства здравоохранения Российской Федерации – Москва, 2015. – 24с.
40. Перелыгин, В. В. Протеазы как вероятные факторы регуляции конкурентных отношений среди микроорганизмов / В. В. Перелыгин, В. Д. Похиленко, В. П. Левчук, Т. А. Калмантаев, Э. А. Светоч // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2018. – № 12 (1). – С. 98-102.
41. Родина, О. В. Нежелательные реакции при различных режимах химиотерапии больных туберкулезом органов дыхания / О. В. Родина, Е.

- В. Борисов, Д. А. Иванова // Туберкулез и социально-значимые заболевания. – 2020. - № 2. – С. 44-54.
42. Савинцева, Е. В. Терапия сопровождения при лечении больных туберкулезом легких с помощью функционального питания / Е. В. Савинцева, О. Е. Русских, А. Р. Гайнутдинова // Туберкулез и социально значимые заболевания. - 2019. - № 2. – С. 46-49.
43. Соловьева, И. В. Микробиота толстой кишки больных туберкулезом легких с множественной лекарственной устойчивостью / И. В. Соловьева, И. В. Белова, А. Г. Точилина, С. Ф. Барболина, Т. П. Иванова, В. А. Жирнов // Медицинский академический журнал. – 2017. - № 4 (17). – С. 71-73.
44. Суворов, А. Н. Микробная персонифицированная терапия как новый инструмент лечащего врача // Российский журнал персонализированной медицины. - 2022. - № 1 (2). - С. 51-62.
45. Сычева, М. В. Биологические свойства энтерококков, выделенных из организма животных и человека: фенотипическая характеристика и генетический контроль // Шаг в науку. – 2021. – № 2. – С. 4–9.
46. Телишевская, Л. Я. Минеральные элементы в жизнедеятельности и метаболизме патогенных бактерий / Л. Я. Телишевская, В. Т. Ночевный // Ветеринарная патология. – 2015. - № 4. – С. 19-28.
47. Титов, Л. П. *Enterococcus faecalis* – эмерджентный возбудитель нозокомиальных инфекций // Здоровоохранение. – 2021. – № 10. – С. 17-24.
48. Топол, И. А. Роль кишечной микробиоты в регуляции иммунных реакций в иммунной системе кишечника в условиях стресса и при модуляции её состава путём введения антибиотиков и пробиотиков / И. А. Топол, И. С. Полякова, А. В. Елыкова // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2022. - № 6(99). – С. 722–733.
49. Туберкулез у взрослых: клинические рекомендации / Российское общество фтизиатров, Национальная ассоциация некоммерческих

- организаций фтизиатров "Ассоциация фтизиатров"; утверждены 2022-03-04. – Москва, 2022. – 151 с.
50. Харитонова, Л. А. Микробиота человека: как новая научная парадигма меняет медицинскую практику / Л. А. Харитонова, К. И. Григорьев, С. Н. Борзакова // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2019. – № 161 (1). – С. 55-63.
51. Холодов, А. А. Взаимосвязь состояния микробиоценоза кишечника и риска развития диспептического синдрома у больных туберкулезом / А. А. Холодов, Т. В. Пьянзова // Сибирское медицинское обозрение. – 2023. – № 1. – С. 22-30.
52. Хохлова, Я. Н. Современные представления о роли кишечной микробиоты в развитии туберкулеза легких / Я. Н. Хохлова, Е. А. Персидская, М. Ш. Аслалиева, Ю. А. Зайцев // Научный аспект. – 2023. – № 4 (11). – С. 1245-1261.
53. Черешнев, В. А. Фактор питания и эволюционно-генетическое формирование кишечной микрофлоры: значение для сохранения иммунитета и здоровья / В. А. Черешнев, В. М. Позняковский // Индустрия питания. – 2020. – Т. 5, № 3. – С. 5-16.
54. Шипицына, И. В., Осипова Е.В. Хронический остеомиелит, роль в этиологии и антибиотикорезистентность бактерий *Enterococcus spp.* / И. В. Шипицына, Е. В. Осипова // Клиническая лабораторная диагностика. 2023. – Т. 68 (11). – С. 710-714.
55. Шипко, Е. С. Влияние температурного стресса на спектр жирных кислот штаммов *Vibrio cholera* / Е. С. Шипко, О. В. Дуванова // Вестник Пермского университета. Серия Биология. – 2022. – № 2. – С. 143-154.
56. Эль-Регистан Г. И. Влияние гормонов и биогенных аминов на рост и выживание *Enterococcus durans* / Г. И. Эль-Регистан, О. В. Земскова, О. А. Галуза, Р. В. Уланова, Е. А. Ильичева, А. В. Ганнесян, Ю. А. Николаев // Микробиология. – 2023. – Т. 92, № 4. – С. 376-395

