

С.М. Ткач, д.м.н., профессор, А.К. Сизенко, К.С. Пучков, Национальный медицинский университет им. А.А. Богомольца, г. Киев

# Трансплантация фекальной микробиоты — революционный прорыв в лечении инфекции *Clostridium difficile* и других заболеваний

В 1978 году инфекция *Clostridium difficile* (*C. difficile*, CDI) была признана одной из основных причин развития антибиотик-ассоциированной диареи и псевдомембранозного колита. С этого времени на всей территории Северной Америки и Европы распространенность, заболеваемость и смертность от инфекции CDI неуклонно возрастали. Анализ Национальной базы больничных выписок США за период с 1996 по 2003 г. показал, что частота установления диагноза CDI среди стационарных больных повысилась вдвое и составила 0,61 случая на 1 тыс. пациентов. В 2008 г. с помощью анализа статистических данных по учреждениям скорой медицинской помощи (12,5% от общего числа таких медицинских учреждений в США) был определен уровень распространенности CDI, который составил 13,1 случая на 1 тыс., что по меньшей мере было на порядок выше, чем ранее установленный показатель. Несмотря на то что распространенность CDI среди пожилых лиц непропорционально больше по сравнению с таковой среди молодых пациентов, частота госпитализаций по причине CDI увеличивается во всех возрастных группах, даже в педиатрической популяции. Ситуация с непрекращающимся ростом распространенности заболевания еще более усугубляется постоянно увеличивающейся частотой тяжелых случаев, о чем свидетельствует повышение уровня CDI-ассоциированной смертности. В частности, в США ежегодно от CDI-ассоциированных заболеваний умирает не менее 14 тыс. человек. Частично эти события связаны с инфицированием более вирулентными штаммами *C. difficile*, такими как риботип PCR 027/NAP1027, который характеризуется большим потенциалом в продукции токсина и более высокой резистентностью к антибиотикам, чем другие соизмеримые по клиническим проявлениям штаммы.

Рецидив CDI является одним из наиболее тяжелых и характерных в последнее время осложнений, и в 20-30% случаев он возникает в течение 30 дней после первичного проявления инфекции. При этом риск развития повторного рецидива удваивается после второго и последующих рецидивов. Известными факторами риска возникновения рецидива являются пожилой возраст, использование антибиотиков по показаниям для интеркуррентных, не-*C. difficile* инфекций, почечная недостаточность, иммунодефицит и прием кислотоснижающих препаратов. Наличие всего трех клинических критериев — возраст старше 65 лет, тяжелое течение заболевания и продолжительный прием антибиотиков после лечения первичного эпизода CDI — повышает вероятность рецидива почти до 90%. CDI также отягощает течение воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК), которые недавно были признаны дополнительным независимым фактором риска CDI. У больных с фоновыми ВЗК наличие CDI ассоциировано с увеличением тяжести колита, более высоким уровнем рецидивирования и ростом частоты колэктомии.

В настоящее время известно, что наличие нормальной здоровой кишечной микробиоты обеспечивает защиту от CDI. И наоборот, возникновение тяжелого дисбиоза на фоне повторного приема антибиотиков, в том числе метронидазола и ванкомицина, которые используются для лечения CDI, является, вероятно, одной из основных причин рецидивирования последней. Chang et al. одними из первых выполнили анализ фекальной микробиоты с помощью секвенирования 16s rPHK у семи больных с первичными и рецидивирующими формами CDI. Они наблюдали уменьшение видового разнообразия бактерий у всех обследуемых пациентов по сравнению с контрольной группой. Наиболее выраженное уменьшение видового разнообразия было обнаружено у трех больных с рецидивирующей CDI. У них нарушение микробиоты кишечника отмечалось на таксономическом уровне с выраженным снижением количества *Bacteroidetes*, которые обычно являются одним из двух доминирующих типов бактерий в толстой кишке. Вместо этого доминирующими типами в кишечной микробиоте у таких пациентов являлись *Proteobacteria* и *Verrucomicrobia*, которые обычно представлены в микробиоте толстой кишки в меньшинстве.

