

Экспериментальное моделирование дисбактериоза детского кишечника с применением биореакторной системы искусственного желудочно-кишечного тракта

О.С. Чемисова, Д.А. Седова, С.Н. Головин, А.М. Ермаков
Донской государственный технический университет, Ростов-на-Дону, Россия

АННОТАЦИЯ

Обоснование. Традиционные методы культивирования микроорганизмов не позволяют воспроизвести сложные межмикробные взаимодействия, характерные для кишечного биоценоза *in vivo*. В связи с этим актуальны разработка и применение современных биореакторных систем для экспериментального моделирования дисбактериоза кишечника у детей, которые обеспечат стандартизацию условий эксперимента и воспроизводимость результатов без этических ограничений.

Цель. Разработка и валидация методики экспериментального моделирования дисбактериоза детского кишечника с использованием биореакторной системы искусственного желудочно-кишечного тракта для изучения патогенетических механизмов нарушений микробиоценоза и оценки эффективности корректирующих воздействий.

Методы. Исследование проводили с использованием автоматизированной системы моделирования желудочно-кишечного тракта, включающей три реактора (желудок, двенадцатиперстная кишка, толстая кишка) с контролируемыми параметрами температуры, pH и анаэробных условий. Исследование проведено с использованием образца фекалий от донора 6 лет. Период наблюдения составлял 35 дней после внесения фекальной суспензии в реакторы. Критериями валидации были соответствие микробного профиля искусственного микробиоценоза клиническому профилю исходного образца и стабильность микробного сообщества по ключевым таксонам. Методы оценки включали бактериологическое исследование на селективных средах и количественную ПЦР с использованием набора «Колонофлор-16». Критерием стабильности устанавливали коэффициент вариации $\leq 20\%$ для основных бактериальных популяций.

Результаты. В исходном образце фекалий методами ПЦР и бактериологическим исследованием выявлены критический дефицит облигатной микрофлоры (снижение количества лактобактерий и бифидобактерий) и избыточный рост условно-патогенных микроорганизмов, что соответствует дисбактериозу III степени. Разработанная биореакторная модель успешно воспроизвела дисбиотические изменения: Общая бактериальная масса в реакторе толстой кишки составила $13,21 \pm 0,20$ lg копий ДНК/мл на 8-й день и $13,38 \pm 0,09$ lg копий ДНК/мл на 35-й день при исходном значении $13,30$ lg копий ДНК/мл. Созданная модель обеспечивает воспроизведение основных характеристик детского дисбактериоза, включая дефицит облигатной микрофлоры (*Lactobacillus* spp. и *Bifidobacterium* spp.) и избыточный рост условно-патогенных микроорганизмов (*E. coli*, *C. perfringens*, *Enterobacter* spp. и др.). Анализ стабильности показал достижение коэффициентов вариации менее 20% для всех ключевых популяций со второй недели культивирования. Модель обеспечила стабильное воспроизведение дисбактериоза III степени в течение 35-дневного периода наблюдения.

Заключение. В ходе исследования успешно разработана и валидирована методика экспериментального моделирования дисбактериоза детского кишечника с использованием системы искусственного желудочно-кишечного тракта. Разработанная модель открывает новые возможности для углубленного изучения патогенетических механизмов нарушений микробиоценоза в детском возрасте, скрининга и оценки эффективности пробиотических препаратов, пребиотиков и других корректирующих воздействий в условиях, приближенных к физиологическим.

Ключевые слова: дисбактериоз; микробиота; искусственный желудочно-кишечный тракт; модель кишечника; детский возраст.

КАК ЦИТИРОВАТЬ:

Чемисова О.С., Седова Д.А., Головин С.Н., Ермаков А.М. Экспериментальное моделирование дисбактериоза детского кишечника с применением биореакторной системы искусственного

Рукопись поступила: 02.09.2025

Рукопись одобрена: 28.10.2025

Опубликована online: 02.11.2025

Статья доступна по лицензии CC BY-NC-ND 4.0 International License

© Эко-Вектор, 2025

Experimental Modeling of Childhood Gut Dysbiosis Using a Bioreactor System of an Artificial Gastrointestinal Tract

Olga S. Chemisova, Darya A. Sedova, Sergey N. Golovin, Alexey M. Ermakov
Don State Technical University, Rostov-on-Don, Russia

ABSTRACT

BACKGROUND: Traditional methods of microorganism cultivation do not allow reproduction of complex intermicrobial interactions characteristic of intestinal biocenosis in vivo. In this regard, the development and application of modern bioreactor systems for experimental modeling of intestinal dysbiosis in children becomes relevant, which will ensure standardization of experimental conditions and reproducibility of results without ethical limitations.

AIM: To develop and validate a methodology for experimental modeling of pediatric intestinal dysbiosis using an artificial GIT bioreactor system for studying pathogenetic mechanisms of microbiocenosis disorders and evaluating the effectiveness of corrective interventions.

METHODS: The study was conducted using an automated gastrointestinal tract modeling system including three reactors (stomach, duodenum, colon) with controlled parameters of temperature, pH, and anaerobic conditions. The study was performed using a fecal sample from a 6-year-old donor. The observation period was 35 days after introducing the fecal suspension into the reactors. Validation criteria were: correspondence of the microbial profile of the artificial microbiocenosis to the clinical profile of the original sample and stability of the microbial community by key taxa. Assessment methods included bacteriological examination on selective media and quantitative PCR using the "Colonoflor-16" kit. The stability criterion was established as a coefficient of variation $\leq 20\%$ for major bacterial populations.

RESULTS: The initial fecal sample analysis by PCR and bacteriological culture revealed a critical deficiency of obligate microflora (reduced counts of lactobacilli and bifidobacteria) and overgrowth of opportunistic microorganisms, corresponding to grade III dysbiosis. The developed bioreactor model successfully reproduced the dysbiotic changes. The total bacterial mass in the large intestine reactor was 13.21 ± 0.20 lg DNA copies/ml on day 8 and 13.38 ± 0.09 lg DNA copies/ml on day 35, compared to the initial value of 13.30 lg DNA copies/ml. The created model ensures the reproduction of the main characteristics of childhood dysbiosis, including deficiency of obligate microflora (*Lactobacillus* spp. and *Bifidobacterium* spp.) and overgrowth of opportunistic microorganisms (*E. coli*, *C. perfringens*, *Enterobacter* spp., etc.). Stability analysis showed that coefficients of variation below 20% were achieved for all key populations starting from the second week of cultivation. The model provided stable reproduction of grade III dysbiosis throughout the 35-day observation period.

