

## МИКРОЭКОЛОГИЯ ЧЕЛОВЕКА В НОРМЕ И ПАТОЛОГИИ ПО ДАННЫМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ МИКРОБНЫХ МАРКЕРОВ

Научный центр сердечно-сосудистой хирургии им А.Н. Бакулева РАМН, Москва;  
Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины  
им. А.М. Никифорова МЧС России, Санкт-Петербург

Представлен обзор данных по применению масс-спектрометрии микробных маркеров (МСММ) для изучения микроэкологии человека. Метод дает качественно новый вариант молекулярного микробиологического исследования благодаря возможности одновременного количественного определения более сотни микробных маркеров непосредственно в биологических пробах без предварительного культивирования микроорганизмов и использования биохимических тестовых материалов и генетических праймеров. Получение в реальном времени расширенной информации об анаэробах и трудно культивируемых аэробах, а также актинобактериях, вирусах, дрожжах и микроскопических грибах из одной пробы обеспечивает полное понимание микробной этиологии заболевания. Получено новое подтверждение полимикробности инфекционных процессов, а также условности деления микробов на патогенные и непатогенные. Данные МСММ подтверждают, что анаэробы родов *Clostridium*, *Eubacterium*, *Propionibacterium*, а также актинобактерии *Streptomyces*, *Nocardia*, *Rhodococcus* являются доминантами полимикробных инфекций. Получено подтверждение транслокации этих микроорганизмов вместе с *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* из кишечника в очаги воспаления. В воспаленном органе концентрация их маркеров оказывается больше, чем в крови того же пациента, что свидетельствует об их размножении в самом органе. Количественные измерения методом МСММ позволяют изучать динамику изменения микробиоты при лечебных мероприятиях, в том числе – влияние антибиотиков и пробиотиков на пристеночную микробиоту кишечника.

Ключевые слова: масс-спектрометрия, микробные маркеры, микроэкология, микробиота, микроорганизмы, микроэкологический статус, инфекция.

### Введение

С современных позиций, нормальную микробиоту человека рассматривают как совокупность микробных сообществ локусов, характеризующихся определенным составом и колонизирующими кожу и слизистые оболочки. Эти сообщества состоят из десятков и сотен родов и видов микроорганизмов. В процессе эволюции постоянные представители нормальной микробиоты превращались во все более взаимосвязанное сообщество микроорганизмов, находящихся между собой и организмом хозяина в разнообразных взаимоотношениях (нейтрализм, конкуренция, мутуализм, комменсализм, синергизм, паразитизм, синтрофия и др.) с разделением и специализацией их функций. Современную концепцию экологической ниши подтверждают исследования многих ученых, известных отечественных и зарубежных научных авторитетов в области микробиологии и других смежных наук [2, 13, 21–23]. Подобная интеграция и специализация функций позволяют нормальной микробиоте здорового человека и животных выступать как единое целое, согласованно работающее в интересах всей системы организма хозяина, в которой она локализована. Нормальная микробиота – тот первичный неспецифический барьер, лишь после прорыва которого инициируется включение всех последующих неспецифических

и специфических факторов защиты макроорганизма. На рубеже XXI в. сформировалось представление о микрофлоре организма человека как о еще одном органе, покрывающим в виде чулка кишечную стенку, слизистые оболочки и кожу человека. Оставаясь невидимым, этот «орган» весит около 2 кг и насчитывает порядка  $10^{14}$  клеток ( $100$  миллиардов) клеток микроорганизмов. Это число в  $10$  раз превышает число собственных клеток человека. Микробиота выступает как чувствительный индикатор физиологического состояния организма человека в зависимости от воздействия на него различных факторов.

К представлению единства сообщества микроорганизмов, обитающих в теле человека, привели первоначально исследования экологических и биотехнологических микробных сообществ. Оказалось, что микробы, во-первых, предпочитают жить, будучи прикрепленными к твердой поверхности, а во-вторых, они организованы в биопленки, сбалансированные по видовому составу и функциональному распределению членов сообщества [7, 16, 17]. Такие сообщества называют консорциумами микроорганизмов. Практика показала многократное увеличение эффективности работы микроорганизмов при такой организации.

На сегодня нет точного описания архитектуры микробного сообщества пристеночного

слоя кишечника. Но известны данные, согласно которым микроорганизмы в количестве  $10^{11}$  клеток/см<sup>3</sup> [9] распределены в пристеночном слое муцина [3, 20], прочного геля, состоящего из пептидогликана, продуцируемого бокаловидными клетками эпителия кишечной слизистой оболочки. Он близок по химической природе полисахаридной защитной капсуле, которой окружают себя многие микробы. Такая среда выглядит пригодной для существования микроорганизмов в тонких слоях муциновой слизи в виде равномерно распределенных клеток на достаточно близком расстоянии (порядка размера микробной клетки) друг от друга. Такое расположение должно обеспечивать контакт с диффундирующим в муцин химусом и клетками между собой для быстрого обмена продуктами метаболизма. Для существования биопленки должен быть поток окружающей среды. Здесь он обеспечивается встречными потоками химуса и пептидогликана. Можно полагать, что это отвечает представлению о кишечной биопленке, как о псевдоцитологической структуре, наследственно консервативной по штаммовому составу и управляемой собственным «микропроцессором» – мозговой тканью, окружающей кишечник [2].

Специальные исследования показали, что в биопленке по-иному, в сравнении с чистыми культурами бактерий, происходят их многочисленные физиологические процессы, в том числе продукция метаболитов и биологически активных веществ. Сообщество организует единую генетическую систему в виде плазмид – кольцевых ДНК, несущих поведенческий код для членов биопленки, определяющих их пищевые (трофические), энергетические и другие связи между собой и внешним миром. Последнее получило специальное определение как социальное поведение (*quorum sensing*) микроорганизмов. Реакция микроорганизмов на изменение условий окружающей среды в биопленке существенно отличается от реакции каждого отдельного вида в монокультуре. Такая организация обеспечивает ее физиологическую и функциональную стабильность и, следовательно, является залогом конкурентного выживания в экологической нише. В организме человека специфическое преимущество такой организации заключается в обеспечении гомеостаза органов, функциональность которых зависит от населяющих их микробов.

Не лишено смысла рассматривать микробное сообщество любых слизистых оболочек в определенной мере подобной кишечнику организованной биопленке. Поводом к тому является

стабильность состава каждого из этих микробиоценозов: гомеостаз микробных маркеров имеет место не только в крови [1, 15], но и в вагинальном содержимом у женщин и эякуляте у мужчин [4].