Основной целью антибиотикотерапии при рецидивирующей CDI является сохранение остаточной микробиоты толстой

кишки и оптимизация ее восстановления. Для достижения этой цели с частичным успехом используются различные схемы антибиотикотерапии, в том числе длительное применение антибактериальных препаратов или последовательная пульс-терапия ванкомицином и рифаксиминим. Новый макроциклический антибиотик фидаксомицин, который обладает узким спектром действия и не активен против рода *Bacteroides*, снижает риск рецидивирования первичной CDI на 50% по сравнению с ванкомицином. Однако лечение фидаксомицином не влияет на частоту рецидивов CDI, вызванных более вирулентным штаммом PCR 027/NAP1. Поэтому, несмотря на успехи в лечении CDI в целом, решить проблему CDI с помощью антибиотикотерапии возможно будет только в обозримом будущем.

## Трансплантация фекальной микробиоты: принцип и история метода

Трансплантация фекальной микробиоты (ТФМ), также известная как «фекальная бактериотерапия», представляет собой одномоментную терапевтическую процедуру, которая позволяет быстро восстановить нормальный состав бактериальной флоры в толстой кишке. В недавно проведенной серии клинических случаев было показано, что ТФМ донора пациенту с рецидивирующей CDI способствовала быстрому и устойчивому заселению толстой кишки последнего нормальными фекальными бактериями. До этого на фоне терапии ванкомицином у таких больных не удавалось добиться стойкого клинического ответа, а при применении фидаксомицина был достигнут лишь частичный контроль симптомов. В противоположность этому при ТФМ, проведенной путем инфузии во время колоноскопии, наблюдалась полная нормализация функционирования кишечника в течение 2 дней после лечения.

Наиболее ранняя публикация, посвященная ТФМ, была представлена Eiseman и соавт., которые еще в 1958 г. описали опыт использования клизм с фекалиями у пациентов с тяжелой или молниеносной формой псевдомембранозного колита. На протяжении многих десятилетий ТФМ проводилась всего в нескольких центрах во всем мире и, как правило, лишь в качестве крайней меры для больных с рецидивирующей инфекцией *C. difficile*. На сегодняшний день зарегистрировано уже более 500 публикаций с описанием как отдельных клинических случаев, так и клинических исследований, в которых наблюдалась приблизительно 90% кумулятивная

эффективность в лечении рецидивирующей инфекции CDI и при этом не отмечалось никаких побочных эффектов. Начиная с 1958 г., когда Eiseman и соавт. была проведена первая ТФМ, во всем мире уже успешно выполнено более 5 тыс. процедур, продемонстрировавших свою эффективность при тяжелой рецидивирующей инфекции CDI, а также ВЗК (неспецифический язвенный колит и болезнь Крона) и синдроме раздраженного кишечника. Кроме того, в последние годы появились работы, свидетельствующие об эффективности ТФМ и при негastroэнтерологических заболеваниях — сахарном диабете и инсулинорезистентности, ожирении, рассеянном склерозе, паркинсонизме, ревматоидном артрите, идиопатической аутоиммунной пурпуре (рис.).

Расширение показаний для ТФМ стало возможным начиная с 2008 г., когда Томас Борода, гастроэнтеролог из Австралии, лечивший больных с дисбиозом кишечника путем пересадки кишечной микробиоты от другого человека-донора, пришел к выводу, что данный вид трансплантации часто улучшает состояние пациентов, страдающих другими заболеваниями,



С.М. Ткач

в частности паркинсонизмом, рассеянным склерозом, синдромом хронической усталости и ревматоидным артритом. Предполагается аутоиммунная природа этих заболеваний. Согласно гипотезе Т. Бороды микробы, заселяющие кишечник, выделяют антигены, попадающие в кровяное русло, и запускают иммунный ответ. В зависимости от индивидуальных особенностей человека такой иммунный ответ может повреждать собственные ткани и органы. До тех пор, пока кишечник человека не будет полностью очищен от вредоносного антигена, иммунный ответ будет работать против самого организма.

В том же году Александр Червонский с коллегами из Университета Чикаго (США), работая с лабораторными мышами в безмикробной среде, обнаружили, что при заселении кишечника мышей бактериями, вызывающими аутоиммунный процесс, происходит повреждение клеток поджелудочной железы, вырабатывающих инсулин, и у мышей возникает диабет 1 типа. Когда производили замену бактерий кишечника мышей другой микрофлорой, также обитающей в кишечнике человека, у большинства мышей наступало выздоровление от диабета.

