

П.В. Шумилов¹, М.Г. Ипатова¹, Л.И. Кафарская¹, А.Н. Шкопоров¹, А.С. Потапов²

¹ Российский государственный медицинский университет, Москва

² Научный центр здоровья детей РАМН, Москва

Клиническое значение пристеночной микрофлоры у детей с неспецифическим язвенным колитом

Контактная информация:

Шумилов Петр Валентинович, кандидат медицинских наук, доцент кафедры детских болезней № 2 Российского государственного медицинского университета им. Н.И. Пирогова

Адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, д. 1, тел.: (495) 254-77-46, e-mail: peter_shumilov@mail.ru

Статья поступила: 03.04.2010 г., принята к печати: 14.09.2010 г.

Одним из ключевых факторов, определяющих течение неспецифического язвенного колита (НЯК), является микрофлора кишечника. Был исследован доминирующий состав пристеночной микрофлоры (*Clostridium coccoides*, *Clostridium leptum*, *Bacteroides fragilis*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Prevotella*, и *Atopobium*) у детей с неспецифическим язвенным колитом (НЯК) методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Показано, что для детей с НЯК характерно повышение бактериальной плотности *C. coccoides* и *Lactobacillus* при некотором снижении *Bifidobacterium*, *B. fragilis* и *Prevotella*. Популяционные уровни отдельных представителей пристеночной микрофлоры (*B. fragilis*, *Lactobacillus*, *C. leptum*, *C. coccoides*, *Prevotella*, *Bifidobacterium*) отличаются в зависимости от распространенности, тяжести и активности патологического процесса при НЯК.

Ключевые слова: воспалительные заболевания кишечника, неспецифический язвенный колит, пристеночная микрофлора кишечника, полимеразная цепная реакция, дети.

Последние три десятилетия характеризуются быстрым ростом числа больных с неспецифическим язвенным колитом (НЯК). НЯК встречается у детей всех возрастных групп. Пик заболеваемости приходится на подростковый и юношеский возраст: приблизительно 30% НЯК манифестирует в возрасте от 10 до 19 лет.

Воспалительные заболевания кишечника у детей и взрослых пациентов схожи в своей клинической манифестации и имеют одинаковый базисный алгоритм

терапии, но течение НЯК у детей имеет ряд важных особенностей. В частности, для детского возраста характерно преобладание быстро прогрессирующих и распространенных форм НЯК. Тотальный колит наблюдаются у 60–80% детей и лишь у 20–30% взрослых, страдающих НЯК [1, 2].

НЯК до сих пор остается неизлечимым заболеванием и часто требует комплексной терапии с применением различных групп лекарственных препаратов,

71

P.V. Shumilov¹, M.G. Ipatova¹, L.I. Kafarskaya¹, A.N. Shkoporov¹, A.S. Potapov²

¹ The Russian State Medical University of Russia's Healthcare Agency, Moscow

² Scientific Center of Children's Health, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

Clinical significance of parietal microflora in children with non-specific ulcerative colitis

One of the key factors driving the development of non-specific ulcerative colitis (NSUC) is the intestinal microflora. The dominant composition of the parietal microflora was studied (*Clostridium coccoides*, *Clostridium leptum*, *Bacteroides fragilis*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Prevotella*, и *Atopobium*) in children with non-specific ulcerative colitis (NSUC) using the polymerase chain reaction method in real time. It was shown that it was characteristic of children with NSUC to have increased bacterial density of *C. coccoides* and *Lactobacillus*, combined with somewhat reduced *Bifidobacterium*, *B. fragilis* and *Prevotella*. Population levels of individual parietal microflora components (*Bacteroides fragilis*, *Lactobacillus*, *Clostridium leptum*, *Clostridium coccoides*, *Prevotella*, *Bifidobacterium*) vary depending on prevalence, severity and intensity of pathological process in the case of NSUC.

Key words: inflammatory intestinal diseases, non-specific ulcerative colitis, parietal intestinal microflora, polymerase chain reaction, children.

а при их неэффективности — даже хирургического вмешательства. Лечение противовоспалительными, антибактериальными препаратами, кортикостероидами и/или иммуносупрессивными средствами, как правило, эффективно, но не приводит к полному выздоровлению [3, 4]. Безусловно, необходим поиск новых подходов к терапии данной патологии, что, в свою очередь, требует более полного понимания факторов, приводящих к развитию НЯК.

