

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ОПТИМИЗАЦИЯ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ПРЕПАРАТА БАКТЕРИЙ ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ МИКРОФЛОРЫ КИШЕЧНИКА

Е.А. Сорокина, Е.С. Жгун*, Ю.В. Кислун, Е.А. Денисова, Ю.А. Беспярых, Е.Н. Ильина

Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины,
119435, Москва, Малая Пироговская, 1а, *e-mail: al.androva@gmail.com

К настоящему моменту эффективность трансплантации фекальной микробиоты (ТФМ) при лечении различных патологий ЖКТ не вызывает сомнений. Препараты фекалий доставляют как через нижние отделы ЖКТ (клизма, колоноскопия), так и верхние (эндоскопия, капсулы). Общим недостатком инструментальных методов введения является их высокая инвазивность, связанная с риском перфорации кишечника и применением анестезии. Пероральные капсулы минимально инвазивны, удобны и более эстетичны, поэтому этот способ доставки препарата становится все более популярным. Основным вопросом, связанным с использованием замороженного кала (в том числе лиофилизата, используемого в капсулах), заключается в эффективности такого препарата по сравнению с исходным материалом. В процессе лиофилизации клетки подвергаются действию стрессовых факторов, таких как низкие температуры, кристаллизация воды, осмотический стресс, изменения pH растворов, дегидратация. Для снижения риска поврежденных клеток при лиофилизации используют защитные среды (лиопротекторы). В качестве лиопротекторов в данной работе использовали сахарозу, желатин и их комбинации. Для оценки количества микроорганизмов проводили бактериологическое исследование. Оценивали количество бактерий рода *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Escherichia*, а также семейства *Enterobacteriales* в целом. Установлено, что в лиофилизированном образце кала, содержащем в качестве защитной среды 10 % сахарозу, наблюдается наибольшее количество жизнеспособных клеток, физические свойства лиофилизата (его сыпучесть) удобны для наполнения капсул. Методом газовой хроматографии исследованы молярные соотношения КЖК в исходных образцах кала и лиофилизатах. Молярные соотношения мажорных короткоцепочечных жирных кислот (КЖК) ацетата, пропионата и бутирата оказались идентичны в исследуемых образцах. Предложен состав защитной среды, в которой лиофилизированный биоматериал максимально соответствует исходному калу по количеству «живых» микроорганизмов. Лиофилизат по своим физическим характеристикам удобен для приготовления капсул.

Ключевые слова: трансплантация фекальной микробиоты; лиофилизированные пероральные капсулы; лиопротекторы; короткоцепочечные жирные кислоты

DOI: 10.18097/BMCRM00151

ВВЕДЕНИЕ

Восстановление бактериального разнообразия кишечника посредством трансплантации фекальной микробиоты (ТФМ) стало эффективным методом лечения и предупреждения рецидивов кишечной инфекции, вызванной ванкомицин-устойчивой формой бактерии *Clostridium difficile* [1]. С 2013 года процедура для терапии данного состояния официально одобрена Управлением по контролю пищевых продуктов и лекарственных препаратов США (Food & Drug Administration) [2, 3]. Спектр применения метода постоянно расширяется. Сегодня его используют в составе комплексной терапии воспалительных заболеваний кишечника [4], коррекции микробиоты после антибактериальной терапии [5], а также в качестве экспериментальной методики при нейродегенеративных расстройствах [6, 7].

Применение ТФМ приводит к снижению представленности патогенов с множественной резистентностью к антибиотикам, что важно на фоне растущей смертности из-за инфицирования резистентным к антибиотикам патогенными бактериями.

По сравнению со многими другими медицинскими процедурами методика проведения ТФМ очень проста. Однако ее практическая реализация зачастую существенно усложняется из-за логистических барьеров, связанных с идентификацией и проверкой доноров, согласованием сроков

сбора и подготовки материала. Эти и другие организационные барьеры преодолеваются использованием замороженного кала [8, 9]. Основным вопросом, связанным с использованием замороженного кала, заключается в жизнеспособности микроорганизмов по сравнению с исходным материалом. В проведенных исследованиях по использованию метода ТФМ для лечения кишечной инфекции, вызванной ванкомицин-устойчивой формой бактерии *Clostridium difficile*, свежеприготовленные и замороженные фекалии не различались по эффективности, которая составляла 81-100% [8, 9]. Еще одним принципиальным вопросом, связанным с использованием замороженного кала, является жизнеспособность микроорганизмов с течением времени. В различных исследованиях приводятся данные об использовании замороженного кала в течение 6 месяцев хранения [10] и даже 1 года [11] без потери эффективности.

