

Федеральное медико-биологическое агентство Российской Федерации

**Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический
центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства»
(ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России)**

**ПРОВЕДЕНИЕ АУТОЛОГИЧНОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ КИШЕЧНОЙ
МИКРОБИОТЫ В ПРАКТИКЕ ПОДГОТОВКИ
ВЫСОКОКВАЛИФИЦИРОВАННЫХ СПОРТСМЕНОВ**

Методические рекомендации

МР ФМБА России 21.2.2.6-2019

Москва
2019

Предисловие

1. Разработано:

1.1 В Федеральном государственном бюджетном учреждении «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России):

Генеральный директор – д-р биологических наук, академик РАН В.М. Говорун.

Заместитель генерального директора по научной работе - д-р биологических наук, профессор РАН Е.Н. Ильина.

2. Исполнители

2.1 От ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России:

Начальник научно-организационного отдела, к.х.н. Д.А. Гудков,

Научный сотрудник А.В. Павленко,

Научный сотрудник, к.б.н. Е.И. Олехнович,

Младший научный сотрудник А.И. Манолов,

Лаборант Д.Н. Конанов.

3. В настоящих методических рекомендациях реализованы требования Федеральных законов Российской Федерации:

- от 27 декабря 2002г. N 184-ФЗ «О техническом регулировании»;

- от 26 июня 2008г. N 102-ФЗ «Об обеспечении единства измерений».

4. Утверждены и введены в действие Федеральным медико-биологическим агентством

«_____» _____ 20 __ г.

5. Введены впервые.

Содержание

Предисловие.....	2
1. Область применения.....	4
2. Обозначения и сокращения.....	5
Введение.....	6
3. Микробиота и физическое нагрузки.....	7
4. Связь микробиоты и окислительно-восстановительного статуса организма.....	8
5. Влияние микробиоты на утомляемость организма.....	8
6. Связь микробиоты с иммунной системой организма.....	9
7. Модуляция изменений кишечной микробиоты.....	10
8. Рекомендации по проведению аутологичной трансплантации кишечной микробиоты спортсмена.....	12
9. Рекомендуемые требования к спортсменам.....	12
10. Лабораторное обследование спортсменов до сдачи кала.....	12
11. Критерии исключения спортсменов из исследования.....	13
Библиография.....	14

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель руководителя
Федерального медико-биологического агентства

« ____ » _____ 2019 г. Ю.В. Мирошникова

МР ФМБА России 21.2.2.6-2019

Дата введения – с момента утверждения

1.1.–Общие вопросы

ПРОВЕДЕНИЕ АУТОЛОГИЧНОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ КИШЕЧНОЙ МИКРОБИОТЫ В ПРАКТИКЕ ПОДГОТОВКИ ВЫСОКОКВАЛИФИЦИРОВАННЫХ СПОРТСМЕНОВ

Методические указания

1. Область применения

Настоящий документ распространяется на порядок проведения аутологичной трансплантации кишечной микробиоты в практике подготовки высококвалифицированных спортсменов.

Документ определяет порядок и правила проведения аутологичной трансплантации кишечной микробиоты в практике подготовки высококвалифицированных спортсменов.

В настоящих методических рекомендациях представлены материалы, предназначенные для врачей сборных команд РФ по отбору и обследованию спортсменов, подготовке биоматериала для аутофекоттрансплантации и ее проведению. Также в литературном обзоре представлены современные представления о взаимодействии микробиоты кишечника и спортсмена, а также предпосылки для использования метода аутофекоттрансплантации. Рекомендации будут полезны для врачей сборных команд РФ при подготовке спортсменов к интенсивным физическим нагрузкам.

Настоящий документ предназначен для применения специалистами научно-исследовательских, лечебно-диагностических и иных организаций, подотчетных ФМБА России, и осуществляющих исследования новых медицинских технологий и перспективных направлений в спортивной медицине.

Область применения: спортивная медицина, практическое здравоохранение, медико-биологические исследования.