57. Юнусбаева, М. М. Современные представления о роли кишечной микробиоты в развитии туберкулеза легких / М. М. Юнусбаева, Л. Я. Бородина, А. М. Закирова, Р. А. Ширипов, Б. Б. Юнусбаев // Туберкулез и болезни легких. – 2023. – № 1 (101). – С. 74-82.
58. Юсубова, А. Н. Состояние микробиоценоза кишечника у детей раннего и дошкольного возраста, больных туберкулезом / А. Н. Юсубова, О. К. Киселевич, О. Ф. Выхристюк // Вопросы детской диетологии. – 2015. - № 4 (13). – С. 63-67.
59. Abdelghani, Z. Therapeutic applications and biological activities of bacterial bioactive extracts / Z. Abdelghani, N. Hourani, Z. Zaidan, G. Dbaibo, M. Mrad, R. Hage-Sleiman // Archives of Microbiology. - 2021. - Vol. 203. – P. 4755–4776.
60. Achache, W. The *Enterococcus* secretome inhibits the growth of *Mycobacterium tuberculosis* complex mycobacteria / W. Achache, J. L. Mege, M. Fellag, M. Drancourt // Access Microbiology. - 2023. – Vol. 5. – P. 000471- 000499.
61. Akbar, A. Draft genome sequence data of *Enterococcus faecium* R9, a multiple enterocins-producing strain / A. Akbar, S. Al-Momin, M. Kishk, A. Al-Ateeqi, A. Shajan, R. Rahmeh // Data in Brief. – 2023. – Vol. 48. – P. 109151 – 109158.
62. Almeida-Santos, A. C. *Enterococcus spp.* as a producer and target of bacteriocins: a double-edged sword in the antimicrobial resistance crisis context / A.C. Almeida-Santos, C. Novais, L. Peixe, A. R. Freitas // Antibiotics. - 2021. – Vol. 10. – P. 1215-1238.
63. Alshanta, O. A. *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis* biofilm frenemies: when the relationship sours / O. A. Alshanta, K. Albashaireh, E. McKlound, C. Delaney, R. Kean, W. McLean, G. Ramage // Biofilm. – 2022. – Vol. 4. – P. 100072-100085.
64. Archer, D. L. The use of microbial accessible and fermentable carbohydrates and/or butyrate as supportive treatment for patients with *Coronavirus SARS-*

- Cov-2 infection / D. L. Archer, D.C. Kramer // *Frontiers Medicine*. – 2020. – Vol. 7. – P. 292-295.
65. Ashique, S. Short Chain Fatty Acids: Fundamental mediators of the gut-lung axis and their involvement in pulmonary diseases / S. Ashique, G. De Rubis, E. Sirohi, N. Mishra, M. Rihan, A. Garg et al. // *Chemico-Biological Interactions*. – 2022. – Vol. 368. – P. 110231-110242.
66. Barbosa-Amezcuca, M. The microbiome as part of the contemporary view of tuberculosis disease / M. Barbosa-Amezcuca, D. Galeana-Cadena, N. Alvarado-Peña, E. Silva-Herzog // *Pathogens*. – 2022. – Vol. 11. P. 584- 599.
67. Bhagwat, A. In vitro assessment of metabolic profile of *Enterococcus* strains of human origin / A. Bhagwat, U. S. Annapure // *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. – 2019. – Vol. 17. – P. 11 – 22.
68. Bollam, R. Detection of *Enterococcus hirae* in a case of acute osteomyelitis / R. Bollam, M. Yassin, T. Phan // *Radiology Case Reports*. – 2021. – Vol. 16. – P. 2366-2369.
69. Browne, H. P. Mother–infant transmission of human microbiota / H. P. Browne, Y. Shao, T. D. Lawley // *Current Opinion in Microbiology*. - 2022. – Vol. 69. – P. 102173 – 102181.
70. Bukharin, O. V. The effect of the intra and extracellular metabolites of microorganisms isolated from various ecotopes on the catalase activity *Staphylococcus aureus* 6538P / O. V. Bukharin, A.V. Sgibnev, S.V. Cherkasov, I. B. Ivanov // *Mikrobiologiya*. – 2002. – Vol. 71 (2). – P. 183-189.
71. Chenga, X. A review: roles of carbohydrates in human diseases through regulation of imbalanced intestinal microbiota / X. Chenga , J. Zhenga, A. Linb , H. Xiaa, Z. Zhanga , Q. Gaoa , W. Lvc, H. Liu // *Journal of Functional Foods*. – 2020. – Vol. 74. – P. 104197- 104211.
72. Comberiati, P. The role of gut and lung microbiota in susceptibility to tuberculosis / P. Comberiati, D. M. Cicco, F. Paravati, U. Pelosi, D. A. Gangi, S. Arasi, S. Barni, D. Caimmi, C. Mastroilli, A. Licari, F. Chiera //