CONCLUSION: The study successfully developed and validated a methodology for the experimental modeling of childhood gut dysbiosis using an artificial GIT system. The developed model opens new opportunities for in-depth study of the pathogenetic mechanisms of microbiocenosis disorders in childhood, as well as for screening and evaluating the efficacy of probiotic preparations, prebiotics, and other corrective interventions under conditions close to physiological.

Keywords: dysbiosis; microbiota; artificial gastrointestinal tract; gut model; childhood.

TO CITE THIS ARTICLE:

Chemisova OS, Sedova DA, Golovin SN, Ermakov AM. Experimental Modeling of Childhood Gut Dysbiosis Using a Bioreactor System of an Artificial Gastrointestinal Tract. *Ekologiya cheloveka* (Human Ecology). 2025;32(10):XX-XX. DOI: 10.17816/humeco690049 EDN: MTJMUA

Received: 02.09.2025

Accepted: 28.10.2025

Published online: 02.11.2025

The article can be used under the CC BY-NC-ND 4.0 International License

© Eco-Vector, 2025

ОБОСНОВАНИЕ

Желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) человека представляет собой сложную экологическую систему, включающую огромное разнообразие микроорганизмов с общим количеством более 10^{13} клеток [1]. Эта микробная экосистема играет ключевую роль в поддержании гомеостаза хозяина, участвуя в процессах пищеварения, синтезе витаминов, модуляции иммунного ответа и защите от патогенов. В последние десятилетия благодаря метагеномным исследованиям значительно расширились представления о структуре и видовом составе кишечной микробиоты, включающей около 2000 видов бактерий, значительная часть которых является некультивируемой. Доминирующими таксонами в составе микробиоценоза кишечника являются филумы *Firmicutes* (в современной номенклатуре *Bacillota*), *Actinobacteria* (*Actinomycetota*) и *Bacteroidetes* (*Bacteroidota*), составляющие до 90% от общего микробного сообщества. К числу субдоминантных филумов относятся *Proteobacteria* (*Pseudomonadota*), *Tenericutes* (*Mollicutes*), *Fusobacteria* (*Fusobacteriota*) и *Verrucomicrobia* (*Verrucomicrobiota*) [2, 3].

Формирование кишечной микрофлоры у детей происходит поэтапно, начиная с момента рождения, и характеризуется высокой динамичностью и чувствительностью к внешним воздействиям. На этот процесс влияют такие факторы, как способ родоразрешения, тип вскармливания, применение антибиотиков и особенности диеты [4]. Изменения микробного состава кишечника у детей связаны с возникновением болезней пищеварительной системы, а также различных инфекционных и неинфекционных заболеваний, включая патологии других органов и систем организма [5]. Нарушения микробиоценоза кишечника у детей могут приводить к развитию различных воспалительных заболеваний, функциональных расстройств пищеварения, диабета 1-го типа, аллергических заболеваний, снижению иммунной защиты и изменениям в развитии нервной системы [6–8].

Дисбактериоз (дисбиоз) кишечника представляет собой клинко-лабораторный синдром, развивающийся на фоне ряда болезней, характеризующийся изменением качественного и/или количественного состава нормальной микрофлоры, метаболическими и иммунными нарушениями, которые сопровождаются у части пациентов клиническими проявлениями поражения кишечника. Дисбактериоз может быть связан с нарушением равновесия различных групп микроорганизмов, населяющих кишечник в норме: бактерий, грибов, вирусов, простейших или их комплекса [9].

Изучение патогенетических механизмов развития дисбактериоза кишечника у детей представляет значительные трудности в связи с этическими ограничениями проведения инвазивных исследований, сложностью получения биологического материала и высокой вариабельностью состава микрофлоры. Традиционные методы культивирования микроорганизмов не позволяют воспроизвести сложные межмикробные взаимодействия, характерные для кишечного биоценоза *in vivo*. Кроме того, методы культивирования не обеспечивают адекватного моделирования физико-химических условий различных отделов ЖКТ, включая градиенты pH, кислорода, питательных веществ и времени транзита. В совокупности это затрудняет прямую валидацию гипотез *in vivo* и требует развитых *in vitro* моделей. В связи с этим особую актуальность приобретает разработка и применение современных биореакторных систем для экспериментального моделирования дисбактериоза кишечника.

Современные *in vitro* модели кишечного микробиома, такие как симулятор человеческой кишечной микробной экосистемы (англ. Simulator of Human Intestinal Microbial Ecosystem, SHIME) и модули взаимодействия хозяин–микробиота (англ. Host-Microbiota Interaction, HMI), позволяют воспроизводить физиологические условия различных отделов ЖКТ с высокой степенью точности [10, 11]. В Донском государственном техническом университете ранее был разработан микробиологический комплекс моделирования процессов в ЖКТ животных — программно-аппаратный комплекс, эквивалентный моделям искусственного кишечника SHIME и HMI (<https://ckp-rf.ru/catalog/usu/3559948/>). Биореакторные модели обеспечивают контролируемые условия для изучения динамики микробных сообществ, их метаболической активности и ответа на различные терапевтические воздействия. Преимуществом таких систем является возможность стандартизации условий эксперимента и воспроизводимости результатов, что критически важно для получения достоверных научных данных [12, 13]. Особое значение биореакторные системы

приобретают при моделировании детского кишечного микробиома, поскольку позволяют учесть специфические особенности микробиоты детей различных возрастных групп и исследовать механизмы развития дисбактериоза без этических ограничений.