2. Обозначения и сокращения

АФК - активные формы кислорода
АЛТ - Аланинаминотрансфераза
АСТ - Аспаратаминотрансфераза
ВИЧ - Вирус иммунодефицита человека
ЖКТ - желудочно-кишечный тракт
ИФА - иммуноферментный анализ
КЖК - короткоцепочечные жирные кислоты
КОЕ - колониеобразующие единицы
GPx - глутатионпероксидаза
САТ - каталаза
SOD - супероксиддисмутаза
GF - germ-free, гнотобионты
BF - Bacteroides fragilis
SPF - specific pathogen-free
IFN γ - гамма-интерферон

Введение

Регулярные физические нагрузки оказывают комплексное воздействие на организм. Вызванные частыми нагрузками изменения в физиологических процессах могут приводить к снижению работоспособности и выносливости. Одним из перспективных способов восстановления после интенсивных тренировок, повышения работоспособности и профилактики негативных последствий физических нагрузок может являться прием препаратов, содержащих собственную микрофлору кишечника.

Микробиота кишечника является важным элементом полноценного функционирования организма, так как участвует в процессе питания, влияет на метаболические функции, развитие кишечника и созревание организма. Жизнедеятельность микроорганизмов в том числе включена в процессы сбора и хранения энергии, получаемой из пищи, и, как следствие, также влияет на энергетический обмен во время интенсивных физических нагрузок. Исследования на гнотобиотических животных, показали, что микрофлора кишечника необходима для развития желудочно-кишечной иммунной системы и влияет на многие физиологические процессы в организме хозяина [1].

Метод трансплантации фекальных масс (ТФМ) от здорового донора к больному человеку в настоящее время используется в терапевтической практике и применяется для лечения различных воспалительных заболеваний кишечника. Особенно эффективно данный способ терапии зарекомендовал себя при лечении рецидивирующего ванкомицин устойчивого клостридиального колита.

Физические нагрузки могут приводить к изменениям в ряде систем организма. Аутологичная трансплантация микробиоты (пересадка собственной микробиоты) кишечника может стать перспективным способом профилактики и устранения последствий окислительного стресса, воспалительных заболеваний, расстройств нервной системы и других возможных негативных последствий регулярных интенсивных нагрузок.

