

Доктор биологических наук
Осипов Г.А.

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ
СОСТАВА И КОЛИЧЕСТВА
МИКРООРГАНИЗМОВ
КИШЕЧНОЙ СТЕНКИ МЕТОДОМ
ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ
ПО КЛЕТОЧНЫМ ЖИРНЫМ
КИСЛОТАМ**

СПб - 2016 г.

СОДЕРЖАНИЕ

Современные представления о составе микробиоты кишечника по данным молекулярных исследований	2
Микробиота кишечника – гомеостатичная биопленка	2
Способ существования микроорганизмов в кишечной биопленке	3
Метод масс спектрометрии микробных маркеров	6
Тестирование метода масс спектрометрии микробных маркеров по фекалиям...	8
Состав микроорганизмов пристеночной микробиоты кишечника	12
Неинвазивный контроль дисбактериозов по микробным маркерам в крови	20
Дисбактериоз при синдроме раздраженной кишки	22
Изменение микрофлоры тонкой кишки при ААД	28
Дисбактериозы с избыточным ростом микробиоты кишечной стенки	29
Микрофлора кишечника и состояние кожи	30
Коррекция дисбактериозов (примеры)	34
Заключение. Как быть с дисбактериозом?	40

Современные представления о составе микробиоты кишечника по данным молекулярных исследований

Микробиота кишечника – гомеостатичная биопленка

На рубеже XXI века сформировалось представление о микрофлоре организма человека как о еще одном органе, покрывающим в виде чужеродной кишечную стенку, другие слизистые оболочки и кожу человека. Оставаясь невидимым, этот «орган» весит около двух килограммов и насчитывает порядка 10^{14} клеток (сто миллиардов) клеток микроорганизмов. Это число в десять раз превышает число собственных клеток организма-хозяина, то есть – человеческих. К представлению единства сообщества микроорганизмов, обитающих в нашем теле, привели первоначально исследования экологических и биотехнологических микробных сообществ. Оказалось, что микробы, во-первых, предпочитают жить, будучи прикрепленными к твердой поверхности, нежели свободно плавающими – как в водной среде рек и океана, в воздухе. Во-вторых, они организованы в так называемые биопленки, сбалансированные по видовому составу и функциональному распределению членов сообщества. В биотехнологии стремятся специально подобрать оптимальное сообщество микроорганизмов для выполнения определенных функций. Это актуально в производстве пищевых продуктов, лекарств и пищевых добавок, утилизации разного рода отходов, нейтрализации загрязнений воды и почвы нефтепродуктами. Такие сообщества называют консорциумами микроорганизмов. Практика показала многократное увеличение эффективности работы микроорганизмов при такой организации. Консорциум – биотехнологическое понятие, которое определяет сообщество микроорганизмов, специально созданное для осуществления определенной цели. В нем (сообществе) существуют количественные и функциональные отношения между микроорганизмами. Они должны быть строго постоянны, иначе цель не достигается. В биотехнологии – это срыв производственного процесса (скажем, производство кефира или пива). У человека такого допустить нельзя, его биореактор (кишечник) должен работать всю жизнь. Поэтому природа постаралась так организовать микробное сообщество, что оно сохраняется в течение всей жизни при максимальном колебании в концентрации отдельных микробов. Независимо от применения антибиотиков. Правильное их применение наряду с восстановительными мерами приводит к сохранению микрофлоры в прежних рамках. По данным молекулярно-генетических исследований состав микрофлоры генетически связан внутри сообщества и специфичен на штаммовом уровне для индивидуума. Это очень прочная система. Туда нельзя внедрить чужеродный штамм. Нетрудно оценить ее гораздо большую антибиотикорезистентность *in-vivo* по сравнению с опытами в чашке Петри. Достаточно капли антибиотика в чашке, чтобы воспрепятствовать росту

микроорганизмов в радиусе 42 мм (высокая чувствительность). В то же время кишечник остается заселенным при длительном применении антибиотиков широкого спектра действия.

Способ существования микроорганизмов в кишечной биопленке

На сегодня нет точного описания архитектуры микробного сообщества пристеночного слоя кишечника. Попытаемся предложить модель биопленки на основе известных фактов. Микроорганизмы, в количестве 10^{11} клеток/см³ должны быть распределены в пристеночном слое муцина – относительно прочного геля, состоящего из пептидогликана, продуцируемого бокаловидными клетками эпителия кишечной слизистой оболочки. Сразу следует заметить, что он близок по химической природе полисахаридной защитной капсуле, которой окружают себя многие микробы. Такая среда выглядит пригодной для существования микроорганизмов в тонких слоях муциновой слизи в виде равномерно распределенных клеток на достаточно близком расстоянии (порядка размера микробной клетки) друг от друга. Такое расположение должно обеспечивать контакт с диффундирующим в муцин химусом и клетками между собой для быстрого обмена продуктами метаболизма. Оно должно отвечать представлению о биопленке, как о псевдоцитологической структуре. В достаточно толстом слое муцинового геля можно предполагать и видеть другие формы микробной биопленки – в виде слоя, прикрепленного к клеткам эпителия, или отдельно расположенных конгломератов клеток.

Достоинством удивления способность микробиоты кишечника сохранять стабильность в условиях разнородных химических и корпускулярных потоков, пронизывающих муцин вдоль и поперек. В соответствии с физиологическими канонами через кишечную стенку и вдоль нее ежедневно проходит десять литров жидкости, включая слюну, желудочный сок с пищевым химусом, желчные и печеночные секреты и прочее. В противоположном всасыванию направлении движется муцин, который микробы кишечной стенки должны успевать переваривать на мономерные составляющие со скоростью его образования клетками слизистой оболочки.

Специальные исследования показали, что в биопленке по иному, в сравнении с чистыми культурами бактерий, происходят их многочисленные физиологические процессы, в том числе продукция метаболитов и биологически активных веществ. Сообщество организует единую генетическую систему в виде плазмид – кольцевых ДНК, несущих поведенческий код для членов биопленки, определяющих их пищевые (трофические), энергетические и другие связи между собой и внешним миром. Последнее получило специальное определение как социальное поведение (*quorum sensing*) микро-

организмов. Реакция микроорганизмов на изменение условий окружающей среды в биопленке существенно отличается от реакции каждого отдельного вида в монокультуре. Такая организация обеспечивает ее физиологическую и функциональную стабильность и, следовательно, является залогом конкурентного выживания в экологической нише. В организме человека специфическое преимущество такой организации заключается в обеспечении гомеостаза органов, функциональность которых зависит от населяющих их микробов.

Здоровый вид кожи, нормальное пищеварение, устойчивость к внешней инфекции (состояние иммунитета) человека во многом определяют стабильностью, можно сказать, «здоровьем» его микрофлоры.

Преимущество коллективного реагирования имеет и отрицательную сторону: таким сообществом трудно управлять извне. Например – лечить заболевания полимикробного происхождения, когда чувствительность к антибиотикам микроорганизмов, ассоциированных в биопленку, не соответствует таковой, определенной в лабораторных тестах на клинических изолятах чистых культур бактерий. Коллективный иммунитет биопленки практически сводит на нет хорошую идею коррекцию дисбактериозов с помощью пробиотиков – препаратов живых культур ключевых микроорганизмов кишечника – бифидобактерий, лактобацилл, энтеробактерий и других. Несомненно, они создают эффект, но не всегда и не такой, как предполагалось по идее. Это происходит из-за коллективного иммунитета микробиоты (организованной микрофлоры) кишечника. Микробы, выращенные искусственно, являются инородными, как инородны пересаживаемые человеку органы и ткани других людей – доноров, или животных. Они отторгаются вследствие биологической несовместимости. Биотехнологические пробиотики не имеют «пароля» для входа микробов внутрь биопленки кишечника, и поэтому пребывают в нем транзитивно, как микрофлора пищи. Это признают фирмы – производители пробиотиков и не утверждают, что их добавки восполняют физически дефицит соответствующих содержимому пробиотика микроорганизмов, но стимулируют рост ущемленной популяции. Отсутствие приживаемости чужеродных микробов подобного вида есть косвенное доказательство существования микрофлоры человека как самостоятельного органа. Появился термин «парацитология биопленки», как структуры, похожей на ткань высших организмов что подразумевает выполнение в ней законов, ей присущих.

Существует еще множество обстоятельств, в силу которых микробиоту человека следует рассматривать как индивидуально специфичную, генетически детерминированную и, видимо, – наследуемую. Они подробно рассмотрены в трехтомнике проф. Б.А.Шендерова «Медицинская микробная экология и

рациональное питание». На основании такого вывода Б.А.Шендеровым предложена (в виде авторского свидетельства, полученного в начале девяностых годов прошлого века) идея консервации индивидуальной микрофлоры в молодом здоровом периоде жизни конкретного человека с целью дупликации ее в будущем при серьезных нарушениях кишечного биоценоза с целью его оздоровления, даже можно сказать – омоложения. Гастроэнтерологам же известны случаи «пересадки» микрофлоры больному от родственника «переклизм» с положительным эффектом коррекции дисбактериоза кишечника.

Сведения о природе микробиоценоза кишечника, накопленные к настоящему времени, выглядят достаточными для понимания его функционирования, как физиологически активного органа человека. Однако для их реализации в управлении этим органом при патологиях, причинно-следственным образом связанных с дисбактериозом, недостает количественного метода определения изменений в составе достаточно широкого круга ключевых микроорганизмов и их мониторинга в процессе коррекции. Причем желательно анализировать состав пристеночной кишечной микробиоты, а не микрофлоры фекалий, как это принято повсеместно. Именно в мукозном слое, облегающем слизистую оболочку кишечника происходит усвоение пищевого химуса, поступающего из желудка, усвоение необходимых питательных веществ клетками эпителия кишечной стенки а также синтез микроорганизмами большого числа биологически активных веществ: ферментов, витаминов, антибиотиков, иммуностимуляторов, но и токсинов и метаболитов, вредных для человека. Предполагается, что отсутствие баланса в их продукции связано с патологическими проявлениями самого разного характера: кишечные расстройства, кожные заболевания, половые дисфункции и сердечная недостаточность. Микрофлора фекалий является отходом этих процессов, в котором продолжается продукция микроорганизмов, но уже в иных условиях по сравнению с верхними отделами кишечника. По мнению известного специалиста в области клинической микробиологии проф. А.Н.Маянского она отражает скорее полостную (свободноживущую, или планктонную), чем пристеночную биопленку, которая более стабильна и физиологична. Цитируя Маянского в части определения дисбактериоза кишечника по фекалиям нельзя не согласиться, что «Фактически это дорогостоящее (тем более, что тестирование рекомендуется делать в динамике), трудоемкое исследование с невысокой (если не с нулевой) отдачей».

