

ПРИСТЕНОЧНАЯ МИКРОФЛОРА ТОНКОЙ КИШКИ У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ ПАНКРЕАТИТОМ

Лоранская И. Д., Болдырева М. Н., Мулухова Э. В.

THE PARIETAL INTESTINAL MICROFLORA IN PATIENTS WITH CHRONIC PANCREATITIS

Loranskaya I. D., Boldyreva M. N., Mulukhova E. V.

Лоранская Ирина Дмитриевна, ГБОУ ДПО РМАПО, заведующая кафедрой гастроэнтерологии

Болдырева Маргарита Николаевна, ФГБУ ГНЦ Института Иммунологии ФМБА России, отдел иммуногенетики, ведущий научный сотрудник

Мулухова Эльда Валерьевна, аспирант кафедры гастроэнтерологии

ГБОУ ДПО РМАПО, кафедра гастроэнтерологии, ФГБУ ГНЦ Института Иммунологии ФМБА России, отдел иммуногенетики

Резюме

В статье приведены данные исследования пристеночного микробиоценоза проксимальных отделов тонкой кишки пациентов с хроническим панкреатитом методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени и оценка эффективности применения препаратов для коррекции микрофлоры у данной категории больных.

Ключевые слова: хронический панкреатит, пристеночная микрофлора, микробиоценоз тонкой кишки, ПЦР в реальном времени.

Мулухова
Эльда Валерьевна
E-mail: elda-12@mail.ru,
т. +79258836657

Summary

The article presents the results of the proximal small intestine parietal microbiocenosis research in patients with chronic pancreatitis by polymerase chain reaction in real time. The study includes an assessment of the pharmacological correction's efficiency in this category of patients.

Keywords: chronic pancreatitis, microbiocenosis, small intestine, real-time PCR.

Введение

Термином хронический панкреатит (ХП) обозначают группу хронических заболеваний поджелудочной железы (ПЖ) различной этиологии, преимущественно воспалительной природы, с фазово — прогрессирующими очаговыми, сегментарными или диффузными дегенеративными или деструктивными изменениями ее экзокринной ткани, атрофией железистых элементов (панкреоцитов) и замещением их соединительной (фиброзной) тканью; изменениями в протоковой системе ПЖ с образованием кист и конкрементов, с различной степенью нарушения экзокринной и эндокринной функций [1]. По мнению многих

исследователей, в последние годы отмечена общемировая тенденция к увеличению заболеваемости острым и хроническим панкреатитом более чем в два раза [1, 2, 3].

Ведущим этиологическим фактором развития хронического панкреатита в 40 – 80% случаев является злоупотребление алкоголем. В последние годы в научных исследованиях показано, что темпы прогрессирования хронического алкогольно-го панкреатита пропорциональны употреблению алкоголя и ассоциированы с продолжением курения [4, 5, 6]. Определенную роль в возникновении

воспалительно-деструктивных изменений поджелудочной железы играют нарушения иммунного ответа, в основе которых часто лежит бактериальный фактор. По современным литературным данным в более чем половине случаев ХП развивается синдром избыточного бактериального роста (СИБР) [7, 8, 9]. Под этим состоянием понимается повышенное заселение проксимальных отделов тонкой кишки бактериями в концентрации более 105 КОЕ/мл аспирата из тощей кишки за счет условно — патогенной микрофлоры, поступающей из верхних отделов желудочно-кишечного тракта (или верхних дыхательных путей) или вследствие ретроградной транслокации. Это связано со снижением внешнесекреторной функции поджелудочной железы (в норме панкреатический сок обладает антибактериальной активностью); нарушением моторики кишечника (потеря или снижение функции мигрирующего моторного комплекса, в том числе в результате приема спазмолитиков), воспалительно-деструктивных изменений в органе [7, 8, 9, 10, 11, 12]. Диагностика синдрома избыточного бактериального роста начинается с выявления возможной причины нарушения микробного биоценоза кишечника. Верификацию этого синдрома проводят с помощью прямых и косвенных методов диагностики. Одним из наиболее информативных и достоверных способов определения видов микроорганизмов в различных биологических средах является метод полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ). Метод основан на многократном избирательном копировании определённого участка ДНК при помощи ферментов в искусственных условиях (*in vitro*) и позволяет провести качественный

и количественный анализ бактериальной флоры исследуемого материала [13, 14, 15].

