

Состояние микробиоценоза желудочно-кишечного тракта в норме и при синдроме раздраженного кишечника

И.Д. Лоранская, М.Н. Болдырева, О.А. Лаврентьева
ГОУ ДПО РМАПО

Статья посвящена одной из актуальных проблем гастроэнтерологии – изучению микробиоценоза желудочно-кишечного тракта при синдроме раздраженного кишечника. Даны определение нормальной микрофлоры, характеристика пристеночной микробиоты, отражены особенности различных микробиотопов ЖКТ. Изложены основные методы исследования состояния микробиоценоза. Особое внимание уделено современному взглядам на проблему изменения состава микрофлоры желудочно-кишечного тракта при синдроме раздраженного кишечника.

Ключевые слова: синдром раздраженного кишечника, микробиоценоз, полимеразная цепная реакция в режиме реального времени.

The present article is devoted to one of the actual problems in gastroenterology – microbiocenosis in gastro-intestinal tract in a syndrome of irritated bowel. In the article one can find the definition of normal microflora, characteristics of parietal microbiota, peculiarities of various microbiotops in the gastro-intestinal tract. Basic techniques for investigating microbiocenotic state are described as well. A specific attention is paid to modern understanding of gastrointestinal microflora changes in a syndrome of irritated bowel.

Key words: syndrome of irritated bowel, microbiocenosis, polymerase chain reaction in real-time mode.

Синдром раздраженного кишечника (СРК) – функциональное расстройство кишечника, при котором боль в животе или дискомфорт связаны с дефекацией, изменениями частоты и характера стула. В зависимости от симптоматики СРК подразделяют на три формы: с преобладанием диареи, с преобладанием запора и смешанная, для которой характерен как запор, так и понос [12]. Частота СРК приблизительно одинакова во многих странах независимо от различий в жизненном стиле. Симптомы СРК, по данным большинства исследований, отмечаются у 10–20% взрослых и подростков. [16]. В практике гастроэнтеролога эта группа пациентов составляет от 40 до 70% [3]. СРК страдают преимущественно лица трудоспособного возраста, что определяет клиническую и социальную значимость данного заболевания. Этиология СРК до настоящего времени не ясна. Среди причин обсуждают изменения моторики желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) и висцеральную гиперчувствительность, а также стрессы, психические расстройства, вялотекущие воспалительные процессы [15].

Исследования последних лет характеризуют СРК как заболевание, сопровождающееся изменениями микрофлоры кишечника. Способность кишечной микрофлоры вырабатывать нейротрансмиттеры, влияющие на энтериную систему и изменяющие тем самым секрецию и моторику кишечника, а также порог висцеральной чувствительности, свидетельствует о важности дисбиотических изменений в патогенезе СРК [20]. Кишечная микрофлора человека оказывает модулирующее действие на кишечный гомеостаз за счет передачи регуляторных сигналов в эпителий и воздействия на иммунный ответ слизистой оболочки. В норме слизистая оболочка проявляет ограниченный ответ на резидентную микрофлору, одновременно сохраняя способность адекватно реагировать на патогенные бактерии. Нарушение иммунных механизмов может приводить к неадекватным реакциям. Таким образом, хотя микрофлора, как правило, играет позитивную роль в состоянии здоровья, при определен-

ных обстоятельствах эта роль может стать негативной. Так происходит при избыточном бактериальном росте в тонкой кишке, проникновении бактерий через кишечную стенку, воспалительных заболеваниях кишечника [18], возможно, и СРК.

Нормальная микрофлора желудочно-кишечного тракта

Для изучения состояния микробиоценоза при СРК и выявления возможных отклонений от нормального состава микрофлоры желудочно-кишечного тракта необходимо дать трактовку понятия нормальная микрофлора (нормофлора). Нормальная микрофлора – качественное и количественное соотношение в отдельных органах и системах разнообразных популяций микробов, поддерживающих биохимическое, метаболическое и иммунное равновесие макроорганизма, необходимое для сохранения здоровья человека [11]. Общая масса всех микроорганизмов, колонизирующих органы и ткани человека, равняется 3–5 кг.