3. Микробиота и физические нагрузки

Физические нагрузки оказывают системное воздействие на организм

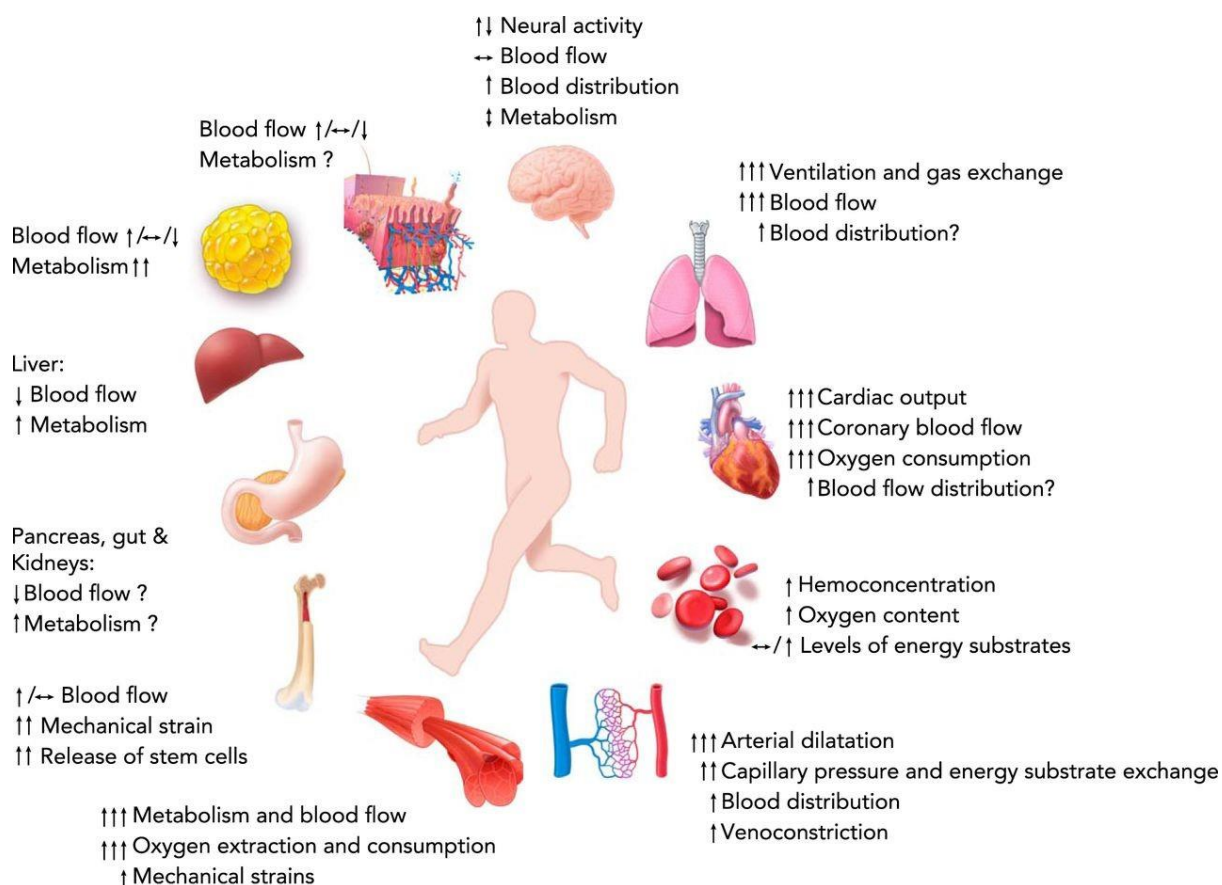


Рисунок 1 - Регулярные физические нагрузки оказывают влияние на ряд систем организма

Физиологические и биохимические изменения в организме, вызванные регулярными физическими упражнениями, включают как мышечные, так и системные реакции [2] (Рисунок 1). Основными положительными реакциями на регулярные тренировки можно считать улучшение механических, метаболических, нервно-мышечных и сократительных функций в мышцах, восстановление баланса электролитов, уменьшение накопления гликогена и увеличение митохондриального биогенеза в мышечной ткани. Кроме того, повышается вентиляционная и насосная функция сердца, связанная с существенно сниженным периферическим сосудистым сопротивлением в мышцах. Это облегчает доставку кислорода и питательных веществ к работающим мышцам, которые потребляют большое количество кислорода и питательных веществ, особенно когда интенсивность упражнений увеличивается.

С другой стороны, упражнения оказывают и негативное влияние на организм, приводя к окислительному стрессу, повышенной проницаемости кишечника, повреждению мышц, а также системным воспалениям.

4. Связь микробиоты и окислительно-восстановительного статуса организма

Интенсивные физические нагрузки могут приводить к окислительному стрессу организма [3]. Окислительный стресс возникает из-за того, что высокоинтенсивные физические упражнения вызывают рост концентрации активных форм кислорода (АФК), наличие которого может приводить к повреждению тканей организма [4]. Система ферментов с антиоксидантной активностью позволяет предотвращать подобные состояния *in vivo* благодаря работе таких ферментов как глутатионпероксидаза (GPx), каталаза (CAT) и супероксиддисмутаза (SOD) [5]. Поэтому повышение активности антиоксидантных ферментов позволяет продлить физическую нагрузку и снизить усталость [6]. Кроме того, поддержка эндогенных антиоксидантных систем дополнительными пероральными дозами антиоксидантов может предотвратить или уменьшить окислительный стресс, уменьшить повреждение мышц и улучшить производительность при физических упражнениях.