Лечение данной категории пациентов заключается в устранении избыточного бактериального роста в тонкой кишке, проведении биокоррекции микрофлоры кишечника, а также в проведении мероприятий, направленных на купирование или уменьшение выраженности симптомов основного заболевания. Восстановление нормального микробиоценоза кишечника при ХП в настоящее время проводится с применением препаратов пре- и синбиотического действия.

- Пребиотики — препараты, не содержащие живые микроорганизмы и оказывающие благоприятный эффект на организм человека через стимуляцию роста и (или) активности представителей симбионтной микрофлоры организма [7, 16]. Мы применяли отечественный пребиотический пектиновый препарат «Пектовит», который представляет собой сбалансированный комплекс высоко- и низкоэтерифицированных пектинов особой очистки в виде растворимого в воде порошка [16].

- Синбиотики — представляют собой рациональную комбинацию пре- и пробиотиков [7, 8].

Наше внимание привлек отечественный жидкий синбиотический препарат «Нормофлорин-Д», которые представляют собой биокомплекс живых микроорганизмов (лакто- и бифидобактерий) в физиологически-активном состоянии, биологических веществ природного происхождения: органических кислот, аминокислот (в том числе незаменимых), микро- и макроэлементов, витаминов, ферментов, эндобиотиков, пребиотика [17].

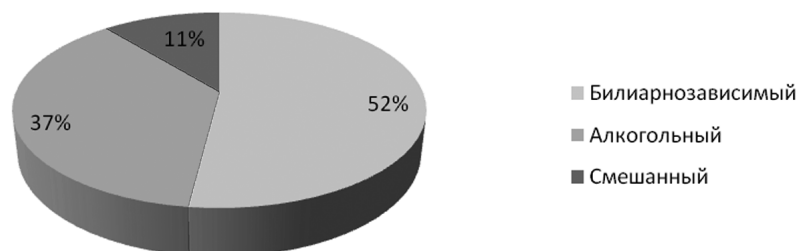
Материалы и методы

Основой нашего исследования явились результаты наблюдения за пациентами с октября 2010 по октябрь 2012 гг. В течение обозначенного времени было обследовано 388 больных с хроническим панкреатитом в отделении гастроэнтерологии городской клинической больницы № 14 города Москвы. В структуре общей гастроэнтерологической заболеваемости на данную патологию пришлось 29%. Из общего числа пациентов с ХП для детального обследования и динамического наблюдения было выбрано 60 человек в возрасте от 25 до 60 лет: 25 мужчин и 35 женщин. У 31 пациента был выявлен билиарнозависимый ХП, в 22 случаях — ХП алкогольного генеза, у 7 человек — ХП смешанной этиологии (билиарнозависимый и алкогольный) (таблица 1).

Всем пациентам проводилось комплексное обследование, которое включало: общеклинические,

лабораторные и инструментальные методы обследования, оценивалась интенсивность болевого синдрома при помощи шкалы ВАШ, подсчитывался индекс курящего человека (ИКЧ). Кроме того, пациентам проводилось исследование состояния пристеночного микробиоценоза тонкой кишки методом ПЦР-РВ. Никто из пациентов не принимал антибактериальных препаратов в течение 2 месяцев до начала исследования. Во время эзофагогастродуоденоскопии у всех пациентов взята биопсия слизистой оболочки проксимальных отделов тонкой кишки. Затем, в полученных биоптатах в ходе иммуногенетического исследования методом ПЦР — РВ идентифицировано 29 групп микроорганизмов, которые являются представителями 4 основных фило типов бактерий (*Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Firmicutes*), кроме того грибы рода

Таблица 1.
Распределение пациентов в зависимости от этиологии хронического панкреатита.