Микроэкологический статус человека, точнее поддержание его гомеостаза, является необходимым условием стабильного функционирования всех его органов и систем. Соответственно одним из первых мероприятий по обеспечению качества и продолжительности жизни, а тем более в лечении любых заболеваний, особенно в клинических отделениях реабилитации и интенсивной терапии, должен быть контроль и восстановление микробиоценоза, если он оказался нарушенным. В этом можно найти сходство во мнениях в современных публикациях [5, 8, 12, 27]. Микробиота человека сконцентрирована в основном в кишечнике. Сведения о природе микробиоценоза кишечника, накопленные к настоящему времени, выглядят достаточными для понимания его функционирования, как физиологически активного органа человека. Однако для их реализации в управлении этим органом при патологиях, причинно-следственным образом связанных с дисбиозом, недостает количественного метода определения изменений в составе достаточно широкого круга ключевых микроорганизмов и их мониторинга в процессе коррекции. Причем желательно анализировать состав пристеночной кишечной микробиоты, а не микробиоты фекалий, как это принято повсеместно. Именно в мукозном слое, облегающем слизистую оболочку кишечника, происходит усвоение пищевого химуса, поступающего из желудка, синтез микроорганизмами большого числа биологически активных веществ: ферментов, витаминов, иммуностимуляторов, но также и токсичных для человека веществ. Предполагается, что отсутствие баланса в их продукции связано с патологическими проявлениями самого разного характера: кишечными расстройствами, кожными заболеваниями, половой дисфункцией и сердечной недостаточностью.

### Материал и методы

Контроль микроэкологического статуса человека сейчас уже является проблемой практического здравоохранения. Следует признать, что классические бактериологические методы затруднительно использовать для ее эффективного решения. Контролировать состав пристеночной микробиоты кишечника и других органов оказалось возможным с помощью метода газовой хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией (ГХ-МС) по содержащимся в

Состав микробиоты фекалий у взрослых людей, полученный генетическим, культурально-биохимическим и масс-спектрометрическим методами

Состав микробиоты, кл/г мокрой массы	Масс-спектрометрия	Генетический метод, Harmsen, 2002	Культуральный метод		
			Бондаренко, 2003	Маянский (Schaechter)	Фирма «Hoechst»
Общая численность	$0,6-5 \cdot 10^{11}$	$3,5 \cdot 10^{10}$	$10^{10}-10^{11}$	$10^{10}-10^{12}$	$2 \cdot 10^{11}$
Доля анаэробов, %	84–94	До 100	90–95	До 100	33–100
Eubacterium	$10^{11}$	$7,1 \cdot 10^9$	$10^9-10^{10}$	$10^9-10^{12}$	$3 \cdot 10^{10}$
Bacteroides	$10^{10}$	$9,5 \cdot 10^9$	$10^9-10^{10}$	$10^{10}-10^{12}$	$10^{11}$
Clostridium	$6 \cdot 10^{10}$	$7,9 \cdot 10^9$	$10^5-10^8$	$10^5-10^{11}$	$3 \cdot 10^{10}$
Bifidobacterium	$10^{10}$	$1,7 \cdot 10^9$	$10^9-10^{10}$	$10^8-10^{12}$	$2 \cdot 10^8$

их клеточной стенке длинноцепочечным жирным кислотам и жирным альдегидам фосфолипидов. Известно, что состав жирных кислот микроорганизмов видоспецифичен и используется для их идентификации в чистой культуре [18]. Кроме того, у многих микробов имеются индивидуальные маркеры, специфичные для таксонов разного уровня (семейства, рода или вида), по которым их можно определять количественно в объектах окружающей среды и клинических пробах [9]. Существование анализа состоит в прямом извлечении с помощью химической процедуры высших жирных кислот из образца, подлежащего исследованию (например биоптата кишечной стенки или крови), их разделения на хроматографе в капиллярной колонке высокого разрешения и анализа состава в динамическом режиме на масс-спектрометре. На основании этих измерений, расшифрован состав микробиоты пристеночного мукозного слоя этих отделов кишечника, а также фекалий [3]. Данные по фекалиям оказались в полном количественном соответствии с литературными, что послужило основанием для верификации метода ГХ-МС в применении к другим объектам исследования, но сразу по всем микроорганизмам в одном анализе и с большой точностью по сравнению с культуральным и, пожалуй, генетическим (FISH) методами (таблица) [9].

Одновременное исследование крови тех же пациентов, а также доноров показало соответствие состава минорных ЖК, альдегидов и стеролов в биоптатах тонкой кишки и крови.

Метод около пятнадцати лет проходил апробацию в медицинских учреждениях Москвы. В 2010 г. Росздравнадзором разрешено его применение в качестве новой медицинской технологии «Оценки микробиологического статуса человека методом хромато-масс-спектрометрии» на территории Российской Федерации (разрешение ФС 2010/038 от 24.02.2010 г.).

### Результаты и их анализ

Обнаруженный в результате систематических исследований гомеостаз микробных маркеров

в крови [1, 15] и адекватность его профиля составу кишечной микробиоты здорового человека обеспечили уникальную возможность мониторировать состояние микробиоты кишечника неинвазивным экспрессным методом – по анализу крови.

Микробная этиология заболеваний кожи и многих внутренних органов уже изучалась в процессе клинической апробации метода МСММ, который позволил не только получить дополнительные сведения об агентах инфекции, но и подтвердить транслокацию микроорганизмов кишечника в очаг воспаления.

Наблюдение за микробиотой тонкой кишки при таких кожных заболеваниях, как себорея, акне и атопический дерматит, дает подтверждение предположению Б.А. Шендерова о том, что «Существует столько вариантов дисбаланса микробиоценозов человека, сколько известно нозологических форм заболеваний» [13], т. е. о нозологической специфичности дисбактериоза кишечника. Увидеть это помогает графическое сопоставление дисбактериоза при упомянутых заболеваниях. У больных с себорейным дерматитом при дефиците *Lactobacillus* и *Propionibacterium* в кишечнике высока концентрация маркеров клостридий группы *C. ramosum* и видов *Eubacterium* (рис. 1а). При угревой болезни (акне) наблюдается дефицит *Lactobacillus* при избыточном росте клостридий группы *C. ramosum*, *Bifidobacterium*, вирусов Herpes и других микроорганизмов (см. рис. 1б). При атопическом дерматите в кишечнике регулярно обнаруживается дефицит *Bifidobacterium* при избыточном росте видов *Eubacterium*, *Propionibacterium freudenreichii*, *Nocardia* и других микроорганизмов (см. рис. 1в).

Метод масс-спектрометрии микробных маркеров благодаря своей экспрессности и информативности позволил получить экспериментальные данные, подтверждающие связь ряда заболеваний с изменением микробиологического статуса организма. Эти данные согласуются с известными данными о связи микробиоты кишечника с кожными заболеваниями [14].

