

Г.И. Подопригора^{1,2}, Л.И. Кафарская¹, Н.А. Байнов¹

¹ ФГБУ Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова
Минздравсоцразвития России, Москва

² Некоммерческое учреждение Научно-исследовательский институт цитохимии и молекулярной фармакологии, Москва

Гнотобиология в современных медико-биологических исследованиях

В обзоре освещено современное состояние и перспективы гнотобиологии и исследований роли нормальной микрофлоры на основе экспериментов с лабораторными животными с контролируемой микрофлорой (гнотобиотами). Рассмотрены основные элементы гнотобиологической технологии и возможности ее использования в экспериментальных и клинических исследованиях. Показана многогранная роль нормальной микрофлоры в физиологических реакциях и при патологии макроорганизма, предопределяющая значение гнотобиологических моделей в различных областях медицины и биологии, в частности при разработке и изучении пробиотиков нового поколения, при оценке и характеристике выделенных штаммов и изучении их взаимодействия с другими представителями микробиоты. Перспективна организация комплексных гнотобиологических исследований.

Ключевые слова: гнотобиология, гнотобиоты, нормальная микрофлора, взаимоотношения хозяин–микроб.

Введение

В современных медико-биологических исследованиях с развитием гнотобиологии значительно расширились возможности контроля роли микробного фактора [1]. Достигнутые успехи в этой области обусловлены разработкой доступных безмикробных изоляторов [2] и организацией коммерческого производства безмикробных крыс, мышей и др. животных для исследований в медицине, биологии, ветеринарии и многих других областях. В России такие работы были начаты в середине 60-х гг. в системе Академии медицинских наук СССР (и одновременно в НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи и НИЛ экспериментально-биологических моделей) [3]. Позднее экспериментальные гнотобиологические исследования получили развитие на кафедре микробиологии РГМУ (ныне РНИМУ имени Н.И. Пирогова), в Ветеринарной академии, Институте биоорганической химии РАН и др. научных учреждениях России.

Исторически развитие гнотобиологии неразрывно связано с формированием учения о нормальной микрофлоре, основанного И.И. Мечниковым и продолженного его учениками и последователями. В России работы

по изучению нормальной микрофлоры начались на кафедре бактериологии (ставшей впоследствии кафедрой микробиологии РНИМУ), основанной П.В. Циклинской в 1908 г. В последующем исследования кафедры развивались под руководством И.Л. Кричевского, Н.Ф. Гамалеи, В.Д. Тимакова. Непосредственно исследования роли микрофлоры на гнотобиотических животных были начаты на кафедре под руководством В.М. Коршунова. В настоящее время коллектив кафедры микробиологии и вирусологии, возглавляемый Л.И. Кафарской, с использованием новейших методов молекулярной биологии и генетики проводит дальнейшее изучение микрофлоры тела человека, нарушений микробиоценоза и способов их коррекции на основе препаратов-пробиотиков нового поколения с применением бифидобактерий и лактобацилл.

Методы гнотобиологии позволяют получать различные категории микробиологически контролируемых животных (гнотобиотов), включая безмикробных и ассоциированных с определенными микроорганизмами т.н. гнотофорных животных, а также животных, свободных от специфических патогенных микроорганизмов. На основе химически определенных диет, стерили-

G.I. Podoprigora^{1,2}, L.I. Kafarskaya¹, N.A. Bainov¹

¹ The Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov (RNRMU), Moscow

² Research Institute of Cytochemistry and Molecular Pharmacology, Moscow

Gnotobiology in modern bio-medical research

An overview of the present status and prospects of gnotobiology along with a role of normal microflora studied using laboratory animals with controlled microflora (gnotobiotics) is presented. The principal elements of gnotobiototechnology as well as possibilities of its using in both experimental and clinical investigations are analyzed. A multifaceted role of normal microflora in the host physiology and pathology preclude the increasing importance of gnotobiological models in various fields of biology and medicine, such as the development of new generations probiotics. An assessment and characteristics of selected microbial strains, host-microbe interactions etc. An organization of further complex gnotobiotic research is of prospective value.

Key words: gnotobiology, gnotobiotics, normal microflora, host-microbe interactions.

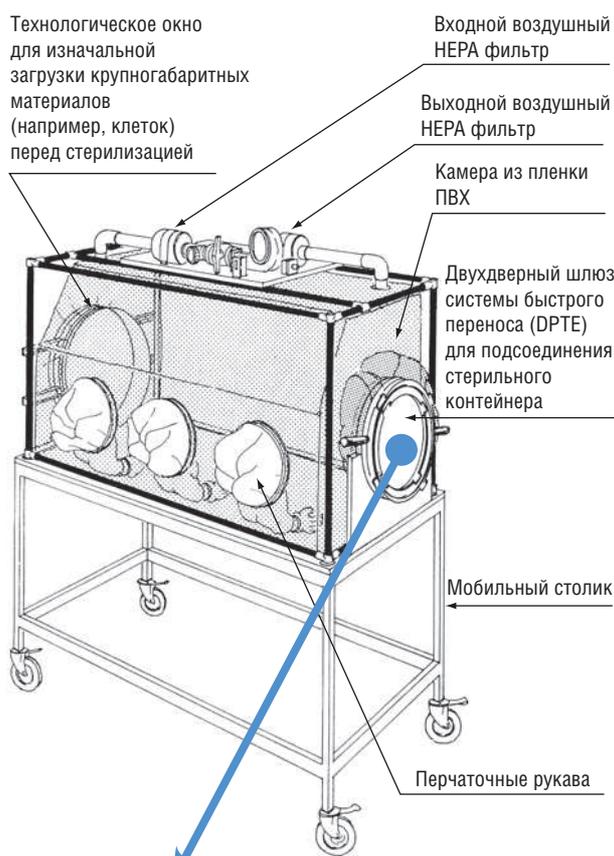


Рис. 1. Стандартный пленочный гнотобиологический изолятор (на примере изолятора фирмы LaCalhene, Франция) (схема). Стрелкой показан шлюз быстрого переноса