- International Journal Environmental Research and Public Health. - 2021. – Vol. 18. P. 12220- 12240.
73. Cui, G. Purification and characterization of a novel bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* CG-9 from human saliva / G. Cui, Ch. Pan, P. Xu, Y. Li, L. Wang, B. Gong, X. Li, Sh. Huang // *Biotechnology and Biotechnological Equipment*. – 2020. – Vol. 34 (1). – P. 1224-1233.
74. Diallo, D. Antituberculosis therapy and gut microbiota: review of potential host microbiota directed Therapies / D. Diallo, A. M. Somboro, S. Diabate, B. Baya, A. Kone, Y. S. Sarro, B. Kone, B. Diarra, S. Diallo, M. Diakite, S. Doumbia, Y. Toloba, R. L. Murphy, M. Maiga // *Frontiers Cellular and Infection Microbiology*. – 2021. – Vol.11. – P. 1-10.
75. Ding. X. A metagenomic study of the gut microbiome in PTB’S disease / X. Ding, J. Zhou, Y. Chai, Z. Yan, X. Liu, Y. Dong, X. Mei, Y. Jiang, H. Lei // *Microbes and Infection*. – 2022. – Vol. 24. – P. 104893 – 104902.
76. Du, R. Purification, characterization and mechanism of action of enterocin HDX-2, a novel class IIa bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* HDX-2 / R. Du, W. Ping, J. Ge // *LWT-Food Science and Technology*. - 2022. – Vol. 153. – P. 112451.
77. Enjeti, A. Impact of the gut-lung axis on tuberculosis susceptibility and progression / A. Enjeti, H. D. Sathkumara, A. Kupz // *Frontiers in Microbiology*. – 2023. – Vol. 14. – P. 1209932-1209940.
78. Fellag, M. Culturomics discloses anti-tubercular *Enterococci* exclusive of pulmonary tuberculosis: a preliminary report / M. Fellag, N. Gouba, M. Bedotto, M. Sakana, D. Zingué, Z. Tarnagda, M. Million, M. Drancourt // *Microorganisms*. - 2020. – Vol. 8.- P. 1544-1557.
79. Foreman, T. W. CD4 T cells are rapidly depleted from tuberculosis granulomas following acute SIV co-infection / T. W. Foreman, C. E. Nelson, K. D. Kauffman, N. E. Lora, C. L. Vinhaes, D. E. Dorosky, S. Sakai, F. Gomez, J. D. Fleegle, M. Parham, S. R. Perera, C. S. Lindestam Arlehamn, A. Sette, Tuberculosis Imaging Program, J. M. Brenchley, A.T.L. Queiroz, B. B.