Основными биотопами являются желудочно-кишечный тракт (ротовая полость, желудок, тонкая кишка, толстая кишка), кожа, дыхательные пути, урогенитальная система [8]. Микрофлора ЖКТ является наиболее представительной, ее масса у взрослого человека составляет более 2,5 кг, численность – 1014 КОЕ [1]. Ранее считалось, что в состав микробиоценоза ЖКТ входят 17 семейств, 45 родов, более 500 видов микроорганизмов. С учетом новых данных, полученных при исследовании микрофлоры различных биотопов ЖКТ с помощью молекулярно-генетических методов и метода газожидкостной хромато-масс-спектрометрии [5; 13], общий геном бактерий ЖКТ насчитывает 400 000 генов, что в 12 раз превышает размер генома человека.

Эндотрофная микрофлора человека делится на три основные группы. К первой группе относят полезную для человека эубиотическую индигенную и эубиотическую транзитную микрофлору, ко второй – нейтраль-

ные микроорганизмы, не влияющие на жизнедеятельность человека, к третьей — патогенные или потенциально патогенные бактерии. В микрoэкологическом плане желудочно-кишечный биотоп может быть разделен на ярусы (ротовая полость, желудок, отделы кишечника) и микробиотопы (полостной, пристеночный и эпителиальный). Ярусы имеют свои анатомические и функциональные особенности, поэтому их содержимое различается по составу веществ, консистенции, рН, скорости перемещения и другим свойствам. Таким образом, хотя содержание бактерий во рту может быть достаточно высоким — до 10⁶ КОЕ/мл, оно снижается до 0–10 КОЕ/мл в желудке, поднявшись на 10¹–10³ КОЕ/мл в тощей кишке и 10⁵–10⁶ КОЕ/мл в дистальных отделах подвздошной кишки, с последующим резким возрастанием количества микробиоты в толстой кишке, достигая уровня 10¹² КОЕ/мл в дистальных её отделах [21]. По мере продвижения содержимого внутри кишечной трубки снижается парциальное давление кислорода и повышается значение рН среды, в связи с этим появляется «этажность» расселения различных видов бактерий по вертикали: выше всего располагаются аэробы, ниже факультативные анаэробы и еще ниже — строгие анаэробы [9]. Способность к аппликации в пристеночном микробиотопе, т.е. гистадгезивность (свойство фиксироваться и колонизировать ткани), определяет суть транзитности или индигенности бактерий. Полостной микробиотоп на протяжении ЖКТ неоднороден, его свойства определяются составом и качеством содержимого того или иного яруса. Пристеночный микробиотоп представлен слизистыми наложениями, гликокаликсом, расположенным над апикальной мембраной энтероцитов и поверхностью самой апикальной мембраны. Пристеночный микробиотоп представляет наибольший интерес с позиции бактериологии, так как именно в нем возникает полезное или вредное для человека взаимодействие с бактериями, то, что мы называем симбиозом [2]. На сегодняшний день известно, что микрофлора слизистой оболочки кишечника существенно отличается от микрофлоры просвета кишечника и каловых масс. Хотя у каждого взрослого человека кишечник населяет определенная комбинация преобладающих видов бактерий, состав микрофлоры может меняться в зависимости от образа жизни, питания и возраста. Сравнительное исследование микрофлоры у взрослых лиц, состоящих в генетическом родстве той или иной степени, выявило, что на состав кишечной микрофлоры генетические факторы влияют больше, чем питание [18].

Методы исследования состояния микробиоценоза

Существуют гистохимические, морфологические, молекулярно-генетические методы исследования микроорганизмов, нагрузочные пробы.