Подходящий для решения такой задачи метод появился в России в начале 90-х годов прошлого века. Он был разработан на базе исследований НИИ биологического приборостроения при поддержке академика РАН Г.А.Заварзина и гранта Министерства экологии и охраны недр РФ «Экологическая безопасность России». Метод основан на выявлении присутствия микроорганизмов

в объектах окружающей среды (воде, почве, стоках и т.п.) по специфическим для них химическим веществам – маркерам из числа жирных кислот, альдегидов и стерина, входящих в состав их клеточной стенки. Специфичность означает, что подобные вещества содержатся только в липидах микроорганизмов и не содержатся в среде их обитания. Поэтому, имея достаточно чувствительный метод анализа их можно обнаружить и измерить количественно непосредственно в среде обитания, избежав необходимости предварительно культивировать их на искусственных средах. Это оказалось возможным сделать с помощью метода газовой хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией (сокращенно – ГХ-МС). Сущность анализа состоит в прямом извлечении с помощью химической процедуры высших жирных кислот из образца, подлежащего исследованию (почвы, ила, клинического материала), их разделения на хроматографе в капиллярной колонке высокого разрешения и анализа состава в динамическом режиме на масс-спектрометре. Поскольку хроматограф соединен в едином приборе с масс-спектрометром и снабжен компьютером с соответствующими программами автоматического анализа и обработки данных, сам процесс анализа занимает 40 мин. Его результатом является определение состава микробных маркеров с точностью 2% относительных. Вместе с пробоподготовкой и расчетом состава микробного сообщества по отдельной программе стандартная процедура контроля 170 микроорганизмов в пробе занимает около 5 часов.

Метод масс-спектрометрии микробных маркеров

Недавно были опубликованы результаты анализа специфических для микроорганизмов длинноцепочечных клеточных жирных кислот (ЖК) в биоптатах стенки тонкой, подвздошной и ободочной кишок (Осипов 2000, 2003; Парфенов 2000). Методом газовой хроматографии - масс-спектрометрии определены ЖК из состава клеточной мембраны и липополисахарида микроорганизмов в биоптатах, полученных во время интестиноскопии и колоноскопии с ретроградной илеоскопией, у пациентов с синдромом раздраженного кишечника (СРК) и здоровых добровольцев. Кровь 14 пациентов с СРК исследована на содержание 135 таких веществ, что дает информацию о 170 таксонах микроорганизмов.

Метод детектирования микроорганизмов по ЖК-маркерам сродни генетическому (ПЦР, определение последовательности нуклеотидов 16SРНК и пр.), поскольку состав жирных кислот детерминирован в ДНК и воспроизводится путем репликации участка генома транспортными РНК и последующего синтеза ЖК в митохондриях по матричным РНК (Альбертс, 1986). Поэтому профиль ЖК бактерий является их визитной карточкой или фингерпринтом как отпечатки пальцев людей (Митрука, 1978). Он так же консервативен, как

строение ДНК, но и так же подвержен мутациям под действием факторов окружающей среды. Стабильность набора жирных кислот, составляющих клетки микробов, подтверждается исследованиями в области бактериальной палеонтологии, которые показывают, что до глубины времен в 2,5 млрд лет состав ЖК отдельных микробов и пула их жирных кислот в целом остается постоянным (Shekhovtsova, 2003).

По этому принципу построена хемодифференциация микроорганизмов, которая широко используется как метод их идентификации и подтверждения таксономического положения (Chemical Methods.. 1985). Он применяется для работы с микроорганизмами, изолированными в чистых культурах и основан на использовании очень больших баз данных, содержащих сведения о составе жирных кислот нескольких тысяч штаммов бактерий и микроскопических грибов. Примером такой системы является специализированный хроматограф Microbial Identification System, выпускаемый фирмой MIDI Inc., Делавер, США [Stead, 1992]. Особенности состава жирных кислот теперь используют наряду с другими параметрами в бактериальной таксономии [Определитель бактерий Берджи, 1997]) и клинической бактериальной диагностике [Вейант и др.,].

Известно, что разные микроорганизмы в составе липидов клеточной стенки имеют в сумме около 200 ЖК, отличающих их от клеток организма человека. При этом оказалось, что в группе клинически значимых микроорганизмов некоторые вещества соотносятся только с одним таксоном. Число клеток или вес таких микроорганизмов вычисляют по концентрации вещества - маркера, используя известные данные по содержанию ЖК в микробной клетке и калибровки прибора.

Площадь пика маркера пропорциональна его концентрации, а следовательно, концентрации соответствующего микроорганизма, которая определяется как число клеток N_1 в единице объема или веса пробы по формуле:

$$N_1 = A_i [Mst / (q_2 \cdot M_{sam} \cdot Ast)] / Ri_1$$
, где выражение в квадратных скобках, постоянный коэффициент $k = Mst / q_2 / M_{sam} / Ast = Mst(mg) / 5,1 \times 10^{(-15)} g / M_{sam}(mg) / Ast$

В этих формулах A_i - площадь пика маркера, Mst - количество введенного в пробу стандарта в мг, M_{sam} - соответственно, количество пробы, Ast - площадь пика стандарта, Ri_1 - доля в % маркера с индексом i в профиле ЖК определяемого микроба с номером 1 (N_1), q_2 - коэффициент, равный $5,1 \times 10^{(-15)} g$, в котором содержится основополагающая в пересчете на число клеток величина $5,9 \times 10^{12}$ клеток микробов, содержащихся в 1г микробной биомассы и доля ЖК в клетке, принятая в среднем равной 3%.

Соответственно, число клеток любого следующего микроорганизма можно рассчитать по аналогичной формуле $N_2 = A_i \times k / Ri_2$ и так далее, умножая площади пика A_i маркера, по которому проводятся вычисления, на

коэффициент k и доля на долю маркера в % в составе ЖК этого микроорганизма. Здесь мы не будем касаться случая, когда одна и та же ЖК происходит из клеток разных микроорганизмов и для разделения компонентов требуется использование более сложных расчетов. Они аналогичны описанным ранее для экологических микробных сообществ (Турова, 1996).

Тестирование метода масс спектрометрии микробных маркеров по фекалиям

Исследование состава микробиоты кишечной стенки методом ГХ-МС по клеточным жирным кислотам ранее не проводилось. Кроме того, отсутствуют количественные данные состава ее микроорганизмов, измеренные каким-либо общеизвестным способом. Тем самым мы лишены возможности сопоставления наших результатов с референтными значениями. Поэтому, нам пришлось, в рамках настоящего исследования измерить также микрофлору фекалий в отдельных пробах здоровых людей разного возраста и пола, а также переходного стула и мекония новорожденных (табл. 1). Поскольку она изучена более подробно в качественном и количественном отношении, мы использовали микрофлору фекалий в качестве референтного материала, с тем, чтобы обосновать достоверность данных анализа микробиоты кишечной стенки и других объектов методом масс-спектрометрии микробных маркеров.

Таблица 1

Результаты исследования состава микроорганизмов фекалий здоровых людей возрастного диапазона 12-60 лет, а также мекония и переходного стула новорожденных.

Метод газовой хроматографии - масс-спектрометрии липидных маркеров (кл/г х10*6)

	Возраст и пол	12л м	40л ж	40л м	60л м	30л ж	Ребенок 5дн	Меконий
	Микроорганизм	Copr1N	Copr2N	Copr3N	CoprN	Copr4N	Stul_5d	Mec12h
1	<i>Eubacterium lentum</i> 7741	1969	0	282	156	0	140	64
2	<i>Eubacterium lentum</i>	2414	11008	4334	2636	11767	0	77
3	<i>Eubacterium moniliforme</i>	568	5465	892	0	1874	0	164
4	<i>Eubacterium sp 1</i>	8725	17462	12026	1848	15148	0	0
5	<i>Eubacterium</i> (основная группа)	13559	126925	93218	14218	26017	10	3
6	<i>Eubacterium sp</i>	0	0	3648	0	1517	0	0
7	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> (зрелая)	6595	24680	9725		18835	0	0
8	<i>Ruminococcus</i>	65	0	30	30	2356	618	340
9	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	19	114	37	27	52	0	38
10	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	2355	0	15192	2964	0	940	5126
11	<i>Clostridium histolyticum</i>	121	83	388	6	0	0	11
12	<i>Clostridium propionicum</i>	3348	13269	13942	384	0	1657	0
13	<i>Clostridium ramosum</i>	54	0	0	22	20062	1199	496
14	<i>Cl.difficile</i>	242	2831	684	820	1016	1173	830