Окислительно-восстановительный статус организма-хозяина связан с микробиотой, и наоборот, состав микробиоты зависит от окислительно-восстановительного статуса хозяина. Известно, что состав микробиоты зависит от множества факторов, таких как питание, образ жизни и др. Так, у поросят, рано отлученных от молочного вскармливания, наблюдалось значительное снижение количества бактерий *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*, которое оказалось ассоциировано в том числе с заметным снижением антиоксидантной способности ферментативных систем в тонкой и толстой кишке [7]. После введения поросётам антиоксидантных препаратов окислительный статус организма пришел в норму, как и состояние микробиоты, что проявилось в восстановлении здорового количества *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*.

С другой стороны, в работе, посвященной исследованию зависимости окислительного статуса от состояния микробиоты, показана и обратная направленность подобной связи. У мышей, лишенных микробиоты, значительно увеличена активность фермента супероксиддисмутаза, катализирующей расщепление супероксидов до пероксида водорода и кислорода [8]. Авторы предполагают опосредованное влияние микрофлоры слепой кишки на активность данного фермента: непатогенные микроорганизмы регулируют необходимый уровень экспрессии генов, ответственных за синтез супероксиддисмутаза.

5. Влияние микробиоты на утомляемость организма

Объемная работа по изучению влияния микробиоты на физическое состояние была проведена на мышах [9]. Для исследования были взяты три группы мышей: у первой микробиота отсутствовала (*germ-free*, GF), вторая группа была моноколонизирована видом *Bacteroides fragilis* (BF), третья имела нормальную микробиоту, не содержащую патогенов (*specific pathogen-free*,

SPF). Мыши подвергались тесту на выносливость, заключающемуся в измерении максимальной продолжительности плавания в бассейне глубиной 20 см. Полное утомление регистрировалось, когда мышь не могла всплыть на поверхность в течение 7 секунд.

Было показано, что мыши, лишённые микробиоты, утомлялись быстрее всех, а максимальная выносливость была выявлена у мышей со здоровой микробиотой (Рисунок 2). Помимо исследования выносливости, были проведены биохимические анализы крови: измерялись концентрации мочевой кислоты, лактатдегидрогеназы, холестерина и других компонентов, а также проводился тест антиоксидантной активности.

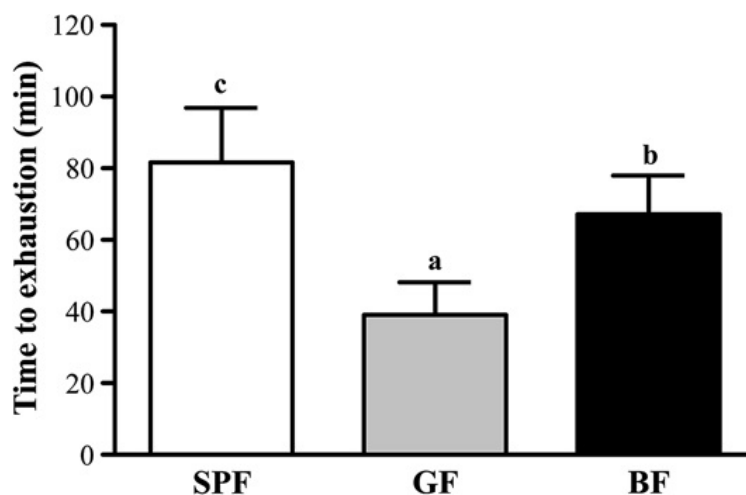


Рисунок 2 - Влияние состава микробиоты на продолжительность плавания мышей. Мыши, лишённые микробиоты (GF), значительно менее выносливы, чем мыши с здоровой микробиотой (SPF). BF - мыши, моноколонизированные *Bacteroides fragilis*.

Была обнаружена более низкая активность глутатионпероксидазы (GPx) в сыворотке и печени у мышей GF по сравнению с мышами SPF и BF. Активность каталазы (CAT) в сыворотке крови также оказалась выше у мышей SPF. Показано, что микробиота кишечника может способствовать повышению активности CAT, что и позволяет уменьшить усталость, вызванную физической нагрузкой. Связи состояния микробиоты с активностью супероксиддисмутазы (SOD) в данном исследовании не было выявлено.