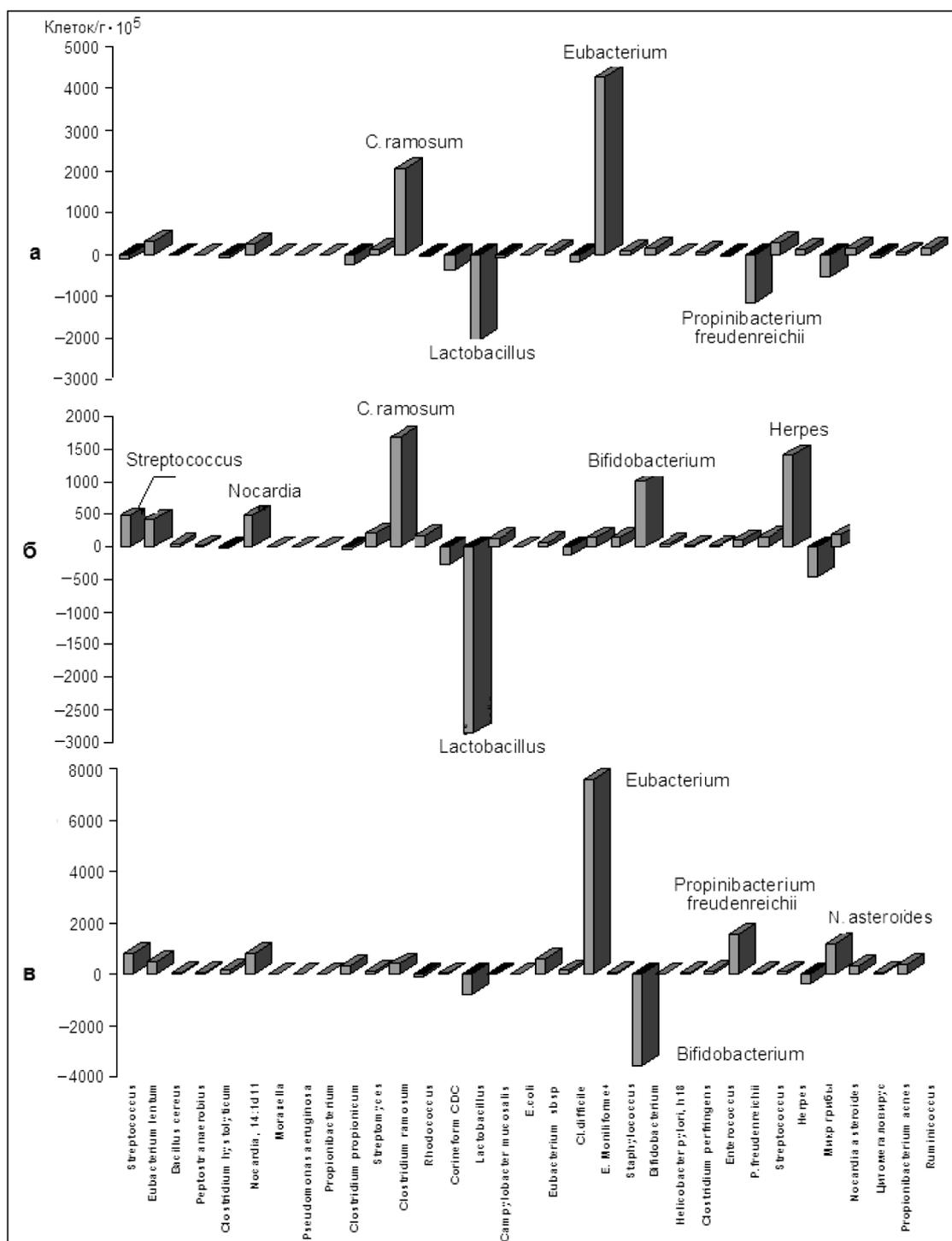


Рис. 1. Диаграмма МСММ в крови у больных с кожными заболеваниями. а – с себорейным дерматитом; б – с акне; в – с атопическим дерматитом.

Более того, они позволяют узнать существо изменений микробиоты, причем, именно тонкой кишки, а не фекалий, как это делалось в предыдущих исследованиях. Для практического врача это означает возможность усовершенствования тактики лечения больных за счет выбора этиотропных антибиотиков для подавления избыточного роста (инфекции) части микробио-

ты и стимулирования размножения дефицитной группы микробов.

При синдроме раздраженного кишечника наблюдается тотальный дефицит кишечной микробиоты до семикратного снижения общей численности микроорганизмов преимущественно за счет уменьшения численности Lactobacillus, Bifidobacterium и Propionibacterium freu-

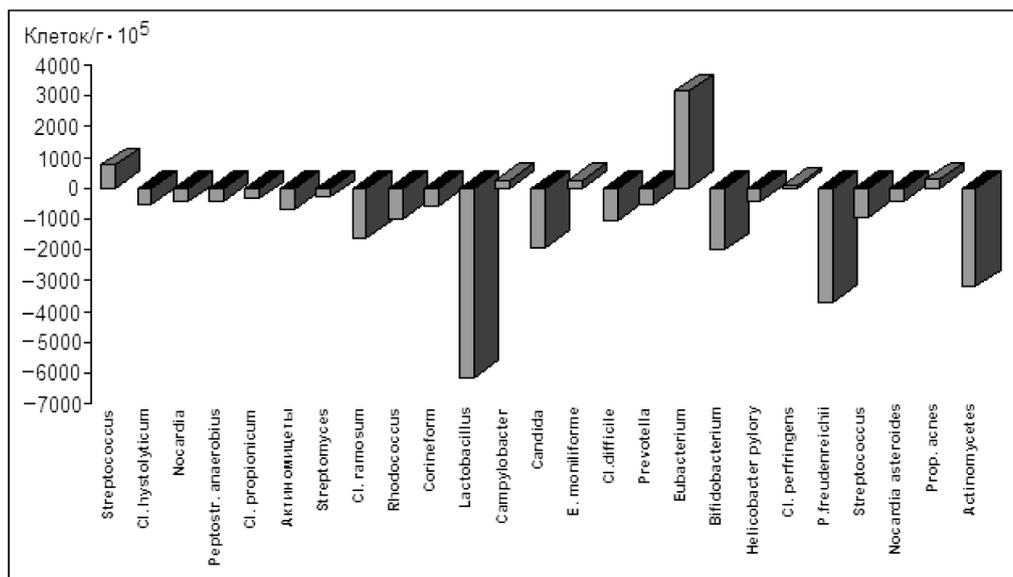


Рис. 2. Диаграмма МСММ в крови у больных при синдроме раздраженного кишечника (n = 30).

denreichii при избыточном росте Eubacterium и Streptococcus [3]. Кроме того, растет численность анаэробов Bacteroides fragilis, Porphyromonas, Propionibacterium acnes при периодическом избытке Enterobacteriaceae, кластридий группы C. ramosum и Eggertella lenta, а также Campylobacter mucosalis, Enterococcus, Pseudomonas, Acinetobacter, Bacillus, Streptococcus. Эта группа микробов, вероятно, является источником токсинов, поддерживающих заболевание при дефиците противодействия со стороны

основных представителей нормальной микрофлоры кишечника (рис. 2).