Candida и фузобактерии. Определялось абсолютное значение общей бактериальной массы в исследуемом материале, проводился качественный и количественный анализ микробного пейзажа полученных образцов. Абсолютные значения показателей искомым микроорганизмов в полученных образцах определялись в десятичных логарифмах (lg), что пропорционально соответствует количеству ДНК, выражаемой в геном-эквивалентах в образце (ГЭ/обр) [13, 15].

30 пациентам после стандартной терапии был назначен четырехнедельный курс для коррекции микрофлоры кишечника. Из них 15 человек принимали пребиотик «Пектовит» на фруктозе, второй группе был назначен синбиотик «Нормофлорин — Д». Спустя месяц после окончания лечения этим больным повторно проводилось исследование пристеночной микрофлоры тонкой кишки. В качестве показателей группы контроля (ГК), в нашей работе

были использованы данные работы Лаврентьевой О. А. — 14 здоровых добровольцев, у которых исследовалась пристеночная микробиота проксимальных отделов тонкой кишки путем проведения ПЦР — РВ [18].

Статистическая обработка результатов исследования проведена на персональном компьютере с помощью программы статистической обработки «Statistica for Windows 6.0» и «Microsoft Office Excel 2007». Средние значения в работе представлены в виде $M \pm m$, где M — среднее арифметическое, а m — ошибка среднего. Для оценки взаимозависимостей вычислялся линейный коэффициент корреляции Пирсона и коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Использовались параметрический метод критерий Стьюдента, непараметрические критерии Вилкоксона и Манна-Уитни. Различия считались достоверными, начиная со значений $p < 0,05$.

Результаты

Интенсивность болевого синдрома оценивалась при помощи визуальной аналоговой шкалы и выражалась в баллах. Более выраженным болевой синдром был у пациентов с билиарнозависимым панкреатитом ($r = 0,620$), меньшая степень корреляции отмечена у больных с алкогольным ХП ($r = 0,516$). При развитии у пациентов с хроническим панкреатитом внешнесекреторной недостаточности уровень болевого синдрома оказался выше ($r = 0,347$).

Выявлена прямая корреляция между уровнем ИКЧ и выраженностью болевого синдрома среди всех обследуемых ($r = 0,417$), возможно это связано с низкой эффективностью противоболевой терапии у курящих пациентов [12]. Между фактором употребления алкоголя и величиной ИКЧ выявлена прямая связь умеренной степени ($r = 0,513$). Кроме того, отмечена прямая зависимость между ИКЧ и частотой развития внешнесекреторной недостаточности поджелудочной железы ($r = 0,326$).

При обработке результатов выявлена прямая корреляция между возрастом пациентов и развитием билиарнозависимого панкреатита. Обратная зависимость отмечена при алкогольном панкреатите. Таким образом, выявлено, что с возрастом возрастает частота развития органических поражений желчевыводительной системы, что приводит к возникновению

хронического билиарного панкреатита, в то время как алкогольный панкреатит выявляется чаще у молодых пациентов.

Прямая корреляционная связь обнаруживается между возрастом и уровнем общей бактериальной массы (ОБМ) ($r = 0,407$), то есть у молодых пациентов микробная контаминация этой области ЖКТ менее выражена.

Оценивалось преобладание определенных групп микроорганизмов относительно общей бактериальной массы у пациентов с хроническим панкреатитом. На первом месте представители ВРР-группы (*Bacteroides*, *Prevotella*, и *Porphyromonas*), содержание их относительно общей бактериальной массы составило -1 (lg). Вторую позицию занимает группа микроорганизмов *Staphylococcus spp*, *Aerococcus spp*, *Streptococcus spp*, которые были обнаружены в количестве $-1,14$ lg. Следующими по содержанию стали *Enterobacterium spp*, относительная масса этих бактерий составила $-2,01$ lg. Остальные микроорганизмы были выделены в меньших количествах. Таким образом, в составе пристеночной микрофлоры проксимальных отделов тонкой кишки у пациентов с хроническим панкреатитом преобладают факультативные анаэробы (рисунок 1).