Рис. 2. Усовершенствованная система стерилизации поступающего в изолятор воздуха с применением установки «Поток Интер» (показана стрелкой)

лизуемых фильтрованием, разработаны методики получения животных с ограниченной антигенной контаминацией. Микробиологический контроль гнотобиотов осуществляется с использованием как культуральных, так и молекулярно-биологических методов с применением таких чувствительных реакций, как ПЦР и NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification), — тестов, основанных на амплификации РНК.

Практически наибольшее распространение получила категория лабораторных животных, лишенных специфических патогенных микроорганизмов, т.н. SPF-животные, или беспатогенные животные (животные с минимальным носительством патогенных или условно-патогенных микроорганизмов). Разработаны упрощенные системы получения и выращивания таких животных [4]. Для целей биостандартизации перспективны гнотобактериальные животные со строго определенной микрофлорой [5].

Гнотобиотехнология

Основу гнотобиологической аппаратуры составляют безмикробные изоляторы (рис. 1). Основным их назначением является обеспечение надежного противомикробного барьера. Гнотобиологический изолятор представляет собой устройство, состоящее из герметичной камеры, снабженной одной или несколькими парами длинных манипуляционных перчаток (обычно изготавливаемых из неопренового латекса). В камере имеется гидро- и/или аэрошлюз, предназначенный для промежуточной стерилизации материалов и асептического проведения стерильных материалов в изолятор, а также выведения отработанных материалов или проб наружу. Изоляторы оснащаются системой стерильного воздухообмена, включающей входной и выходной фильтр для очистки поступающего в камеру воздуха от микробных загрязнений.

Современные тенденции развития технологии включают упрощение и сокращение времени отдельных технологических операций, повышение надежности изолирующих систем и противомикробной защиты в целом, оптимизацию и повышение эффективности стерилизующих процедур, подбор адекватных рационов и полноценного стерильного питания, а также углубление контроля микробно-антигенной контаминации гнотобиотов в режиме реального времени, включая использование молекулярно-биологических методов. С целью повышения надежности стерилизации поступающего воздуха нами усовершенствованы системы стерильного воздухообмена с использованием отечественной установки «Поток Интер» (рис. 2), которая в дополнение к HEPA фильтрам обеспечивает предварительную обработку поступающего воздуха при помощи эффекта статического электричества [6].

В практической работе с гнотобиотическими мышами перспективно применение т.н. микроизоляторов, представляющих собой пластиковые стерилизуемые клетки, покрываемые сверху фильтровальной тканью, обеспечивающей стерильный воздухообмен. Такие микроизоляторы (например, фирмы UNO, Голландия) показали себя надежными для содержания небольшого количества мышей при периодической смене стерильного подстилочного материала и пополнении корма и воды в ламинарном боксе.

Получение гнотобиотических животных первой генерации осуществляется оперативными и консервативными методами (рис. 3). К числу первых относятся различные