**Коррекция дисбиоза.** До лечения у пациента обнаружен избыток C. ramosum, Streptococcus, Nocardia и Actinomyces viscosus при существенном недостатке основных микроорганизмов нормальной микрофлоры кишечника – Lactobacillus, Bifidobacterium, Eubacterium и Propionibacterium (рис. 3).

После лечения с применением жидких пробиотиков типа нормофлоринов или биовети-

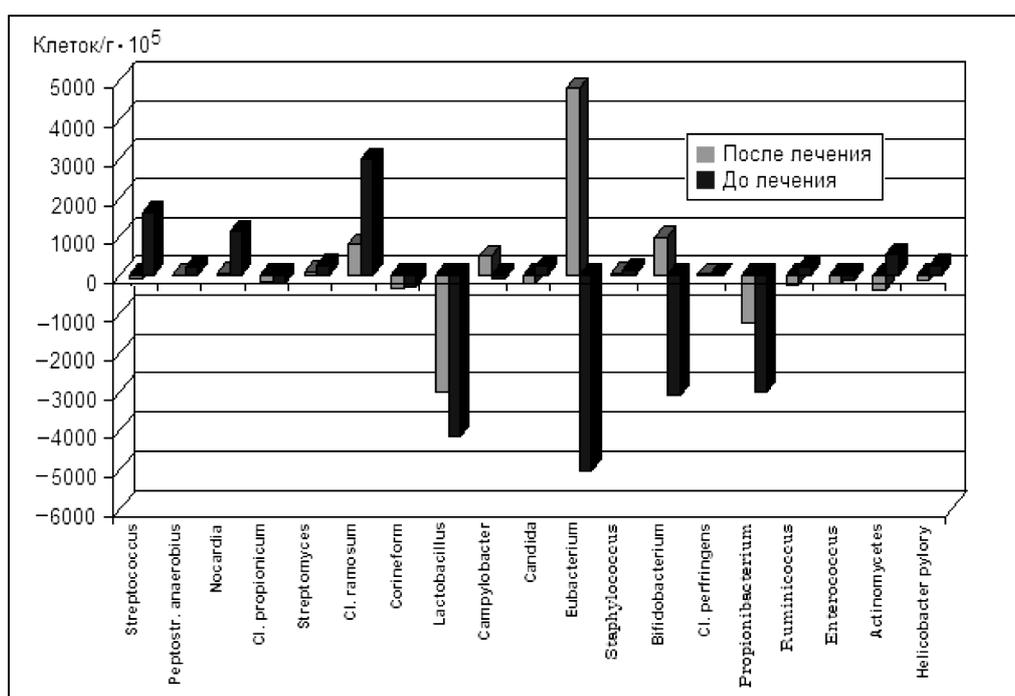


Рис. 3. Диаграмма МСММ в крови при коррекции дисбиоза жидкими пробиотиками.

нов микрoэкологический статус в основном нормализовался, за исключением того, что *Lactobacillus* не достигли нормы, а численность *Eubacterium* перешла в избыток. При восстановлении нарушенного микрoэкологического статуса оказалось полезным применение иммуномодуляторов (гепон, имуномакс), висмутовых препаратов типа денола, а также метронидазола, который, как оказалось, кроме подавления внедренных в слизистую оболочку бактериоидов, стимулирует рост всех микроорганизмов нормальной микробиоты кишечника.

При септических состояниях, лихорадках, как правило, неясного генеза, чаще происходит избыточный рост ряда микроорганизмов из состава нормальной микробиоты человека, что по определению является инфекцией [8, 12, 19]. Общим признаком этой части пациентов является более чем двукратное превышение в крови концентраций маркеров *Staphylococcus*, клостридий группы *Clostridium ramosum*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Eubacterium lentum* (*Eggertella lenta*) и дрожжей *Candida*. Наибольший прирост численности бактерий приходится на *C. ramosum* и *Lactobacillus*. К частным признакам относится прирост численности основной группы зубактерий (*Eubacterium moniliforme*, *E. nodatum*, *E. sabureum*), который наблюдается не у всех пациентов. Частично участвуют в инфекционном процессе грамотрицательные микроорганизмы семейства *Enterobacteriaceae* (*E. coli*, *Proteus*, *Klebsiella* и др.). Реже уровень клинической значимости превышали маркеры *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Fusobacterium/Haemophilus*, *Selenomonas*, *Helicobacter pylori* и *Prevotella*. Другие грамотрицательные бактерии, такие как представители родов *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter*, *Neisseria*, *Bacteroides*, *Burkholderia*, *Francisella*, не превышали уровня клинической значимости или предела детектирования. У больных с раневой инфекцией или сепсисом наблюдали общий избыточный рост микробиоты по оценке микрoэкологического статуса при том обстоятельстве, что численность части микроорганизмов почти у всех обследованных снижалась более чем в 2 раза по сравнению с нормой. Это относится, прежде всего, к *Bifidobacterium* и *Propionibacterium freudenreichii*, *Enterococcus* и *Clostridium propionicum*. В некоторых случаях значимые снижения концентраций отмечены для *Lactobacillus*, *Eubacterium*, *Corineform* и микроскопических грибов (не из рода кандиды).

Что касается инфекционной составляющей, то она, как и следовало ожидать, наилучшим образом выявляется при анализе материала из очага инфекции: соскоба, пунктата, экссудата. Если очаг закрыт, то информацию можно получить и из анализа крови. Сопоставление результатов двойного анализа – раневого экссудата и крови – для больного с инфекцией в области хирургического вмешательства после удаления селезенки представлено на рис. 4.