Для сравнения приведены данные, полученные в биоптатах тонкой кишки здоровых людей

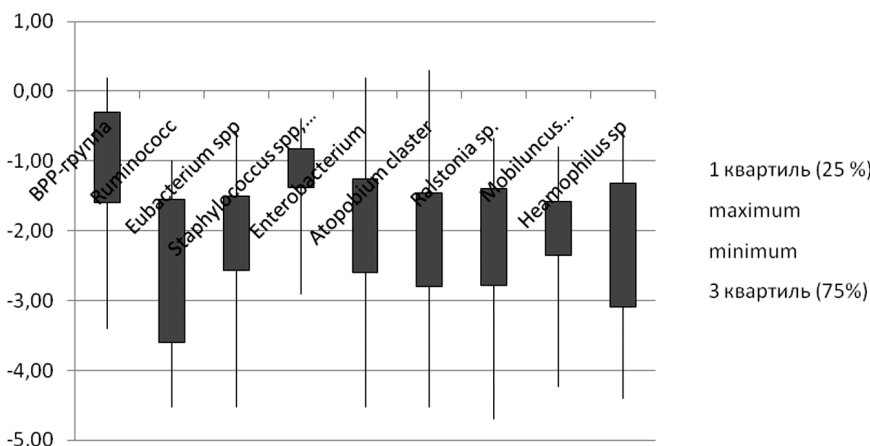
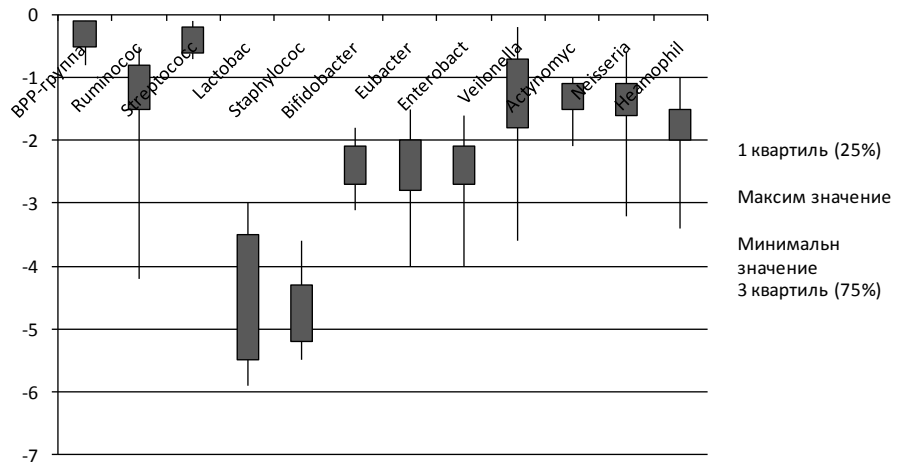


Рисунок 1. Относительное количество микроорганизмов, нормированное на общую бактериальную массу (ОБМ) (lg), в составе мукозной микрофлоры проксимальных отделов тонкой кишки пациентов с ХП.

Рисунок 2. Относительное количество микроорганизмов, нормированное на ОБМ (lg), в составе пристеночной микрофлоры проксимальных отделов тонкой кишки группы контроля [15].



(рисунок 2). В группе контроля преобладали концентрации ВРР-группа, Streptococcus spp, Ruminococcus spp [15].

Общая бактериальная масса пациентов с хроническим панкреатитом составила 4,04 lg (ГЭ/образец), в группе контроля этот показатель 3,8 lg (ГЭ/образец). Таким образом, достоверных различий между общей массой идентифицированных в нашем исследовании бактерий в слизистой оболочке тонкой кишки у пациентов с хроническим панкреатитом и здоровых людей не выявлено. Представленные в современной литературе данные о развитии в тонкой кишке избыточного роста бактерий основаны на исследовании полостного микробиоценоза этой части желудочно-кишечного тракта [7, 8, 9, 18].