№	Микроорганизм	Copr1N	Copr2N	Copr3N	CoprN	Copr4N	Stul_5d	Mec12h
15	<i>Clostridium perfringens</i>	1186	63808	44698	9401	152478	68826	4
16	<i>Bacteroides hypermegas</i>	45	278	163	99	183	0	0
17	<i>Porphyromonas</i>	15	97	39	82	32	0	0
18	<i>Prevotella</i>	2583	7841	7557	8149	0	0	56
19	<i>Bacteroides fragilis</i>	394	1718	1340	3223	1149	0	1
20	<i>Bacteroides ruminicola</i>	1325	3730	2769		1723	0	0
21	<i>Fusobacterium</i>	0	1261	129	428	46	555	0
22	<i>Propionibacterium acnes</i>	323	1068	388	2545	0	0	36
23	<i>Propionibacterium</i>	161	70	698	0	820	0	0
24	<i>Bifidobacterium</i>	3411	9375	10723	3191	8234	230	0
25	<i>Lactobacillus</i>	1211	37195	30510	2094	77247	2203	987
26	<i>Helicobacter pylori</i> , h18	114	4985	2134	368	56037	480	19
27	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18	62	42	42	0	0	0
28	<i>Acinetobacter</i>	48	93	125	539	545	52	0
29	<i>Stenotrophomonas multophila</i>	0	45	24	0	0	0	0
30	<i>Klebsiella 2h14</i>	0	0	84	159	393	1153	104
31	<i>Flavobacterium</i>	2	65	0	25	0	32	0
32	<i>E.coli</i>	53	98	0	0	1773	445	0
33	<i>Campylobacter mucosalis</i>	35	45	18	0	61	0	63
34	<i>Bacillus cereus</i>	209	683	284	181	859	0	73
35	<i>Bacillus megaterium</i>	0	0	0	0	4359	34	13
36	<i>Enterococcus</i>	234	2516	669	921	1337	3070	20
37	<i>Staphylococcus</i>	71	463	121	1991	434	422	206
38	<i>Streptococcus 10:0</i>	1298	2315	1691	0	21600	2018	251
39	<i>Streptococcus</i>	0	0	641	0	1536	0	352
40	<i>Enterococcus faecalis</i>	2059	0	4649		3453	0	0
41	<i>S.intermedius,i17</i>	82	5402	2061	0	5000	1341	0
42	<i>Corineform CDC</i>	0	2231	65	0	289	589	0
43	<i>Nocardia</i> , 14:1d11	78	185	7	70	59	0	57
44	<i>Актиномицеты 10Me15</i>	17	0	0	34	53	52	56
45	<i>Pseudonocardia</i>	9	3	34	477	0	62	78
46	<i>Streptomyces</i>	594	5796	1522	518	2327	309	539
47	<i>Rhodococcus</i>	58	280	127	74	1092	334	350
48	<i>Mycobacterium/Candida</i>	0	0	0	0	4914	651	82
49	<i>Actinomadura</i>	30	0	0	0	69	0	0
50	<i>Nocardia asteroides</i>	134	0	108	0	4376	0	199
51	<i>Актиномицеты 10Me14</i>	50	159	92	54	135	750	135
52	Микр грибы	1493	4073	1430	1173	697	10598	167
53	Микр грибы	2895	5178	888	8	3664	12329	294
54	Микр грибы	30	2982	286		49	0	0
55	Цитомегаловирус	21	0	8	0	95	0	7
56	<i>Herpes</i>	0	0	0	13	24	110	151
	Сумма	60296	365939	270514	57721	455665	112270	11291
	Сумма анаэробов	50800	333264	255545	52691	396593	78030	8252
	Доля анаэробов, %	84	91	94	91	87	70	73

Микроорганизмы в таблице распределены по группам: в верхней части все анаэробы во главе с лидирующим в количественном отношении родом

Eubacterium. Далее по ранжиру следуют клостридии, бактероиды, лактобациллы и бифидобактерии. Для людей с оформленной микробиотой кишечника их доля составляет 84-94% от суммы по данным наших измерений (строка в нижней части табл. 1). Аэробы представлены в основном кокками разных таксонов, аэробными актиномицетами (актинобактериями) и микроскопическими грибами. Энтеробактерии, псевдомонады, другие грамотрицательные аэробы и вирусы присутствуют в минорных концентрациях.

Данные по микрофлоре фекалий получены у практически здоровых людей разного пола и возраста. Как видно из таблицы, количественный состав микроорганизмов и их сумма резко различны. Вариации по сумме составляют порядок, а по отдельным микробам до двух порядков и более. Например, порядок по бифидобактериям, два порядка по лактобациллам, три порядка по пропионовым бактериям, хеликобактеру и *Clostridium ramosum*. Результат еще раз свидетельствует о нестабильности состава фекалий и, следовательно, проблематичности его использования для оценки изменений микрофлоры кишечника: колебания в норме перекрывают патологические сдвиги. Сам факт существования этих микроорганизмов в составе фекалий известен, но из отдельных измерений в разных лабораториях, а также обобщений в руководствах. В этом свете таблица содержит подтверждение известных данных, но сразу многих в одном анализе и с большой точностью по сравнению с культуральным и, пожалуй, генетическим (FISH) методами.

Для подтверждения достоверности этих и последующих измерений методом ГХ-МС микробных маркеров приводим их сопоставление с известными количественными данными, полученными культурально-биохимическим и генетическим методами (табл. 2).

Таблица 2

Сопоставление данных анализа микробиоты фекалий генетическим, культурально-биохимическим и масс-спектрометрическим методами.

	Состав микробиоты фекалий взрослых людей, клеток/г мокрого веса				
	Масс-спектрометрия	Генетический метод, Harmsen, 2002	Культуральный метод		
			Бондаренко, 2003	Маянский (Schaechter)	Фирма Hoechst (сух.вес.)
Общая численность	$0,6-5 \times 10^{11}$	$3,5 \times 10^{10}$	$10^{10} - 10^{11}$	$10^{10} - 10^{12}$	2×10^{11}
Доля анаэробов, %	84-94	До 100	90-95	До 100	33-100
Eubacterium	10^{11}	$7,1 \times 10^9$	$10^9 - 10^{10}$	$10^9 - 10^{12}$	3×10^{10}
Бактероиды	10^{10}	$9,5 \times 10^9$	$10^9 - 10^{10}$	$10^{10} - 10^{12}$	10^{11}
Клостридии	6×10^{10}	$7,9 \times 10^9$	$10^5 - 10^8$	$10^5 - 10^{11}$	3×10^{10}
Бифидобактерии	10^{10}	$1,7 \times 10^9$	$10^9 - 10^{10}$	$10^8 - 10^{12}$	2×10^8

Полученная методом ГХ-МС общая численность микроорганизмов фекалий находится в пределах интервала значений $0,6-5 \times 10^{11}$ кл/г, что согласуется с известными литературными данными измерений генетическим и культурально-биохимическим методами. Совпадает с известными оценками и относительное количество анаэробов в них, которое по этим данным составляет 88%. Родовое распределение трудно сравнивать с литературными данными, так как в них приводится очень широкий диапазон значений, - в пределах 3-6 порядков. Тем не менее, совпадает оценка о приоритете рода Eubacterium, численность которых имеет порядок 10^{11} кл/г ($10^9 - 10^{12}$ по литературным данным), о количестве бактероидов 10^{10} кл/г ($10^{10} - 10^{12}$ по известным данным), клостридий - 6×10^{10} кл/г ($10^5 - 10^{11}$ соответственно), бифидобактерий 10^{10} кл/г ($10^{10} - 10^{12}$), а также по энтерококкам, энтеробактериям, лактобациллам и стафилококкам. Этот результат позволяет утверждать что анализ микробиоты фекалий методом ГХ-МС по жирным кислотам клеточной стенки микроорганизмов дает достоверные данные об их численности. Следовательно, можно считать так же достоверными приводимые здесь сведения о составе микроорганизмов в биоптатах кишечной стенки.

Результаты разных исследований микробиоты фекалий отводят бифидобактериям в их составе почти от 100% до 0,1%. Диапазон в три порядка вряд ли вызван межлабораторной воспроизводимостью - в каждом исследовании приводится серьезная статистика и добросовестная аналитическая процедура. Разницу следует, скорее, отнести к особенностям самого материала и точностью сопоставляемых методов количественных измерений. Не вдаваясь в детали, можно заключить, что эффект доминирования бифидобактерий создает рутинная практика анализа только бифидобактерий, иногда лактобацилл, еще реже - клостридий и бактероидов в сопоставлении с долей условно-патогенной микрофлоры при исследованиях дисбактериозов. Как видно из поля зрения микробиолога при этом выпадают эубактерии, бактероиды и клостридии, которых в фекалиях по современным оценкам по крайней мере в несколько раз больше, чем бифидобактерий. Это заблуждение выглядит естественным, если вспомнить, что в рамках общей микробиологии принято считать, что в микробном сообществе в среднем культивируемыми являются не более 20% микроорганизмов любого местообитания. Что касается фекалий, то по оценкам молекулярно-генетическими методами так же оказывается, что определение 60-80% их микробиоценоза не доступно для культуральных методов. Данные масс-спектрометрии коррелируют с генетическими (в рамках сопоставимости микробиологических количественных измерений) и одинаково показывают, что эубактерий, бактероидов и клостридий вместе и по отдельности на порядок больше, чем бифидобактерий.

Состав микроорганизмов пристеночной микробиоты кишечника

При ГХ-МС исследовании фракций ЖК в биоптатах кишечной стенки и пробах крови практически здоровых людей и пациентов с дисбактериозами найдено, что основными компонентами (на уровне относительного содержания более 1%) являются четные кислоты с 12 - 18 атомами углерода: C18:1, C16:0, C18:2, C18:0, C16:1 (в порядке уменьшения содержания в профиле ЖК), а также полиненасыщенные ЖК C20:n, C22:n, холестерин, альдегиды и 2-оксикислоты. Иногда величину 1% превышает содержание длинноцепочечных кислот C20 - C26. Нечетные кислоты - C15:0 и C17:0 составляют около 1% каждая.

Перечисленные выше вещества являются липидными компонентами клеток организма человека и составляют естественный фон, на котором в исследованных пробах выявлены минорные компоненты, не характерные для макроорганизма. Хроматограммы, полученные по методу селективных ионов, позволяют уверенно детектировать микробные компоненты на фоне преобладающих компонентов слизистой кишечника (рис. 1).