6. Связь микробиоты с иммунной системой организма

Микробиота кишечника также играет основную роль в индукции и функционировании иммунной системы хозяина и защите от патогенных микроорганизмов. Показано, что среди спортсменов, подвергающихся длительным и интенсивным тренировкам, широко распространены инфекционные заболевания верхних дыхательных путей и желудочно-кишечного тракта, в том

числе повышенная проницаемость желудочно-кишечной стенки, нарушение толщины слизистой оболочки и др. [10].

Микробиота кишечника и связанные с ней метаболиты, в частности, короткоцепочечные жирные кислоты (КЖК), способны снижать проницаемость слизистой оболочки толстой кишки и уровень воспалительных цитокинов, таким образом противодействуя воспалительным процессам, вызванным интенсивной физической нагрузкой. Это противовоспалительное свойство микробиоты кишечника также может помочь замедлить симптомы усталости в процессе интенсивных тренировок. Так, исследование с участием игроков в регби показало, что, во-первых, микробиота профессиональных спортсменов отличается от микробиоты контрольной группы. Во-вторых, эти модификации микробиоты ассоциированы с более низким воспалительным статусом по сравнению с контролем [11].

Полное секвенирование метагенома для функционального геномного анализа наряду с профилированием иммунных параметров крови необходимо для определения того, какие пути иммунного ответа, если таковые имеются, изменяются в процессе интенсивных физических нагрузок. Данные секвенирования могут быть применены в качестве биомаркеров для отслеживания метаболического и системного стресса во время и после упражнений. Поскольку изменения микробного разнообразия ассоциированы с распространенностью заболеваний желудочно-кишечного тракта и дыхательных путей среди профессиональных спортсменов, можно предположить, что искусственная модуляция микробиоты кишечника может улучшать состояние иммунной системы.

7. Модуляция изменений кишечной микробиоты

В настоящее время известно, что прием пробиотиков, пребиотиков и антибиотиков модифицирует микробиоту кишечника [12]. Регулярное потребление пробиотиков способно положительно воздействовать на популяцию и структуру кишечной микробиоты и, как следствие, влиять на иммунные функции, а также на пролиферацию и состояние кишечного эпителия у людей, подверженных регулярным физическим нагрузкам.

К настоящему времени проведен ряд исследований возможности использования пробиотиков для предотвращения респираторных заболеваний или регулярных симптомов простудных заболеваний и гриппа у спортсменов. Одно из таких исследований было проведено с участием 46 женщин-пловцов [13]: исследуемая группа принимала пробиотический йогурт, содержащий *Lactobacillus acidophilus* spp., *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus*, *Bifidobacterium bifidum* и *Streptococcus salivarius thermophilus*. В то же время контрольная группа получала такие же количества обычного йогурта (полученного с использованием культуры *L. delbrueckii* subsp.

bulgaricus и *S. thermophilus*). Было показано, что употребление пробиотического йогурта приводит к сокращению числа случаев респираторных инфекций после соревнований по плаванию, а также уменьшению продолжительности отдельных симптомов.

В похожем исследовании приняли участие 20 профессиональных бегунов [14]. Аналогично, спортсмены, принимавшие пробиотики в течение одного месяца, оказались в два раза реже подвержены респираторным инфекциям по сравнению с контрольной группой. Важным результатом стал факт, что прием пробиотиков приводит к двукратному увеличению содержания гамма-интерферона (IFN γ) в крови по сравнению с группой, получавшей плацебо, что позволяет предположить, что именно поддержание уровней IFN γ может быть одним из основных факторов, обеспечивающих положительные результаты.

Как уже было сказано ранее, регулярные физические нагрузки нередко приводят к снижению защитных свойств иммунитета организма. Так, было обнаружено, что спортсмены после интенсивных тренировок имеют клинические характеристики, сходные с таковыми у людей, которые перенесли инфицирование вирусом Эпштейна-Барра, что выражалось в том числе в значительно меньшей секреции IFN γ из CD4+ Т-клеток крови по сравнению с группой контроля [15]. После 4 недель употребления капсул, содержащими $2,0 \times 10^{10}$ колониеобразующих единиц (КОЕ) *Lactobacillus acidophilus* уровень секреции IFN γ восстановился до уровней, сходных с таковыми у здоровых людей.