Препараты фекалий доставляют как через нижние отделы ЖКТ (клизма, колоноскопия), так и верхние (эндоскопия, пероральные капсулы). Каждый из методов имеет свои преимущества и свои недостатки и остается на выбор медицинского персонала. Общим недостатком инструментальных методов введения (эндоскопия, колоноскопия) является их инвазивность, связанная с риском перфорации кишечника и применением анестезии. Пероральные капсулы, заполненные лиофилизированными фекалиями, минимально инвазивны, удобны и более эстетичны, поэтому при отсутствии противопоказаний



врачи и пациенты все чаще отдают предпочтение именно этому способу доставки препарата [12, 13]

В процессе лиофилизации клетки микроорганизмов подвергаются действию стрессовых факторов, таких как низкие температуры, кристаллизация воды, осмотический стресс, изменения pH растворов, дегидратация. Для снижения риска повреждения клеток при лиофилизации используют защитные среды - главный из варьируемых факторов, влияющий на выживание бактерий при высушивании [14]. Подбор защитных сред проводят эмпирически. Это в значительной степени связано с тем, что полностью не определены механизмы повреждения бактериальных клеток при высушивании и хранении сухих препаратов, так же, как и механизмы защитного действия лиопротекторов, представления о которых находятся на уровне предположений. Протективные среды должны защищать клетки от повреждений при замораживании, дегидратации, хранении, быть легко высушиваемыми, хорошо растворяться при регидратации, не обладать токсичностью. Спектр эффективных лиопротекторов, соответствующих вышеуказанным свойствам, ограничен углеводами, некоторыми аминокислотами, восстановленным молоком, сывороткой крови, желатином и их комбинациями [15]. Наиболее популярными лиопротекторами являются низкомолекулярные углеводы. Их защитные свойства при высушивании бактерий подтверждены результатами многочисленных исследований [16, 17]. Наиболее эффективными лиопротекторами являются дисахариды [17], которые используются в рабочих концентрациях 5-20% как индивидуально, так и в составе с протекторами другой химической природы [15, 17]. По данным большинства работ, защитные свойства дисахаридов возрастают в ряду лактоза-сахароза-трегалоза [18].

Целью настоящего исследования была оптимизация условий лиофилизации биоматериала для последующей фекальной трансплантации, оценка жизнеспособности микроорганизмов и сопоставление молярных соотношений КЖК в полученных лиофилизатах по сравнению с исходными образцами кала

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования служил кал донор-волонтера, полученный после естественной дефекации. Донор-волонтер отвечал критериям отбора донора для включения в проект «Создание биобанка фекальных образцов здоровых доноров ФНКЦ ФХМ», одобренный Локальной этической комиссией ФНКЦ ФХМ от 06.09.2016.

В работе использовали фосфатно-солевой буфер (PBS, в таблетках, «Биолот», Россия), сахарозу («Sigma-Aldrich», США), желатин пищевой.

Подготовка образцов фекалий для лиофилизации

В работе в качестве лиопротекторов использовали (а) сахарозу и (б) смесь сахарозы и пищевого желатина.

(а) Свежий образец фекалий донора (40 г.) разводили в стерильном фосфатном буфере 0.1 М, pH 7.4 (конечное объемное соотношения фекалии:буфер 1:4). Для получения гомогенной массы использовали бытовой погружной блендер с объемом измельчителя 0.7 л («Philips», Китай). Гомогенизацию проводили в течении 1 мин. Полученную

суспензию фильтровали через ситечко для чая (диаметр отверстий 1-2 мм) и разливали в пластиковые стерильные баночки для замораживания объемом 50 мл, («Sarstedt», Германия). В зависимости от выбранной процентной концентрации сахарозы (5%, 10%, 20%) и конечного объема смеси (40 мл) в емкости добавляли рассчитанное количество сахарозы («Sigma-Aldrich») (2 г, 4 г, 8 г соответственно). Объем смеси доводили до 40 мл фосфатным буфером. Каждый приготовленный образец (40 мл) разливали в 2 стеклянных стакана для лиофилизации и замораживали при -80°C.