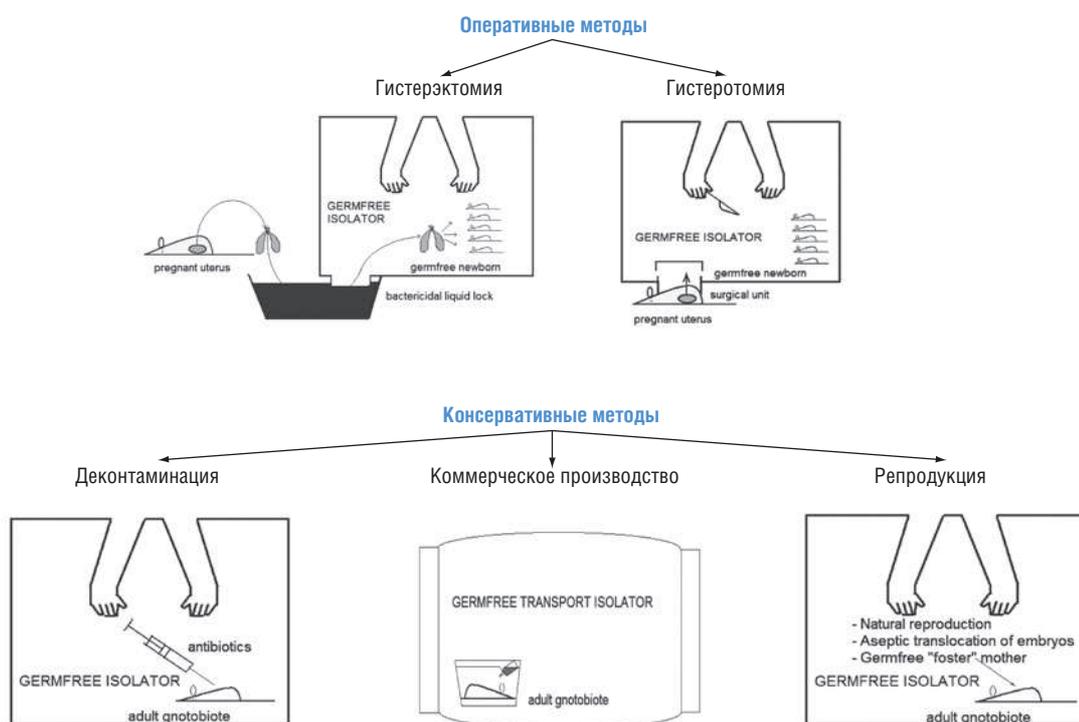


Рис. 3. Методы получения первой генерации безмикробных животных

модификации гистерэктомии (сухой и влажной) и гистеротомии. Дополнительное количество безмикробных животных может быть получено путем одной из модификаций кесарева сечения с последующим использованием естественного вскармливания лактирующей гнотобиотической самкой. Из консервативных способов применяют методы деконтаминации взрослых особей антибиотиками и антимикробными препаратами. В последние годы разработан метод асептической имплантации эмбрионов безмикробным самкам, позволяющий получать гнотобиотов необходимых линий и генно-инженерных модификаций (нокаутные и пр. биомодели). Элементы технологии, включают подбор диет, методы стерилизации, микробиологический контроль и пр. [1, 5]. Структура лаборатории гнотобиологии РНИМУ им. Н.И. Пирогова представлена на рис. 4.

От безмикробных экспериментов к клинической гнотобиологии

Возможность обеспечения безмикробных условий с помощью гнотобиологических изоляторов способствовала разработке клинических аспектов гнотобиологии. Такая работа была начата в 70-х гг. прошлого века в сотрудничестве НИЛ биомоделей АМН СССР с кафедрой детской хирургии РГМУ. Многочисленные эксперименты показали высокую эффективность безмикробной изоляции (изотехнологии) в предотвращении операционной контаминации, а также инфекционных осложнений экспериментальных ожоговых травм, моделируемых у лабораторных животных в условиях гнотобиологической изоляции [7]. Было установлено три основных направления клинической гнотобиологии: биологическая локальная изоляция, безмикробная хирургия и общая или полная гнотобиологическая изоляция. Принцип **биологической локальной изоляции**, получивший сокращенное название **БИОЛИЗ**

[8, 9], основан на разработке и применении локальной гнотобиологической системы, обеспечивающей антимикробную изоляцию поврежденной конечности или другой части тела, и создающей микробиологически контролируемую и управляемую среду. Эффективность этой оригинальной системы была подтверждена многолетним успешным опытом применения в ряде клиник хирургического профиля [10]. Метод оказался эффективным в лечении обширных ран различной этиологии, в том числе инфицированных ран, глубоких локальных ожоговых поражений с последующей кожной пластикой, а также в комбинации с другими методами, повышающими терапевтический потенциал, такими как лазерная или криотерапия [11]. Эффективность локального изолятора во многом обусловлена феноменом микробной сукцессии и микрoэкологических изменений в изолированной инфицированной ране [12], заключающихся в спонтанной частичной элиминации патогенов и замещении их нормофлорой, включая липофильные бактерии, которые играют адьювантную и иммуностимулирующую роль и способствуют заживлению ран. В процессе самоочищения инфицированных ран принимают участие механизмы как врожденного, так и приобретенного иммунитета, стимулируемые влиянием микрофлоры. Этот метод в разных модификациях получил развитие и перспективен для клинической практики. Метод **безмикробной хирургии** основан на использовании специального стерильного операционного (хирургического) пленочного изолятора для проведения хирургических вмешательств на органах брюшной полости, при торакотомии, вмешательствах на кровеносных сосудах, костях, суставах и др. как у новорожденных, так и у взрослых индивидуумов [11]. Использование изоляторов оправдано и для хирургических диагностических вмешательств (например, диагностическая лапаротомия), а также для учебных и др. клинических целей. Преимуществом безмикробных хирургических изоляторов является создание



Рис. 4. Лаборатория гнотобиологии РНИМУ им. Н.И.Пирогова

и поддержание абсолютно стерильной среды в операционном поле. Вследствие своей мобильности безмикробный хирургический изолятор может быть использован для неотложной хирургической помощи нетранспортабельным больным как в домашних, так и в полевых условиях. Применение пластиковых безмикробных изоляторов целесообразно при аутопсии погибших от особо опасных инфекций, что снижает риск заражения персонала.

Полная или общая гнотобиологическая изоляция, обеспечивающая надежную противомикробную защиту, показана для достижения тотальной или селективной деконтаминации и существенно дополняет рациональную антибиотикотерапию, основанную на концепции колонизационной резистентности [13]. Такой подход позволяет предотвратить или существенно снизить риск развития нозокомиальных инфекций, приводящих к серьезным социально-экономическим последствиям. Известно, что больничные инфекции поражают от 5 до 10% всех острых больных, поступающих в госпитали в развитых странах, а в развивающихся странах этот процент на порядок выше [14]. Проблема внутрибольничных инфекций Всемирной организацией здравоохранения признается приоритетной.