Благотворное влияние пробиотиков на иммунную систему приводит к улучшению состояния спортсменов, поэтому модуляция микробиоты с помощью пробиотиков может быть использована и как средство профилактики, и как средство восстановления последствий долгих физических нагрузок. Развитие методов метагеномики в перспективе может помочь с подбором оптимальных пробиотических комплексов для направленного воздействия на те или иные физиологические процессы.

Собственная здоровая флора кишечника человека может также обладать пробиотическими функциями. При этом она обладает лучшим средством к организму хозяина, т.к. это его собственные бактерии, которые потенциально будут лучше приживаться, чем чужеродные микроорганизмы. Микрофлора, в период отдыха спортсмена обладает более широким метаболическим потенциалом, чем во время интенсивных нагрузок. Поэтому подход с применением аутофлототрансплантации может потенциально улучшить состояние спортсмена в период интенсивных нагрузок.

8. Рекомендации по проведению аутологичной трансплантации кишечной микробиоты спортсмена

Все спортсмены перед забором биоматериала и проведения процедуры феко-трансплантации должны были пройти полное медицинское обследование и анкетирование об образе жизни и ранее перенесенных заболеваниях для минимизации риска осложнений при трансплантации биоматериала.

Перед процедурой трансплантации спортсмен проходит комплекс лабораторных анализов кала и крови, чтобы убедиться в наличии или отсутствии сопутствующих инфекций и заболеваний.

9. Рекомендуемые требования к спортсменам

Мужчина или женщина от 12 до 50 лет

Спортсмен должен иметь нормальный ежедневный стул;

Отсутствие ВЗК в анамнезе и раковых заболеваний органов ЖКТ

Отсутствие известных инфекционных заболеваний

Отсутствие метаболического синдрома (диагностируется по гипертензии, ожирению и диабету)

Спортсмен не должен принимать антибиотики за 3 месяца до сдачи кала;

Спортсмен не должен принимать запрещенные лекарственные препараты

10. Лабораторное обследование спортсменов до сдачи кала

Общий анализ крови.

ИФА крови на наличие паразитарных инфекций (лямблии, токсокары описторхи, аскариды, трихинеллы).

Анализ мочи общий.

Биохимический анализ крови (АЛТ, АСТ, щелочная фосфатаза, амилаза общая, фракции билирубина, уровень глюкозы, С-реактивный белок, холестерин, мочевины, креатинин).

Определение антител к вирусным гепатитам В и С в крови.

Определение антител к ВИЧ в крови.

Анализ на наличие возбудителя сифилиса.

Посев кала на дисбактериоз.

Анализ кала на патогенные бактерии (*Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Yersinia*, *Norovirus*).

Анализ кала на наличие токсина *C. Difficile*.

11. Критерии исключения спортсменов из исследования

Диарея (3 и более опорожнения кишечника в течение суток или водянистый стул).

Прием антибиотиков за 6 месяца до процедуры.

Положительный тест на ВИЧ; вирусные гепатиты В, С; Наличие патогенов в кале (*Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Yersinia*, *Norovirus*) или патогенных паразитов.

Наличие токсина *C. difficile* в кале.

Если спортсмен успешно прошел медицинское обследование и имеет нормальные показатели лабораторных исследований крови кала и мочи, у него можно собрать кал для подготовки кишечнорастворимых капсул в период минимальных физических нагрузок.

Подготовленные капсулы, в количестве 15 штук рекомендуется давать спортсменам за 1-2 дня до предполагаемых интенсивных физических нагрузок. Все капсулы принимаются одновременно (в течение 15 минут). Режим приема – однократный.

Для выявления возможных осложнений процедуры аутофекотрансплантации, т.к. синдром системного воспалительного ответа, недомогание, боли в животе, диарея, необходимо обеспечить медицинский контроль спортсмена гастроэнтерологом в первые 2 дня после процедуры.