Результаты современных отечественных и зарубежных исследований указывают на значительную роль индигенной микрофлоры в патогенезе НЯК. Но на сегодняшний день данные о кишечной микрофлоре у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника неоднозначны. Это обусловлено тем, что традиционные методы выделения микроорганизмов в культуре дают неполную картину состава микрофлоры кишечника вследствие того, что одни виды бактерий, обитающих в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ), лучше поддаются культивированию, чем другие. В результате искажается состав кишечной микрофлоры, что приводит к недооценке роли отдельных микроорганизмов и целых бактериальных групп у здоровых детей и при патологических процессах. Также в большинстве исследований изучалась преимущественно фекальная микрофлора, которая по составу существенно отличается от микрофлоры слизистой оболочки ЖКТ [5]. Доминирующая часть пристеночной микрофлоры, в которой в значительной степени преобладают некультивируемые анаэробы, остается мало изученной.

В настоящее время для изучения микрофлоры в качестве наиболее чувствительного и быстрого метода широко применяется метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием специфических праймеров, которые позволяют определить род и вид представителей микробиоценоза. Уже разработаны специфические праймеры для многих известных видов бактерий, которые присутствуют в пищеварительном тракте [6–8]. ПЦР в режиме реального времени с видоспецифичными праймерами может предоставить точные количественные данные о пристеночной микрофлоре.

Учитывая актуальность данной проблемы, целью нашей работы стало изучение особенностей состава пристеночной микрофлоры методом количественной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени у пациентов с неспецифическим язвенным колитом.

Согласно молекулярным исследованиям нуклеотидных последовательностей 16S рибосомальных РНК, бактерии микрофлоры человека таксономически подразде-

ляются на четыре филогенетических отдела: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* и *Proteobacteria*. При этом первые 3 отдела составляют до 95% общей популяции микроорганизмов. В нашей работе мы изучили количественный состав представителей каждого филогенетического отдела: род *Lactobacillus*, группу *Clostridium leptum*, группу *Clostridium coccoides* (отдел *Firmicutes*), группу *Bacteroides fragilis*, род *Prevotella* (отдел *Bacteroidetes*), род *Bifidobacterium*, группу *Atopobium* (отдел *Actinobacteria*).

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводилось в отделении гастроэнтерологии Научного центра здоровья детей РАМН. Было обследовано 16 детей с НЯК: 7 девочек и 9 мальчиков в возрасте от 3,5 до 17 лет ($10,8 \pm 3,9$ лет). Детальное распределение детей с НЯК по возрасту и полу представлено в табл. 1. У всех больных диагноз НЯК был установлен на основании стандартных методов исследования, включающих в себя клинические, лабораторные, эндоскопические и морфологические критерии.

Группу контроля составили 8 детей, у которых фиброколоноскопия проводилась с диагностической целью. В результате обследования у 5 детей был диагностирован синдром раздраженной кишки, у 2-х — трещина анального отверстия и у 1-го ребенка — полип в сигмовидной кишке. Обе группы были сопоставимы по возрасту и полу.

Изучение особенностей состава индигенной пристеночной микрофлоры (*C. coccoides*, *C. leptum*, *B. fragilis*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Prevotella*, и *Atopobium*) проводилось методом количественной ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с группоспецифичными и родоспецифичными праймерами (табл. 2) [7, 8].

Забор материала для исследования проводился во время плановой диагностической фиброколоноскопии с лестничной биопсией, назначенной лечащим врачом согласно индивидуальному плану обследования. В качестве материала для исследования пристеночной микрофлоры были использованы биоптаты слизистой оболочки кишки, взятые из стандартного участка на границе сигмовидной и прямой кишки (ректосигмоидный переход), который условно определяли на расстоянии 10 см от анального сфинктера. Исследование образца данного участка желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) было обусловлено самой высокой бактериальной плотностью, а также наиболее частой локализацией патологического процесса у детей с воспалительными заболеваниями кишечника.