Как видно из рис. 4, ведущими микроорганизмами (около 90 % в раневом экссудате) яв-

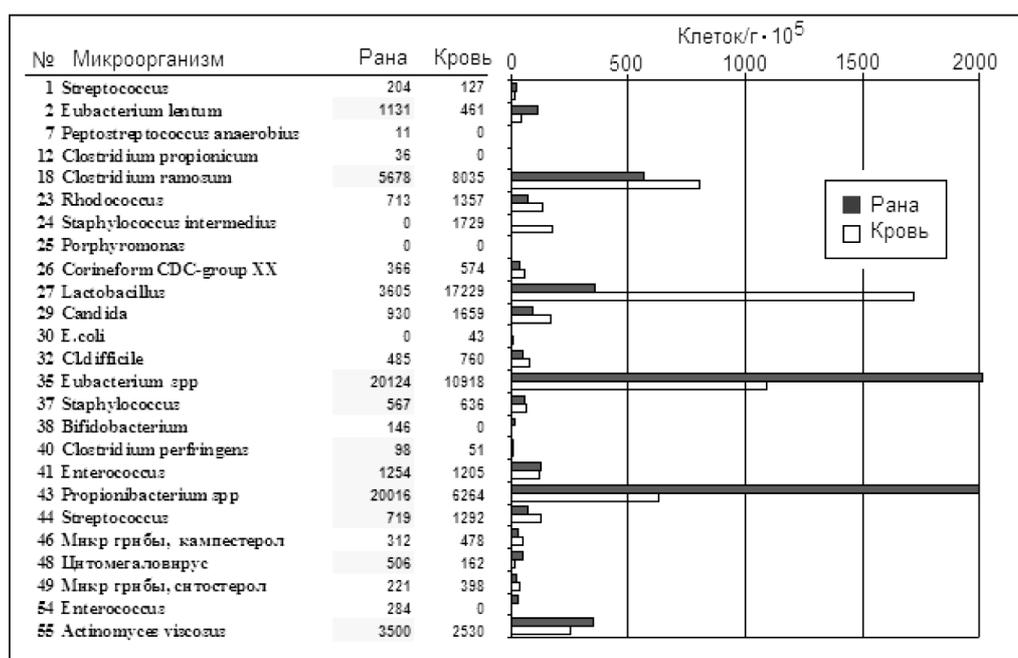


Рис. 4. Сопоставление результатов анализа раневого экссудата и крови методом МСММ у больного с инфекцией в области хирургического вмешательства после удаления селезенки.

ляются анаэробы. Это клостридии *C. ramosum* и *C. perfringens*, пропионобактерии *P. freudenreichii*, эубактерии *Eubacterium moniliforme*, *E. nodatum*, *E. sabureum*, *E. lentum* и анаэробный актиномицет *Actinomyces viscosus*. Все они составляют нормальную (индигенную) микрофлору организма человека. Им сопутствует группа кокковых бактерий: стафилококки, стрептококки, энтерококки, которые обычно выявляют при классическом бактериологическом исследовании. Их доля в данном примере – около 6 %. Выше нормы концентрация микроскопических грибов *Candida*, актинобактерий *Streptomyces*, *Nocardia*, *Rhodococcus* и других, на долю которых приходится 7 % от общей инфекции. Мажорную группу составляют грамотрицательные микроорганизмы: *Moraxella*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Fusobacterium*, *Alcaligenes* и *Helicobacter pylori*. Маркеров бактерий семейства *Enterobacteriaceae* в экссудате не обнаружено (менее  $10^5$  клеток/мл).

У больного с септическим менингитом, развившимся в результате черепно-мозговой травмы, в ликворе найдено 23 таксона микроорганизмов, маркеры которых имеют клинически значимое (более чем в 2 раза) превышение нормы. Обнаружено, что ведущими микроорганизмами воспаления мозга являются клостридии группы *C. ramosum*, а также *C. propionicum* и *C. hystolyticum*. Вычисленная по концентрации их маркеров численность самих микроорганизмов в ликворе составляет  $9 \cdot 10^8$  клеток/мл. На втором уровне микст-инфекции представлены актинобактерии (аэробные актиномицеты) родов *Rhodococcus*, *Pseudonocardia* и не идентифицированные виды, а также *Eubacterium*, *Staphylococcus*, *Propionibacterium*, дрожжи *Candida* и микроскопические грибы. Уровень их концентрации – около  $10^7$  клеток/мл.

Проведена реконструкция микст-инфекции при пиелонефрите по микробным маркерам в моче у детей Детской городской клинической больницы № 13 им. Н.Ф. Филатова (Москва, 60 пациентов). В ходе исследования было показано, что в моче доминируют маркеры анаэробов *Propionibacterium freudenreichii*, клостридий *Clostridium hystolyticum*, *C. ramosum* и *C. propionicum*, специфичных для кишечника, и значительно повышена концентрация маркеров *Alcaligenes*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Moraxella*. Кишечные микробы создают мукоз повышенной (в присутствии *P. freudenreichii*) вязкости, способствующий размножению многочисленных видов микроорганизмов и физически препятствующий обменным процессам. Уровень клинической значимости превышают маркеры *Rhodococcus*, *Pseudonocardia* и других актинобактерий, а также *Fusobacterium*, *Bacillus*, *Eggerella lenta*, *Helicobacter pylori*, *Clostridium perfringens*, *Prevotella* и дрожжей *Candida*. На рис. 5 показан результат реконструкции состава микроорганизмов по микробным маркерам в моче у девочки, 11 лет, больной пиелонефритом.

Многочисленные анализы инфекции и дисбиозов методом МСММ при вагинитах выявили ряд типичных случаев:

1) гонококковый вагинит. В вагинальном секрете и соскобах присутствуют маркеры *Neisseria* и сопутствующей в таких случаях анаэробной микрофлоры (*Peptostreptococcus*, *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Selenomonas*). В то же время занижено содержание *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, некоторых *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Actinomyces*, части *Eubacterium* и других микроорганизмов нормофлоры – вагинальный дисбактериоз;

2) синергизм актинобактерий и кокков. Превалируют аэробные актиномицеты (*Streptomyces*

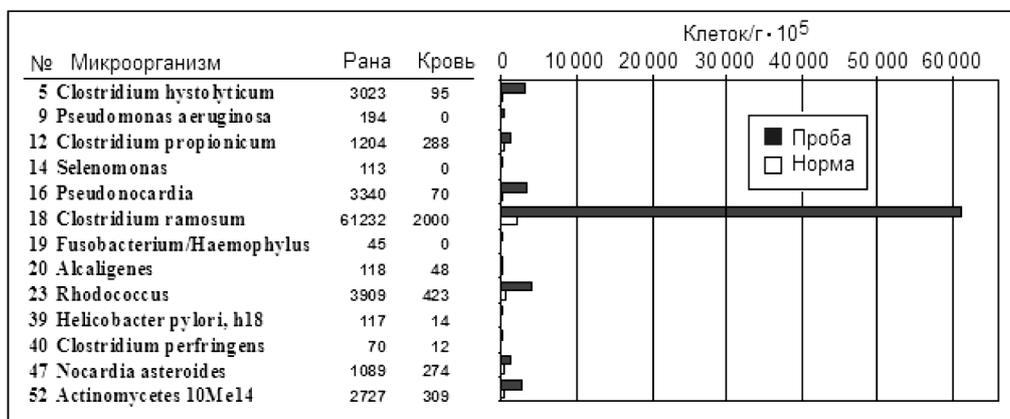


Рис. 5. Реконструкция инфекции при пиелонефрите по данным анализа микробных маркеров в моче методом МСММ.