б) Подготовку образцов фекалий для лиофилизации со смесью сахарозы и желатина проводили аналогично. Фекалии разводили в фосфатном буфере, содержащем 1% желатин, приготовленный согласно инструкции производителя.

Изучение качественного и количественного бактериологического состава исходного кала и лиофилизированных смесей проводили согласно методическим рекомендациям «Бактериологическая диагностика дисбактериоза», утвержденным Министерством здравоохранения РФ 14.04.1997 и методическим рекомендациям «Бактериологическая диагностика заболеваний, вызываемых энтеробактериями», утвержденным Министерством здравоохранения РФ 2001 на базе бактериологической лаборатории центра.

Газохроматографическое определение КЖК проводили на газовом хроматографе Кристалл 5000.2 («Хроматэк», Россия) с пламенно-ионизационным детектором (ДИП) и капиллярной хроматографической колонкой длиной 30 метров, внутренним диаметром 0.32 мм, толщиной пленки 1.0 мкм поперечно сшитой неподвижной жидкой фазы Карбовакс по методике, разработанной ранее [19].

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программного пакета Statistica 10.0 для Windows. Достоверность результатов оценивали по критерию линейной корреляции Пирсона, значимыми считали значения более 0.85.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

После анализа литературных данных по применению защитных сред для лиофилизации [16-18, 20, 21] для дальнейшей практической работы из всего спектра предлагаемых лиопротекторов была выбрана сахароза как наиболее описанный в научной литературе и доступный. Дополнительно использовали смесь сахарозы с желатином. Схема эксперимента представлена на рисунке 1. После бактериологического исследования и газохроматографического анализа исходного образца кала, он был лиофилизирован с различными выбранными концентрациями сахарозы (5%, 10% и 20%). Полученные лиофилизаты также были подвернуты бактериологическому и газохроматографическому исследованию.

Перед проведением бактериологического исследования проводили визуальную оценку структуры полученных лиофилизатов для их практической пригодности для ручного наполнения капсул. Образцы с содержанием сахарозы 5% и 10% обладали воздушной текстурой, хорошо поддающейся дроблению на мелкодисперсные частицы, напоминающие «кофейный порошок», удобный для наполнения капсул. Лيوфилизаты не меняли своих физических свойств с течением времени. Образец с содержанием сахарозы 20%

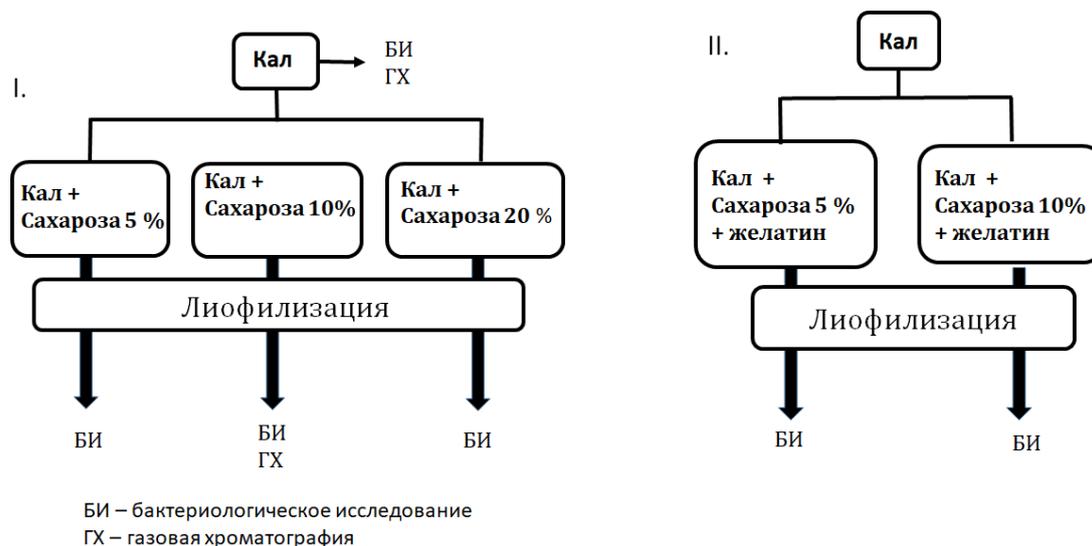


Рисунок 1. Схема эксперимента.