При сравнении относительного содержания отдельных групп микроорганизмов с показателями, выявленными в группе контроля, были обнаружены достоверные различия в составе пристеночной микрофлоры тонкой кишки пациентов с ХП и здоровых добровольцев (рисунок 3). У пациентов с ХП достоверно увеличено содержание представителей ВРР-группы, которые по литературным данным преимущественно населяют дистальные отделы тонкой кишки, относятся к условно-патогенным микробам и при бактериальном дисбалансе могут привести к развитию заболеваний [19, 20]. Достоверно выше уровень группы кокков, в которую вошли Staphylococcus spp, Aerococcus spp, Streptococcus spp, в норме эти микроорганизмы встречаются на протяжении ЖКТ и обеспечивают колонизационную резистентность слизистой, но при определенных условиях они могут стать патогенными для человека.

Достоверно меньше у пациентов с ХП содержание руминококков, вейлонелл и Eubacterium spp. по сравнению со здоровыми донорами.

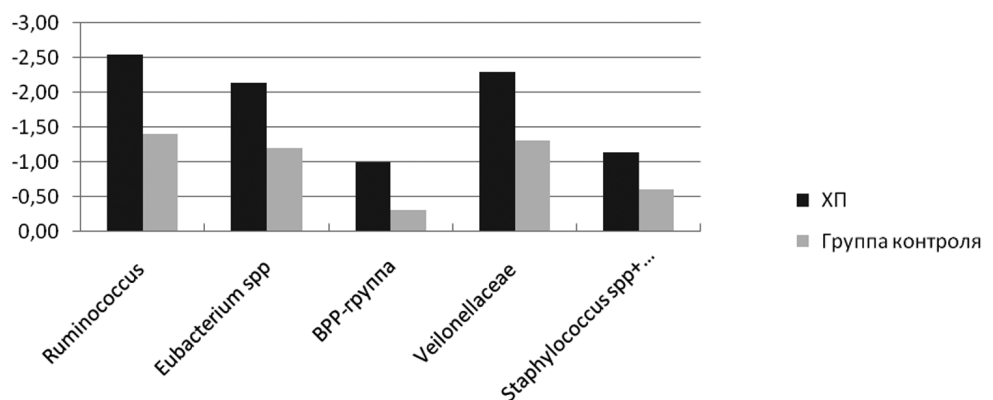
В исследовании, проведенном О. В. Желтаковой, при изучении аспирата из тонкой кишки пациентов с билиарным ХП выявлено снижение уровня уксусной кислоты, что коррелировало с угнетением и снижением ферментативной активности бифидо- и лактобактерий [18]. В проведенной нами работе, обращает на себя внимание, что в биоптатах слизистой тонкой кишки пациентов с ХП уровни Bifidobacterium spp., Lactobacillus spp. были ниже предела обнаружения иммуногенетическим методом ПЦР в реальном времени.

В нашей работе при обработке полученных во время эндоскопического исследования образцов слизистой оболочки проксимальных отделов тонкой кишки отмечено, что у пациентов с билиарнозависимым ХП установлен достоверно более высокий уровень общей бактериальной массы в биоптатах по сравнению со здоровыми людьми, что вероятнее всего связано со снижением антибактериального действия панкреатического сока.

Назначение препаратов для оптимизации состояния микрофлоры кишечника рекомендовано современными отечественными и зарубежными авторами. На следующем этапе работы мы изучали изменения состояния микробиоценоза проксимальных отделов тонкой кишки у пациентов с хроническим панкреатитом до и после четырехнедельной терапии биопрепаратами для коррекции микрофлоры.

15 пациентов после окончания курса стандартной терапии принимали синбиотик «Нормофлорин — Д»

Рисунок 3. Сравнительный анализ количества микроорганизмов, нормированное на ОБМ (lg), пристеночной микрофлоры проксимальных отделов тонкой кишки пациентов с хроническим панкреатитом и группы контроля (p ≤ 0,05).



в течение четырех недель в дозе 15 мл 3 раза в день за 15–20 минут до приема пищи. При сопоставлении данных исследования до и спустя месяц после окончания приема синбиотика уровень общей бактериальной массы и содержание отдельных групп микроорганизмов в образцах слизистой проксимальных отделов тонкой кишки остался практически неизменным. В литературе описаны данные исследований с применением Нормофлорина — Д. Эффект препарата при этом оценивался по результатам бактериологического анализа кала, отмечалось увеличение количества облигатной флоры, снижение уровня условно-патогенных микроорганизмов [17].