Цель исследования. Разработка и валидация методики экспериментального моделирования дисбактериоза детского кишечника с использованием биореакторной системы искусственного ЖКТ для изучения патогенетических механизмов нарушений микробиоценоза и оценки эффективности корректирующих воздействий.

МЕТОДЫ

УСЛОВИЯ ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проводили с использованием автоматизированной системы «Микробиологический комплекс моделирования процессов в желудочно-кишечном тракте» (<https://ckprf.ru/catalog/usu/3559948/>), адаптировав её параметры к поставленным задачам исследования. В работе использовали три реактора, имитирующие желудок, двенадцатиперстную кишку (ДПК), толстую кишку (ТК). Реакторы соединены перистальтическими насосами с клапанами для контролируемой перекачки содержимого, снабжены датчиками температуры, pH, магнитными мешалками. Каждый реактор оборудован отверстиями для внесения компонентов (питательной среды, искусственного желудочного сока, химуса, растворов соляной кислоты и щёлочи) и для отбора проб. Полезный объём реакторов следующий: желудок — 50 мл, ДПК — 200 мл, ТК — 300 мл. Система автоматически поддерживает постоянную температуру 37 °С, анаэробные условия путём подачи инертного газа (азота), pH содержимого реактора-желудка на уровне 3,0, реактора-ДПК — 6,5–6,8, реактора-ТК — 6,8–7,0 (за счёт дозированного поступления растворов 0,5 М HCl и 1 М NaHCO₃).

Для создания модели микробиоценоза использовали образцы кала от ребенка 6 лет с установленным по микробиологическим критериям дисбактериозом III степени (значительное снижение титров *Bifidobacterium* spp. и *Lactobacillus* spp., обнаружение в анализе условно-патогенных микроорганизмов в высоких титрах как одного вида, так и в ассоциациях). Сбор биоматериала проводили в соответствии с требованиями п. 6.8.3. МУ 4.2.2039-05 «Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории. Методические указания». Отбор фекалий производили в стерильную посуду, материал исследовали бактериологическим методом в течение 2 ч после получения образца. Для подготовки фекальной взвеси, вносимой в реакторы, биологический материал гомогенизировали в стерильном искусственном химусе в соотношении 1:10, фильтровали через нейлоновый фильтр с диаметром пор 150 мкм, определяли методом количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) общую бактериальную массу в копиях ДНК/мл, что принимали за эквивалент КОЕ/мл. Фекальную взвесь вносили однократно в начале эксперимента в реакторы в концентрации, соответствующей физиологическим значениям для имитированных отделов кишечника [14], рассчитанных исходя из исходной концентрации бактерий в фекальной суспензии и объёма соответствующего реактора: в реактор-ДПК до количества *Escherichia coli* 10² КОЕ/мл (2 lg КОЕ/мл), в реактор-ТК — до количества общей бактериальной массы 10¹² КОЕ/мл (12 lg КОЕ/мл).

Для имитации желудочного сока и кишечного химуса использовали концентрации ферментов и жёлчных солей в соответствии с рекомендациями INFOGEST [15]. Состав искусственного желудочного сока: 50 мМ NaCl, пепсин свиной сывороточный (2000 U/мл). К полученному раствору добавляли 0,5 М HCl до достижения значения pH 3,0. Приготовленный раствор стерилизовали фильтрацией через мембранные фильтры с диаметром пор 0,2 мкм (Biofil, Китай). Экспозиция в реакторе желудка составляла 120 мин, после чего весь объём перекачивался в реактор-ДПК один раз в сутки.

В качестве основы искусственного дуоденального химуса использовали 1% мясопептонный бульон с добавлением 0,5% лактозы, который обеспечивал необходимое содержание аминокислот и пептидов, характерное для частично переваренной белковой пищи в тонком кишечнике. Ферментативная активность искусственного химуса достигалась путём добавления панкреатина свиного (CDH, Индия) с нормированной липазной активностью 2000 U/мл. В качестве компонентов жёлчи добавляли таурохолат натрия 1,5 мг/мл. Физиологический уровень pH 6,5–6,8 искусственного химуса поддерживали введением 1 М раствора гидрокарбоната натрия. Скорость перекачки содержимого реактора-ДПК в реактор-ТК составляла 20–22 мл каждые 4 ч, объём в реакторе-ДПК поддерживался постоянным за счёт периодического добавления свежего искусственного дуоденального химуса.

Для предотвращения влияния остаточной жёлчи/ферментов и обеспечения роста анаэробных консорциумов в реакторе-ТК после перекачки содержимого из реактора-ДПК вводили до достижения заданных параметров буферную среду: 100 мМ NaCl, 5 мМ K₂HPO₄, 5 мМ KH₂PO₄, 100 мМ NaHCO₃, 0,5 мМ MgCl₂, 1,5 мМ CaCl₂, 0,05% L-цистеин-HCl, pH 6,8–7,0. Каждые 24 ч проводили сброс до 50–60% от объёма содержимого ТК, объём в реакторе-ДПК поддерживался за счёт перекачки содержимого из ДПК и введения буферной среды.

Отбор образцов из реакторов ДПК и ТК проводили один раз в сутки перед этапом перекачки. Для микробиологического исследования готовили десятикратные разведения образцов в тиогликолевом буфере от 10⁻¹ до 10⁻⁸. Из разведений производили высевы по 0,1 мл на соответствующие агаризованные среды и по 1,0 мл в высокий столбик на среды для определения бифидобактерий и клостридий. Посев материала производили на универсальные и дифференциально-диагностические среды: ГРМ-агар, Бифидум-среда, MRS-агар, агар Эндо, Колумбийский агар, Стафилококкагар, среда Вильсон-Блера производства (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия). Посевы инкубировали при +37 °С. Степени дисбиотических изменений определяли согласно ОСТ 91500.11.0004-2003 «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника».