Таблица 1. Бактериологическое исследование образцов кала до и после лиофилизации

Вид микроорганизмов	Исходный материал	Лиофилизат с 20% сахарозы	Лиофилизат с 10% сахарозы	Лиофилизат с 5% сахарозы
<i>Bifidobacterium</i> КОЕ/г	10^8	10^8	10^8	10^8
<i>Lactobacillus</i> КОЕ/г	10^7	10^7	10^7	10^7
<i>Enterobacteriales</i> (общее кол-во) КОЕ/г	10^8	10^4	10^6	10^6
<i>Escherichia</i> (общее кол-во) КОЕ/г	10^8	10^4	10^6	10^6
<i>Enterococcus</i> КОЕ/г	10^6	10^4	10^4	10^4

оказался непригоден для дальнейшей работы, так как не обладал сыпучестью, плохо дробился и с течением времени становился гигроскопичным. Лиофилизаты, содержащие смесь лиопротекторов сахароза-желатин, также не были взяты в дальнейшую работу, так как после лиофилизации они частично вспенивались, образуя пористую структуру, не пригодную для дробления в однородный порошок и дальнейшего технологического использования.

Для определения микробного состава анализируемого биоматериала (свежий кал, лиофилизаты с содержанием сахарозы 5% и 10%) проводили бактериологическое исследование. В ходе исследования оценивали качественный состав популяции микробиоты и количественную представленность бактерий рода *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Escherichia* а также семейства *Enterobacteriales*, в целом. Особое внимание уделяли видам, относящимся к нормальной микрофлоре кишечника: бифидобактериям и лактобактериям [20]. Известно, что нормальная микрофлора кишечника создает условия для оптимального протекания процессов пищеварения и всасывания в кишечнике, защищает от патогенных агентов и стимулирует ответные иммунные реакции организма [20]

Согласно полученным данным в лиофилизированных образцах количественная представленность бифидобактерий и лактобактерий не изменялась по сравнению с исходным материалом (свежим калом) (табл. 1). Представленность

других бактерий – энтеробактерий, энтерококков и кишечной палочки – существенно снизилось (в среднем на 2 порядка). Вероятно, это связано с различной чувствительностью микроорганизмов к перепадам температуры (замораживанию-размораживанию). Согласно литературным данным, грамотрицательные бактерии зачастую более чувствительны к замораживанию, чем грамположительные, что объясняется особенностями строения клеточной стенки [21].

Особенностью данного образца является повышенный рост бактерий рода *Proteus*. Данные микроорганизмы являются представителями нормальной, условно-патогенной микрофлоры кишечника человека. Однако их наличие оказало определенное влияние на конечные результаты. Бактерии рода *Proteus* отличаются очень активной подвижностью и способны подавлять рост других микроорганизмов, характеризующихся более медленным ростом. Данное обстоятельство может затруднять идентификацию других видов микроорганизмов. Главным образом данное наблюдение относится к кишечной палочке, представленность которой в лиофилизированных образцах была несколько снижена.