Таблица 1. Распределение детей с воспалительными заболеваниями кишечника ($n = 16$) по гендерному признаку и возрасту

Пациенты	Возраст		
	до 3-х лет	4 года — 12 лет	13–17 лет
Мальчики	1	2	6
Девочки	0	1	6
Всего	1	3	12

Таблица 2. Группо- и родоспецифические праймеры 16S рРНК для полимеразной цепной реакции в реальном времени

Бактериальная группа	Праймеры	Нуклеотидная последовательность	Размер ампликона, п.н.	Температура отжига, °С	Источник
<i>Bacteroides fragilis</i> (группа)	g-Bfra-F	ATAGCCTTTCGAAAGRAAGAT	495	50	Matsuki и соавт., 2002 [7]
	g-Bfra-R	CCAGTATCAACTGCAATTTTA			
<i>Prevotella</i> (род)	g-Prevo-F	CACRGTAACGATGGATGCC	513	55	Matsuki и соавт., 2002 [7]
	g-Prevo-R	GGTCGGGTTGCAGACC			
<i>Clostridium coccoides</i> (группа)	g-Ccoc-F	AAATGACGGTACCTGACTAA	440	50	Matsuki и соавт., 2002 [7]
	g-Ccoc-R	CTTTGAGTTTCATTCTTGCGAA			
<i>Clostridium leptum</i> (группа)	sg-Clept-F	GCACAAGCAGTGGAGT	239	50	Matsuki и соавт., 2004 [8]
	sg-Clept-R3	CTTCCTCCGTTTTGTCAA			
<i>Atopobium</i> (группа)	c-Atopo-F	GGGTTGAGAGACCGACC	190	55	Matsuki и соавт., 2004 [8]
	c-Atopo-R	CGGRGCTTCTTCTGCAGG			
<i>Lactobacillus</i> (род)	Lacto-F	GTCGTCTATGAACCTACCA	251	55	Настоящее исследование
	Lacto-R	CCCCGTCATCGACCCCGACA			
<i>Bifidobacterium</i> (род)	Bifi-F	ATCGTGGCTAGGGAGAACGC	318	50	Настоящее исследование
	Bifi-R	ACCGACAGATCGGGCACGGG			

ка. Биоптат слизистой оболочки прямой кишки хранился в сухой пластиковой микропробирке при температуре -80°C до проведения исследования.

Выделение ДНК из образцов проводилось с использованием набора ZR Genomic DNA Tissue MiniPrep (Zymo Research) в соответствии с рекомендациями изготовителя. Постановку реакции ПЦР в режиме реального времени осуществляли с использованием готовых 2,5X ПЦР-смесей (Синтол) в приборе АНК-32 (Синтол). Флуоресценция в пробирках детектировалась в режиме реального времени на канале FAM. Значения пороговых циклов определялись автоматически прибором. Построение калибровочных кривых и расчет значений концентрации бактериального геномного ДНК в исследуемых образцах проводили с использованием программы Microsoft Excel.

Статистическая обработка проводилась с помощью стандартного пакета программ BIostat и STATISTICA 6.0 с использованием критериев параметрической (Т-тест) и непараметрической (критерий Манна–Уитни и парный критерий Уилкоксона) статистики. В целях выявления характера взаимодействия между показателями, характеризующими изменение в организме ребенка, анализировалась линейная корреляция Пирсона (r) или ранговая корреляция Спирмена (r_s).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При поступлении в клинику у большинства (64%) детей наблюдалось обострение болезни. Самыми частыми клиническими проявлениями у детей, страдающих НЯК, были: частый разжиженный стул до 4–6 раз в сут (69%), кровь в стуле (50%) и болевой синдром (54%), локализующийся по ходу толстой кишки и имеющий связь с актом

дефекации. У 69% детей с НЯК отмечались внекишечные проявления. Умеренная клиническая активность диагностировалась у большинства (31%) пациентов, дети с высокой и низкой активностью патологического процесса составили по 25%, соответственно. Ремиссия отмечалась у 19% пациентов.

При эндоскопическом обследовании у детей с НЯК преобладали распространенные формы поражения толстой кишки (панколит) — в 63% случаев и низкая степень активности (38%), в то время как умеренная и высокая активность болезни отмечалась у 25% пациентов. У 12% детей эндоскопическая картина соответствовала стадии ремиссии.

Результаты лабораторных исследований у детей с НЯК указывали на наличие анемии (25% пациентов) и латентного дефицита железа (41,1% случаев). Среди неспецифических изменений крови, свойственных хроническому воспалению, у больных с НЯК наиболее часто встречались лейкоцитоз, моноцитоз, тромбоцитоз, ускорение СОЭ, диспротеинемия, гипергаммаглобулинемия, увеличение уровней иммуноглобулинов (Ig) класса А, G и М, циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК).