Качественные и количественный анализ микробиоценоза биоматериала от донора и образцов из искусственного ЖКТ проводили методом ПЦР в режиме реального времени с использованием набора реагентов «Колонофлор-16 (премиум)» (Альфалаб», Россия). Набор реагентов предназначен для выявления ДНК облигатных представителей микрофлоры ТК (бифидобактерий, лактобацилл, кишечной палочки), а также условно-патогенных и патогенных микроорганизмов. Выделение ДНК осуществляли с помощью набора ДНК-сорб-В (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии, Россия). Постановку ПЦР проводили в соответствии с инструкцией производителя (<https://alphalabs.ru/produkcziya/test-sistemyi-dlya-issledovaniya-sostava-mikrobioty-tolstogo-kishechnika/>) на амплификаторе детектирующем ДТ-96 (ДНК-Технология, Россия).

После внесения биологического материала в виде фекальной суспензии донора в реакторы ДПК и ТК в течение 35 дней (период наблюдения) оценивали стабильность микробиоценоза, контролируя показатели бактериологическим методом и количественной ПЦР. Критериями валидации искусственного ЖКТ считали соответствие микробного профиля искусственного микробиоценоза клиническому профилю исходного образца и стабильность сформированного микробного сообщества в течение периода наблюдения по ключевым таксонам.

Исследование проводили с соблюдением принципов биомедицинской этики с получением информированного согласия законных представителей ребёнка. Проведение исследования одобрено локальным независимым этическим комитетом ФГБОУ ВО «Донской государственный технический университет» (протокол № 26 от 17.09.2024). Исследование проводили в период с декабря 2024 г. по март 2025 г.

СТАТИСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Для статистических расчётов использовали пакет прикладных программ Microsoft Excel 2010, IBM SPSS Statistics 26.0. Микробиологические данные представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения. Для определения периода стабилизации микробного сообщества анализировали динамику изменений численности основных бактериальных популяций в течение 35 дней культивирования. Коэффициент вариации (CV) рассчитывали по формуле: $CV = (\sigma/\mu) \times 100\%$, где σ — стандартное отклонение; μ — среднее арифметическое значение. Порог в 20% изменчивости или 80% сходства был установлен в качестве критерия стабильности [16].

РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате анализа образца faeces от донора в ПЦР и бактериологическим методом выявлены значительные нарушения качественного и количественного состава микрофлоры, соответствующие дисбактериозу III степени, характеризующиеся критическим дефицитом облигатной микрофлоры и избыточным ростом условно-патогенных микроорганизмов. Общая бактериальная масса в ПЦР превысила верхнюю границу референсного интервала, указывая на избыточный бактериальный рост в ТК (табл. 1). Бактериологическое исследование также подтвердило высокую общую микробную нагрузку 12 lg КОЕ/мл.

Среди облигатной микрофлоры отмечено снижение популяций лактобактерий на 1,15–2,15 lg ниже референсных значений, и бифидобактерий до 7,60 lg копий ДНК/мл, что соответствует 25-кратному снижению относительно нижней границы нормы. Результаты бактериологического исследования подтвердили дефицит лактобактерий — на MRS-агаре выявлено только 5,78 lg КОЕ/мл. При этом культуральное исследование на Бифидум-среде показало ещё более выраженное снижение

количества бифидобактерий до 6 lg КОЕ/мл, что объясняется возможностью выявления молекулярно-генетическими методами ДНК погибших бактериальных клеток.

Наиболее критичным являлось превышение содержания условно-патогенных микроорганизмов. Выявление *Citrobacter* spp. в концентрации 12,48 lg копий ДНК/мл, что превышает референсные значения более чем в 10^8 раз, свидетельствует о массивной колонизации кишечника условно-патогенными энтеробактериями. Также зарегистрировано превышение нормальных значений для *Akkermansia muciniphila* (12,30 lg копий ДНК/мл при норме не более 11 lg копий ДНК/мл) и незначительное повышение содержания стрептококков (6×10^8 КОЕ/г при норме не более 10^8 КОЕ/г), *Acinetobacter* spp. (6,60 lg копий ДНК/мл при норме не более 6 lg копий ДНК/мл) и *Streptococcus* spp. (8,78 lg копий ДНК/мл при допустимом уровне не более 8 lg копий ДНК/мл). Патогенные микроорганизмы (*Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, энтеропатогенная *E. coli*) не обнаружены. Однако культуральное исследование на среде Вильсона-Блера показало наличие сульфитредуцирующих клостридий в количестве 5 lg КОЕ/мл, что также является признаком дисбиотических нарушений.

Комплексное исследование позволило охарактеризовать выраженные нарушения микробиоты кишечника донора и определить показатели для контроля формирования модели дисбактериоза ЖКТ в нашем эксперименте. Внесение подготовленной фекальной взвеси в биореакторную систему проводилось с учётом физиологических градиентов микробной обсеменённости различных отделов ЖКТ. В качестве индикаторного микроорганизма, позволяющего оценить динамику изменений в искусственной модели ДПК при длительном непрерывном культивировании, был выбран вид *E. coli*, в реакторе-ДПК была достигнута целевая концентрация *E. coli* 2 lg КОЕ/мл, что соответствует уровню бактериальной обсеменённости тонкого кишечника. В реакторе-ТК общая бактериальная масса составила 12 lg копий ДНК/мл, моделируя высокую концентрацию микроорганизмов, характерную для ТК.

Сравнительный анализ микробного профиля модели ТК с исходным образцом продемонстрировал высокую степень воспроизводимости ключевых характеристик дисбактериоза III степени на протяжении 35-дневного периода наблюдения (см. табл. 1). Выбраны две контрольные точки для сопоставления модели дисбактериоза в реакторе-ТК с исходным образцом и референсными значениями — 8-й день культивирования в реакторе после периода адаптации бактерий к искусственной системе и 35-й день по окончании наблюдения. В результате определения общей бактериальной массы показано поддержание исходного уровня: $13,21 \pm 0,20$ lg копий ДНК/мл на 8-й день и $13,38 \pm 0,09$ lg копий ДНК/мл на 35-й день практически соответствовали исходному значению 13,30 lg копий ДНК/мл, что свидетельствовало о сохранении общей биомассы микроорганизмов в биореакторной системе.