- Andrade, J. Kabat, L. E. Via, D. L. Barber // Cell Reports. – 2022. – Vol. 39. – P. 180896 – 180896.
80. Frem, J. A. Clinical manifestations, characteristics, and outcome of infections caused by vancomycin-resistant enterococci at a tertiary care center in Lebanon: a case-case-control study / J. A. Frem, M. Ghanem, G. Doumat, Z. A. Kanafani // Journal of Infection and Public Health. – 2023. – Vol. 16. – P. 741-745.
81. Fu, X. Safety assessment and probiotic characteristics of *Enterococcus lactis* JDM1 / X. Fu, L. Lyu, Y. Wang, Y. Zhang, X. Guo, Q. Chen, Ch. Liu // Microbial Pathogenesis. – 2022. – Vol. 163. – P. 105380 – 105388.
82. Galdiero, E. Pentadecanoic acid against *Candida albicans-Klebsiella pneumoniae* biofilm: towards the development of an anti-biofilm coating to prevent polymicrobial infections / E. Galdiero, A. Ricciardelli, C. D'Angelo, E. Alteriis, A. Maione, L. Albarano // Research in Microbiology. – 2021. – Vol. 172 (7-8). – P. 103880.
83. Grenda, A. *Enterococci*—involvement in pathogenesis and therapeutic potential in cancer treatment: a mini-review / A. Grenda, T. Grenda, P. Domaradzki, K. Kwiatek // Pathogens. - 2022. – Vol. 11. – P. 687 - 696.
84. Hu, Y. The Gut Microbiome signatures discriminate healthy from pulmonary tuberculosis patients / Y. Hu, Y. Feng, J. Wu, F. Liu, Z. Zhang, Y. Hao, S. Liang, B. Li, J. Li, N. Lv, Y. Xu, B. Zhu, Z. Sun // Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. – 2019. – Vol. 9. – P. 90 - 98.
85. Huang, Y. Alterations in the intestinal microbiota associated with active tuberculosis and latent tuberculosis infection / Y. Huang, J. Tang, Zh. Cai, Y. Qi, Sh. Jiang, T. Ma, Y. Yue, F. Huang, H. Yang, Y. Ma // Heliyon. – 2023. – Vol. 9 (6). – P. 22124 – 22136.
86. Ivy, J. Probiotic potential and safety assessment of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* strains with antibacterial activity against *Listeria* and vancomycin-resistant *Enterococci* / J. Ivy, I. Fugaban, W. H. Holzapfel, S. D.

- Todorov // *Current Research in Microbial Sciences*. – 2021. – Vol. 2. – P. 100070- 100083.
87. Jung, A. Comparison of pathogenic and non-pathogenic *Enterococcus cecorum* strains from different animal species / A. Jung, M. Metzner, M. Ryll // *BMC Microbiology*. – 2017. – Vol. 17. - P. 33 – 46.
88. Keulers, L. Probiotics, prebiotics, and synbiotics to prevent or combat air pollution consequences: the gut-lung axis / L. Keulers, A. Dehghani, L. Knippels, J. Garssen, N. Papadopoulos, G. Folkerts, S. Braber, J. Bergenhenegouwen // *Environmental Pollution*. – 2022. – Vol. 302. – P. 119066 – 119080.
89. Krawczyk, B. The many faces of *Enterococcus spp.*—commensal, probiotic and opportunistic pathogen / B. Krawczyk, P. Wityk, M. Galecka, M. Michalik // *Microorganisms*. - 2021. – Vol. 9. – P. 1900 – 1920.
90. Kuczkowska, K. Comparison of eight *Lactobacillus* species for delivery of surface-displayed mycobacterial antigen / K. Kuczkowska, L. Overland, S. D.C. Rocha, V. G.H. Eijsink, G. Mathiesen // *Vaccine*. – 2019. – Vol. 37. – P. 6371-6379.
91. Kuczkowska, K. Immunogenetic properties of *Lactobacillus plantarum* producing surface-displayed *Mycobacterium tuberculosis* antigens // K. Kuczkowska, Ch. R. Kleiveland, R. Tjaland, H. Carlsen, T. Lea, G. Mathiesen, V. G.H. Eijsink // *Applied and Environmental Microbiology*. - 2016. – Vol. 83. – P. e02782-16.
92. Li, D. Diet-gut microbiota-epigenetics in metabolic diseases: from mechanisms to therapeutics / D. Li, Y. Li, Sh. Yang, J. Lu, X. Jin, M. Wu // *Biomedicine and Pharmacotherapy*. – 2022. – Vol. 153. – P. 113290- 113305.
93. Li, Q. Purification, characterization and structural identification of a novel bacteriocin produced by marine original *Enterococcus durans* YQ-6, and its inhibition of *Listeria monocytogenes* / Q. Li, Q. Chen, Yu. Wu, Zh.Chen, Y. Liu, Zh. Fang, Q. Deng // *LWT-Food Science and Technology*. - 2023. – Vol. 173. – P. 114329-114339.