В декабре 2011 г. группа бразильских исследователей опубликовала результаты исследований, которые еще раз продемонстрировали, насколько бактерии, заселяющие кишечник, могут влиять на иммунную систему организма и возникновение диабета. Ученые взяли для анализа линию мышей, невосприимчивых к инсулину из-за особенностей иммунитета, что характерно для диабета 2 типа, и заменили их бактериальную флору на другую.

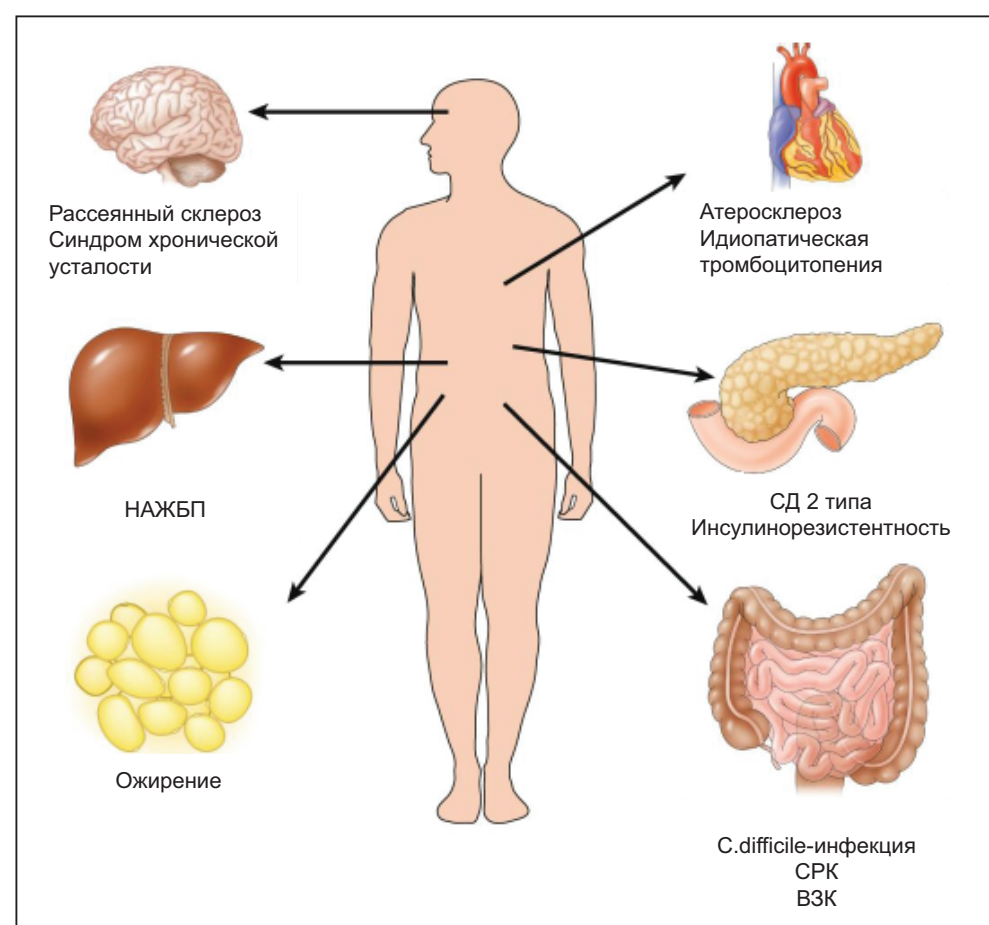


Рис. Существующие и перспективные показания для ТФМ (van Nood, Nieuendorp, NEJ, 2013)

В результате у мышей исчезли признаки диабета, то есть они стали нормально реагировать на инсулин.

**!** Проведенные исследования способствовали тому, что успехи в изучении микробиоты кишечника человека и ее влияния на жизненные процессы в организме были признаны одним из десяти главных достижений науки за 2012 г. Клинический интерес к исследованию роли микробиоты человека в норме и при различной патологии резко усилился после усовершенствования и официального признания принципиально нового метода лечения, о котором идет речь в данной статье, — ТФМ. В частности, в октябре 2013 г. на XXI Европейской объединенной гастроэнтерологической неделе ТФМ была представлена как одно из наиболее весомых достижений гастроэнтерологии в 2013 г.