При анализе количественного состава пристеночной микрофлоры было выявлено, что суммарная бактериальная плотность (количество бактериальной геномной ДНК, которая была детектирована методом ПЦР-РВ в каждом исследуемом биоптате) у детей с НЯК и в группе контроля не имеет статистически значимых отличий. У детей с НЯК была выявлена более низкая бактериальная плотность *B. fragilis* и *Prevotella* и повышенное количество *Lactobacillus* по сравнению с детьми контрольной группы. При оценке бактериальной обсемененности пристеночной микрофлоры у детей исследуемых групп было выяв-

лено, что для детей с НЯК характерны более высокие значения *C. coccoides* (табл. 3).

Были изучены особенности состава пристеночной микрофлоры кишечника и его влияния на клиническую и эндоскопическую картины, а также площадь поражения у детей с НЯК.

У детей с высокой клинической активностью НЯК (25% пациентов) было снижено содержание представителей всех исследуемых групп микрофлоры, за исключением рода *Lactobacillus*, уровень которого был максимальным (рис. 1). Количество копий нуклеотидных последовательностей *Bifidobacterium* у этих детей с высокой клинической активностью было ниже порогового уровня чувствительности метода. Максимальные значения *Bifidobacterium* были отмечены у детей с низкой активностью болезни (23%). Данные закономерности изменений *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* подтверждаются выявленными прямыми сильными корреляционными связями *Lactobacillus* с высокой клинической активностью НЯК ($r_s = 0,86$, $p < 0,01$), а *Bifidobacterium* с низкой клинической активностью патологического процесса ($r_s = 0,79$, $p < 0,05$).

При анализе лабораторных показателей с исследуемыми бактериальными группами было выявлено, что для *Bifidobacterium* характерна прямая сильная корреляция ($r_s = 0,78$, $p < 0,05$) с уровнем IgM в сыворотке крови. Для *Lactobacillus* была выявлена прямая сильная связь с повышением С-реактивного белка (СРБ) ($r_s = 0,83$, $p < 0,001$).

При индивидуальном анализе бактериальных групп в зависимости от эндоскопического индекса активности по Rachmilewitz нами было отмечено, что для детей с высокой эндоскопической активностью характерно снижение бактериальной плотности *Prevotella* по сравнению с детьми, у которых эндоскопическая картина соответствовала умеренной и низкой активности (рис. 2). Однако, это количество было схоже с количеством копий нуклеотидных последовательностей *Prevotella* у детей, находящихся в эндоскопической ремиссии. У детей с умеренной эндоскопической активностью (31%) не было выявлено статистически значимых отличий бактериальной плотности исследуемых бактерий по сравнению с эндоскопической картиной у других детей. При низкой клинической активности (25% случаев) были выявлены самые высокие значения копий нуклеотидных последовательностей *Prevotella* по сравнению с другими группами эндоскопической активности; отличия были статистически значимы ($p < 0,05$). Эндоскопическая ремиссия у детей с НЯК (19%) характеризовалась самой низкой бактериальной плотностью *C. leptum* и *C. coccoides*.

Анализируя связь бактериальной плотности с распространенностью патологического процесса при НЯК, было выявлено, что при проктосигмоидитах (25%) повышена бактериальная плотность *B. fragilis*, *C. coccoides* по сравнению с проктитами и панколитами (см. рис. 2). А у детей с проктитами (12%) количество копий нуклеотидных последовательностей *Bifidobacterium* было ниже порогового уровня чувствительности метода.

Таблица 3. Состав пристеночной микрофлоры ректосигмоидного отдела кишечника по результатам полимеразной цепной реакции ($M \pm \sigma$)

Бактериальная группа	Праймер	Больные НЯК ($n = 16$)	Группа контроля ($n = 8$)
	$\log_{10}$, копий геномной ДНК/г		
<i>Bacteroides fragilis</i> (группа)	g-Bfra-F	$6,45 \pm 0,72$	$6,89 \pm 0,89$
	g-Bfra-R		
<i>Prevotella</i> (род)	g-Prevo-F	$6,31 \pm 0,82$	$6,53 \pm 0,75$
	g-Prevo-R		
<i>Clostridium coccoides</i> (группа)	g-Ccoc-F	$8,15 \pm 1,05$	$7,83 \pm 1,07$
	g-Ccoc-R		
<i>Clostridium leptum</i> (группа)	sg-Clept-F	$7,51 \pm 0,41$	$7,42 \pm 0,43$
	sg-Clept-R3		
<i>Atopobium</i> (кластер)	c-Atopo-F	$8,39 \pm 0,32$	$8,32 \pm 0,21$
	c-Atopo-R		
<i>Lactobacillus</i> (род)	g-Lacto-F	$2,59 \pm 0,63$	$2,29 \pm 0,58$
	g-Lacto-R		
<i>Bifidobacterium</i> (род)	g-Bifi-F	$7,39 \pm 0,15$	$7,63 \pm 0,58$
	g-Bifi-R		

Примечание. * — $p < 0,05$ по сравнению с группой сравнения.