ces, Nocardia и др.) со Streptococcus, Bifidobacterium и Ruminococcus. В числе кокков – Rhodococcus equi, который рассматривают как внутриклеточный условный патоген (аналог гонококка, но менее вирулентный – обычно встречается у мужчин при простатите). Превышают норму некоторые другие бактерии, среди которых заслуживают внимания два вида клостридий;

3) ложный кандидоз, подмена агента при молочнице. Похожую клинику дает Clostridium perfringens при отсутствии Candida albicans. Превышают норму маркеры анаэробных бактерий C. perfringens и Propionibacterium spp. Завышено содержание маркера Staphylococcus epidermidis;

4) энтеробактерии, эндотоксинемия. Ведущими микроорганизмами являются грамотрицательные микроорганизмы, преимущественно семейства Enterobacteriaceae, которые создают высокие концентрации эндотоксина в локусе и крови;

5) микоз, без участия кандиды. Существенно превышают норму маркеры микроскопических грибов, продуцирующих кампестерол и ситостерол, а также Staphylococcus aureus и Clostridium propionicum и Clostridium perfringens. Ниже нормы количество многих бактерий, в том числе Lactobacillus и Bifidobacterium (дисбактериоз);

6) ведущая микрофлора представлена бактериями Clostridium perfringens и микроскопическими грибами Candida albicans при наличии Streptococcus (Streptococcus oralis) и грамотрицательных микроорганизмов родов Klebsiella, а также анаэробов Eubacterium;

7) у женщин с проблемами беременности или неудачами ЭКО методом МСММ выявляется существенное превышение нормы «скрытыми» (от рутинных методов) компонентами нормальной микробиоты: Clostridium perfringens, Helicobacter pylori, Streptomyces, Eubacterium. При наличии такого рода токсигенных микроорганизмов в детородном органе как по отдельности, а тем более при одновременном присутствии, вряд ли будут возможны развитие оплодотворенной яйцеклетки в полноценный плод и нормальное протекание беременности [6].

Полученные данные подтверждают современное представление об инфекциях урогенитального тракта как о полимикробном воспалении. Более того, данные показывают, что ни один из контролируемых таксонов микроорганизмов не сохраняет свою концентрацию в пределах нормы при воспалениях. Здесь понятие таксон может иметь ранг семейства или рода как правило. На самом деле видовое разнообразие мик-

робиоценоза урогенитального тракта в несколько раз шире в сравнении с результатами рутинных клинических обследований. Следует отметить, что оно напоминает кишечную микробиоту своим качественным составом, в том числе анаэробами.

Подобно микробиоте кишечника, микробное сообщество слизистых оболочек половых органов у женщин гомеостатично и играет положительную роль в обменных процессах и защите от внешних патогенов. В то же время, оно проявляет и враждебные по отношению к хозяину функции, если состав микробиоты нарушен, и токсинообразование, характерное для большинства представителей нормальной микробиоты, становится клинически значимым и может угрожать здоровью женщины. Более того, оно может угрожать и главной физиологической функции женских половых органов – репродуктивной [6].

По данным из научной литературы, *воспалительные процессы внутренних половых органов* составляют 62,5 % в структуре гинекологической заболеваемости, причем у 9,5 % женщин диагностируют гнойные воспалительные заболевания маточных труб и яичников.

Отмечается, что инфекционные заболевания редко вызываются одним возбудителем. Смешанные инфекции составляют примерно 20–30 % в структуре инфекционных заболеваний матки и придатков, т.е. почти у каждой третьей пациентки выявляется инфекционный процесс, вызванный несколькими возбудителями. Подавляющее большинство воспалительных заболеваний органов малого таза обусловлено собственной условно-патогенной микробиотой, ведущая роль в развитии которых принадлежит наиболее вирулентным анаэробам, энтеробактериям и коккам. Исследованы 21 инфицированный биоптат от 10 пациенток, перенесших операции по разным поводам [8]. Из 54 таксонов микроорганизмов, контролируемых в процессе анализа, 32 показывают избыточный рост (инфекцию). Инфицирование каждого исследованного материала включает несколько (до 12) таксонов микроорганизмов. Это подтверждает тезис о смешанном характере инфекции половых органов у женщин. Полученные данные подтверждают также сформировавшееся представление о доминировании анаэробов. Их доля составляет 70–90 % по нашим измерениям и соответствует оценке других авторов. Оказалось, что доминантами у 11 больных из 12 обследованных являются кишечные бактерии вида Propionibacterium freudenreichii, родов Eubacterium, Clostridium и Bifidobacterium. Такой тип ин-

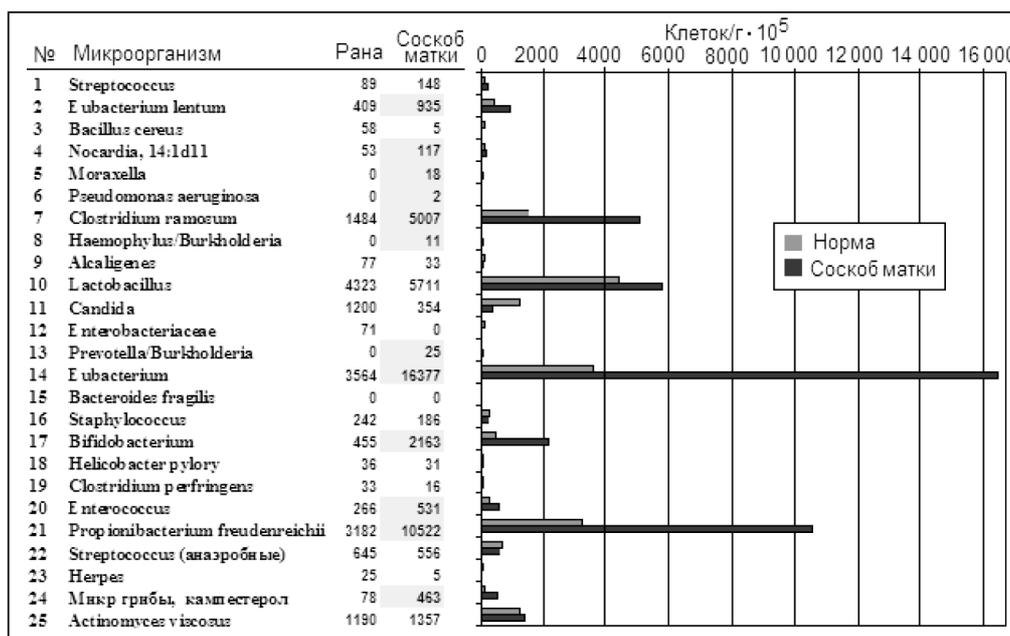


Рис. 6. Избыточный рост микроорганизмов (инфекция) в соскобе полости матки методом МСММ.