#### Подбор донора и подготовка образца для ТФМ

В силу риска трансмиссии патогенов в организм особо чувствительного в этом отношении пациента необходим тщательный подбор доноров для ТФМ. Ранее предпочтение отдавали супругам, родственникам или членам семьи. Теоретически эта тактика оправдана с точки зрения некоторых позитивных последствий выбора таких доноров, в частности речь идет о сопоставимой реципиенту микрофлоре в связи с аналогичным окружением или генетикой.

Согласно протоколу, разработанному американскими гастроэнтерологами Vakep и соавт., перед выполнением ТФМ следует детально оценить анамнез донора, провести полноценный физикальный осмотр, уделяя особое внимание состоянию желудочно-кишечного тракта и возможности его инфицирования. Перед проведением ТФМ осуществляют скрининг образцов фекалий и крови доноров на наличие патогенных микроорганизмов и вирусов. Большинство исследователей основываются на результатах полного общего анализа крови, функциональных биохимических проб печени, анализа на наличие гепатита А, В, С, ВИЧ, сифилиса, рутинного культурального исследования кала, выявления токсина *S. difficile* с помощью ПЦР, обнаружения яиц и цист в кале, антигена *Giardia*, паразитов. В более расширенных вариантах выполняют тестирование в отношении HTLV I/II, *Helicobacter pylori*, цитомегаловируса, вируса Эпштейна-Барр, содержания в кале *Cyclospora*, *Isospora*, *Sporosporidium*.

В случаях фульминантного течения *S. difficile*-колиты можно рассмотреть вариант исключения большей части из вышеприведенных тестов, если в качестве донора выступает сексуальный партнер, поскольку маловероятно, что пересадка кала в таком случае в значительной степени увеличит риск трансмиссии заболеваний сверх того, что уже выявляется при ранее имевшем место близком контакте.

В настоящее время считается, что донором может быть как родственник или знакомый пациента, так и незнакомый ему человек. Предполагается, что наиболее безопасным донором кишечной микрофлоры для больного является человек с такой же группой крови и схожими генетическими особенностями и образом жизни. Считается, что донор не должен разделять с пациентом жилое помещение, так как существует большая вероятность того, что они могут иметь один и тот же тип дефектной микрофлоры. Клинически донор должен иметь нормальный ежедневный стул и в последние 6 мес не принимать антибиотики, не иметь в анамнезе ВЗК, а также быть клинически здоровым. Донор также должен пройти обследование на наличие *S. difficile* для исключения бессимптомного носительства.

Обычно материал собирают в день трансплантации, в идеале — в пределах 6 ч. При работе со всеми образцами следует соблюдать общие меры предосторожности.

Для гомогенизации образца используют блендер, а также лишенные консервантов физиологический раствор натрия хлорида или 4% молоко для создания вязко-жидкой суспензии. Консистенция должна быть приемлемой для прохождения через назогастральный зонд или канал колоноскопа. Образец следует применять немедленно в объеме 25–50 мл при введении через назогастральный зонд или 250–500 мл — с помощью колоноскопа либо удерживающей клизмы. Необходимо соблюдать осторожность в случае, если реципиенты получают иммуносупрессанты, препараты антител против фактора некроза опухоли, химиотерапию. Кроме этого, более высокий риск осложнений возможен у ВИЧ-инфицированных пациентов с заболеваниями печени в терминальной стадии или иными состояниями иммуносупрессии.