Еще 15 пациентов прошли курс коррекции микрофлоры пребиотиком «Пектовит» на фруктозе в дозе 16,5 г в сутки на три приема в течение месяца. Рядом авторов описывается положительное влияние препарата Пектовит на микрофлору кишечника [16]. У пациентов на фоне приема Пектовита отмечалось антагонистическое действие пектиновых препаратов на клебсиеллы, грибы и гемолитическую кишечную палочку. Через 2–3 недели наблюдалась нормализация микрофлоры, повышение количества бифидобактерий и лактобацилл по результатам бактериологического исследования кала. Однако длительность

Выводы

У пациентов с хроническим панкреатитом в составе пристеночной микрофлоры проксимальных отделов тонкой кишки преобладают представители факультативных анаэробов: BPP-группы (*Bacteroides*, *Prevotella*, и *Porphyromonas*), *Staphylococcus* spp, *Aerococcus* spp, *Streptococcus* spp, а также *Enterobacterium* spp.

В ходе нашего исследования не было обнаружено достоверных различий общей бактериальной массы пристеночной микробиоты проксимальных отделов тонкой кишки у пациентов с хроническим панкреатитом и здоровых лиц.

В группе больных хроническим билиарнозависимым панкреатитом выявлено достоверное увеличение уровня общей бактериальной массы пристеночной микрофлоры по сравнению со здоровыми людьми.

У пациентов с хроническим панкреатитом в составе пристеночной микрофлоры тонкой кишки обнаружено достоверное уменьшение уровня бактерий рода *Ruminococcus*, *Eubacterium* spp и *Veilonellaceae*

коррекции микробиоценоза определялась в описанном исследовании продолжительностью курса терапии основного заболевания, приведшего к нарушению микробного пейзажа в кишечнике [16]. В нашем исследовании не было обнаружено достоверных различий в составе пристеночной микрофлоры тонкой кишки до и после окончания курса приема Пектовита.

Особенное внимание в нашей работе уделялось изучению воздействия назначаемых препаратов для биокоррекции микрофлоры на нормализацию стула пациентов. В группе пациентов, принимавших Пектовит, к 4 дню стул нормализовался у 14 человек, что составило 86% от общего количества больных. Непереносимости и аллергических реакций при приеме этих препаратов отмечено не было.

При сравнении результатов у пациентов с хроническим панкреатитом в нашей работе не выявлено достоверных различий в составе микрофлоры слизистой оболочки тонкой кишки у пациентов с ХП до и после биокоррекции, что свидетельствует о сохранении высоких адаптационных возможностей организма пациентов и стабильности пристеночной микрофлоры тонкой кишки, обеспечивающей колонизационную резистентность.

по сравнению со здоровыми добровольцами. Достоверно выше в исследуемом микробиоценозе у пациентов с хроническим панкреатитом по сравнению со здоровыми людьми содержание представителей BPP-группы, *Staphylococcus* spp + *Aerococcus* spp + *Streptococcus* spp.

У пациентов с хроническим панкреатитом не было выявлено достоверных различий в составе пристеночной микрофлоры тонкой кишки до и после четырехнедельной терапии препаратами для коррекции микробиоценоза кишечника. Отмечен положительный клинический эффект пребиотиков у пациентов с хроническим панкреатитом с признаками внешне-секреторной недостаточности ПЖ.

Таким образом, метод ПЦР в реальном времени является перспективным для оценки состояния пристеночной микрофлоры тонкой кишки у пациентов с хроническим панкреатитом, а также в диагностике дисбиоза при различных заболеваниях. Это позволит определить показания для целевой биокоррекции микробиоты желудочно-кишечного тракта.