Библиография

1. Smith K., McCoy K. D., Macpherson A. J. Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota // *Seminars in immunology*. – Academic Press, 2007. – Т. 19. – №. 2. – С. 59-69.
2. Heinonen I. et al. Organ-specific physiological responses to acute physical exercise and long-term training in humans // *Physiology*. – 2014. – Т. 29. – №. 6. – С. 421-436.
3. Dekany M. et al. Antioxidant status of interval-trained athletes in various sports // *International journal of sports medicine*. – 2006. – Т. 27. – №. 02. – С. 112-116.
4. Deaton C. M., Marlin D. J. Exercise-associated oxidative stress // *Clinical Techniques in Equine Practice*. – 2003. – Т. 2. – №. 3. – С. 278-291.
5. Powers S. K. et al. Exercise-induced improvements in myocardial antioxidant capacity: the antioxidant players and cardioprotection // *Free radical research*. – 2014. – Т. 48. – №. 1. – С. 43-51.
6. Bogdanis G. C. et al. Short-term high-intensity interval exercise training attenuates oxidative stress responses and improves antioxidant status in healthy humans // *Food and Chemical Toxicology*. – 2013. – Т. 61. – С. 171-177.
7. Xu J. et al. Regulation of an antioxidant blend on intestinal redox status and major microbiota in early weaned piglets // *Nutrition*. – 2014. – Т. 30. – №. 5. – С. 584-589.
8. Dobashi Y. et al. Upregulation of superoxide dismutase activity in the intestinal tract mucosa of germ-free mice // *Journal of Veterinary Medical Science*. – 2012. – С. 12-0248.
9. Hsu Y. J. et al. Effect of intestinal microbiota on exercise performance in mice // *The Journal of Strength & Conditioning Research*. – 2015. – Т. 29. – №. 2. – С. 552-558.
10. Belkaid Y., Hand T. W. Role of the microbiota in immunity and inflammation // *Cell*. – 2014. – Т. 157. – №. 1. – С. 121-141.
11. Clarke S. F. et al. Exercise and associated dietary extremes impact on gut microbial diversity // *Gut*. – 2014. – Т. 63. – №. 12. – С. 1913-1920.
12. Marchesi J. R. et al. The gut microbiota and host health: a new clinical frontier // *Gut*. – 2016. – Т. 65. – №. 2. – С. 330-339.
13. Salarkia N. et al. Effects of probiotic yogurt on performance, respiratory and digestive systems of young adult female endurance swimmers: a randomized controlled trial // *Medical journal of the Islamic Republic of Iran*. – 2013. – Т. 27. – №. 3. – С. 141.
14. Cox A. J. et al. Oral administration of the probiotic *Lactobacillus fermentum* VRI-003 and mucosal immunity in endurance athletes // *British Journal of Sports Medicine*. – 2010. – Т. 44. – №. 4. – С. 222-226.
15. Clancy R. L. et al. Reversal in fatigued athletes of a defect in interferon γ secretion after administration of *Lactobacillus acidophilus* // *British journal of sports medicine*. – 2006. – Т. 40. – №. 4. – С. 351-354.

Федеральное медико-биологическое агентство Российской Федерации

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства»
(ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России)

ПРОВЕДЕНИЕ АУТОЛОГИЧНОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ КИШЕЧНОЙ МИКРОБИОТЫ В ПРАКТИКЕ ПОДГОТОВКИ ВЫСОКОКВАЛИФИЦИРОВАННЫХ СПОРТСМЕНОВ

Методические рекомендации

МР ФМБА России 21.2.2.6-2019

Заместитель генерального директора по научной работе
д.б.н., профессор РАН

Е.Н. Ильина

Исполнители:

научный руководитель – д.б.н., профессор РАН

Е.Н. Ильина

начальник научно-организационного отдела
к.х.н.

Д.А. Гудков

научный сотрудник

А.В. Павленко

научный сотрудник, к.б.н. Е.И.

Олехнович

младший научный сотрудник

А.И. Манолов

лаборант

Д.Н. Конанов