фекции показан на рис. 6, где доминируют маркеры кишечных микроорганизмов: клостридий группы *C. ramosum*, основной группы эубактерий (*E. moniliforme*, *E. nodatum*, *E. sabureum*), пропионобактерий (*Propionibacterium freudenreichii*). Клинически значимый уровень превышают маркеры *Prevotella*, *Nocardia*, *Enterococcus*.

Серия анализов одной и той же больной показывает более чем десятикратное увеличение численности вида *P. freudenreichii*, родов *Eubacterium* и *Bifidobacterium* в матке и придатках по сравнению с уровнем колонизации влагалища в норме. Для вагины более характерна инфекция *Clostridium perfringens*. При воспалениях, напоминающих по клиническим проявлениям кандидоз, их численность в 30 раз превышает уровень колонизации слизистой оболочки в норме. В исследованных пробах верхних отделов клинически значимых превышений маркера *C. perfringens* не обнаружено. Здесь регулярно участвует в воспалительном процессе другая группа клостридий – *C. ramosum*. Их численность до 7 раз превышает норму в исследованных материалах. Из трудно культивируемых микроорганизмов, которые позволяет выявить масс-спектрометрический метод, следует отметить еще анаэробы *Actinomyces viscosus*, численность которых в ряде проб до 5 раз выше нормальной.

Выявляемые в клинических лабораториях при рутинных анализах микроорганизмы в рейтинговом положении оказываются во втором ранге смешанной инфекции верхних половых орга-

нов. Максимального уровня в этой группе достигает *Enterococcus* –  $10^8$  клеток/мл. Тогда как перечисленные выше доминирующие анаэробы занимают порядки  $10^8$ – $10^{11}$ . Грамотрицательные микроорганизмы *Moraxella/Acinetobacter*, *P. aeruginosa*, *Haemophilus/Burkholderia*, *Prevotella*, *B. fragilis*, *H. pylori* обнаруживаются в исследованных пробах в количестве  $10^5$ – $10^7$  клеток/мл. Представители семейства *Enterobacteriaceae* присутствуют, но не выходят за пределы уровня колонизации вагины в норме.

Результаты этого анализа перспективны для выявления и консервативного лечения подобного рода заболеваний на ранних стадиях, а также уточнения механизма возникновения патологических изменений матки и придатков, приводящих к необходимости оперативного вмешательства.

При инфекционном простатите в разных исследованиях выявлены представители семейства *Enterobacteriaceae*, бактерии рода *Pseudomonas*, энтерококки (*Enterococcus faecalis*, *E. faecium* и др.), *Staphylococcus aureus*, *Chlamydia trachomatis*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Peptostreptococcus*, *Streptococcus*, *Escherichia*, *Flavobacterium spp.*, *Pseudomonas testosteroni*. Исследование ДНК секрета и биоптатов простаты свидетельствует о наличии в них микроорганизмов, отличающихся от микробиоты кожи и прямой кишки и, следовательно, не обнаруживаемых традиционными методами. Действительно, генетическим методом удалось определить в семени наличие 15 видов необычных

анаэробов родов *Peptostreptococcus*, *Prevotella*, *Corynebacterium*, *Rubrivirax*, *Actinobacillus*, *Veillonella* и *Eubacterium*, а также трех аэробов: *Streptococcus salivarius*, *S. pneumoniae* и *Burkholderia picketii* [25, 26]. В секрете простаты обнаружено большое количество недектируемых в обычной клинической практике коринеформных бактерий, причем в сложном сообществе с *Staphylococcus*, *Peptostreptococcus*, *Streptococcus* и *Escherichia*, состав которого различен у разных пациентов. Кроме того, обнаружены микробные ассоциации и у здоровых мужчин, однако иные, чем у больных, и в меньшей концентрации.

### Заключение

Приведенные здесь примеры в целом показывают, что диагностика возбудителей инфекционных процессов, по данным масс-спектрометрии биологических жидкостей, является экспрессным, чувствительным и универсальным методом индикации, одинаково эффективным как для аэробных, так и для анаэробных микроорганизмов. При этом следует отметить, что инфекции в подавляющем большинстве случаев полимикробны, в них доминируют анаэробы, в воспалениях существенную роль в провоспалительных и противовоспалительных актах играет собственная автохтонная микробиота организма человека.

Метод МСММ может быть использован для определения любого микроба, имеющего в составе структурных клеточных компонентов вещество-маркер, отличное от химических веществ фоновой биологической жидкости. Наши наблюдения и литературные данные свидетельствуют о достаточном количестве клеточных компонентов, специфичных сугубо для возбудителя, по которым его можно идентифицировать, используя индивидуальные или коллективные маркеры [26].

Чувствительность метода составляет  $10^4$ – $10^5$  клеток в пробе в зависимости от содержания маркера в клетке. В настоящее время для проведения анализа требуется не более 3 ч на 1 образец или 7 ч на серию из 5 проб. Экспрессность и универсальность анализа при возможности точного определения численности микроорганизмов позволили за короткий срок пополнить сведения о микробной этиологии многих заболеваний сердечно-сосудистой системы [24], органов дыхания и пищеварительной системы, кожи [10, 11], урогенитального тракта, послеоперационных и травматических инфекций. Полученные для каждого больного данные по составу микроорганизмов, участни-

ков инфекционного процесса при оценке общего микробиологического статуса позволяют врачу получить качественно новую обширную информацию для принятия адекватной антимикробной и общей терапии.