При исследовании количества основных представителей облигатной микрофлоры выявлены изменения, характерные для исходного образца faeces: значительное снижение относительно референсных значений количества *Bifidobacterium* spp. с незначительными колебаниями от $7,86 \pm 0,08$ lg копий ДНК/мл на 8-й день до $7,90 \pm 0,01$ lg копий ДНК/мл на 35-й день, *Lactobacillus* spp. — от $5,32 \pm 0,15$ lg копий ДНК/мл до $4,30 \pm 0,07$ lg копий ДНК/мл соответственно.

Для основных представителей анаэробной микрофлоры ТК *Bacteroides* spp. и *Faecalibacterium prausnitzii* показано превышение верхней границы референсных значений при сохранении соотношения Vfr/Frau в пределах нормы, что также соответствовало дисбиотическим показателям биологического образца донора.

Выраженное превышение референсных значений установлено для *E. coli*, *Citrobacter* spp., *A. muciniphila*, *Acinetobacter* spp. и *Streptococcus* spp. В модельной системе ТК зарегистрировано увеличение количества *C. perfringens* и *Enterobacter* spp., не обнаруженных методом ПЦР в образце faeces, что обусловлено присутствием данных микроорганизмов в концентрациях ниже порога чувствительности метода. Колонизация биореактора этими представителями обеспечила дополнительные критерии дисбактериоза.

Оценку стабильности и вариабельности микробного сообщества проводили с использованием CV микробного сообщества в обоих модельных реакторах на протяжении 35-дневного периода культивирования (табл. 2). В реакторе-ДПК популяция *E. coli* достигла стабильного состояния уже в первую неделю эксперимента, демонстрируя CV=11,54% в период 1–7 дней с последующим снижением до 11,35% на второй неделе. Наименьшая вариабельность отмечена в период с 15-го по 35-й дни, что свидетельствовало о достижении устойчивого равновесного состояния.

В реакторе-ТК в первую неделю культивирования критически высокую вариабельность (CV >20%) демонстрировали несколько ключевых популяций: *C. perfringens* (CV=40,13%), что могло быть связано с процессом первичной колонизации и адаптации к анаэробным условиям, а также

Enterobacter spp. (CV=27,12%), и *Enterococcus* spp. (CV=19,10%), показатель которых находился на пороге критического значения.

Во втором периоде наблюдения (8–14-й дни) большинство популяций значительно снизили свою вариабельность: *C. perfringens* до CV=9,04%, *Enterobacter* spp. до CV=12,41%, *Enterococcus* spp. до CV=7,89%. К третьему периоду (15–21-й дни) практически все популяции достигли стабильного состояния с CV менее 10%.

Заключительный период наблюдения (22–35-й дни) характеризовался достижением максимальной стабильности микробного сообщества. Большинство популяций демонстрировали CV <5%: *Bifidobacterium* spp. (CV=0,25%), *F. prausnitzii* (CV=0,35%), *Citrobacter* spp. (CV=0,38%), что указывало на формирование устойчивого микробного консорциума.

Наиболее стабильными на протяжении всего периода наблюдения оказались представители основной анаэробной микрофлоры ТК *Bacteroides* spp. и *F. prausnitzii*, а общая бактериальная масса варьировала в пределах CV=0,75–6,35%. Данные показатели свидетельствовали о высокой адаптивности основных представителей кишечной микрофлоры к условиям биореакторной системы.

ОБСУЖДЕНИЕ

Возможность моделирования и длительного поддержания стабильного дисбиотического профиля создаёт основу для изучения эффективности пробиотических препаратов, пребиотиков и других корректирующих воздействий, поскольку их эффективность при воздействии на здоровый и нарушенный микробиоценоз может кардинально различаться.

Использование трёхреакторной системы «желудок–ДПК–ТК» позволит обеспечить адекватное моделирование воздействия градиентов pH, компонентов желудочного сока, жёлчи, времени транзита на вводимые в систему препараты и оценить их влияние на микробиоценоз ТК. Установленные параметры имеющейся установки искусственного ЖКТ, включающие физические (температура, газообмен, скорость перемешивания и перекачивания) и химические (состав искусственного желудочного сока и химуса) факторы, позволили поддерживать концентрацию аэробных и анаэробных групп микроорганизмов, не допуская их критической гибели или вымывания из системы. Использование в качестве основы для кишечного химуса мясопептонного бульона с добавлением лактозы позволило обеспечить питательный субстрат, имитирующий по аминокислотному и углеводному составу пищу, поступающую в ЖКТ *in vivo*, и поддерживающий рост основных таксонов.

Необходимо подчеркнуть, что в подобных моделях при каждом исследовании будет использоваться новый биологический материал для загрузки искусственного ЖКТ. В связи с этим до проведения исследования из нескольких образцов faeces был отобран материал от пациента детского возраста, соответствующий состоянию дисбактериоза III степени и характеризующийся отклонениями одновременно по нескольким микробиологическим показателям, что позволило провести валидацию метода по широкому набору таксономических групп, которые могут встречаться и у других пациентов с дисбактериозом. Вместе с тем целенаправленно был выбран образец, не содержащий облигатных патогенов, что обеспечивает биологическую безопасность проводимых исследований. Критерием успешной валидации служила способность биореакторной системы обеспечивать длительное стабильное поддержание 18 независимых показателей микробиоценоза, характеризующих различные таксономические группы микроорганизмов — от облигатных анаэробов до факультативных анаэробов и аэробов. Комплексная валидация разработанной биореакторной модели проводилась на основании соответствия микробных профилей исходному клиническому материалу и долгосрочной стабильности сформированного микробного сообщества с использованием ПЦР. Применение молекулярно-генетического метода обеспечило качественный и количественный мониторинг трудно культивируемых анаэробов, преобладающих в ЖКТ человека. Бактериологический метод при оценке микробиоценоза в биореакторах применялся как дополнительный для контроля жизнеспособности лакто- и бифидобактерий, а также для подсчёта групп микроорганизмов, присутствующих в образцах в низких концентрациях, например, *E. coli* в реакторе-ДПК.