В целом анализ бактериального состава образцов кала донора (свежего и лиофилизированного) позволяет говорить о сопоставимом микробном пейзаже исследуемых препаратов. Несмотря на то, что бактериальный состав в лиофилизатах,

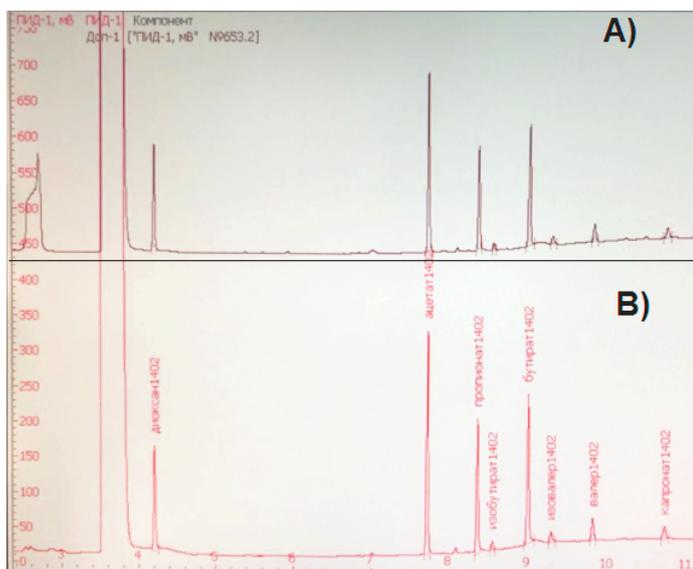


Рисунок 2. Газохроматографический анализ содержания короткоцепочечных жирных кислот в образцах кала. А) свежий кал. В) лиофилизированный кал.

содержащих 5% и 10% сахарозу, оказался практически идентичным, для дальнейшей отработки методики и последующего технологического использования было решено использовать лиофилизат с содержанием сахарозы 10%, так как такая концентрация лиопротектора, по данным литературы, более традиционна для лиофилизации бактерий [15, 17]. Воспроизводимость результатов («выживаемость» бактерий в лиофилизированных образцах кала) оценивали на основании 6 повторных серий экспериментов. Коэффициент линейной корреляции Пирсона между сериями составил $r=0.853$

Терапевтический эффект ТФМ поливалентен и связан не только с замещением микрофлоры, но и с обогащением метаболитами, обладающими «оздоравливающим» действием. К таким метаболитам относятся КЖК, продуцируемые кишечной микрофлорой. Молярное соотношение мажорных КЖК (ацетата, пропионата и бутирата) в толстой кишке и фекалиях здоровых индивидуумов относительно постоянно и составляет в среднем 60:20:20 [22], что позволяет использовать их для объективной оценки функционального состояния микробиоты кишечника. Методом газовой хроматографии были проанализированы концентрации и молярные соотношения КЖК исходного образца кала и исследуемых лиофилизатов, которые оказались идентичны между собой (рис. 2). Молярные соотношения мажорных КЖК в исследуемом образце составили 64:19:17.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическими стандартами институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От донора, включенного в исследование, было получено информированное добровольное согласие.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках госзадания.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