### Литература

1. Белобородова Н. В., Осипов Г. А. Гомеостаз малых молекул микробного происхождения и его роль во взаимоотношениях микроорганизмов с хозяином // Вестн. РАМН. – 1999. – Т. 16, № 7. – С. 25–31.
2. Заварзин Г.А. Лекции по природоведческой микробиологии. – М.: Наука, 2003. – 348 с.
3. Клиническое значение исследования микроорганизмов слизистой оболочки кишечника культурально-биохимическим и хромато-масс-спектрометрическими методами / Г.А. Осипов, А.И. Парфенов, Н.В. Верховцева [и др.] // Эксперим. клинич. гастроэнтерология. – 2003. – Т. 4. – С. 59–67.
4. Крымцева Т.А. Физиологическая роль изменения жирнокислотного состава урогенитальных жидкостей организма человека при дисбиозах: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – М., 2003. – 35 с.
5. Микробиологический статус кандидатов на пересадку печени / О.И. Андрейцева, В.В. Киселев, Н.Б. Бойко [и др.] // Трансплантология. – 2010. – № 1. – С. 37–46.
6. Минорные жирные кислоты биологических жидкостей урогенитальных органов и их значимость в диагностике воспалительных процессов / Т.А. Крымцева, Г.А. Осипов, Н.Б. Бойко [и др.] // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2003. – № 2. – С. 92–101.
7. Николаев Ю.Н., Плакунов В.К. Биопленка – «город микробов» или аналог многоклеточного организма? // Микробиология. – 2007. – Т. 76, № 2. – С. 149–163.
8. Осипов Г.А., Федосова Н.Ф., Лядов К.В. Количественный *in situ* микробиологический анализ по липидным маркерам в биологических жидкостях с использованием метода газовой хроматографии – масс-спектрометрии // Здоровоохранение и мед. технологии. – 2007. – № 5. – С. 20–23.
9. Осипов Г.А. Хромато-масс-спектрометрический анализ микроорганизмов и их сообществ в клинических пробах при инфекциях и дисбиозах / Хим. анализ в мед. диагностике. – М.: Наука, 2010. – С. 293–368.
10. Спектрометрическое исследование состава микроорганизмов кишечника у больных себорейным дерматитом / И.В. Полеско, Ю.С. Бутов, Г.А. Осипов, В.В. Малиновская // Рос. журн. кож. и вен. болезней. – 2006. – № 3. – С. 23–27.
11. Состав кожного сала, микробиология кожи и кишечника у больных себорейным дерматитом и акне (исследование методом газовой хроматографии масс-спектрометрии) / И.В. Полеско, Ю.С. Бутов, Г.А. Осипов [и др.] // Рос. журн. кож. и вен. болезней. – 2007. – № 2. – С. 43–50.
12. Федосова Н.Ф., Лядов К.В., Осипов Г.А. Новые подходы к анализу инфекционных послеопе-

- рациональных и посттравматических осложнений // Инфекции в хирургии. – 2010. – Т. 8, № 2. – С. 56–62.
13. Шендеров Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание : 3 т. – М. : Грант, 1998. – Т. 1 : Микрофлора человека и животных и ее функции. – С. 14–17.
14. Abnormal fecal microflora and malabsorption phenomena in atopic eczema patients / G. Ionescu, R. Kiehl, L. Ona, R. Schuler // J. Adv. Med. – 1990. – Vol. 3. – P. 71–89.
15. Beloborodova N.V., Osipov G.A. Small molecules originating from microbes (SMOM) and their role in microbes-host relationship // Microbial. Ecology in Health. and Disease. – 2000. – Vol. 12. – P. 12–21.
16. Davey M.E. and O'Tool G.A. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics // Microbiol. and Molecular. Biol. Rev. – 2000. – Vol. 64, N 4. – P. 847–867.
17. Donlan R.M., William J. Costerton. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms // Clin. Microbiol. Rev. – 2002. – Vol. 15, N 2. – P. 167–193.
18. Evaluation of a commercial microbial identification system based on fatty acid profiles for rapid, accurate identification of plant pathogenic bacteria / D.E. Stead, J.E. Sellwood, J. Wilson, J.J. Viney // Appl. Bacteriol. – 1992. – Vol. 72. – P. 315–321.
19. Guideline for prevention of surgical site infection / A.J. Mangram, T.C. Horan, M.L. Pearson [et al.] // Jarvis. Am. J. Infect. Control. – 1999. – Vol. 27. – P. 97–134.
20. Macfarlane S., Hopkins M.J., Macfarlane G.T. Bacterial growth and metabolism on surfaces in the large intestine // Microbial. Ecology in Health. and Disease. – 2006. – Vol. 2. – P. 64–72.
21. Nicholson J.K. Global systems biology, personalized medicine and molecular epidemiology // Mol. Syst. Biol. – 2006. – Vol. 2. – P. 52.
22. Nicholson J.K., Holmes E., Wilson I.D. Gut microorganisms, mammalian metabolism and personalized health care // Nat. Rev. Microbiol. – 2005. – Vol. 3. – P. 431–438.
23. Nicholson J.K., Wilson I.D. Understanding global systems biology: Metabonomics and the continuum of metabolism // Nat. Rev. Drug. Discov. – 2003. – Vol. 2. – P. 668–676.
24. Osipov G.A., Turova E.S. Studying species composition of microbial communities with the use of gas chromatography-mass spectrometry. Microbial community of kaolin // FEMS Microbiol. Rev. – 1997. – Vol. 20. – P. 437–446.
25. Prokaryotic DNA sequences in patients with chronic idiopathic prostatitis / J.N. Krieger, D.E. Riley, M.C. Roberts, R.E. Berger // J. Clin. Microbiol. – 1996. – Vol. 34, N 12. – P. 3120–3128.
26. Polymerase chain reaction-based detection of bacteria in semen / K. Jarvi, J.-M. Lacroux, A. Jain, I. Dumitru [et al.] // Fertil. Steril. – 1996. – Vol. 66, N 3. – P. 463–467.
27. The gut microbiota as a target for improved surgical outcome and improved patient care / J. Kinross, A.C. von Roon, N. Penney [et al.] // Curr. Pharm. Des. – 2009. – Vol. 15, N 13. – P. 1537–1545.

УДК 613.67 : 355.233.22

С.В. Попов

## ВОССТАНОВЛЕНИЕ ФИЗИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ ВОДОЛАЗОВ ПОСЛЕ ВЫПОЛНЕНИЯ ПРОФЕССИОНАЛЬНЫХ ЗАДАЧ ПОД ВОДОЙ

Военно-морская академия им. Н.Г. Кузнецова, Санкт-Петербург

Проведен анализ физиологических механизмов, вызывающих функциональные нарушения физического состояния специалистов водолазной службы при выполнении военно-профессиональных задач в условиях водной среды, установлены основные причины их возникновения и развития. На основании полученных данных, раскрываются программы применения физкультурно-оздоровительных воздействий, повышающих физическую подготовленность и функциональные резервы организма водолазов.

Ключевые слова: водолазы, подводники, экстремальные условия, реабилитация, физкультурно-оздоровительные воздействия, физическая подготовка.

### Введение

По вероятности утраты здоровья или смерти, связанной с исполнением служебных обязанностей, работа водолазов относится к классу опасных (экстремальных) условий труда [7]. К сожалению, в постперестроечный период в Российской Федерации была разрушена сло-

жившаяся десятилетиями в СССР система подготовки водолазов, научного сопровождения аварийно-спасательных работ и восстановления функциональных резервов организма после подводных спусков. Неснижающееся количество техногенных аварий и катастроф увеличивают потребность в проведении подводных ра-