Гнотобиологические модели в медико-биологических исследованиях

В зависимости от микробного статуса выделяют две группы морфофункциональных фенотипических характеристик лабораторных животных. *Germfree animal characteristics (GAC)* — морфофункциональные особенности безмикробного животного (сопоставление аналогичных параметров у безмикробных и конвенциональных животных указывает на интегральную роль микрофлоры). *Microflora-associated characteristics (MAC)* — совокупность морфофункциональных изменений организма хозяина, определяемых взаимодействием с определенной ассоциированной микрофлорой и ее отдельными представителями.

Сопоставление этих характеристик позволяет глубже понять роль микробиоты и ее представителей в норме и при патологии макроорганизма. При этом отсутствие экспрессии ряда генов, отвечающих за ту или иную патологию у безмикробных или даже SPF-животных, указывает на их взаимодействие с микробным фактором и, в первую очередь, с аутофлорой [15]. Гнотобиологические модели подходят для изучения клеточных

и молекулярных механизмов перекрестного взаимодействия компонентов микробиоты, эпителия кишечника и иммунной системы макроорганизма [16]. Морфогенная роль микробиоты проявляется в постнатальном развитии кишечника, включая развитие капиллярной кровеносной и лимфатической сети микрососудов мезенхимной части ворсинок тонкой кишки [17]. Стимулирующее влияние микробного фактора отмечается в развитии поведенческих и локомоторных реакций макроорганизма [18].

Особенности обмена веществ безмикробных животных включают сниженный энергетический обмен и метаболизм в целом (например, основной обмен веществ у безмикробных животных снижен на 25%); ограниченный биосинтез (например, витамины В, К, и др.) и дефицит ряда ферментов (лактаза, β -глюкуронидаза и т.д.). Для гнотобиотов характерно снижение интенсивности процессов окисления гидроксильных групп, восстановления кетонов и гидрогенизации двойных связей. Кроме того, отмечается сниженный метаболизм ненасыщенных жирных кислот, а также желчных кислот и стеролов, концентрации которых у безмикробных животных в несколько раз выше, чем у обычных. Микробная деконъюгация желчных кислот и окислительные процессы, обладая определенным бактерицидным эффектом, участвуют в формировании и саморегуляции микробиоценозов в кишечнике, входя в основу механизмов микробной конкуренции и антагонизма.

Получены данные о роли кишечной микробиоты как фактора регуляции запасов жира в организме, что объясняется повышенной активностью АМФ-активированной протеинкиназы, влияющей на окисление жирных кислот. Безмикробные мыши, нокаутированные по фактору *Fiaf* (*fasting-induced adipose factor*) — циркулирующему ингибитору липопротеиновой липазы, экспрессия которой в эпителии кишечника селективно тормозится микробиотой, теряют устойчивость к алиментарному ожирению [18]. Такие наблюдения позволяют контролировать процессы алиментарного ожирения путем коррекции микробиоценозов.

Важную роль кишечная микробиота играет и в энергетическом обмене, оказывая влияние на энергетический баланс и являясь важным супраорганизменным компонентом метаболома. Микробиом модулирует абсорбцию, накопление и получение энергии из диеты на системном уровне [19]. Установлено, что микрофлора регулирует запас калорий в адипоцитах [20]. Гнотобиотические модели показывают, что микробиота способствует расщеплению неперевариваемых макроорганизмом полисахаридных компонентов диеты [21]. Трансплантированная микробиота за счет собственных гидролаз повышает способность организма хозяина к расщеплению растительных полисахаридов с гликозидными связями, а также модулирует гены хозяина, влияющие на накопление энергии в адипоцитах.

Для современной медицины исследования метаболической роли микробиоты приобретают особую актуальность в связи с началом проекта «Метаболом человека». Ожидается, что метаболомный проект будет иметь для медицины и терапии не меньшее значение, чем проект «Геном человека», поскольку метаболомы, с точки зрения мониторинга здоровья и физиологических процессов организма, являются более чувствительными индикаторами. Такие индикаторы могут быть использованы для диагностики многих генетических, инфекционных и др. заболеваний. Исследование взаимосвязи микробиоты и метаболической активности

у гнотобиотических мышей показало значительную зависимость специфического метаболита от резидентного микробиома [19]. Учет микробиотического фактора имеет огромное значение, т.к. триллионы микроорганизмов, населяющих желудочно-кишечный тракт, одновременно с собственными ферментными системами макроорганизма действуют как экстракорпоральный метаболический орган.

Учитывая лавинообразный поток информации и огромный объем фактического материала, важнейшую роль в анализе, обобщении и систематизации данных приобретают инструменты системной биологии, в частности моделирование процессов взаимодействия макроорганизма и микробиоты на различных уровнях интеграции организма, включая молекулярный [22]. Построение различных моделей и виртуальных фантомов с учетом взаимодействия макроорганизма и микробиотических факторов среды даст возможность создавать проверяемые гипотезы, обладающие предсказательным потенциалом, и поможет в построении целостной картины взаимодействия макроорганизма и его микроокружения. Данные гнотобиологических исследований внесут весомый вклад в комплексную характеристику взаимодействия эу- и прокариотических систем.