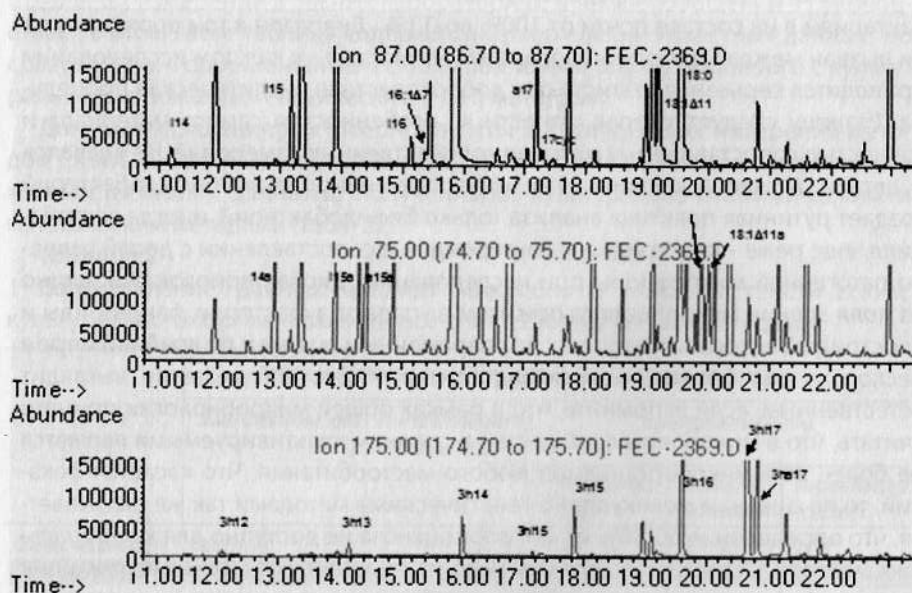


Рис. 1. Single ion monitoring chromatograms represent fractions of fecal fatty acids (ion 87, upper plot), fatty aldehydes (ion 75, in the middle) and hydroxyl FA (ion 175, lower plot). Nick names of substances and associated microbes listed in table 4.



Рис. 2. Состав основных микроорганизмов тощей кишки по данным масс-спектрометрии микробных маркеров биоптата.

Концентрация микробных маркеров, а следовательно, и соответствующих им микроорганизмов пристеночного слоя кишечника (табл. 3, Рис. 2 – круговая диаграмма таксонов) в биоптатах кишечной стенки здоровых людей по порядку величины оказалась одинаковой для тощей, подвздошной и толстой кишок ($0,6 - 1 \times 10^{11}$ кл/г, но существенно меньшей по сравнению с фекалиями ($2,7 \times 10^{11}$ кл/г). По данным табл. 3 общая удельная численность микроорганизмов в пристеночном слое ободочной кишки (далее будем говорить просто в ободочной или другой кишке, имея в виду биоптат кишечной стенки вместе с мукозным слоем) в два с половиной раза меньше, чем в фекалиях, но доля анаэробов так же составляет 89%. Однако родовой состав внутри группы анаэробов иной, чем в фекалиях. На стенке больше втрое концентрация бифидобактерий, но меньше лактобацилл и эубактерий. Причем у последних изменен и видовой состав по сравнению с фекальным. Интересно отметить, что концентрация *C. perfringens* на три порядка меньше в пристеночном слое как ободочной, так и подвздошной кишки, чем в фекалиях, но снова увеличивается в тощей. Это означает практически, что фекалии являются основным местообитанием этих бактерий, а также *C. propionicum*. Другие клостридии, *C. histolyticum* и *C. difficile* сохраняют порядок величины по отделам кишечника и в фекалиях (около 10^3), а *C. ramosum* не обнаруживается в фекалиях, но ее численность растет от 10^8 в ободочной до 10^9 в тощей кишке. Следующей по численности группой в фекалиях являются факультативные анаэробы – энтеробактерии и энтерококки, в основном, за счет *E. faecalis*, который не обнаруживается в подвздошной и тощей кишках, тогда как прочие энтерококки, хеликобактер и клебсиеллы равномерно заселяют кишечник и фекалии.

E.coli и другие бактерии сем. Enterobacteriaceae в норме обнаруживаются методом ГХ-МС только в кишечной стенке, а Campylobacter mucosalis – только в фекалиях.

Таблица 3.

Состав микроорганизмов стенки кишечника и в фекалиях по группам

Группы и таксоны микроорганизмов	Численность, кл/г, $\times 10^6$			
	Тошная	Подвздошная	Ободочная	Фекалии
Кокки, бациллы, коринебактерии				
Streptococcus (Lactococcus)	261	253	1170	1691
Bacillus cereus	0	51	157	284
Bacillus megaterium	90	0	0	0
Corineform (Listeria) a17	1398	439	713	65
Staphylococcus	616	410	490	121
Streptococcus (оральные)	1642	127	2	641
Сумма	4006	1281	2533	2803
Анаэробы				
Eubacterium lentum	98	675	670	4334
Clostridium histolyticum	692	467	849	388
Peptostreptococcus anaerobius	487	330	423	37
Clostridium propionicum	1237	150	0	13942
Bacteroides hypermegas	0	0	0	163
Clostridium ramosum	3892	1942	118	0
Fusobacterium	0	0	0	129
Porphyromonas	0	0	0	39
Lactobacillus	17355	17190	16231	30510
Eubacterium moniliforme	0	0	0	892
Cl.difficile	1769	861	1055	684
Prevotella	620	583	345	7557
Eubacterium (основная группа)	6832	11497	24457	12026
Bacteroides fragilis	0	63	43	1340
Bifidobacterium	5249	7108	31886	10723
Clostridium perfringens	224	50	43	44698
Eubacterium	27	1548	3549	93218
Propionibacterium (P.freudenreichii)	12777	1057	13086	3648
Propionibacterium acnes	0	0	359	388
Ruminococcus	804	800	1364	30
E.lentum 7741	93	56	0	282
Bacteroides ruminicola	0	7	9	2769
Eubacterium spp.	365	265	5650	9725
Propionibacterium	0	0	0	698
Сумма	52520	44648	100138	238219

Аэробные актиномицеты	Тошная	Подвздошная	Ободочная	Фекалии
Nocardia, 14:1d11	1595	0	1136	7
Актиномицеты	797	289	105	0
Pseudonocardia	215	7	85	34
Streptomyces	493	392	329	1522
Rhodococcus	1588	792	698	127
Mycobacterium/Candida	3025	3184	3257	0
Actinomadure	151	0	12	0
Nocardia asteroides	1782	0	609	108
Actinomycetes 10Me14	3652	3196	2328	92
Сумма	13297	7859	8558	1891
Грам (-) палочки	0	0	0	125
Acinetobacter	0	0	0	42
Pseudomonas aeruginosa	0	0	0	24
Stenotrophomonas maltophilia	0	0	0	191
Сумма	146	261	190	84
Энтеробактерии и энтерококки	0	0	0	18
Klebsiella /Sphingomonas 2h14	20	21	25	0
Campylobacter mucosalis	529	141	92	2134
E.coli	783	484	1252	669
Helicobacter pylori, h18	0	0	530	4649
Enterococcus	1478	907	2089	7554
Enterococcus faecalis	216	375	112	1430
Сумма	197	422	56	888
Микроскопические грибы	0	0	0	286
Микр грибы (кампестерол)	413	797	168	2604
Микр грибы (ситостерол)	216	113	203	0
Микр грибы (эргостерол)	919	31	26	8
Сумма	1135	144	230	8
Вирусы				
Herpes				
Цитомегаловирус				
Сумма				
Не идентифицированы				
Маркер i14	0	840	92	15192
Маркер i17	3066	1549	0	2061
Сумма	3066	2389	92	17253
Общая сумма	75915	57772	112637	270523

Существенную долю (17%, $1,3 \times 10^{10}$ кл/г) микробиоты тощей кишки (в фекалиях – на порядок меньше) составляют аэробные актиномицеты (актинобактерии – по современной классификации микроорганизмов). В специализированных лабораториях подтверждено их наличие на слизистых оболочках и коже человека и животных, а также их участие в воспалительных процессах. Они не доступны рутинному клиническому контролю, однако, благодаря наличию уникальных молекулярных маркеров могут быть обнаружены и количественно измерены методом масс-спектрометрии. Далее по численности следуют аэробные кокки (стафилококки, стрептококки, энтерококки и коринеформные бактерии) – около 5% в тощей кишке и 1% в фекалиях.

В результате удалось измерить концентрацию микробных компонентов непосредственно в месте обитания, где присутствуют сами клетки микробов кишечной стенки. Поэтому мы вправе делать прямые доступные нам сопоставления между концентрацией маркеров и числом микробных клеток в условиях отсутствия пищевой липидной компоненты, поскольку биоптаты получали натощак. Такая логика убеждает в том, что измерена ведущая микрофлора кишечной стенки. Ведущая в количественном отношении, так как оказалось, что при наличии биоптата весом 4 мг можно детектировать микроорганизмы начиная с концентрации 10^4 - 10^5 кл/г, поэтому, значительная часть минорной микрофлоры осталась вне поля зрения. Как оказалось, общая численность микроорганизмов кишечной стенки в норме имеет величину в пределах $(0,5-1,3) \times 10^{11}$ кл/г в зависимости от отдела кишечника (табл. 3).

Плотность заселения стенки кишечника в дистальном направлении меняется мало: в подвздошной кишке она в два раза меньше, а в толстой в полтора раза больше, чем в тощей. Пристеночная микрофлора оказалась существенно более концентрированной, чем просветная (по литературным данным [Schaechter, 1993]), которая в тонкой кишке на шесть порядков ниже по численности (до 10^5 кл/мл), в подвздошной кишке – на порядок выше, а в ободочной кишке соответствует таковой в ее содержимом. Видовой состав микроорганизмов соответствует известным представлениям о компонентах кишечной микрофлоры, в особенности – микроорганизмов фекалий [24]. Однако сходство ограничивается категориями общего характера: качественного состава и приоритетного (рангового) содержания основных элементов кишечного микробиоценоза. Действительно, в толстом кишечнике и фекалиях существенно больше анаэробов.