Рис. 1. Средние значения представителей индигенной микрофлоры в зависимости от клинической активности по индексу Рахмилевича у детей с неспецифическим язвенным колитом (log10, клеток/г)

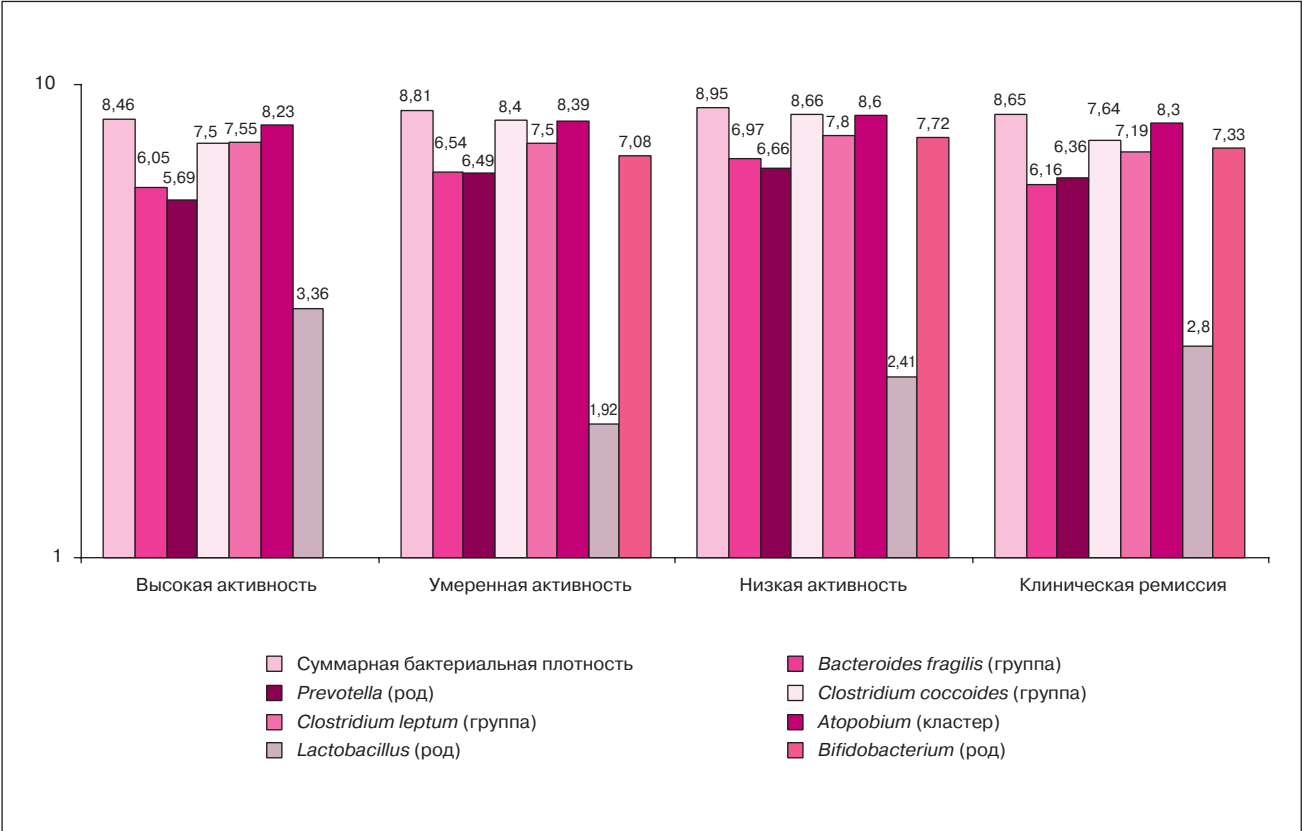
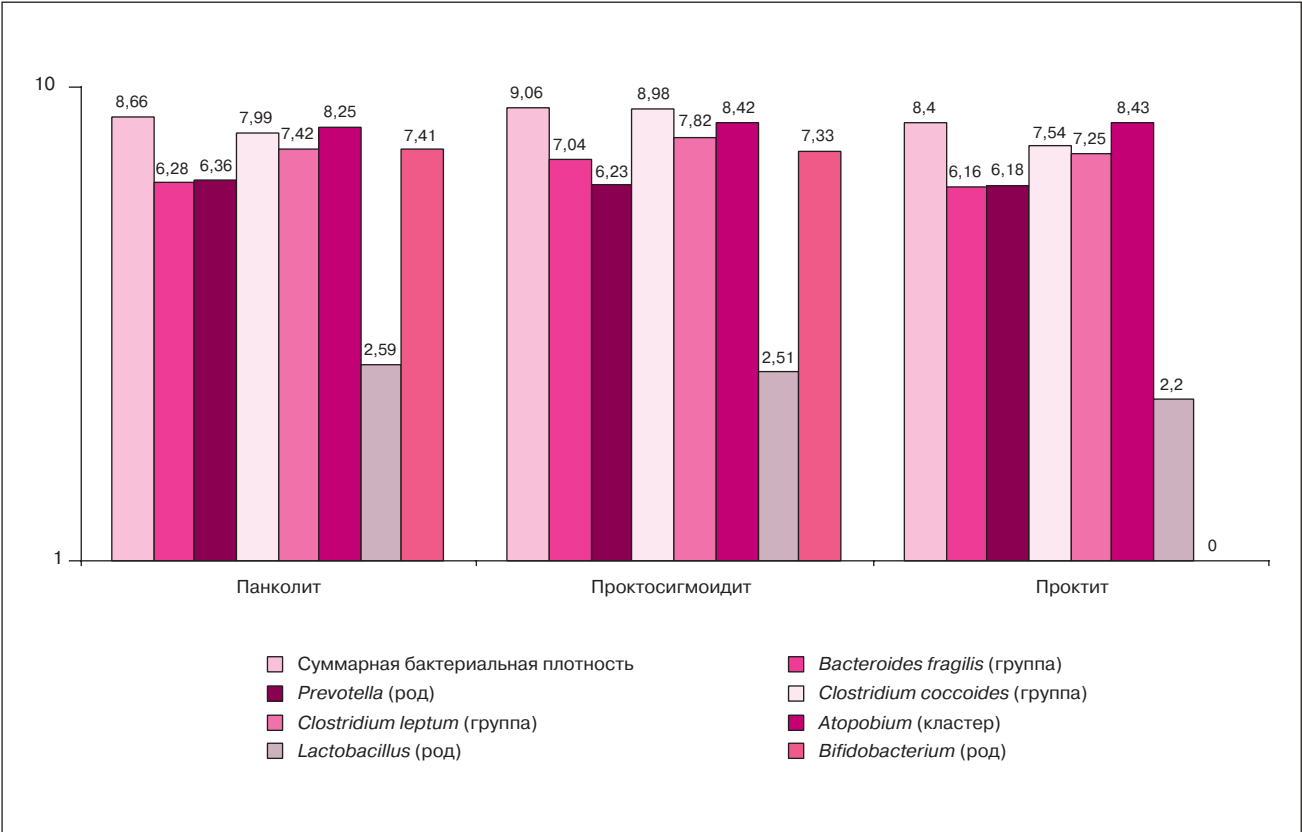