Систематические наблюдения на гнотобиотах позволили получить дополнительные данные об иммуногенной роли микробиоты. Характерной особенностью иммунной системы безмикробных животных является недоразвитие лимфоидной ткани; пониженное содержание иммуноглобулинов (IgM, IgG, IgA, sIgA) и даже их отсутствие у т.н. безантигенных животных; сниженная продукция цитокинов (например, интерферона- γ , фактора некроза опухоли (ФНО)- α) и др. К особенностям клеточного иммунитета относят отсутствие т.н. синдрома истощения при неонатальной тимэктомии, а также возможность радиационного химеризма при аллогенной трансплантации костного мозга. Для безмикробных животных характерны низкие уровни как гуморальных, так и клеточных факторов неспецифической резистентности организма к инфекции (комplement, лизоцим, пропердин, низкая активность мононуклеарно-фагоцитарной системы, в меньшей степени выражена барьерная функция лимфоидной ткани). Одновременно у гнотобиотов отмечается снижение степени выраженности признаков воспаления на флоготенные факторы и лихорадочной реакции на пирогены, снижение микроциркуляторных реакций и реактивности микрососудов на гистамин. Сравнение с обычными конвенциональными животными, ассоциированными с микрофлорой, показывает отсутствие у безмикробных животных признаков «физиологического» воспаления в слизистых оболочках, являющегося важным функциональным звеном в адаптационно-защитных механизмах организма при взаимодействии с микробной средой.

В последних исследованиях установлена важная роль микробиоты в генерации медиаторов иммунологических реакций. Микробиота (в частности, симбиотические бактерии за счет утилизации нитратов и нитритов) активно участвует в выработке в кишечнике NO, играющего роль универсального медиатора иммунологических и гомеостатических реакций. В экспериментах на крысах обогащение диеты лактобациллами и нитратами приводило к повышению концентрации NO в тонкой кишке до 3–8 раз. Отмечается разнонаправленное действие отдельных бактерий на метаболизм NO. Так, подселение гнотобиотическим животным *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli* снижало содержание NO за счет усвоения этого продукта [23].

При этом в естественной микроэкосистеме обеспечивается поддержание гомеостатического баланса, т.к. избыточная генерация окиси азота одними бактериальными видами уравнивается быстрым поглощением другими.

В свете важной роли toll-подобных рецепторов (TLR), играющих ключевую роль в клеточной активации в ответ на патогены, интерес вызывает их экспрессия у гнотобиотических животных. Систематических данных об особенностях комплекса этих рецепторов у безмикробных животных пока не накоплено. Известно, что экспрессия TLR9, обнаруженная у обычных мышей на апикальной поверхности эпителия толстой кишки, в ответ на патогенные микроорганизмы у безмикробных животных не отмечается [24]. Возможными отличиями в экспрессии TLR2, контролирующей плотность межклеточных контактов энтероцитов и обеспечивающих резистентность кишечного барьера в отношении флогенно-стрессовых факторов [25], может объясняться повышенная проницаемость кишечного барьера и транслокация кишечных микроорганизмов у гнотобиотов.

Активация TLR в кишечнике под влиянием микробиоты — важный фактор поддержания гомеостаза и обеспечения толерантности к комменсалам в кишечнике. Сигналы от TLR и общей адаптогенной молекулы MyD88 в процессе адаптационной гомеостатической реакции в кишечнике играют ключевую роль во взаимосвязи между врожденными и приобретенными защитными реакциями. Потенциальные возможности пробиотиков и фармпрепаратов, действующих как агонисты TLR, могут быть использованы с целью модуляции воспалительного ответа в кишечнике. Важная роль микробного фактора состоит в том, что микрофлора обучает и настраивает иммунную систему, стимулирует созревание врожденной и адаптивной иммунной системы [26–28]. Механизмы иммунорегулирующей роли микрофлоры включают выработку иммуномодулирующих пептидов, примирование иммунокомпетентных клеток, а также стимуляцию других механизмов, участвующих в колонизационной резистентности организма.

Большие возможности контроля микробного фактора предопределили использование безмикробных методов и гнотобиологических моделей в различных областях современной биологии и медицины. В **экспериментальной геронтологии** применение гнотобиологических моделей показало, что влияние микробного фактора на продолжительность жизни весьма существенно и разнонаправленно в зависимости от вида микроорганизмов, возраста и питания животных. Показано, что гнотобиотические (безмикробные и ассоциированные с ограниченной непатогенной флорой) крысы и мыши живут дольше обычных [29]. У гнотобиотических мух-дрозофил установлено различное влияние микробов-контаминантов на продолжительность жизни. Если в раннем периоде это влияние носит положительный характер, то в позднем присутствии бактерий сокращает продолжительность жизни. Предполагается определенное взаимодействие микроорганизмов с генами старения и механизмами апоптоза [30].

В **радиобиологии** установлено, что безмикробные животные (мыши и др. животные) обладают повышенной, по сравнению с конвенциональными животными, устойчивостью к облучению в дозах, вызывающих в обычных условиях летальный энтерит. Минимальная доза облучения, вызывающая 50% летальный эффект, выше для безмикробных животных [31]. При облучении всего тела летальной дозой безмикробные животные живут дольше контрольных животных [32, 33]. Облучение

всего тела летальной дозой у безмикробных мышей сопровождалось менее выраженным апоптозом в клетках эндотелия и лимфоцитах ворсинок тонкой кишки, чем у конвенциональных животных [16]. Установлена важная роль ангиопоэтин-подобного протеина эпителиального происхождения, экспрессия которого в норме подавляется микробиотой, а его дефицит сопровождается утратой резистентности клеточных популяций эндотелия и лимфоцитов ворсинок к апоптозу, вызываемому радиоактивным облучением.