#### Процедура проведения ТФМ

Наиболее часто используемыми путями введения являются назогастральный или назоюнональный (с помощью зонда) и толстая кишка (с применением колоноскопа или клизмы). Чаще всего в настоящее время прибегают к кишечному пути ТФМ при помощи колоноскопа. При этом реципиентам предварительно назначается полная доза ванкомицина (125 мг 4 раза в сутки перорально) с отменой за 2 суток до запланированного проведения процедуры ТФМ. За день до процедуры пациентам назначается полиэтиленгликолевое слабительное, которое является стандартом в клинике при подготовке к колоноскопии и применяется до процедуры с целью удаления остаточных количеств антибиотика и фекалий. После этого больным проводится полное колоноскопическое исследование под общей седацией. При отсутствии очевидных признаков ВЗК выполняется биопсия слизистой оболочки с целью исключения лимфоцитарного колита. Большая часть подготовленного донорского материала (220–240 мл) вводится через биопсийный канал колоноскопа в терминальный отдел подвздошной кишки или в купол слепой кишки пациента. Также в некоторых случаях небольшие порции материала (50 мл) можно вводить в области толстой кишки, где был визуализирован выраженный дивертикулез. Проводимые восстановительные манипуляции идентичны тем, которые обычно используются во время стандартной колоноскопии. Упрощенный протокол ТФМ представлен в таблице.

При введении материала в нижние отделы желудочно-кишечного тракта при помощи клизмы реципиенту предварительно рекомендуется пероральный прием ванкомицина (500 мг дважды в сутки в течение 7 дней) с последующим однократным пероральным лаважем раствором полиэтиленгликоля с электролитами (3–4 л). После этого через клизму вводится 200–300 г кала донора, суспендируемого в 200–300 мл стерильного физиологического раствора. Пациентам рекомендуется удерживать клизму в течение не менее 6 ч. Предварительный прием лоперамида (2 мг, а затем дополнительно в дозе 2 мг каждые 2 ч, в общей сложности до 8 мг) может помочь

увеличить время удержания клизмы. Введение повторяют ежедневно в течение пяти дней. Во время лечения больным рекомендуется придерживаться диеты с высоким содержанием пищевых волокон, чтобы создать благоприятные условия для колонизации введенных бактерий.

Введение через верхние отделы желудочно-кишечного тракта — альтернативный путь введения через назогастральный или назоюнональный зонд. Подготовка пациента и кала аналогична процедуре, используемой в отношении больных, которым вводят трансплантат через нижние отделы желудочно-кишечного тракта. Однако в дополнение к антибиотикам и слабительным пациенты должны получить определенную дозу ингибитора протонной помпы (например, омепразол 20 мг) накануне вечером и утром перед процедурой для снижения кислотности желудка. Процедура обычно проводится под наркозом; назоюнональный зонд вводят в тонкую кишку, размещение подтверждается рентгенологически перед выполнением инфузии. При использовании данного метода обычно достаточно однократной инстилляцией от 25 до 30 г фекалий, разведенных в 50 мл физиологического раствора. В некоторых случаях зонд рекомендуется оставлять на месте в течение пяти дней для проведения повторных инфузий.

Очевидно, что положительный эффект процедуры ТФМ путем введения через зонд в желудок/тонкую кишку пациентов водной суспензии фекалий (30–50 г) обусловлен не самими микроорганизмами фекальной микробиоты, поскольку эффект от проведенной процедуры в некоторых исследованиях был зафиксирован уже через 2 ч. Следует заметить, что этот срок явно недостаточен для интенсивного размножения пересаженной микрофлоры донора и достижения сопряженного с этим положительного эффекта восстановления собственной микробиоты кишечника больных. С большой долей вероятности можно утверждать, что успешный опыт ТФМ, скорее всего, связан с компонентами фекалий, в частности с микробными экзотоксидами. Так, короткоцепочечные жирные кислоты (уксусная, пропионовая, масляная) участвуют в энергообеспечении эпителия; пропионовая кислота и пропионат обладают антибактериальным действием, осуществляют поставку субстратов глюконогенеза, а в совокупности с масляной кислотой и бутиратом участвуют в регуляции пролиферации и дифференцировки эпителия. Ацетат и бутират поставляют субстраты липогенеза; формат активирует фагоцитоз; пропионат и пропионовая кислота блокируют адгезию патогенов к слизистой. Короткоцепочечные жирные кислоты и их соли, гамма-аминомасляная кислота и глутамат участвуют в поддержании ионного обмена и регулируют моторную активность кишечника; β-аланин выступает поставщиком субстратов для синтеза кофеинов; масляная кислота и бутират усиливают местный иммунитет. Приведенный перечень микробных экзотоксинов, поступающих в кишечник в процессе

жизнедеятельности нормальной кишечной микробиоты, и их физиологические эффекты на уровне целостного организма свидетельствуют о больших потенциальных возможностях как микробных экзотоксинов, так и других компонентов кишечного содержимого в защите кишечника и организма от патогенных микроорганизмов. При этом формирование колонизационной резистентности слизистой оболочки кишечника и поддержание его нормального биоценоза, возможно, является одной из приоритетных функций микроорганизмов нормальной микрофлоры, но осуществляются они за счет микробных экзотоксинов.