Задачей моделирования реакторов желудка и ДПК являлось обеспечение физико-химических условий (pH, ферментов, солей жёлчных кислот), которые при дальнейшем применении модели могут оказывать воздействие на вводимые в систему препараты, влияя на их эффективность. В связи с этим мы не преследовали цель моделировать микробиоценозы желудка и ДПК, отличающиеся значительно более низким количеством микроорганизмов. В качестве индикаторного микроорганизма выбрали одного представителя (*E. coli*) для контроля численности бактерий в результате перекачивания содержимого между реакторами. Достигнутые значения CV менее целевых 20% свидетельствуют о стабилизации численности популяции *E. coli* и, соответственно, об

оптимальных параметрах, таких как скорость и объём обмена, при моделировании системы биореакторов.

В реакторе-ТК были воспроизведены дисбиотические изменения облигатной микрофлоры, установленные для образца от донора, в том числе сниженное количество *Lactobacillus* spp., которое является одним из наиболее часто регистрируемых нарушений при дисбактериозе у детей до 7 лет [17]. Подтверждено моделирование избыточного роста условно-патогенной микрофлоры (*Citrobacter* spp., *C. perfringens*, *Acinetobacter* spp., *Streptococcus* spp.) в концентрациях, превышающих нормативные значения, что характерно для дисбиоза III степени.

Доминирующим таксоном в модели ТК являлся род *Bacteroides*, что соответствует микробиому кишечника *in vivo* [18]. Эта группа обладает разнообразными системами утилизации полисахаридов, позволяющими эффективно использовать пищевые длинноцепочечные полисахариды, недоступные хозяину, и продуцируют короткоцепочечные жирные кислоты, критически важные для целостности слизистой оболочки кишечника и иммунной регуляции. Однако при дисбиотических состояниях некоторые штаммы могут стать условно-патогенными микроорганизмами [19]. В полученной нами модели дисбиоза созданы условия для стабилизации численности *Bacteroides* spp. выше референсных значений, что является важным валидационным критерием. Вместе с тем было обеспечено поддержание соотношения *Bacteroides* spp. и *F. prausnitzii* в пределах физиологических значений, что соответствовало исходному образцу от донора. Нарушение данного соотношения ассоциировано с развитием воспалительных заболеваний в организме человека [20].

Применение порогового значения CV 20% в качестве критерия стабильности основано на результатах других исследователей [16]. Наши результаты демонстрируют, что численность ключевых популяций бактерий достигла стабильности уже с 8-го дня эксперимента. Для доминирующих *Bacteroides* spp. и *F. prausnitzii* установлена CV <5% уже в первую неделю моделирования, что свидетельствует о высокой адаптивности основных представителей анаэробной микрофлоры. Период от 8 до 14 дней можно рассматривать как минимальный срок, необходимый для формирования стабильного искусственного микробиоценоза, воспроизводящего характерные особенности дисбиотических нарушений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе исследования успешно разработана и валидирована методика экспериментального моделирования дисбактериоза детского кишечника с использованием системы искусственного ЖКТ. Созданная модель обеспечивает воспроизведение основных характеристик детского дисбактериоза, включая дефицит облигатной микрофлоры (*Lactobacillus* spp. и *Bifidobacterium* spp.) и избыточный рост условно-патогенных микроорганизмов (*E. coli*, *C. perfringens*, *Enterobacter* spp.), а также поддержание стабильного дисбиотического профиля в течение 35-дневного периода наблюдения. Практическое значение *in vitro* модели заключается в возможности изучить влияние исследуемых препаратов на динамику микробных популяций, оценить их устойчивость к воздействию желудочного сока, жёлчи и ферментов пищеварительного тракта, а также проанализировать механизмы взаимодействия с резидентной микрофлорой в приближенных к физиологическим условиях. Полученные в модели результаты могут стать основой для отбора наиболее перспективных компонентов терапевтических препаратов, формирования обоснованных гипотез и протоколов последующих клинических исследований.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Вклад авторов. О.С. Чемисова — определение концепции, разработка дизайна экспериментального исследования, проведение эксперимента и сбор данных, работа с данными, написание рукописи; Д.А. Седова — проведение эксперимента и сбор данных, работа с данными, редактирование рукописи; С.Н. Головин — проведение эксперимента и сбор данных, работа с данными, редактирование рукописи; А.М. Ермаков — определение концепции, редактирование рукописи. Все авторы одобрили рукопись (версию для публикации), а также согласились нести ответственность за все аспекты работы, гарантируя надлежащее рассмотрение и решение вопросов, связанных с точностью и добросовестностью любой её части.

Этическая экспертиза. Исследование проводили с соблюдением принципов биомедицинской этики с получением информированного согласия законных представителей ребёнка. Проведение исследования одобрено локальным независимым этическим комитетом ФГБОУ ВО «Донской государственный технический университет» (протокол № 26 от 17.09.2024).

Источники финансирования. Отсутствуют.

Раскрытие интересов. Авторы заявляют об отсутствии отношений, деятельности и интересов за последние три года, связанных с третьими лицами (коммерческими и некоммерческими), интересы которых могут быть затронуты содержанием статьи.

Оригинальность. При создании настоящей работы авторы не использовали ранее опубликованные сведения (текст, иллюстрации, данные).

Доступ к данным. Редакционная политика в отношении совместного использования данных к настоящей работе не применима, новые данные не собирали и не создавали.

Генеративный искусственный интеллект. При создании настоящей статьи технологии генеративного искусственного интеллекта не использовали.

Рассмотрение и рецензирование. Настоящая работа подана в журнал в инициативном порядке и рассмотрена по обычной процедуре. В рецензировании участвовали два внешних рецензента, член редакционной коллегии и научный редактор издания.

ADDITIONAL INFORMATION

Author contributions: O.S. Chemisova: defining the concept, developing the design of an experimental study, conducting an experiment and collecting data, working with data, writing a manuscript; D.A. Sedova: conducting an experiment and collecting data, working with data, editing a manuscript; S.N. Golovin: conducting an experiment and collecting data, working with data, editing a manuscript; A.M. Ermakov: definition of the concept, editing of the manuscript. All authors approved the manuscript (the version for publication), and also agreed to be accountable for all aspects of the work, ensuring proper consideration and resolution of questions related to the accuracy and integrity of any part of it.