Сравнительные **онкологические** исследования безмикробных и обычных животных демонстрируют наличие или отсутствие зависимости опухолеобразования от микробного фактора. Отсутствие или замедленное развитие опухолей у безмикробных животных указывает на участие микробных энзиматических механизмов в метаболизме канцерогенов. Так, циказин или 1, 2-диметилгидразин вызывают развитие карциномы кишечника у обычных или ассоциированных с *E. coli* гнотобиотических животных в отличие от безмикробных крыс. Усиленный канцерогенный эффект (производные нитрозогуанидина и нитрозоуретана) у безмикробных крыс указывает на онкопротективное действие отдельных представителей микробиоты. В то же время для отдельных канцерогенов (3-метилхолантрен, 7, 12-метилхолантрен, уретан) роль микробного фактора не обнаружена.

Большой интерес представляет связь физиологических и патологических процессов с **микробиологией**, в частности желудочно-кишечного тракта. Известно, что роль кишечной микрофлоры человека отличается от таковой у животных, что неизбежно. Модели гнотобиотов, ассоциированных с человеческой микрофлорой (*HFA*), позволяют изучить взаимодействие между микрофлорой человека, факторами макроорганизма, составом диет и лечебными препаратами, такими как про-, пре- и антибиотики [34]. Особую важность представляет использование гнотобиологических моделей для оценки потенциальных кандидатов пробиотиков, их взаимодействия с другими представителями микробных биоценозов. Исследования на животных моделях показывают, что механизмы защитного действия пробиотиков включают модуляцию иммунной системы, биомодификацию аутофлоры, метаболические процессы и, вероятно, оказывают влияние на нейрогуморальные регуляторные механизмы. Иммуномодулирующий эффект проявляется также в генерации и стимуляции активности цитокинов и гуморальных факторов резистентности и иммунитета (стимуляция противовоспалительных ИЛ-10, интерферона, выработки NF- κ B и др. факторов), участия в механизмах колонизационной резистентности. На примере препарата Symbioflor-2 показано, что пробиотики стимулируют увеличение числа внутриэпителиальных лимфоцитов в тонкой кишке гнотобиотов [5]. Пробиотики (в частности, *Bifidobacterium bifidum*) обладают выраженной способностью к стимуляции увеличения числа купферовских клеток в печени и повышению активности мононуклеарно-фагоцитарной системы (МФС) гнотобиотов. Известно, что микробные сигналы со стороны кожи и слизистых оболочек (кишечник, легкие и др.) могут воздействовать на периферические рецепторы блуждающего нерва и достигать образований ЦНС, влияя на функцию мозга. Механизмы защитного действия пробиотиков, таких как *Lactobacillus plantarum* и *L. paracasei*, включают также повышенную способность влиять на ядерный фактор NF- κ B. *L. plantarum* и *Leuconostoc mesenteroides* отличаются увеличенной способностью стимулировать образование провоспалительных (ИЛ-1 β , ИЛ-8) и проти-

воспалительных цитокинов (ИЛ-10). Способность к выработке антиоксидантов отмечена у микроорганизмов *L. plantarum* и *Pediococcus pentosaceus* [35]. Прямые и опосредованные механизмы колонизационной резистентности, т.е. подавления роста потенциально патогенных бактерий, запускаемые микробиотой, включают механизмы конкуренции за питательные вещества, за связывающие сайты и рецепторы, выработку токсических метаболитов [36], а также иммуномодулирующих пептидов. За счет стимуляции клеток Панета происходит активация выработки лизоцима, дефензинов, секреторной фосфолипазы A_2 и др. антимикробных пептидов [37], участвующих в защите крипт тонкой кишки от микробной и паразитарной инвазии.

Большую роль в реализации иммуногенного эффекта пробиотиков играет активация мононуклеарно-фагоцитарной системы, являющейся интегральным показателем резистентности организма. В сравнительных экспериментах с использованием безмикробных и контрольных обычных животных были установлены заметные различия в клиренсе крови от внутривенно введенных патогенных бактерий *E. coli* B₄₁. В то время как у обычных животных наблюдался эффективный клиренс, очищение крови от введенных микроорганизмов у безмикробных животных было замедленным и неполным. На этой модели показано иммуномодулирующее действие различных пробиотиков — *Lactobacillus acidophilus*, *Saccharomyces boulardii* и *E. coli* ЕМО (лишенный плазмид штамм кишечной палочки). У мышей-гнотобиотов уже спустя 1 нед моноассоциации с указанными пробиотиками отмечался эффект стимуляции мононуклеарно-фагоцитарной системы, особенно выраженный в случае применения лактобацилл. Стимуляция МФС лактобациллами наблюдалась и у конвенциональных мышей, прошедших обработку иммунодепрессантом (циклофосфамидом), а также нокаутированных по ФНО- α . Определенной стимулирующей активностью у гнотобиотических мышей обладали также бифидобактерии и непатогенные бактерии *E. coli* [5].

В последние годы появилось много сообщений, указывающих на важную роль внутриэпителиальных лимфоцитов в реакциях местного и системного иммунитета. При исследовании слизистой оболочки кишечника одновременно наблюдается усиление местного клеточного ответа на ассоциацию с микроорганизмами проби-

отиками, что выражается в повышении числа внутриэпителиально расположенных лейкоцитов, особенно заметно при моноассоциации гнотобиотических мышей с кишечной палочкой [38].