Наиболее распространенным методом является бактериологическое исследование кала. Как правило, количество определяемых показателей колеблется от 14 до 25. Достоинством метода является точная верификация патогенных бактерий семейства кишечных. К недостаткам метода относится возможность получения ложноположительных и ложноотрицательных результатов из-за неоднородности выделения микроорганизмов из разных отделов испражнений, трудности культивирования анаэробных микроорганизмов. Кроме того, определяет-

ся полостная и транзитная флора, которая доминирует в фекальной флоре, при этом пристеночная флора не оценивается [4].

Альтернативу бактериологическим исследованиям могут составить хроматографические методы дифференциации микроорганизмов — газо-жидкостная, ионно-обменная и, в частности, газо-жидкостная хроматография (ГЖХ) в сочетании с масс-спектрометрией (МС) — ГЖХ-МС. Метод ГЖХ-МС основан на определении компонентов бактериальных клеток, появляющихся в результате их естественного отмирания или атаки компонентов иммунной системы. В качестве маркеров используют минорные липидные компоненты мембран микробов. По их содержанию и количеству можно в течение нескольких часов определить до 170 видов аэробных и анаэробных бактерий и грибов в разных биологических средах [6]. К преимуществам метода можно отнести специфичность диагностики анаэробных инфекций, возможность оценки живых и мертвых микроорганизмов, возможность определения малых концентраций клеток микроорганизмов на преобладающем фоне биологической жидкости, относительную быстроту получения результата. К недостаткам можно отнести требование многократных исследований для анализа широкого диапазона микроорганизмов, большую стоимость исследования, зависящую от технического оборудования [4]. Разработан и внедряется в практику метод ГЖХ-анализа, основанный на определении короткоцепочечных жирных кислот (КЖК), являющихся метаболитами в основном анаэробных родов микроорганизмов. На основании полученных данных создан метаболический паспорт при эубиозе кишечника. Метод позволяет достаточно быстро и достаточно точно оценить состояние индигенной микрофлоры [4].

Синдром избыточного бактериального роста в тонкой кишке (СИБР) предполагает аномальный рост (более 10⁵ КОЕ/мл) эндогенных бактерий в тонкой кишке, сходных с теми, что в норме находятся в толстой кишке. Для диагностики СИБР применяют прямые и косвенные методы. Прямой заключается в посеве дуоденального и еюнального содержимого, полученного с помощью стерильного зонда. К косвенному методу можно отнести исследование выделяемого водорода — дыхательный тест. Обоснованием для создания водородного дыхательного теста стал тот факт, что в процессе метаболизма углеводов микрофлорой толстой кишки образуется большое количество газов, в том числе водорода. Водородный тест может применяться для ориентировочного представления о степени бактериального обсеменения тонкой кишки [6].

В последние годы широкое распространение получил способ определения видов микроорганизмов с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Метод ПЦР разработал еще в 1983 г. Кэри Мюллис, за что в 1993 г. он был удостоен Нобелевской премии в области химии. В основу метода ПЦР положено многократное копирование (амплификация) искомого фрагмента ДНК с помощью фермента ДНК-полимеразы. По сравнению с традиционными методами диагностики ПЦР отличается высокой чувствительностью и специфичностью. Он позволяет использовать для диагностики образцы с менее жесткими требованиями к жизнеспособности исследуемых микроорганизмов, чем для исследования

микробиологическими методами. Сегодня существует более усовершенствованный, чем «классический», метод ПЦР — с детекцией результатов в режиме реального времени. Этот метод основан на автоматическом измерении уровня флюоресцентного сигнала, увеличивающегося с каждым циклом при положительной ПЦР, что позволяет проводить количественную оценку ДНК исследуемого микроорганизма в биологическом образце.

Особенности микробиоценоза при синдроме раздраженного кишечника.

В течение последних лет в исследованиях отечественных и зарубежных авторов уделяется большое внимание изучению состава микрофлоры ЖКТ при СРК.