94. Lokesh, D. *Bifidobacterium adolescentis* is intrinsically resistant to antituberculosis drugs / D. Lokesh, R. Parkesh, R. Kammara // Science Reports. - 2018. – Vol. 8. – P. 11897.
95. Luo, D. Untargeted Metabolomics of Feces Reveals Diagnostic and Prognostic Biomarkers for Active Tuberculosis and Latent Tuberculosis Infection: Potential Application for Precise and Non-Invasive Identification / D. Luo, B. Yang, K. Qin, Ch. Shi, N. Wei, H. Li, Y. Qin, G. Liu, X. Qin, Sh. Chen, X. Guo, L. Gan, R. Xu, B. Dong, J. Li // Infection and Drug Resistance. – 2023. – Vol. 16. – P. 6121–6138.
96. Ma, P-J. Gut microbiota: A new insight into lung diseases / P-J Ma, M. Wang, Y. Wang // Biomedicine and Pharmacotherapy. – 2022. – Vol. 155. – P. 113810 – 113820.
97. Majlessi, L. Colonization with *Helicobacter* is concomitant with modified gut microbiota and drastic failure of the immune control of *Mycobacterium tuberculosis* / L. Majlessi, F. Sayes, J-F. Bureau, A. Pawlik, V. Michel, G. Jouvion, M. Huerre, M. Severgnini, C. Consolandi, C. Peano, R. Brosch, E. Touati, C. Leclerc // Mucosal Immunology. – 2017. – Vol. 10. – P. 1178-1189.
98. Marcelino, V. R. Disease-specific loss of microbial cross-feeding interactions in the human gut / V. R. Marcelino, C. Welsh, Ch. Diener, E. L. Gulliver, E. L. Rutten, R. B. Young, E. M. Giles, S. M. Gibbons, Ch. Greening, S. C. Forster // Nature Communications. – 2023. - Vol. 14. – P. 6546 – 6567.
99. Matthew, F. W. Antibiotic treatment for tuberculosis induces a profound dysbiosis of the microbiome that persists long after therapy is completed / F. W. Matthew, D. W. Fitzgerald, M. A. J. Juste, Y. Taur, S. Namasivayam, A. Sher, J. M. Bean, V. Bucci, M. S. Glickman // Scientific Reports. – 2017. – Vol. 7. – P. 10767-10778.
100. Mladenovic, K. G. The hydrophobicity of enterobacteria and their co-aggregation with *Enterococcus faecalis* isolated from Serbian cheese / K. G. Mladenovic, M. Z. Grujovic, D. D. Nikodijevic, L. R. Comic // Bioscience of Microbiota, Food and Health. – 2020. - Vol. 39 (4). – P. 227–233.

101. Montané, E. Pilot, double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial of the supplement food Nyaditum resae® in adults with or without latent TB infection: Safety and immunogenicity / E. Montané, A. M. Barriocanal, A. L. Arellano, A. Valderrama, Y. Sanz, N. Perez-Alvarez, P. Cardona, C. Vilaplana, P. J. Cardona // PLoS One. - 2017. – Vol. 12. – P. 0171294 – 0171304.
102. Mori, G. Microbiome-immune interactions in tuberculosis / G. Mori, M. Morrison, A. Blumenthal // PLoS Pathogens. – 2021.- Vol. 4 (17). – P. 1009377- 1009413.
103. Naidoo, C. C. Anaerobe-enriched gut microbiota predicts pro-inflammatory responses in pulmonary tuberculosis / C. C. Naidoo, G. R. Nyawo, I. Sulaiman, B. G. Wu, C. T. Turner, K. Bu, Z. Palmer, Y. Li, B.W. Reeve, S. Moodley, J.G.Jackson, J. Limberis, A. H. Diacon, P. D. Helden, J. C. Clemente, R. M. Warren, M. Noursadeghi, L. N. Segal, G. Theron // EBioMedicine. - 2021. – Vol. 67. – P. 103374 - 103386.
104. Ngom, I. I. Metaproteomics of the human gut microbiota: challenges and contributions to other OMICS / I. I. Ngom, Ph. Decloquement, N. Armstrong, R. Didier, E. Chabriere // Clinical Mass Spectrometry. – 2019. – Vol. 14. – P. 18-30.
105. O’Toole, R. F. The host microbiome and impact of tuberculosis chemotherapy / R. F. O’Toole, S. S. Gautam // Tuberculosis. – 2018. – Vol. 113. – P. 26–29.
106. Perez, J. C. Fungi of the human gut microbiota: roles and significance / J. C. Perez // International Journal of Medical Microbiology. – 2021. – Vol. 311. – P. 151490 – 151496.
107. Pinkes, M. E. Native-valve *Enterococcus hirae* endocarditis: a case report and review of the literature / M. E. Pinkes, C. White, C. S. Wong // BMC Infectious Diseases. – 2019. – Vol. 19. – P. 891 – 896.
108. Rahmania, M. *Enterococci* from breast-fed infants exert higher antibacterial effects than those from adults: a comparative study / M.