- Lin, Z., Iqbal, Z., Ortiz, J.F., Khan, S.A., Jahan, N. (2020) Fecal Microbiota Transplantation in Recurrent Clostridium Difficile Infection: Is it Superior to Other Conventional Methods? *Cureus*. **12**(8), e9653. DOI: 10.7759/cureus.9653
- Enforcement Policy Regarding Investigational New Drug Requirements for Use of Fecal Microbiota for Transplantation to Treat Clostridium difficile Infection Not Responsive to Standard Therapies (2013) Retrieved from: www.fda.gov
- Smith, M., Kassam, Z., Edelstein, C., Burgess, J., Alm, E. (2014). OpenBiome remains open to serve the medical community. *Nat. Biotechnol.*, **32**, 867. DOI:10.1038/nbt.3006
- Tan, P., Li, X., Shen, J., Feng, Q. (2020). Fecal Microbiota Transplantation for the Treatment of Inflammatory Bowel Disease: An Update. *Front Pharmacol.* **11**, 574533. DOI: 10.3389/fphar.2020.574533
- Taur, Y., Coyte, K., Schluter, J., Robilotti, E., Figueroa, C., Gjonbalaj, M., Littmann, E.R. et al. (2018) Reconstitution of the gut microbiota of antibiotic-treated patients by autologous fecal microbiota transplant. *Sci Transl Med.* **10**(460), eaap9489. DOI: 10.1126/scitranslmed.aap9489
- Kang, D-W., Adams, J.B., Gregory, A.C., Borody, T., Chittick, L., Fasano, A., Khoruts, A., Geis, E., et al. (2017). Microbiota Transfer Therapy alters gut ecosystem and improves gastrointestinal and autism symptoms: an open-label study. *Microbiome*, **5**(1), 10. DOI: 10.1186/s40168-016-0225-7
- Evrensel, A., Ceylan, M.E. (2011). Fecal Microbiota Transplantation and Its Usage in Neuropsychiatric Disorders. *Clin. Psychopharmacol. Neurosci.*, **14**(3), 231-237. DOI: 10.9758/cpn.2016.14.3.231
- Jiang, Z.D., Ajami, N.J., Petrosino, J.F., Jun, G., Hanis, C.L., Shah, M., Hochman, L., et al. (2017). Randomised clinical trial: faecal microbiota transplantation for recurrent Clostridium difficile infection - fresh, or frozen, or lyophilised microbiota from a small pool of healthy donors delivered by colonoscopy. *Aliment Pharmacol Ther.* **45**(7), 899-908. DOI: 10.1111/apt.13969
- Lee, C.H., Steiner, T., Petrof, E.O., Smieja, M., Roscoe, D., Nemataallah, A., Weese, J.S., Collins, S., et al. (2016). Frozen vs Fresh Fecal Microbiota Transplantation and Clinical Resolution of Diarrhea in Patients With Recurrent Clostridium difficile Infection: A Randomized Clinical Trial. *JAMA.* **315**(2), 142-9. DOI: 10.1001/jama.2015.18098.
- Costello, S.P., Conlon, M.A., Vuaran, M.S., Roberts-Thomson, I.C., Andrews, J.M. (2015). Faecal microbiota transplant for recurrent Clostridium difficile infection using long-term frozen stool is effective: clinical efficacy and bacterial viability data. *Aliment Pharmacol Ther.* **42**(8), 1011-8. DOI: 10.1111/apt.13366.
- Staley, C., Hamilton, M.J., Vaughn, B.P., Graiziger, C.T., Newman, K.M., Kabage, A.J., Sadowsky, M.J., Khoruts, A. (2017). Successful Resolution of Recurrent Clostridium difficile Infection using Freeze-Dried, Encapsulated Fecal Microbiota; Pragmatic Cohort Study. *Am J Gastroenterol.* **112**(6), 940-947. DOI: 10.1038/ajg.2017.6
- Kao, D., Roach, B., Silva, M., Beck, P., Rioux, K., Kaplan, G.G., Chang, H.J., Coward, S., Goodman, K.J., et al. (2017). Effect of Oral Capsule- vs Colonoscopy-Delivered Fecal Microbiota Transplantation on Recurrent Clostridium difficile Infection: A Randomized Clinical Trial. *JAMA.* **318**(20), 1985-1993. DOI: 10.1001/jama.2017.17077
- Zipursky, J.S., Sidorsky, T.I., Freedman, C.A., Sidorsky, M.N., Kirkland, K.B. (2012). Patient attitudes toward the use of fecal microbiota transplantation in the treatment of recurrent Clostridium difficile infection. *Clin Infect Dis.* **5**(12), 1652-8. DOI: 10.1093/cid/cis809
- Peiren, J., Buyse, J., De Vos, P., Lang, E., Clermont, D., Hamon, S., et al. (2015). Improving survival and storage stability of bacteria recalcitrant to freeze-drying: a coordinated study by European culture collections. *Arahal. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99**(8), 3559-71. DOI: 10.1007/s00253-015-6476-6
- Cabri guidelines. Laboratory procedures of microorganisms. Protective suspension media for freezing or (freeze)-drying. Retrieved November 26, 2020 from: <http://www.cabri.org/guidelines/microorganisms/M300Ap3.html>.
- Schwab C., Vogel R., Ganzle M.G. (2007). Influence of oligosaccharides on the viability and membrane properties of Lactobacillus reuteri TMW1.106 during freeze-drying. *Cryobiology.* **55**(2), 108-14. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2007.06.004 429-37.
- Tymoczyszyn, E.E., Diaz, M.R., Gómez-Zavaglia, A., Disalvo, E.A. (2007). Volume recovery, surface properties and membrane integrity of Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus dehydrated in the presence of trehalose or sucrose. *J. Appl. Microbiol.* **103**(6), 2410-9. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2007.03482.x.