В работе А.И. Парфенова и соавт. использовался метод газовой хроматографии — масс-спектрометрии микробных маркеров для изучения состава микрофлоры в биоптатах слизистой оболочки тощей, подвздошной и ободочной кишки, полученных у 14 больных с синдромом раздраженного кишечника с преобладанием поносов. Контрольную группу составили 3 здоровых добровольца. Выявлено, что у больных имеет место увеличение *Eubacterium* (в 30 раз), стрептококков (в 25 раз), энтерококков (в 10 раз), кандид (в 15 раз), появление бактерий рода *Acinetobacter* и вирусов герпеса; уменьшено от 2 до 30 раз количество большинства анаэробов, актиномицетов, клебсиелл и других микроорганизмов, являющихся естественными обитателями кишечника [5].

По результатам изучения КЖК в кале при СРК с преобладанием запора и диареи установлены противоположные изменения в родовом составе кишечной микрофлоры при различных типах нарушения моторики кишечника. Так, при СРК с запором выявлена активизация родов аэробных бактерий, в частности обладающих протеолитической активностью. При СРК с диареей — повышение активности анаэробных микроорганизмов родов бактероидов, пропионибактерий, клостридий и т.д. [4].

Потенциальную связь между СИБР и СРК предполагает сходство клинических симптомов (дискомфорт в животе, вздутие живота, метеоризм). Чаще всего для диагностики СИБР используется дыхательный тест с нагрузкой лактулозой или глюкозой. В исследованиях с использованием данного метода СИБР был обнаружен у пациентов с СРК в диапазоне от 4 до 84%. Целью работы S.C. Reddymasu и соавт. было выявление специфических особенностей, которые могли бы служить в качестве потенциальных предикторов, связанных с развитием СИБР у больных с СРК. В результате исследования выявлено, что значительная доля (36%) пациентов с СРК, у которых вздутие живота и метеоризм были преобладающими жалобами, имели положительный дыхательный тест с использованием глюкозы, указывающий на наличие СИБР. Сделан вывод о том, что пожилой возраст и женский пол можно считать предикторами СИБР у пациентов с СРК. Представляет интерес тот факт, что водород был преобладающим газом у пациентов с СРК с диареей, метан чаще обнаруживался у пациентов с СРК с запорами, что наблюдалось и в ряде ранее проведенных исследований [19].

Группой ученых в Финляндии использован метод ПЦР для оценки микрофлоры ЖКТ при СРК. Собраны образцы кала 24 пациентов с СРК (10 образцов — форма с преобладанием диареи, 8 — с преобладанием запора,

6 — смешанная форма) и 23 здоровых лиц. Выделенные геномы бактерий были погруппно объединены и фракционированы по содержанию гуанина и цитозина. Отобранные фракции проанализированы путем клонирования и секвенирования 3753 клонов гена субъединицы 16S рибосомной РНК. Затем некоторые из найденных различий были подтверждены на индивидуальных образцах методом количественной ПЦР. Исследование показало, что микрофлора фекалий больных СРК существенно отличается от микрофлоры здоровых лиц; при разных симптомах СРК микробный состав варьировал. Основные различия в составе микрофлоры у здоровых лиц и больных СРК были выявлены в содержании бактерий, относящихся к типам *Firmicutes* и *Actinobacteria*. У бактерий, принадлежащих к типу *Actinobacteria*, метод ПЦР показал существенные различия в содержании *S. aerofaciens*. Эта бактерия была обнаружена в 96% контрольных образцов, а у пациентов с СРК *S. aerofaciens* встречалась гораздо реже [15].