Рис. 2. Средние значения представителей индигенной микрофлоры в зависимости от распространенности патологического процесса у детей с неспецифическим язвенным колитом



ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, качественный и количественный анализ состава пристеночной микрофлоры кишечника у детей с НЯК не показал статистически значимых различий суммарной бактериальной плотности между детьми, страдающими НЯК и группы контроля. Однако, в ходе исследования были выявлены качественные и количественные различия в составе пристеночной микрофлоры при различных формах течения НЯК у детей. Для пациентов с НЯК характерен относительно высокий уровень *C. coccoides* и *Lactobacillus* при некотором снижении бактериальной плотности *Bifidobacterium*, *B. fragilis* и *Prevotella*. Период обострения болезни характеризуется относительным повышением бактериальной плотности по сравнению с ремиссией. Максимальная бактериальная плотность отмечается у детей с низкой клинической активностью ($\log_{10} 8,65 \pm 0,28$). По мере повышения клинической активности показатели бактериальной плотности снижаются до $\log_{10} 8,46 \pm 0,63$, что связано с усилением агрессивности проводимого лечения, в том числе с назначением антибактериальной терапии.

Интересно, что у детей с высокой клинической активностью НЯК выявлена и более высокая бактериальная плотность *Lactobacillus* ($p < 0,01$), а также прямая сильная корреляция с повышением уровня СРБ ($r_s = 0,83$, $p < 0,001$), что указывает на участие *Lactobacillus* в патологическом процессе. Для объяснения выявленной зависимости необходимы дальнейшие исследования с учетом особенностей различных штаммов рода *Lactobacillus*, так как в настоящее время доказано, что разные штаммы лактобацилл оказывают различный по степени выраженности иммуномодулирующий эффект. В ходе многочисленных исследований было выявлено, что лактобациллы могут участвовать в процессе распознавания макрофагами и даже способны активировать фактор транскрип-

ции NF-κB, однако, в норме развитие иммунного ответа подавляется [8].

Частота встречаемости *Bifidobacterium* у детей с НЯК составила 43% случаев, и 25% — в группе контроля. Однако при высокой клинической активности у детей с НЯК было отмечено практически полное отсутствие *Bifidobacterium*, то есть значения *Bifidobacterium* были ниже порогового уровня чувствительности метода. Вместе с тем была выявлена прямая сильная корреляция бифидобактерий с низкой активностью заболевания ($r_s = 0,79$, $p < 0,05$). Анализ лабораторных показателей показал, что для пациентов с НЯК характерна прямая сильная корреляция *Bifidobacterium* ($r_s = 0,78$, $p < 0,05$) с уровнем IgM в сыворотке крови, что свидетельствует об активации гуморального звена иммунитета.

На сегодняшний день известно, что лакто- и бифидобактерии обладают иммуногенными свойствами и способны стимулировать врожденный и приобретенный иммунитет. В норме иммунный ответ слизистой оболочки кишечника ограничен, характеризуется иммунологической толерантностью к представителям индигенной микрофлоры (в первую очередь лакто- и бифидобактериям), одновременно сохраняя способность адекватно реагировать на патогенные микроорганизмы. Иммунологическая толерантность является одним из компонентов иммунного «покоя». Отклонения от этого состояния и, в частности, генетически детерминированные патологические иммунные ответы на антигены, находящиеся в просвете кишечника, могут приводить к развитию воспалительных заболеваний кишечника.

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о нарушении иммунологической толерантности к представителям нормальной микрофлоры ЖКТ, что является предпосылкой для более осторожного применения пробиотических препаратов у пациентов с данной патологией, особенно при высокой активности болезни.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Румянцев В.Г., Щиголева Н.Е. Болезнь Крона в детском возрасте // Consilium Medicum. Прил. — 2002; 4 (6): 17–20.
2. Румянцев В.Г., Щиголева Н.Е. Неспецифический язвенный колит у детей // Consilium Medicum. Прил. — 2002; 4 (6): 16–19.
3. Prantera C., Berto E., Scribano M. et al. Use of antibiotics in the treatment of active Crohn's disease: experience with metronidazole and ciprofloxacin // Ital. J. Gastroenterol. Hepatol. — 1998; 30: 602–606.
4. Prantera C., Kohn A. Proposed measures of disease activity: how useful are they? — New York, NY: Marcel Dekker Inc, 1996. — P. 187–97.
5. Eckburg P.B., Bik E.M., Bernstein C.N. et al. Diversity of the human intestinal microbial flora // Science. — 2005; 308: 1635–1638.
6. Matsuki T., Watanabe K., Fujimoto J. et al. Development of 16S rRNA-gene-targeted group-specific primers for the detection and identification of predominant bacteria in human feces // Appl. Environ. Microbiol. — 2002; 68: 5445–5451.
7. Matsuki T., Watanabe K., Fujimoto J. et al. Use of 16S rRNA gene-targeted group-specific primers for real-time PCR analysis of predominant bacteria in human feces // Appl. Environ. Microbiol. — 2004; 70: 7220–7228.
8. Miettinen M., Lehtonen A., Julkunen L. et al. Lactobacilli and streptococci activate NF-κB and STAT signaling pathways in human macrophages // J. Immunol. — 2000; 164: 3733–3740.