Библиография

1. Лоранская И. Д., Мамедова Л. Д., Ракитская Л. Г., Батюхо Т. А. Хронические панкреатиты — вопросы диагностики и лечения: Учебное пособие. М. РМАПО; 2011.
2. Казюлин А. Н. Хронический билиарнозависимый панкреатит. А. Н. Казюлин, Ю. А. Кучерявый. М. ГОУ ВУНМЦ МЗиСР РФ; 2005.
3. Маев И. В., Казюлин А. Н., Кучерявый Ю. А. Хронический панкреатит. М. ОАО «Издательство «Медицина»; 2005.
4. Chowdhury P. Pathophysiological effects of nicotine on the pancreas: an update. *Exp Biol Med* 2002; 227 (7): 445–454.
5. Maisonneuve P et al. Cigarette smoking accelerates progression of alcoholic chronic pancreatitis. *Gut* 2005; 54 (4): 510–514.
6. Шифрин О. С., Соколова И. А. и др. Фактор курения и лечение болевой формы хронического алкогольного панкреатита. *Российский журнал Гастроэнтерологии, Гепатологии, Колопроктологии* 2006; 1; прил. 27: 102.
7. Ардатская М. Д., Минушкин О. Н. Диагностика состояний микрофлоры кишечника и дифференцированная коррекция ее нарушений. Методическое пособие для врачей, руководителей органов управления здравоохранения и лечебно-профилактических учреждений. М; 2005.
8. Белоусова Е. А. Синдром избыточного бактериального роста тонкой кишки при хроническом панкреатите. *РМЖ*; 2009;17; 5: 317–320.

9. Яковенко Э. П., Иванов А. Н., Казарина А. В. и др. Нарушение нормального состава кишечных бактерий: клиническое значение и вопросы терапии. РМЖ 2008; 2: 41 – 47.
10. Di Stefano M., Corazza G. R. Treatment of small bowel bacterial overgrowth and related symptoms by Rifaximin. In: Rifaximin: a Poorly Absorbed Antibiotic. Ed. C. Scarpinato. Karger; 2005.
11. Dominguez-Munoz JB, Iglesias-Garcia J. Oral pancreatic enzyme substitution therapy in chronic pancreatitis: is clinical response an appropriate marker for evaluation of therapeutic efficacy. JOP 2010; 2: 158 – 162.
12. Vinokurova L. V., Trubisina I. E, Lazebnik L. B., Gubina A. V. Mucic Gel Properties in Duodenum Mucous Coat of Patients with Chronic Pancreatitis. Pancreatology 2008; 8; 3: 360 – 361.
13. Болдырева М. Н., Донников А. Е., Тумбинская Л. В. «Фемофлор» исследование биоценоза урогенитального тракта у женщин репродуктивного возраста методом ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени; 2010.
14. Болдырева М. Н., Липова Е. В., Алексеев Л. П., Витвицкая Ю. Г., Гуськова И. А. Характеристика биоты урогенитального тракта у женщин репродуктивного возраста методом ПЦР в режиме реального времени. Журнал акушерства и женских болезней; 2009; LVIII; 6: 36 – 42.
15. Лоранская И. Д., Болдырева М. Н., Лаврентьева О. А. Состав мукозной микрофлоры желудочно-кишечного тракта при синдроме раздраженного кишечника. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология 2013; 3: 15 – 22.
16. Пектиновые препараты в медицинской практике как лечебно-профилактические средства. Методические разработки. РМАПО. Москва; 2009.
17. Бондаренко В. М., Шапошникова Л. И. Клинический эффект жидких симбиотических биокомплексов, содержащих физиологически активные клетки бифидобактерий и лактобацилл. Тверь. ООО «Издательство «Триада»; 2009.
18. Желтакова О. В. Коррекция морфофункциональных нарушений желудка и двенадцатиперстной кишки при хроническом билиарнозависимом панкреатите. Дисс. ... к. м. н.. Москва 2007.
19. Eckburg P. B., Bik E. M., Bernstein C. N. et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. Science 2005; 308: 1635 – 1638.
20. Ko JS. The intestinal microbiota and human disease. Korean J Gastroenterol 2013; 8; 62 (2): 85 – 91.