Позитивное влияние микрофлоры ЖКТ на СРК доказано тем, что прием пробиотических бактерий способствует уменьшению симптомов заболевания. Несколько систематических обзоров и метаанализов посвящено изучению влияния пробиотиков на клиническое течение СРК. Доказано, что *Bifidobacterium infantis* 35624 оказались эффективны в облегчении симптомов СРК. В Японии пациенты с СРК были рандомизированы для получения пробиотиков, содержащих *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus helveticus*, *Bifidobacterium* и плацебо. После 6 нед лечения значительное уменьшение болей и вздутия живота зарегистрировано в группе приема пробиотиков по сравнению с контролем. Исследование, проведенное в Корее, показало, что пробиотики (*Bacillus subtilis* и *Streptococcus faecium*) были эффективны в снижении тяжести и частоты абдоминальных болей по сравнению с плацебо при СРК с преобладанием диареи и смешанном типе СРК. Еще одно исследование показало, что корейский комплексный препарат, содержащий пробиотики *Bifidobacterium bifidum* BGN4, *Lactobacillus acidophilus* AD031 и другие виды, был безопасен и эффективен в лечении пациентов с СРК. Тем не менее имеющиеся данные об использовании пробиотиков при СРК по-прежнему противоречивы [14].

Одна из крайне актуальных проблем — так называемый, постинфекционный синдром раздраженного кишечника. По данным зарубежных исследователей, у 24–32% пациентов через 3 мес после кишечной инфекции формируется СРК-подобный синдром [17]. Диагноз постинфекционного СРК ставится в случаях, когда синдром развивается *de novo* после острой кишечной инфекции, несмотря на элиминацию вызвавшего ее возбудителя. Патогенез постинфекционного СРК остается неясным, предполагается роль хронического субклинического воспаления, изменений проницаемости кишечного барьера и нарушения кишечной флоры. Выявлены различные факторы, связанные с демографическими данными и тяжестью кишечной инфекции, которые повышают риск постинфекционного СРК [26].

В серии работ А.И. Парфенова и соавт. с помощью реакции коаггутинации было установлено, что у 53,1% больных с постинфекционным СРК определяются антигены шигелл Флекснера. Было показано, что некоторые острые кишечные инфекции, в частности

кампилобактериоз, могут протекать под маской обострения СРК [7].

В результате исследования, проведенного шведскими учеными, отмечено, что ни один из специфических энтеропатогенов не увеличивал риск постинфекционных функциональных кишечных нарушений [22].

На основании имеющихся на сегодня данных предполагается следующая цепь событий, приводящая к развитию и течению постинфекционного СРК. У лиц с факторами риска острая кишечная инфекция и связанная с ней антибиотикотерапия приводят к изменению количественного и качественного состава микрофлоры кишечника. Указанные факторы приводят к локальным иммунным нарушениям и развитию субклинического воспаления. Следствием является нарушение энтеральной нейроэндокринной регуляции, развитие гиперсенситивности и гиперреактивности кишки. В дальнейшем происходит формирование патологической функциональной системы, включающей церебрэнтеральные взаимосвязи [7].

Несмотря на то, что некоторые механизмы локальных и центральных расстройств при постинфекционном СРК стали более менее понятны, все исследователи указывают на необходимость дальнейших работ по выяснению роли инфекционных агентов, кишечной микрофлоры в патогенезе и течении данного кишечного расстройства.

Таким образом, есть все основания полагать, что качественные и количественные изменения кишечной микрофлоры могут способствовать развитию СРК. Подтверждают это недавно полученные в результате исследований следующие данные: 1) микрофлора кишечника у больных с СРК отличается от таковой у здоровых людей; 2) газообразование в толстой кишке, связанное с бактериальной ферментацией неабсорбированных пищевых веществ, более выражено у пациентов с СРК, чем у здоровых субъектов; 3) обнаружен СИБР у пациентов с СРК; 4) симптомы СИБР сходны с симптомами СРК; 5) продукция метана *Methanobrevibacter smithii* ассоциирована с запором; метан снижает моторику желудочно-кишечного тракта и постпрандиальную выработку серотонина; 6) СРК может развиваться вследствие острой гастроинтестинальной инфекции — состояние, известное как постинфекционный СРК; 7) терапевтические воздействия на кишечную микрофлору с помощью антибиотиков или пробиотиков облегчают симптомы СРК [14].