Основную долю (от 70% в тощей кишке до 88 в фекалиях) микроорганизмов во всех отделах кишечника составляют анаэробы. Второе место по численности в тощей кишке занимают актиномицеты – 17% (в фекалиях их всего 0,7 %) соответственно. Аэробные кокки (стафилококки, стрептококки, энтерококки и коринеформные бактерии) – составляют 5% колонизации тонкого кишечника

по сравнению с 0,7 % в фекалиях. Доля энтеробактерий и энтерококков по отделам кишечника и в фекалиях близка к 2%.

Неожиданным результатом, несомненно, является обнаружение значительного количества аэробных актиномицетов. Специфичность их маркеров – разветвленных жирных кислот с метильной группой в положении $\Delta 10$ не позволяет предполагать какие-либо иные таксономические группы микроорганизмов, кроме представителей порядка Actinomycetales, содержащих в составе клеточной стенки миколовые кислоты, являющиеся источником 10 Me-разветвленных ЖК. Они содержатся в микобактериях, нокардиях, родоках, Actinomadura spp. и других актиномицетах, но не найдены у высших организмов (в грибах, растениях, животных). Присутствие этих молекул в биоптатах кишечника, крови и других органах и жидкостях человека подтверждается масс-спектрами в хроматографическом пике и относительным хроматографическим временем удерживания, а также их анализом в составе музейных культур соответствующих микроорганизмов. Бактерии родов Streptomyces и Nocardiosis подтверждены также уникальным маркером изо-гексадекановой кислотой (i16). Кроме того, профиль разветвленных ЖК специфичных для стрептомицетов выявлен в крови септических больных [ISIAM, Abstract], а Nocardiosis dassonvillei выделен в чистой культуре из кишечника в настоящем исследовании. Список актиномицетов на самом деле шире, чем это показано в первой группе табл. 3. Сюда следует добавить анаэробные актиномицеты и близкие к ним микроорганизмы. Это Propionibacterium, Actinomyces, Brevibacterium, которые также выделены в чистой культуре и коринеформные бактерии. Наконец, если учесть, что до настоящего времени в некоторых руководствах по микробиологии, как и ранее [Bergi, 8-th Ed.], род Bifidobacterium относят к семейству Actinomycetaceae, то окажется, что актиномицеты филогенетически близки традиционно известным представителям пристеночной микробиоты кишечника. С ними возрастает значимость микробиоты кишечника для организма хозяина, так как актиномицеты превосходят все прочие микроорганизмы по продукции антибиотиков и витаминов и обладают мощным ферментативным аппаратом. Высокая степень колонизации кишечника актиномицетами не выглядит необычным явлением, если иметь в виду, что они широко распространены в окружающей среде – почве, воде, воздухе, на внутренних стенах жилых и производственных помещений [Andersen]. Их обитание в организме человека при таких обстоятельствах выглядит естественным. Действительно, в руководствах по клинической микробиологии отмечается обнаружение актиномицетов и родственных организмов, таких как Mycobacterium, Actinomadura, Propionibacterium, Actinomyces, Corynebacterium, Bifidobacterium в кишечнике и других органах человека. Они известны (в том числе и бифидобактерии) как участники инфекционных и воспалительных

процессов. Однако патогенность актиномицетов, чувствительность к антибиотикам, способы лечения связанных с ними заболеваний являются предметом единичных специализированных лабораторий и клиник. Трудности в их бактериальной диагностике и культивировании послужили препятствием широкой известности этих микроорганизмов в клинической практике. В том числе при многочисленных заболеваниях, связанных с изменением микробиоты кишечника.

Итак, применение масс-спектрометрического метода дало возможность измерить численность более 50 таксонов микроорганизмов кишечника не только в фекалиях, но и в отделах самого кишечника, путем анализа их маркеров (жирных кислот) непосредственно в биоптатах, полученных при интестиноскопии и колоноскопии с ретроградной илеоскопией. Эти данные показывают, что там также доминируют зубактерии, а их видовой состав существенно меняется по длине кишечника. Следует отметить филогенетическое родство зубактерий и клостридий. В определителе Берджи 9-го издания прямо сказано, что род *Eubacterium* создан для удобства, чтобы поместить в него слабо спорообразующие клостридии. Если отметить еще известную, и до сих пор не упорядоченную, гетерогенность обеих родов, то можно видеть, что **кишечная микробиота представляет собой доминирующий континуум штаммов и видов родов *Clostridium* и *Eubacterium* в их сегодняшнем написании при равновеликом суммарном количестве бактериоидов, бифидобактерий и лактобацилл**. На долю остального биоразнообразия микроорганизмов кишечника (по данным масс-спектрометрии) приходится до 10% в фекалиях и пристеночном слое ободочной кишки и до 30% в тощей кишке. О том, что роды клостридий и зубактерий близки генетически, свидетельствует отсутствие на сегодня специфичные зонды для каждого рода. Зонды, сконструированные для клостридий перекрестно, определяют зубактерии и наоборот. Например, зонд, предложенный для определения группы новых клостридий во главе с *C.coccoides* (обнаружен в кишечнике в 1997г) включает в группу кроме зубактерий еще и руминококки.

Приведенные данные свидетельствуют о важности рода *Eubacterium* в формировании и функционировании кишечной микробиоты. Теперь уже трудно, после проведенного анализа филогенетических связей, оторвать его от рода *Clostridium* (по крайней мере группы *C.coccoides*) и рассматривать их как пищеварительно важную группу протеолитических и целлюлолитических организмов. Следует отметить принципиально важную особенность представителей рода *Eubacterium*, заключающуюся в способности образовывать водород. Это ключевое свойство консорциумов микроорганизмов, осуществляющих дайджест органического субстрата при анаэробных процессах в природе (болота), в рубце жвачных и в биотехнологии при анаэробном сбраживании разного рода отходов и получении биогаза. Мукозный слой

кишечника человека по существу является аналогичным биореактором. Там идет образование метана, следовательно, работают археобактерии-метаногены, продуктивность которых строго зависима от концентрации водорода в системе. В метаногенном сообществе водородные бактерии играют ключевую регуляторную роль еще и благодаря обратной связи процесса продукции и потребления водорода на первичный процесс расщепления углеводов с образованием ацетата. При СРК, как следует из наших измерений, наибольший избыточный рост обнаруживают зубактерии, что должно приводить к увеличению концентрации водорода в системе. Действительно, ранее экспериментально показано четырехкратное увеличение концентрации водорода в выдыхаемом воздухе у больных с СРК (King, 1998) и его возвращение в норму при снятии симптомов в результате ограничительной диеты.

Чтобы подтвердить выявленные по ЖК маркерам микроорганизмы часть биоптатов разных пациентов были посеяны на питательные среды в аэробных условиях. При этом было выделено 52 штамма бактерий, аэробных актиномицетов, дрожжей и грибов. По данным световой и электронной микроскопии колоний, биохимическим тестам, профилям жирных кислот (MIS, Sherlock), при подтверждении идентификации методом ГХ-МС выявлено 26 таксонов на уровне рода или вида (табл. 4).

Таблица 4

Перечень родов микроорганизмов, выделенных в чистом виде и идентифицированных при посеве биоптатов кишечника на питательные среды (в скобках - число видов, если больше одного)

• Acinetobacter	• Candida (2)	• Nocardiosis
Actinomyces	Chrisebacterium	Ochrobactrum
• Alcaligenes	• Citrobacter	• Penicillium
Aspergillus	Comamonas	Peptostreptococcus
• Bacillus (8)	• Enterococcus	• Propionibacterium
Bacteroides	Enterobacter	Pseudomonas (3)
• Bifidobacterium	• Helicobacter	• Proteus
Brevibacterium	Lactobacillus	Stenotrophomonas
• Campylobacter	• Leuconostoc	• Streptococcus

В таблицу включены два представителя анаэробной микрофлоры: *Peptostreptococcus anaerobius*, выделенный в анаэроstate и *Actinomyces viscosus*, выявленный в накопительной культуре при посеве во флаконы БАСТЕС на среду для анаэробов. Эти организмы определены методом ГХ-МС по составу ЖК. В первом случае благодаря чувствительности метода, позволившей провести идентификацию *P.anaerobius* из малых колоний (около 1 мм

диаметром), образовавшихся при первичном посеве на твердую среду. Во втором случае, благодаря его селективности: микробные жирные кислоты были выделены на фоне компонентов питательной среды. Состав жирных кислот колоний из толщи агара позволяет предполагать в них наличие более одного вида микроорганизмов (накопительная культура, сообщество микроорганизмов), причем как аэробных, так и анаэробных. Из анаэробов по специфическим признакам можно выделить маркеры бактерий группы *Bacteroides fragilis* (3h17, 3h16 и i15) и лактобацилл (16:1 DMA и 19сус 11,12). Им сопутствуют аэробы *Stenotrophomonas* (маркер i11:0), *Eikenella* (предполагается по паре маркеров 3h10 и 3h12 при отсутствии 2h12), и представители семейства *Enterobacteriaceae*, судя по одновременному присутствию характерных для них маркеров: β -оксимиристиновой кислоты (3h14), *cis*-vacenic acid (18:1w7) and cycloheptanoic acid (17сус). В другой пробе удалось выявить лишь *Propionibacterium avidum* по профилю разветвленных жирных кислот – этот микроб был выделен и при посеве в аэробных условиях, поскольку является аэротолерантным организмом. Основная часть профиля жирных кислот этой пробы (прямопочечные ЖК) наиболее близка к *Pseudomonas alcaligenes*, так как включает одновременно циклопропановые кислоты с 17 и 19 атомами углерода при малых значениях концентраций 3h10 и 3h14, что исключает в совокупности другие псевдомонады и энтеробактерии [41].

Неинвазивный контроль дисбактериозов по микробным маркерам в крови

Исследование крови пациентов и доноров показало соответствие состава минорных ЖК и стеролов в тонкой кишке и в крови и количественную адекватность изменений их концентраций в этих органах при дисбактериозе, ассоциированном с синдромом раздраженной тонкой кишки с преобладанием поносов, болезнью Крона и псориазом. Это означает возможность неинвазивной оценки изменений микрофлоры кишечника по данным анализа крови методом ГХ-МС микробных маркеров.