Таким образом, использование гнотобиологических моделей перспективно для ряда областей медико-биологических исследований. Несмотря на обширные наблюдения, выполненные на гнотобиотических животных, подход не теряет своей актуальности. На сегодняшний день пока еще мало известно о том, как компоненты кишечной микрофлоры взаимодействуют с хозяином при установлении взаимовыгодных симбиотических отношений. Гнотобиоты позволяют уточнить фундаментальные механизмы взаимодействия клеток про- и эукариот.

Прогресс в гнотобиологии тесно связан с внедрением молекулярно-биологических методов анализа состава микробиоты в режиме реального времени на основе определения 16S гРНК-генов представителей микроорганизмов с помощью ПЦР и градиентного гелевого электрофореза, что позволило значительно углубить представления о реальной микрофлоре [39–41]. С развитием молекулярно-генетических методов контроля, позволяющих детектировать некультивируемые традиционными методами виды, открываются новые представления о микрофлоре, демонстрируя, что реальная микрофлора в количественном и видовом составе представлена значительно шире и многообразнее. Изучение анатомио-физиологических характеристик, биохимических и иммунологических изменений в макроорганизме, возникающих под влиянием микрофлоры, особенно полно раскрывается в контрольных гнотобиологических экспериментах. Как показывает опыт ведущих зарубежных гнотобиологических центров, внедрение гнотобиологических моделей имеет особое значение для изучения пробиотиков нового поколения, оценки и характеристики выделенных штаммов и их взаимоотношений с другими представителями микробиоты. Особый интерес в этом отношении представляют биомодели с подселенной человеческой микрофлорой. Развитие таких исследований происходит и на базе лаборатории гнотобиологии кафедры микробиологии и вирусологии РНИМУ им. Н.И. Пирогова, имеющей исторически сложившиеся традиции изучения нормальной микрофлоры.

REFERENCES

- Luckey T.D. Germfree Life and Gnotobiology. *New York, London: Academic Press*. 1963. 512.
- Trexler P.C., Reynolds L.I. Flexible film apparatus for the rearing and use of germfree animals. *Appl. Microbiol.* 1957; 5 (6): 406–412.
- Podoprigora G.I. Znachenie NIL eksperimental'no-biologicheskikh modelei' rossii'skoi' AMN v stanovlenii i razvitii gnotobiologii v Rossii. *Baltic J. Lab. Anim. Sci.* 1997; 7: 232–243.
- Sedlacek R.S. Gnotobiotics with micro-isolators utilising ventilated cages and automatic watering. *Microecology and Therapy*. 1999; 28: 55–61
- Podoprigora G.I. Meditsinskaja gnotobiologija. *M.: MIA*. 2003. 271.
- Podoprigora G.I., Bai'nov N.A., Shkoporov A.N. i dr. Ocenka effektivnosti sterilizatsii vozduha pri kombinirovannom ispol'zovanii ustanovki «potok 150-M-01» s NERA-fil'trom v gnotobiologicheskom izolatore. *Sterilizatsia i gospiial'nye infekcii*. 2009; 2 (12): 34–39.
- Fedorov N.A., Koriaqina I.K., Podoprigora G.I. Izuchenie prirody' toksicheskikh faktorov pri ozhogakh v usloviakh gnotobiologicheskogo eksperimenta. *Biull. E'qsp. Biol. Med.* 197; 10: 81–84.
- Isaqov Iu.F., Stepanov E'.A., Podoprigora G.I., Ginodman G.A. Mestnaia gnotobiologicheskaja izolatsia pri lechenii infitsirovanny'kh ran. *Vestn. hirurgii im. I.I. Grekova*. 1976; 116 (5): 53–58.
- Podoprigora G.I., Ginodman, G.A. Metod lechenia ran. *Biull. otgry'tii' i izobretenii'*. 1977; 41: 15.
- Ginodman G.A., Nemsadze V.P., Korschunov V.M. and Dadamjan R.A. Why we need the local gnotobiological isolation: 25 the summer experience of the treatment of wounds in children. Proceedings of the XIIth International Symposium on Gnotobiology. *June 24–28, Honolulu, Hawaii, USA*. 1996. 63.
- Isakov Iu.F. Stepanov E'.A., Podoprigora G.I., Nemsadze V.P. Ginodman G.A. Gnotobiologija v hirurgii. *M.: «Meditsina»*. 1982. 223.
- Belokry'senko S.S., Podoprigora G.I., Ginodman G.A. Ekologicheskoe izmenenie v mikroflоре gnoi'ny'kh ran v usloviakh