По традиции исследования резидентной микрофлоры фокусировались на изучении разнообразия микрофлоры кала. Для оценки состояния микробиоценоза кишечника более важной является информация о микробной колонизации в стенке кишки, которая обеспечивается адгезивными свойствами бактерий. В отличие от микрофлоры фекалий, именно эти микроорганизмы наиболее точно отражают состояние микробной экологии человека [10].

Задачей нашего исследования явилось изучение состава и проведение количественной оценки пристеночной микробиоты разных отделов желудочно-кишечного тракта (ротовой полости, проксимальных отделов тонкой кишки, ободочной и прямой кишки) при синдроме раздраженного кишечника методом ПЦР в режиме реального времени, за основу взято состояние пристеночной микрофлоры здоровых добровольцев. Отобраны 15 здоровых добровольцев в возрасте от 18 до 50 лет. Всем

включенным в группу исследуемых проведено комплексное обследование, подтвердившее отсутствие заболеваний желудочно-кишечного тракта, включающее общеклинические исследования (общий анализ крови, мочи, биохимический анализ крови, копрограмма), УЗИ органов брюшной полости, эзофагогастродуоденоскопию, фиброколоноскопию. Произведен забор слюны, при эндоскопических исследованиях выполнены биопсия тонкой, ободочной и прямой кишки. Осуществлена ПЦР-диагностика в режиме реального времени состава микрофлоры ротовой полости, проксимальных отделов тонкой, ободочной и прямой кишки. В результате исследования наибольшая обсемененность выявлена в ротовой полости — 108 гз/проба, наименьшая — в тонкой кишке — не более 105 гз/проба, в ободочной и прямой кишке значимых различий не выявлено, обсемененность составила 105–107 гз/проба. Обнаружены различия в составе микробиоты исследуемых в возрасте моложе и старше 40 лет. В настоящее время проводится набор материала для оценки пристеночной микробиоты у пациентов с СРК с преобладанием диареи и запоров, с последующим проведением ПЦР с качественной и количественной детекцией результатов в режиме реального времени и сравнительной оценкой полученных данных.

Для многих врачей СРК является только психосоматическим расстройством. Опубликованные отчеты о постинфекционном СРК, СИБР, взаимосвязи кишечной флоры и сенсомоторной функции кишечника, потенциальной возможности пробиотиков и антибиотиков облегчать некоторые симптомы СРК дают убедительные доказательства важной роли кишечной флоры в патогенезе данной патологии. Это является началом новой парадигмы в нашем понимании СРК [14]. Надеемся, что результаты нашего исследования внесут свой вклад в понимание роли микрофлоры ЖКТ в патогенезе синдрома раздраженного кишечника.

Литература

1. Бондаренко В.М., Мацулевич Т.В. Дисбактериоз кишечника как клиничко-лабораторный синдром: современное состояние проблемы. — М.: Издательская группа «ГЭОТАР-Медиа». — 2007. — С. 8–35.
2. Григорьев А.В. Желудочно-кишечный тракт как среда обитания бактерий// Раздел 1. — М.: Издательство: ЗАО «СИЛМА». — 2004. — С. 5–7, 16–32.
3. Лоранская И.Д. // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. — 2008. — № 1. — С. 90–95.
4. Минушкин О.Н., Ардатская М.Д., Зверков И.В., Чичерин И.Ю. Дисбактериоз кишечника (понятие, диагностика, принципы лечебной коррекции). Современные возможности пребиотической терапии.// Учебно-методическое пособие. — Москва. — 2010. — С. 12–15.
5. Осипов Г.А., Парфенов А.И., Богомолов П.О. // Российский гастроэнтерологический журнал. — 2001. — № 1. — С. 54–69.
6. Парфенов А.И., Бондаренко В.М. // Приложение к журналу *Consilium Medicum. Гастроэнтерология*. — 2009. — № 2. — С. 67–70.
7. Симаненков В.И. Клиническая Гастроэнтерология и гепатология. Русское издание. — 2008. — Т. 1, № 4. — С. 266–268. И др. авторы.