#### Барьеры на пути к широкому использованию ТФМ

Недостаточно широкое применение ТФМ в настоящее время обусловлено наличием нескольких нетривиальных практических барьеров, а отнюдь не отсутствием эффективности. Эти барьеры заключаются в отсутствии материального возмещения за скрининг доноров, сложности подготовки материала и его доставки пациенту, а также в эстетических соображениях по поводу проведения процедуры в кабинете эндоскопии или в медицинском учреждении. Кроме того, фармацевтическая промышленность мало интересуется технологическим развитием ТФМ как метода лечения, в основном по причине высокой доступности донорского материала и сложности его подготовки. Вместо этого развитием метода занимаются главным образом отдельные клиницисты, которые сталкиваются с высокой потребностью своих пациентов в данной процедуре.

В 2009 г. на базе Университета Миннесоты (США) была создана программа ТФМ для преодоления и минимизирования некоторых ассоциированных с ТФМ проблем. Это способствовало революционному переходу от концепции индивидуально подобранного пациентом донора к концепции «универсальных» доноров-волонтеров, а также к отказу от использования свежего фекального материала, который ранее готовили прямо в эндоскопическом кабинете, и переходу к более стандартизованному лабораторному подходу с применением замороженных фекальных экстрактов. Например, Hamilton и соавт. наблюдали 43 пациентов, которым выполнили пересадку кала начиная с 2009 г. Авторы особое внимание уделили подготовке образца. Индивидуальный подбор обеспечил позитивный результат в 70% случаев, тогда как при использовании стандартизованного донорского и стандартизованного замороженного материала положительный результат был достигнут в 92 и 90% случаев соответственно. Применение стандартизованного донорского материала также позволило сократить временной интервал и затраты на подбор доноров.

Несмотря на доказанную эффективность пересадки кишечной микрофлоры, широкое медицинское сообщество нуждается в том, чтобы самостоятельно пройти путь к восприятию необходимости ее внедрения в клиническую практику. Многие клиницисты считают, что наряду с положительными отзывами об эффективности трансплантации кишечной микрофлоры здорового донора посредством введения в желудок/тонкую кишку суспензии фекалий через назогастральный/назоюнональный зонд возможно естественное неприятие данной процедуры многими специалистами и пациентами в сравнении с аналогичным введением суспензии фекалий с помощью колоноскопии или клизмы в прямую кишку. Поэтому сегодня ставится вопрос о возможности модификации способа введения в желудок больным фекалий донора с целью изменения отношения к самой процедуре и использования эстетичных капсул с соответствующим лечебным содержимым.

Таблица. Упрощенный протокол ТФМ

Скрининг донора
<ul style="list-style-type: none"> <li>Исследование стула:               <ul style="list-style-type: none"> <li><i>S. difficile</i> (культура, токсины А/В)</li> <li>Посев на патогенную микрофлору</li> <li>Яйца глист и паразиты</li> </ul> </li> <li>Исследование крови:               <ul style="list-style-type: none"> <li>HSV, HBV, HIV 1, HIV 2 (определение антител методом ИФА)</li> <li>Бледная трепонема (реакция Вассермана)</li> </ul> </li> </ul>
Процедура ТФМ
<ul style="list-style-type: none"> <li>Предшествующее назначение в течение 4 дней ванкомицина или метронидазола (отменить за 36 ч до ТФМ)</li> <li>Донорский образец кала (20–30 мл) получают в пределах 6 ч до ТФМ</li> <li>Образец донорского кала гомогенизируют в 100–200 мл физраствора</li> <li>220–240 мл суспензии вводится в терминальный отдел подвздошной кишки или в купол слепой кишки пациента через биопсийный канал колоноскопа</li> </ul>