Наличие маркеров микроорганизмов в крови теоретически обусловлено механизмом иммунного ответа на появление возбудителя. Фагоцитирующие клетки организма человека адсорбируют и переваривают антигены микроорганизмов, в том числе и целые клетки, и выводят продукты лизиса в поток лимфатической и кровеносной систем. Кроме фагоцитоза, клетки микроорганизмов разрушаются под действием других механизмов, в том числе собственного аутолиза клеток и лизиса ферментами белкового компонента крови и других компонентов иммунной защиты. В любом случае разрушение происходит в конечном счете до мономерных составляющих биополимеров. Исходя из основ физиологии обмена биологических жидкостей человека [8], обмен 70% жидкости плазмы с интерстиционным пространством происходит

за 1 мин. Поэтому малые фрагменты микробных биополимеров, образующиеся в этом пространстве, поступают в кровь практически сразу. То есть наличие микробных маркеров в крови отражает состав микробных сообществ тела человека, независимо от места обитания микроорганизмов или очага воспаления.

Однако и в норме, то есть при отсутствии симптомов воспаления или локального инфицирования, концентрация микробных маркеров в крови остается достаточно высокой, что до сих пор не находило разумного объяснения. Полученные в настоящей работе количественные данные о концентрации микроорганизмов на стенке кишечника с очевидностью свидетельствуют о том, что их преимущественным источником является микрофлора кишечника. Поскольку ранее было показано существование гомеостаза микробных маркеров в крови (Белобородова, 1999; Beloborodova, 2000), то в свете вышеизложенного можно говорить о гомеостазе микробиоценоза кишечника. Это является еще одним подтверждением сходства его состава у людей в норме и различия в патологическом состоянии (Шендеров, 3т). Можно провести следующую оценку соотношения количества микробных ЖК в крови с суммарным количеством микробов кишечника. Эксперименты проведены с биоптатами, имеющими характерный размер 2мм. Предположим, что измеренная концентрация микробных клеток относится именно к такому слою слизистой кишечника толщиной 2мм. Тогда, учитывая, что поверхность слизистой кишечника порядка $0,3 \text{ м}^2$ (без учета складок и микроворсинок), объем зондированной слизистой составляет $3 \times 10^3 \text{ см}^2 \times 0,2 \text{ см} = 6 \times 10^2 \text{ см}^3$, т.е. 600г, где по нашим оценкам должно находиться $10^{11} \text{ кл/г} \times 600 \text{ г} = 6 \times 10^{13}$ клеток. Это хорошо согласуется с оценкой общей численности микроорганизмов в теле человека в 10^{14} клеток. По сумме концентраций микробных маркеров в крови здоровых людей соответствующее число микробных клеток, из которых они произошли, равно $2911 \times 10^6 \text{ клеток/мл}$ или $1,4 \times 10^{13}$ клеток в целом, если считать, что объем крови взрослого человека составляет 5 л. Т.е. в кровь попадает примерно 1/5 часть жирных кислот клеток микроорганизмов, колонизирующих кишечник.

То, что корреляция имеет место между кровью и пристеночной микрофлорой тонкой кишки соответствует известным представлениям о биохимии всасывания липидов, витаминов и прочих компонентов пищи, которое происходит именно в тонкой кишке. В его эпителии происходит разборка и повторная сборка глицеридов и поступление их в кровь [Физиология человека, 1996]. Естественно, то же самое происходит, видимо, с липидами отмирающих клеток микроорганизмов, колонизирующих тонкую кишку, или в результате их фагоцитоза. При этом пищевая компонента в наших условиях отсутствует, так как пациенты не принимали пищу, по крайней мере в течение 15 часов до забора биоптата слизистой оболочки кишечника и крови.

Как показывают параллельные измерения концентрации микробных маркеров в крови у тех же пациентов, у которых исследовались биоптаты тонкой кишки, тенденция изменения их концентрации совпадает.

Дисбактериоз при синдроме раздраженной кишки

Обследовано 44 больных СРК с преобладанием диареи. Среди них преобладали мужчины, возраст которых составил 20-45 лет. Диагноз полностью соответствовал «Римским критериям II». Длительность заболевания у 18 больных не превышала 2 лет, у 17 - 3 лет, у 9 - 5 лет. Большинство (29 больных) начало заболевания связывали с перенесенной кишечной инфекцией или пищевой токсикоинфекцией (ПТИ), у других заболевание развивалось постепенно. Протяженность последнего обострения СРК варьировала от 4 до 6 месяцев (у 15 больных - 6 месяцев, 19-5 месяцев и 4 месяца - у 10 больных.). У 31 пациента начало последнего обострения можно было связать с перенесенной ПТИ. Все больные перед поступлением в стационар трижды сдавали посеы кала, в которых выявлено изменение фекальной микрофлоры в сторону снижения содержания бифидо-и лактобактерий с ростом условно-патогенной микрофлоры (кокков, кандид, протей, клебсиелл и клостридий), при этом патогенных энтеробактерий не обнаружено. Все больные без исключения в последние 6 месяцев до поступления в клинику перенесли либо простудные заболевания, либо острую вирусную инфекцию: ОРВИ - 26 пациентов, острый гайморит - 4 пациента, острый ринофарингит - 11 пациент, 3 - острый трахеобронхит. В связи с чем больным проводились курсы антибактериальных препаратов (полусинтетические пенициллины и сульфамилаиды) в сочетании с коротким курсом пробиотиков (бифидумбактерин, бификол, линекс), однако в повторных посевах кала сохранялись изменения фекальной микрофлоры. В отделении патологии тонкой кишки всем пациентам проводилась дуоденоскопия с биопсией слизистой оболочки из тощей кишки. В биоптатах изучалось морфологическое строение слизистой оболочки и микрофлора. При гистологическом исследовании лишь у 9 пациентов обнаружен катаральный еунит без признаков атрофии, у других - слизистая оболочка тонкой кишки имела обычное строение.

У больных СРК обнаружены отклонения от нормы до 30 кратного увеличения или уменьшения концентрации многих маркеров микроорганизмов. Частота таких изменений для тонкой и толстой кишок, а также крови показана в табл. 5. Учитывались только те изменения, которые более чем вдвое отличались от нормы по концентрациям соответствующих маркеров. Это правило выявлено при статистической обработке данных систематических измерений концентраций микробных маркеров в крови [11]. Для части больных (n=14) они измерены одновременно в тонком и толстом кишечнике, а также в крови

Анализ показывает, что у данной группы больных в основном происходит уменьшение концентраций маркеров (13 из 25) тонкой кишки от 2 до 30 раз. Те же самые маркеры обнаруживают уменьшение концентрации в крови (выделены жирным шрифтом цифры в таблице 5). Только 6 маркеров, соответствующих *Enterococcus*, *Candida albicans*, α -*Streptococcus*, *Bacillus*, *Eubacterium* и *Acinetobacter* в большинстве случаев количественно растут. Для 8 микроорганизмов изменения концентраций их маркеров происходят в одну сторону одновременно по кишечнику и в крови. Маркеры энтерококка и кандиды растут, а клебсиелл, *Cl. perfringens*, нокардий, *Bacteroides ureolyticum*, *H. pylori* и *Actinomyces* уменьшаются. Четыре маркера меняются в тонкой и толстой кишке в разные стороны: численность *Peptostreptococcus anaerobius* и *Staphylococcus aureus* уменьшаются в тонкой кишке, но растут в толстой, *Lactobacillus*, напротив, в большинстве случаев растет количественно в тонкой, и уменьшается в толстой кишке.

Таблица 5.

Число случаев увеличения или уменьшения концентрации маркеров микроорганизмов по отделам кишечника и в крови у больных с синдромом раздраженного кишечника.

($\uparrow$ - увеличение, $\downarrow$ - уменьшение более чем в два раза по сравнению с нормой)

№	Микроорганизмы	Краткое обозначение маркера *	Тощая кишка, n=12		Толстая кишка, n=14		Кровь n=14	
			$\uparrow$	$\downarrow$	$\uparrow$	$\downarrow$	$\uparrow$	$\downarrow$
1	<i>Clostridium perfringens</i>	10h18	2	9	3	9	0	8
2	<i>Bacteroides fragilis</i>	hi17	3	0	1	8	1	0
3	<i>Bacillus cereus</i>	a13	6	0	1	9		
4	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	a19			5	0	1	
5	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	i14	1	10	11	0	0	12
6	<i>Propionibacterium</i>	i15	0	10	5	4	1	11
7	<i>Enterococcus</i>	19сус	5	1	8	2	11	3
8	<i>Enterobacteriaceae</i>	17сус	2	1	11	0		
9	<i>Fusobacterium</i>	h14	0	7	4	5	2	11
10	<i>Staphylococcus aureus</i>	a15	0	11	6	2	0	11
11	<i>Acinetobacter</i>	h12					1	
12	<i>Ruminococcus</i>	16:1d11	0	11	1	9	1	9
13	<i>Candida albicans/Mycobacterium</i>	17;1	11	0	5	3	7	0
14	<i>Rhodococcus</i>	10Me16		8	6	2	0	12
15	<i>Streptomyces</i>	i16	0	8	1	2	0	0
16	<i>Clostridium difficile</i>	i18	6	5	3	1	5	9
17	<i>Lactobacillus</i>	18:1d11	9	0	1	13	2	7

который дополнил бы комбинацию препаратов действием на бактериоды. Эффективность пары амоксициллин-метронидазол отмечена в справочнике Видаль-1999 в статье Metronidazole, где его вместе с амоксициллином рекомендуют для лечения, например, вульгарных угрей (акне). Действительно, даже монотерапия метронидазолом стимулирует рост нормальной микрофлоры тонкого кишечника при родственном акне заболевании – себорейном дерматите. На рис. 6 показано изменение состава микробиоты кишечника, измеренной по маркерам в крови больного до и после курса метронидазола (данные совместно с к.м.н. Полеско И.В.). Дефицит бифидобактерий и пропионобактерий, обнаруженный у больного был преодолен, но сохранился первоначальный избыточный рост *Clostridium ramosum*, стрептомицетов и грибов кандиды. Видимо, было бы полезным включить амоксициллин, к которому у клостридий чувствительность на порядок выше, чем к метронидазолу. Стрептомицеты и грибы также требуют применения иных антимикробных средств.