- Rahmania, F. Saffarib, O. Aboubakric, S. Mansouri // *Human Microbiome Journal*. – 2020. – Vol. 17. – P. 100072 – 100076.
109. Sanjiwani, M. I. D. Probiotic-based therapy for active tuberculosis infection: role of gut-lung axis and granulocyte macrophage-colony stimulation factor / M.I.D. Sanjiwani, N.B. W. Setiawan, A.I.Y. D.Putra, A.E. Darwinata // *Jurnal Respirasi*. – 2021. – Vol. 07 (02). – P. 93-99.
110. Sarma, D. T. Latent tuberculosis and computational biology: a less-talked affair / D.T. Sarma, R. Parveen, J. Kumdu, S. Chatterjee // *Progress in biophysics and Molecular Biology*. – 2023. – Vol. 178. – P. 17-31.
111. Shah, T. The role of microbiota in respiratory health and diseases, particularly in tuberculosis / T. Shah, Z. Shah, Z. Baloch, X. Cui // *Biomedicine and Pharmacotherapy*. – 2021. – Vol. 143. – P. 112108 – 112131.
112. Sharma, P. Novel enterocin E20c purified from *Enterococcus hirae* 20c synergised with β -lactams and ciprofoxacin against *Salmonella enterica* / P. Sharma, M. Rashid, S. Kaur // *Microbial Cell Factories*. – 2020. – Vol. 19. – P. 98-119.
113. Shekh, R. M. Biochemical characterization of an anti-*Candida* factor produced by *Enterococcus faecalis* / R. M. Shekh, U. Roy // *BMC Microbiology*. – 2012. – Vol. 12. -P. 132 – 147.
114. Shi, J. The Relevance of Host Gut Microbiome Signature Alterations on de novo Fatty Acids Synthesis in Patients with Multi-Drug Resistant Tuberculosis / J. Shi, G. Gao, Zh. Yu, K. Wu, Y. Huang, L. Wu, Z. Wu, X. Ye, Ch. Qiu, X. Jiang // *Infection and Drug Resistance*. – 2022. – Vol.15. – P. 5589–5600.
115. Shi, W. Alterations of gut microbiota in patients with active pulmonary tuberculosis in China: a pilot study / W. Shi, Y. Hu, Z. Ning, F. Xia, M. Wu, Y. O.O. Hu, Ch. Chen, S. Prast-Nielsen, B. Xu // *International Journal of Infectious Diseases*. – 2021. – Vol. 111. – P. 313-321.

116. Somboro, A. M. The role of the microbiome in inflammation during tuberculosis / A. M. Somboro, D. Diallo, J. L. Holl, M. Maiga // *EBioMedicine*. - 2021. – Vol. 68. – 103435 – 103437.
117. Suryaleta, K. Decoding the proteomic changes involved in the biofilm formation of *Enterococcus faecalis* SK460 to elucidate potential biofilm determinants / K. Suryaleta, L. Narendrakumar, J. John, M. P. Radhakrishnan, S. George, S. Thomas // *BMC Microbiology*. – 2019. – Vol. 19. - P. 146 – 159.
118. Tarek, N. Genome sequencing of *Enterococcus faecium* NT04, an oral microbiota revealed the production of enterocin A/B active against oral pathogens / N. Tarek, A. F. Azmy, A. S. Khairalla, M. Abdel-Fattah, O. A. Jefri, M. Shaban, A. A.A. El-Sayed, A. O. El-Gendy // *Heliyon*. - 2023. – Vol. 9. – P. 16253 -16265.
119. Tsukahara, T. Stimulation of murine cell-mediated immunity by dietary administration of a cell preparation of *Enterococcus faecalis* strain KH-2 and its possible activity against tumour development in mice / T. Tsukahara, S. Nakamura, G. A. Romero-Perez, M. Ohwaki, T. Yanagisawa, T. Kan // *Bioscience of Microbiota, Food and Health*. – 2018. - Vol. 37 (3). - P. 49–57.
120. Wang, H. Gut dysbacteriosis attenuates resistance to *Mycobacterium bovis* infection by decreasing cyclooxygenase 2 to inhibit endoplasmic reticulum stress / H. Wang, J. Yao, Y. Chen, Y. Wang, Y. Liu, Y. Liao, Zh. Liang, Y. Dong, M. Qu, X. Ge, X. Zhou // *Emerging Microbes and Infections*. – 2022. – Vol. 11. – P. 1806-1818.
121. Wang, J. Long-term effects of multi-drug-resistant tuberculosis treatment on gut microbiota and its health consequences / J. Wang, K. Xiong, S. Zhao, C. Zhang, J. Zhang, L. Xu, A. Ma / *Frontiers in Microbiology*. – 2020. – Vol. 11. – P. 1 –
122. Wang, W. Microbiota, metabolites and mucosal immunity as potential targets of traditional Chinese medicine for respiratory diseases based on the lung-gut crosstalk / W. Wang, Sh. Zhu, Y. Zhang, L. Chu, S. Liu, H. Yang,