18. Pehkonen, K.S., Roos, Y.H., Miao, S., Ross, R.P., Stanton, C. (2008). State transitions and physicochemical aspects of cryoprotection and stabilization in freeze-drying of *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG). *J. Appl. Microbiol.* **104**, 1732–1743. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2007.03719.x
19. Zhgun, E.S., Kislun, Y.V., Kalachniuk, T.N., Veselovsky, V.A., Urban, A.S., Tikhonova, P.O., Pavlenko, A.V., Ilchenko, G.N., Ilina, E.N. (2020). Evaluation of the Levels of Metabolites in Feces of Patients with Inflammatory Bowel Diseases. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **66**(3), 233–240. DOI: 10.1134/S1990750820040113
20. Isolauri, E. (2001). Probiotics in human disease. *Am J Clin Nutr.* **73**(suppl),

1142S–6S. DOI: 10.1093/ajcn/73.6.1142S

21. Gracheva, I.V., Osin, A.V. (2016). Mechanisms of Damaging Bacteria during Lyophilization and Protective Activity of Shielding Media. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii.* **3**(5), 12. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-3-5-12
22. Cummings, J.H., Pomare, E.W., Branch, W.J., Naylor, C.P., Macfarlane, G.T. (1987). Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut*, **28**(10), 1221-1227. DOI: 10.1136/gut.28.10.1221

Поступила: 14.06.2021

После доработки: 20.06.2021

Принята к публикации: 25.06.2021

OPTIMIZATION OF CONDITIONS FOR HUMAN BACTERIAL PREPARATION FOR BIOLOGICAL CORRECTION OF INTESTINAL MICROFLORA

E.A. Sorokina, E.S. Zhgun, Yu.V. Kislun, E.A. Denisova, Yu.A. Bespyatykh, E.N. Ilina*

Federal Scientific and Clinical Center for Physico-Chemical Medicine,
1a Malaya Pirogovskaya str., Moscow, 119435 Russia; *e-mail: al.androva@gmail.com

Fecal microbiota transplantation (FMT) is now considered as an effective tool for the treatment of various GI pathologies. Fecal preparations are delivered both through the lower GIT (enema, colonoscopy) and upper (endoscopy, capsules). A common disadvantage of instrumental methods of administration is their high invasiveness associated with the risk of intestinal perforation and the use of anesthesia. Oral capsules are minimally invasive, comfortable and more aesthetic, so this method of drug delivery is gaining popularity. The main issue with the use of frozen feces (including the lyophilisate used in capsules) is its efficiency compared to the original material. During lyophilization, cells are exposed to stress factors such as low temperatures, water crystallization, osmotic stress, changes in pH, and dehydration. To reduce the likelihood of cell damage during lyophilization, protective media (lyo-protectants) are used. In this work sucrose, gelatin, and their combinations have been used as lyo-protectants. To estimate the number of microorganisms, a bacteriological study was carried out. The number of *Bifidobacteria*, *Lactobacilli*, and the total number of *E.coli* and *Enterobacteriaceae* was estimated. It was found that the lyophilized stool sample containing 10% sucrose as a protective medium had the highest number of viable cells. Also, the physical properties of the lyophilisate (its flowability) are convenient for preparing capsulated form. The molar ratios of short chain fatty acids (SCFAs) in the original fecal samples and lyophilisates were studied by gas chromatography. The molar ratios of major SCFAs (acetate, propionate and butyrate) were identical in the samples studied. The composition of the protective medium in which the lyophilized biomaterial corresponds to the original feces in terms of the number of "live" microorganisms has been proposed. According to its physical characteristics lyophilisate is convenient for capsules preparation.

Key words: fecal microbiota transplantation; lyophilized oral capsules; lyoprotectants; short-chain fatty acids

FUNDING

This study was performed within the framework of the State Assignment of the Federal Scientific and Clinical Center for Physico-Chemical Medicine.

Received: 14.06.2021, revised: 20.06.2021, accepted: 25.06.2021