Ethics approval: The study was conducted in compliance with the principles of biomedical ethics and with the informed consent of the child's legal representatives. The study was approved by the local independent Ethics Committee of the Don State Technical University (Protocol No. 26 dated 09/17/2024).

Consent for publication: All participants provided written informed consent prior to inclusion in the study.

Funding sources: No funding.

Disclosure of interests: The authors have no relationships, activities, or interests for the last three years related to for-profit or not-for-profit third parties whose interests may be affected by the content of the article.

Statement of originality: No previously published material (text, images, or data) was used in this work.

Data availability statement: The editorial policy regarding data sharing does not apply to this work, as no new data was collected or created.

Generative AI: No generative artificial intelligence technologies were used to prepare this article.

Provenance and peer review: This paper was submitted unsolicited and reviewed following the standard procedure. The peer review process involved two external reviewers, a member of the editorial board, and the in-house scientific editor.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Sender R, Fuchs S, Milo R. Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. *PLoS Biol.* 2016;14(8):e1002533. doi: 10.1371/journal.pbio.1002533
2. Almeida A, Mitchell AL, Boland M, et al. A new genomic blueprint of the human gut microbiota. *Nature.* 2019;568(7753):499–504. doi: 10.1038/s41586-019-0965-1
3. Rinninella E, Raoul P, Cintoni M, et al. What is the healthy gut microbiota composition? a changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases. *Microorganisms.* 2019;7(1):14. doi: 10.3390/microorganisms7010014
4. Tamburini S, Shen N, Wu HC, Clemente JC. The microbiome in early life: implications for health outcomes. *Nat Med.* 2016;22(7):713–722. doi: 10.1038/nm.4142
5. Voroshilina ES, Moskvina MV, Kirillov MYu, et al. Fundamentals of modern approaches to assessing gut microbiota in children. *Neonatology: News, Views, Education.* 2023;11(3):47–59. doi: 10.33029/2308-2402-2023-11-3-47-59 EDN: LAWLUP
6. Kalashnikova IG, Nekrasova AI, Makarov VV, et al. Features of gut microbiota in atopic dermatitis and food allergy in children. *Laboratory Diagnostics. Eastern Europe.* 2024;13(S1):300–302. (In Russ.) EDN: BUFJCU
7. Ma T, Bu S, Nzerem AC, et al. Association of the infant gut microbiome with temperament at nine months of age: a michigan cohort study. *Microorganisms.* 2024;12(1):214. doi: 10.3390/microorganisms12010214

8. Schoultz I, Claesson MJ, Dominguez-Bello MG, et al. Gut microbiota development across the lifespan: Disease links and health-promoting interventions. *J Intern Med.* 2025;297(6):560–583. doi: 10.1111/joim.20089
9. Kozlovsky AA. Topical aspects of intestinal dysbiosis in children. *Pediatrics. Eastern Europe.* 2022;10(4):576–590. doi: 10.34883/PI.2022.10.4.012 EDN: VPCQWL
10. Zhu W, Zhang X, Wang D, et al. Simulator of the human intestinal microbial ecosystem (SHIME®): current developments, applications, and future prospects. *Pharmaceuticals (Basel).* 2024;17(12):1639. doi: 10.3390/ph17121639
11. Marzorati M, Vanhoecke B, De Ryck T, et al. The HMI™ module: a new tool to study the Host-Microbiota Interaction in the human gastrointestinal tract in vitro. *BMC Microbiol.* 2014;14:133. doi: 10.1186/1471-2180-14-133
12. Isenring J, Bircher L, Geirnaert A, Lacroix C. *In vitro* human gut microbiota fermentation models: opportunities, challenges, and pitfalls. *Microbiome Res Rep.* 2023;2(1):2. doi: 10.20517/mrr.2022.15
13. Biagini F, Daddi C, Calvigioni M, et al. Designs and methodologies to recreate in vitro human gut microbiota models. *Bio-des Manuf.* 2022;6(10):298–318. doi: 10.1007/s42242-022-00210-6
14. O'Hara AM, Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep.* 2006;7(7):688–693. doi: 10.1038/sj.embor.7400731
15. Brodkorb A, Egger L, Alminger M, et al. INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nat Protoc.* 2019;14(4):991–1014. doi: 10.1038/s41596-018-0119-1
16. Possemiers S, Verthé K, Uyttendaele S, Verstraete W. PCR-DGGE-based quantification of stability of the microbial community in a simulator of the human intestinal microbial ecosystem. *FEMS Microbiol Ecol.* 2004;49(3):495–507. doi: 10.1016/j.femsec.2004.05.002
17. Repetskaya MN, Burdina OM, Toropova EA. Dysbiotic bowel disorders in children under modern conditions. *Medical Newsletter of Vyatka.* 2017;(4):19–23. EDN: YLYIZI
18. Zafar H, Saier MH Jr. Gut *Bacteroides* species in health and disease. *Gut Microbes.* 2021;13(1):1–20. doi: 10.1080/19490976.2020.1848158
19. Muramatsu MK, Winter SE. Nutrient acquisition strategies by gut microbes. *Cell Host Microbe.* 2024;32(6):863–874. doi: 10.1016/j.chom.2024.05.011
20. Sitkin SI, Vakhitov TYa, Tkachenko EI, et al. Gut microbiota in ulcerative colitis and celiac disease. *Experimental and Clinical Gastroenterology Journal.* 2017;(1):8–30. EDN: ZFVTVN