- H.Wu // Pharmacological Research – Modern Chinese Medicine. – 2024. – Vol. 10. – P. 100374-100390.
123. Wanga, F.Y.Y. *Candida albicans* triggers qualitative and temporal responses in gut bacteria / F. Y.Y. Wanga, C. Xina, F. Liua, Ch. Zhaoa, L. Xiang, Z. Songa // Journal of Medical Mycology. – 2021. – Vol. 31(3). – P. 101164.
124. Xiang, D. Antagonistic interaction between two key endodontic pathogens *Enterococcus faecalis* and *Fusobacterium nucleatum* / D. Xiang, P. Dong, L.Cen, B. Bor, R. Lux, W. Shi, Q. Yu, X. He, T. Wu // Journal of Oral Microbiology. – 2023. – Vol.15. – P. 2149448 – 2149458.
125. Yang, F. The gut microbiota mediates protective immunity against tuberculosis via modulation of lncRNA / F. Yang, Y. Yang, L. Chen, Zh. Zhang, L. Liu, Ch. Zhang, Q. Mai, Y. Chen, Z. Chen, T. Lin, L. Chen, H. Guo, L. Zhou, H. Shen, X. Chen, L. Liu, G. Zhang, H. Liao, L. Zeng, G. Zeng // Gut Microbes. – 2022. – Vol. 14, No.1. – P. 2029997 – 2030023.
126. Yu, Sh-H. Decrease of insoluble glucan formation in *Streptococcus mutans* by co-cultivation with *Enterococcus faecium* T7 and glucanase addition / Sh-H Yu, S-H. Kwak. T. T. H. Nguyen. Y. Seo. C. Song, K. Mok, D. Kim // Biotechnology Letters. – 2018. – Vol. 40. – P. 375-381.
127. Zheng, J. ClpP participates in stress tolerance, biofilm formation, antimicrobial tolerance, and virulence of *Enterococcus faecalis* / J. Zheng, Y. Wu, Z. Lin, G. Wang, S. Jiang, X. Sun, H. Tu, Z. Yu, D. Qu // BMC Microbiology. – 2020. – Vol. 20. - P. 30 – 48.
128. Zhong, Z. A genome-wide association study of antibiotic resistance in dairy products-associated *Enterococcus faecium* isolates / Z. Zhong, T. Shen, J. Lu, X. Ma, M. Zhu, L-Y Kwok, W. Liu // LWT-Food Science and Technology. - 2023. – Vol. 185. – P. 115189-115197.
129. Zhong, Z. Comparative genomic analysis revealed great plasticity and environmental adaptation of the genomes of *Enterococcus faecium* / Z. Zhong,

- L. Kwok, Q. Hou, Y. Sun, W. Li, H. Zhang, Z. Sun // BMC Genomics. – 2019. – Vol. 20. – P. 602 – 615.
130. Zhuo, Q. The gut and lung microbiota in pulmonary tuberculosis: susceptibility, function, and new insights into treatment / Q. Zhuo, X. Zhang, K. Zhang, Ch. Chen, Zh. Huang, Y. Xu // Expert Review of Anti-infective Therapy. – 2023. – Vol. 21 (12). – P. 1355-1364.