- mestnoi` gnotobiologicheskoi` izoliatsii. *Vestn. AMN SSSR*. 1978; 1: 46–50.
13. van der Waaij D. Antibiotic choice: the importance of colonization resistance. *New York, Brisbane, Toronto, Singapore*. 1983. 132.
 14. Pittet D., Allegranzi B., Storr J., et al. Infection control as a major World Health Organization priority for developing countries. *J. Hosp. Infect.* 2008;68 (4): 285–292.
 15. ИТОХ К., NARUSHIMA S. Intestinal flora of animal models of human diseases as an environmental factor. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* 2005; 6 (1): 9–15.
 16. Crawford P.A., Gordon J.I. Microbial regulation of intestinal radiosensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005; 102 (37): 13254–13259.
 17. Stappenbeck T.S., Hooper L.V., Gordon J.I. Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002; 99 (24): 15451–15455.
 18. Backhed F., Manchester J.K., Semenkovich C.F., Gordon J.I. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007; 104 (3): 979–984.
 19. Martin F.P., Dumas M.E., Wang Y., et al. A top-down systems biology view of microbiome-mammalian metabolic interactions in a mouse model. *Mol. Syst. Biol.* 2007; 3: 112.
 20. Backhed F., Ding H., Wang T. et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004; 101 (44): 15718–15723.
 21. Hooper L.V., Midtvedt T., Gordon J.I. How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annu Rev. Nutr.* 2002; 22: 283–307.
 22. Modern Trends in Systems Biology. Virtual Modelling and Regulation. G.I. Podoprigora, Y.R. Nartsissov (eds.). *Proceedings of the 14th Workshop of International Study Group for Systems Biology. September 6–10, Vladimir*. 2010. 172.
 23. Sobko T., Huang L., Midtvedt T. et al. Generation of NO by probiotic bacteria in the gastrointestinal tract. *Free Radic. Biol. Med.* 2006; 41 (6): 985–991.
 24. Ewaschuk J.B., Backer J.L., Churchill T.A. et al. Surface expression of Toll-like receptor 9 is upregulated on intestinal epithelial cells in response to pathogenic bacterial DNA. *Infect. Immun.* 2007; 75 (5): 2572–2579.
 25. Cario E., Gerken G., Podolsky D.K. Toll-like receptor 2 controls mucosal inflammation by regulating epithelial barrier function. *Gastroenterology*. 2007; 132 (4): 1359–1374.
 26. Macpherson A.J., Uhr T. Compartmentalization of the mucosal immune responses to commensal intestinal bacteria. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2004; 1029: 36–43.
 27. Macdonald T.T., Monteleone G. Immunity, inflammation, and allergy in the gut. *Science*. 2005; 307 (5717): 1920–1925.
 28. Cash H.L., Whitham C.V., Behrendt C.L., Hooper L.V. Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin. *Science*. 2006; 313 (5790): 1126–1130.
 29. Pollard M., Wostmann B.S. Increased life span among germfree rats. *Progr. Clin. Biol. Res.* B.S. Wostmann et al. (eds.). *New York*. 1985; 181: 75–76.
 30. BRUMMEL T., CHING A., SEROUDE L., SIMON A.F., BENZER S. Drosophila lifespan enhancement by exogenous bacteria. *PROC. NATL. ACADEM. SCI. USA*. 2004; 101 (35): 12974–12979
 31. McLaughlin M.M., Dacquoise M.P., Jacobus D.P., Horowitz R.E. Effect of the germfree state on responses of mice to whole-body irradiation. *Radiat. Res.* 1964; 23:333–349.
 32. Matsuzawa T. Survival time in germfree mice after lethal whole body X-irradiation. *Tohoku J. Exp. Med.* 1965; 85: 257–263.
 33. Onoue M., Uchida K., Yokokura T., Takahashi T., Mutai M. Effect of intestinal microflora on the survival time of mice exposed to lethal whole-body gamma irradiation. *Radiat. Res.* 1981; 88 (3): 533–541.
 34. Hirayama K., Itoh K. Human flora-associated (HFA) animals as a model for studying the role of intestinal flora in human health and disease. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* 2005; 6 (2): 69–75.
 35. Ljungh A. *Microb. Ecol. Health Dis.* 2002; 3 (4): 4.
 36. Freter R.R., Irminger J.C., Porter J.A., Jones S.D., Stiles C.D. A novel 7-nucleotide motif located in 3' untranslated sequences of the immediate-early gene set mediates platelet-derived growth factor induction of the JE gene. *Mol. Cell Biol.* 1992; 12 (12): 5288–5300.
 37. Bevins C.L. The Paneth cell and the innate immune response. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 2004; 20 (6): 572–580.
 38. Podoprigora G.I., Communian L.B., Pimentel E.F., Moura L.N., Cara D.C., Nicoli J.R. and Vieira E.C. Stimulatory effect of gram-positive and gram-negative probiotics on the host mononuclear phagocyte system in gnotobiotic mice. *Microecology and Therapy*. 1999; 28: 177–191.
 39. Zoetendal E.G., Akkermans A.D., De Vos W.M. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998; 64 (10): 3854–3859.
 40. Tannock G.W., Munro K., Harmsen H.J., Welling G.W., Smart J, Gopal P.K. Analysis of the fecal microflora of human subjects consuming a probiotic product containing *Lactobacillus rhamnosus* DR20. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000; 66 (6): 2578–2588.
 41. Tannock G.W. New perceptions of the gut microbiota: implications for future research. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 2005; 34 (3): 361–382.

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Подопригора Геннадий Игнатьевич, доктор медицинских наук, профессор, директор НИИ цитохимии и молекулярной фармакологии

Адрес: 115404, Москва, ул. 6-я Радиальная, д. 24, стр. 14

Тел./факс: (495) 327-49-87

Е-mail: gipodoprigora@yandex.ru

Кафарская Людмила Ивановна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой микробиологии и вирусологии РНИМУ им. Н.А. Пирогова

Адрес: 117869, Москва, ул. Островитянова, д. 1

Тел.: (495) 434-17-66

Е-mail: likmed@mail.ru

Байнов Николай Алексеевич, кандидат медицинских наук, доцент кафедры микробиологии и вирусологии РНИМУ им. Н.А. Пирогова

Адрес: 117869, Москва, ул. Островитянова, д. 1

Тел.: (495) 434-17-66

Е-mail: vonib@mail.ru