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / AUTHORS' INFO

* Автор, ответственный за переписку	* Corresponding author
* Чемисова Ольга Сергеевна , канд. биол. наук; адрес: Россия, 344003, Ростов-на-Дону, пл. Гагарина, д. 1, корп. 6; ORCID: 0000-0002-4059-2878; eLibrary SPIN: 1129-7436; e-mail: chemisova@inbox.ru	* Olga S. Chemisova , Cand. Sci. (Biology); address: 1 Gagarina sq, bld 6, Rostov-on-Don, Russia, 344003; ORCID: 0000-0002-4059-2878; eLibrary SPIN: 1129-7436; e-mail: chemisova@inbox.ru
Седова Дарья Андреевна ; ORCID: 0000-0003-1194-7251; eLibrary SPIN: 6197-7220; e-mail: dased0va@yandex.ru	Darya A. Sedova ; ORCID: 0000-0003-1194-7251; eLibrary SPIN: 6197-7220; e-mail: dased0va@yandex.ru
Головин Сергей Николаевич ; ORCID: 0000-0002-1929-6345; eLibrary SPIN: 5345-4005; e-mail: labbiobez@yandex.ru	Sergey N. Golovin ; ORCID: 0000-0002-1929-6345; eLibrary SPIN: 5345-4005; e-mail: labbiobez@yandex.ru
Ермаков Алексей Михайлович ; ORCID: 0000-0002-9834-3989; eLibrary SPIN: 5358-3424; e-mail: amermakov@yandex.ru	Alexey M. Ermakov ; ORCID: 0000-0002-9834-3989; eLibrary SPIN: 5358-3424; e-mail: amermakov@yandex.ru

ТАБЛИЦЫ

Таблица 1. Показатели микробиоценоза образца фекаес и модели толстой кишки по результатам ПЦР

Table 1. Indicators of microbiocenosis of faeces sample and colon model based on PCR results

Показатель	Референсные значения, lg копий ДНК/мл	Образец faeces, lg копий ДНК/мл	Реактор толстой кишки, lg копий ДНК/мл (среднее ± SD) на 8-й день	Реактор толстой кишки, lg копий ДНК/мл (среднее ± SD) на 35-й день
Общая бактериальная масса	11–13	13,30	13,21±0,20	13,38±0,09
<i>Lactobacillus</i> spp.	7–8	5,85	5,32±0,15	4,30±0,07
<i>Bifidobacterium</i> spp.	9–10	7,60	7,86±0,08	7,90±0,01
<i>Escherichia coli</i>	6–8	7,90	8,90±0,03	11,89±0,17
<i>Bacteroides</i> spp.	9–12	13,30	13,14±0,11	13,25±0,03
<i>F. prausnitzii</i>	8–11	12,30	11,39±0,02	11,38±0,01
<i>Bacteroides thetaomicon</i>	Допустимо любое количество	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено
<i>A. muciniphila</i>	Не более 11	12,30	11,89±0,11	12,22±0,01
<i>Enterococcus</i> spp.	Не более 8	6,60	6,82±0,29	7,03±0,15
<i>C. perfringens</i>	Не обнаружено	Не обнаружено	10,47±0,03	5,26±0,14
<i>Proteus vulgaris/mirabilis</i>	Не более 4	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено
<i>Citrobacter</i> spp.	Не более 4	12,48	8,92±0,03	7,79±0,02
<i>Enterobacter</i> spp.	Не более 4	Не обнаружено	4,34±0,15	4,61±0,03
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено
<i>Parvimonas micra</i>	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено
<i>Blautia</i> spp.	8–11	8,48	8,86±0,23	9,44±0,13
<i>Acinetobacter</i> spp.	Не более 6	6,60	7,17±0,10	7,85±0,11
<i>Streptococcus</i> spp.	Не более 8	8,78	8,69±0,10	8,97±0,06
<i>Eubacterium rectale</i>	8–11	10,00	9,56±0,90	9,85±0,06
<i>Roseburia inulinivorans</i>	8–10	8,90	8,23±0,04	8,37±0,07
<i>Prevotella</i> spp.	Не более 11	8,00	8,34±0,11	9,27±0,12
<i>Methanobrevibacter smithii</i>	Не более 10	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено
<i>Methanosphaera stadmanae</i>	Не более 6	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено
<i>Ruminococcus</i> spp.	Не более 11	9,30	9,06±0,19	8,97±0,170
<i>Bacteroides</i> spp./ <i>F. prausnitzii</i> (рассчитано для КОЕ/мл)	0,01–100,00	10,00	72,70	83,30

Таблица 2. Вариабельность микробиома модельных реакторов двенадцатиперстной кишки и толстой кишки

Table 2. Variability of microbiome of model reactors of duodenum and colon

Показатель	Коэффициент вариации в 1–7-й дни, %	Коэффициент вариации в 8–14-й дни, %	Коэффициент вариации в 15–21-й дни, %	Коэффициент вариации в 22–35-й дни, %
Реактор двенадцатиперстной кишки				
<i>E. coli</i>	11,54	11,35	7,79	8,69
Реактор толстой кишки				
Общая бактериальная масса	2,37	2,23	6,35	0,75
<i>Lactobacillus</i> spp.	13,76	10,53	1,73	4,32
<i>Bifidobacterium</i> spp.	6,95	6,53	2,22	0,25
<i>E. coli</i>	16,36	8,83	4,81	2,34
<i>Bacteroides</i> spp.	2,22	1,58	2,36	0,83
<i>F. prausnitzii</i>	2,95	0,44	0,35	0,35
<i>A. muciniphila</i>	2,61	3,41	0,42	0,58
<i>Enterococcus</i> spp.	19,10	7,89	4,00	3,12
<i>C. perfringens</i>	40,13	9,04	5,91	13,02
<i>Citrobacter</i> spp.	6,08	4,87	0,38	0,38
<i>Enterobacter</i> spp.	27,12	12,41	3,92	6,16
<i>Blautia</i> spp.	4,84	3,21	2,45	1,91
<i>Acinetobacter</i> spp.	16,19	4,01	3,38	1,42
<i>Streptococcus</i> spp.	4,81	1,40	1,40	1,48
<i>Eubacterium rectale</i>	5,25	1,77	0,92	0,92
<i>Roseburia inulinivorans</i>	4,81	2,39	1,67	1,43

<i>Prevotella</i> spp.	3,31	2,59	3,30	1,72
<i>Ruminococcus</i> spp.	4,22	4,31	2,58	2,45

Accepted for publication