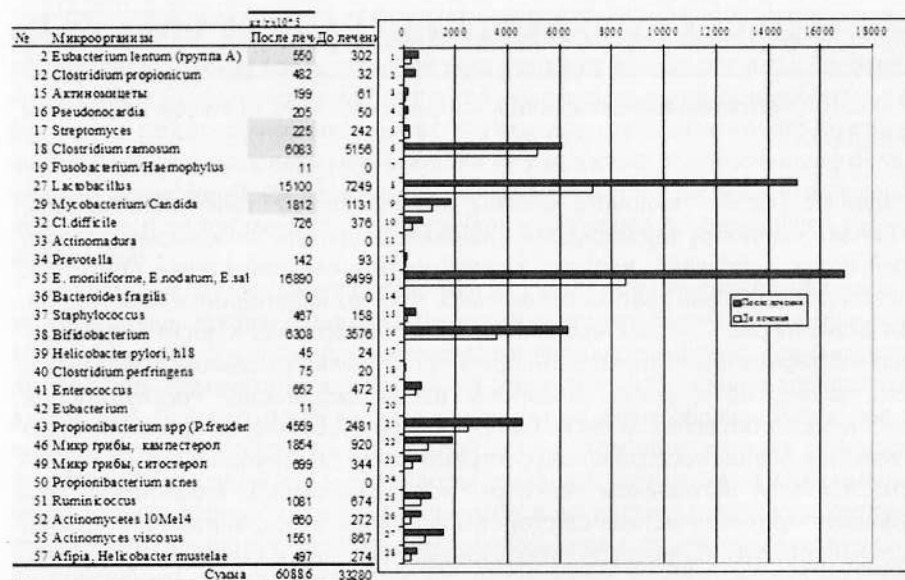


Рис. 6. Метронидазол оказал неожиданное действие, стимулирующее рост нормальной микробиоты кишечника у больного себорейным дерматитом, имевшего дефицит бифидобактерий и пропионобактерий при избытке *Clostridium ramosum*, стрептомицетов и грибов кандиды.

Таблица 6

Количество случаев более чем двукратного превышения нормы (>2N) численности микроорганизмов в тонком кишечнике и соответственно ее уменьшения более чем вдвое (<0,5N) при СРК и ААД

		AAD (n = 17)		IBS (n = 30)	
Микроорганизмы		>2N	<0.5N	>2N	<0.5N
1	<i>Streptococcus</i>	13	3	15	5
2	<i>Eubacterium lentum, i16a</i>	14	5	6	1
3	<i>Bacillus cereus</i>	12	0	19	0
4	<i>Clostridium histolyticum</i>	0	15	0	26
5	<i>Nocardia, 14:1d11</i>	2	11	3	20
6	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	2	17	1	30
7	<i>Acinetobacter</i>	10	0	18	0
8	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12	0	22	0
9	<i>Propionibacterium</i>	2	0	3	0
10	<i>Bacillus megaterium</i>	1	16	2	29
11	<i>Clostridium propionicum</i>	2	9	2	14
12	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	4	0	8	0
13	<i>Bacteroides hypermegas</i>	2	0	3	0
14	Актиномицеты 10Me15	0	16	1	29
15	<i>Pseudonocardia</i>	0	8	0	16
16	<i>Streptomyces</i>	2	12	3	24
17	<i>Clostridium ramosum</i>	1	13	1	21
18	<i>Fusobacterium/Haemophilus</i>	0	0	6	0
19	<i>Sphingomonas</i>	0	4	0	12
20	<i>Flavobacterium</i>	4	0	11	0
21	<i>Rhodococcus</i>	0	12	0	23
22	<i>Porphyromonas</i>	7	0	15	0
23	Коринебактерии групп CDC	1	10	2	16
24	<i>Lactobacillus</i>	4	10	7	14
25	<i>Campylobacter mucosalis</i>	12	0	22	0
26	<i>Mycobacterium/Candida</i>	0	13	1	23
27	<i>E. coli</i>	2	13	7	19
28	<i>Eubacterium moniliforme</i>	3	0	6	0
29	<i>C. difficile</i>	0	12	0	20
30	<i>Actinomyces</i>	0	13	3	24
31	<i>Prevotella</i>	0	17	1	29
32	<i>Eubacterium</i> (основная группа)	11	3	9	7
33	<i>Bacteroides fragilis</i>	10	0	15	0
34	<i>Staphylococcus</i>	1	6	2	11

Микроорганизмы	>2N	<0.5N	>2N	<0.5N
35 <i>Bifidobacterium</i>	5	6	6	10
36 <i>Helicobacter pylori</i>	0	0	1	28
37 <i>Clostridium perfringens</i>	2	7	4	16
38 <i>Enterococcus</i>	2	5	5	10
39 <i>Eubacterium</i>	6	1	13	3
40 <i>Propionibacterium</i>	3	7	1	11
41 <i>Streptococcus</i>	0	12	0	20
42 <i>Herpes</i>	2	8	3	16
43 <i>Microscopic fungi</i>	6	6	10	10
44 <i>Nocardia asteroides</i>	1	9	3	16
45 <i>Cytomegalovirus</i>	0	16	2	28
46 <i>Microscopic fungi</i>	9	3	13	5
47 <i>Propionibacterium acnes</i>	15	0	27	0
51 <i>Ruminococcus</i>	0	6	2	11
48 <i>Actinomyces 10Me14</i>	0	16	0	29
49 <i>E. lentum 7741, 14a</i>	0	15	1	28
50 <i>Enterococcus faecalis</i>	5	0	9	0
51 <i>Eubacterium spp.</i>	1	10	6	18



Рис. 7. Изменение микрофлоры тонкой кишки при ААД

У всех 17 больных ААД также исследовался микробный спектр в биоптатах слизистой оболочки тощей кишки методом ГХ-МС, при которой обнаружен 51 таксон микроорганизмов, концентрация которых определена по молекулярным маркерам непосредственно в биоптате слизистой оболочки кишки (табл 6). Существенные (более, чем в два раза) отклонения в численности колониза-

ции претерпевают многие микроорганизмы - 13 из 50 контролируемых. Особенно часто увеличивается концентрация *Streptococcus* (13 из 17 пациентов), *Bacillus cereus* (12), *Acinetobacter* (10), *Pseudomonas aeruginosa* (12), *Campylobacter mucosalis* (12), *Eubacterium*, основная группа (11), *Bacteroides fragilis* (10), *Propionibacterium acnes* (15) и микроскопических грибов (9), продуцирующих ситостерол. Увеличение численности *Cl. difficile* не наблюдалось. Но обнаруживали превышение нормы колонизации *Cl. Perfringens* - 2 случая и *Cl. propionicum* - 2 случая. Однако, основной тенденцией синдрома является уменьшение численности большинства микроорганизмов, - 22 из 50 контролируемых более чем в 50% случаев. Регулярно уменьшалась численность лактобацилл, клостридий, анаэробного пептострептококка, энтеробактерий и аэробных актиномицетов. Отсюда следует, что причиной ААД является не определенный инфекционный агент, в частности, *Cl. difficile*, а скорее неспецифическое изменение нормальной микрофлоры тощей кишки. Такая ситуация представляется более правдоподобной по сравнению с моноэтиологичным вариантом. Действительно, пациенты принимали различные антибиотики и трудно представить, что у всех оказывался резистентным только один оппортунистический микроорганизм - *Cl. difficile*.

При исследовании микрофлоры тонкой кишки у ряда больных СРК имелись изменения такие же как при ААД (табл 6). В связи с этим можно высказать предположение, что в развитии обострения СРК с преобладанием поносов сыграло роль проведение курсов антибиотиков, которые могли изменить состав и соотношение микроорганизмов в слизистой оболочке тонкой кишки. Длительному сохранению изменений микрофлоры кишечника при СРК способствовало, вероятно, снижение напряженности местного иммунитета. С другой стороны, нарушение микрофлоры ведет к нарушению синтеза биологически активных веществ таких как серотонин, гистамин, которые изменяют моторику кишечника.

Таким образом, однотипность изменений микробиоценоза у ряда больных ААД и СРК с преобладанием поносов объясняется, возможно, применением последними антибиотиков с целью лечения интеркуррентных инфекций.

Дисбактериозы с избыточным ростом микробиоты кишечной стенки

Одним из примеров такого нарушения микробного гомеостаза кишечной стенки является избыточный рост микроорганизмов ободочной кишки при гемаррогическом колите, ассоциированным с антибиотикотерапией. Первоначально в биоптате было обнаружено шестикратное превышение численности микроорганизмов по сравнению с нормой. В результате двух курсов лечения микрофлора нормализована (рис 8). В том числе, снижено до нормы содержание хеликобактера, клостридий, анаэробного пептострепто-

кокка, численность которых более чем на порядок превышала норму. Эти микроорганизмы можно рассматривать как условно-патогенные как по количественному критерию, так и по их специфическим факторам патогенности. Вместе с тем оказалось, что в очаге воспаления численность бифидобактерий до лечения также на порядок превышала норму, что дает повод подозревать их в проявлении патогенных свойств. Известно, что бифидобактерии обнаруживают в качестве агентов воспаления в паховой области. Significant recovery of nonsporulating anaerobic rods from clinical specimens. **Author:** Brook I, Frazier EH **Source** Clin Infect Dis, 16(4): 476-80 1993 Apr.

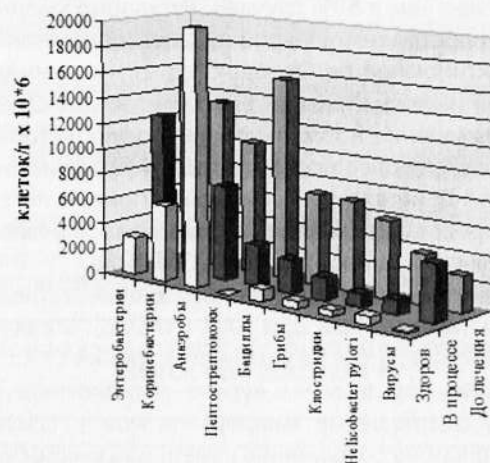


Рис. 8. Избыточный рост микроорганизмов ободочной кишки при гемарогическом колите, ассоциированным с антибиотикотерапией. Контроль в процессе лечения

Микрофлора кишечника и состояние кожи

Стрессовые отклонения от режима рационального питания детей все чаще приводят к нарушению обменных процессов в кишечнике, которые вместе с другими факторами способствуют возникновению атопического дерматита или в экстремальной ситуации язвенного некротического энтероколита. Последнее заболевание в своей этиологии связано с избыточным ростом в кишечнике клостридий перфрингенс, хеликобактера и особенно стрептомицетов, токсическое действие которых оправдывает его название.

Атопический дерматит является ярким примером связи состояния кожных покровов с микрофлорой кишечника. Обследование методом ГХ-МС микробных маркеров пятидесяти детей в возрасте от одного месяца до 12 лет

(совместно с Мазитовой Л.П. и Текучевой Л.В., ЦНИКВИ им. Короленко) выявило систематический избыточный рост в тонком кишечнике эубактерий, клостридий перфрингенс, клостридий дефициле и стрептомицетов, а также превотелл, сфингомонад, энтеробактерий, пропионобактерий, стафилококков, бацилл, анаэробного пептострептококка, хеликобактера. В статистической матрице они дают желтые полосы напротив соответствующих микроорганизмов по всей ее ширине. Отдельными ячейками выделены эпизодические сопутствующие микроорганизмы. В некоторых случаях концентрация микроорганизмов у больных ниже нормы – соответствующие ячейки в матрице помечены бирюзовым цветом. При этом суммарная концентрация микроорганизмов во всех случаях выше нормы.

Abundance

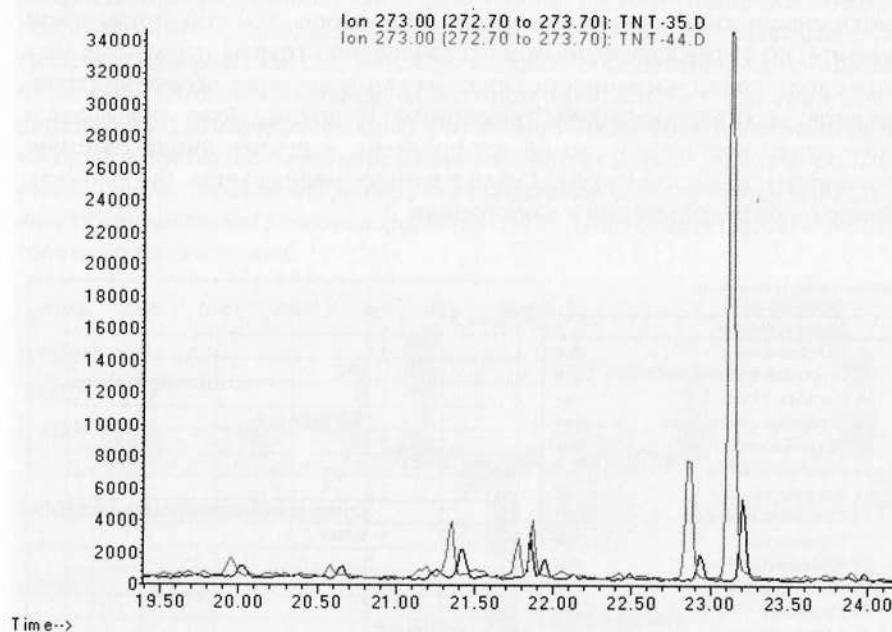


Рис. 9. Хроматографические пики маркеров *Clostridium perfringens* (10-гидрокси-олеиновой и 10-гидрокси-стеариновой кислот – два пика справа) существенно выше у детей с атопическим дерматитом (зеленая, верхняя хроматограмма) по сравнению со здоровыми (нижняя, черная хроматограмма).

Специфика изменений микробиоты при АД состоит в том, что хотя многие микробы приобретают клинически значимые концентрации у всех больных, наблюдается много частых появлений сопутствующих микроорганизмов. Возможно, с этим связана атопика - неопределенность локализации и

характера клинических проявлений этого заболевания.

Результаты исследования изменений состава микроорганизмов в кишечнике при atopическом дерматите свидетельствуют, что здоровье кожи напрямую связано с его стабильностью. Что является первичным, а что вторичным в этом взаимоотношении еще предстоит выяснить. Тем не менее, ясно, что нормализация кишечного биоценоза может облегчить лечение заболевания.

Себорейный дерматит (себорея)

Впоследствии было найдено, что и при других кожных заболеваниях происходят изменения в составе микробиоты тонкого кишечника. В стадии завершения работа по себорейному дерматиту (совместно с акад. Учайкиным В.Ф. и кнм Полеско И.В., РГМУ). Это распространенное заболевание сопровождается иными изменениями кишечной микрофлоры, чем при atopическом дерматите, но также одинаковым у исследованной группы пациентов. При себорее тоже растет численность аэробных актиномицетов, но уже не стрептомицетов, а псевдонокардий, родококков и других. Также повышается концентрация клостридий, но не перфрингенс, а других: видов рамозум, пропионикум и гистолитикум. Одновременно уменьшается численность зубактерий, бифидобактерий и лактобацилл.

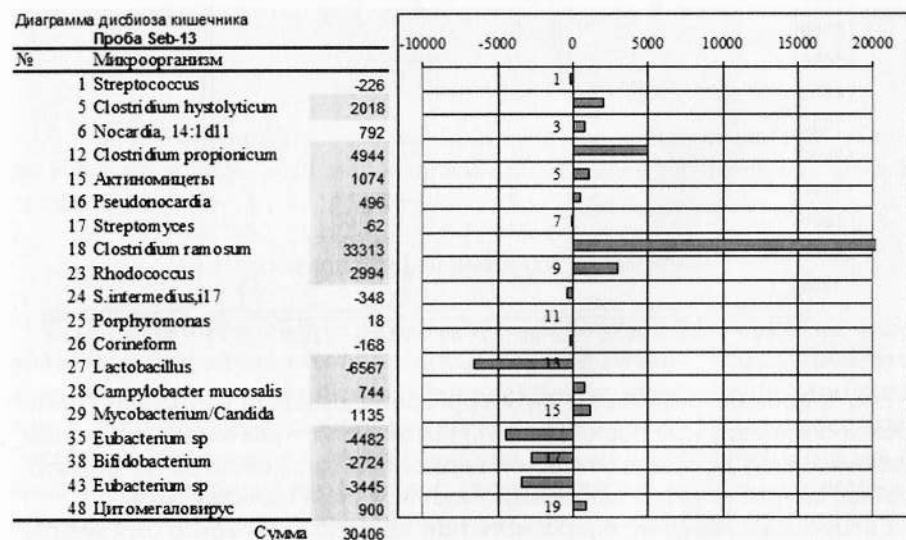
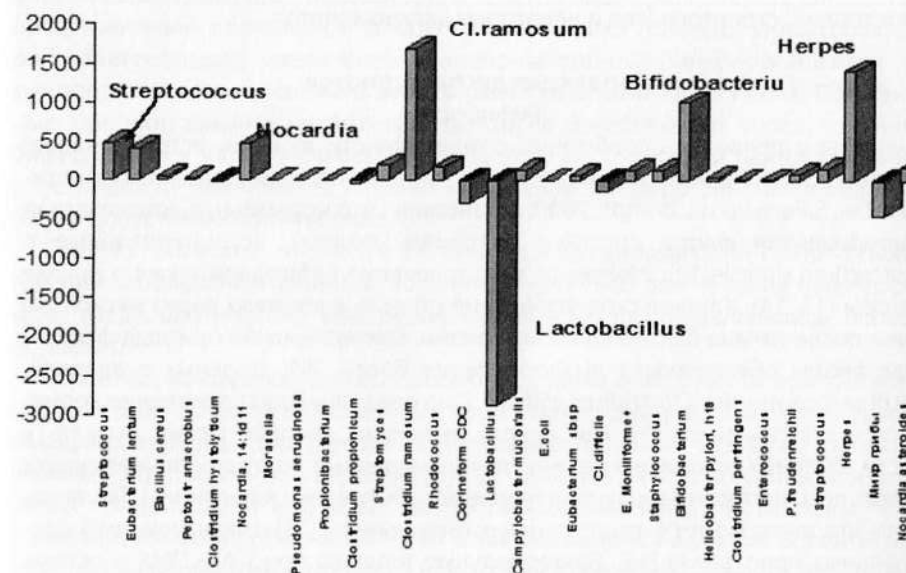


Рис. 10. Диаграмма и таблица изменений численности части микробиоты кишечника, типичных для себореи.

Угревая болезнь (акне)

Это распространенное в молодом возрасте заболевание имеет общие корни с себореей, связано с изменением функции сальных желез и сопутствующим изменением микрофлоры кожи. Основными бактериальными агентами акне и себореи считаются микроскопические грибы рода *Malassezia*, бактерии *Propionibacterium asnes* и стафилококки. Метод ГХ-МС позволил подтвердить и расширить список микроорганизмов кожи, участвующих в процессе заболевания, а также обнаружить систематические изменения состава микрофлоры кишечника, сходные у обследованных больных (совместно с проф. Самсоновым В.А. и аспирантом Кабаевой Т.И., ЦНИКВИ им Короленко). Действительно, при акне кроме малассезии в коже наблюдается усиленный рост и других микроскопических грибов: кандиды и группы не идентифицированных, но обнаруженных по продукции специфических стеролов – кампестерола и ситостерола. Кроме *P. asnes*, микроба, видовое определение которого стало названием заболевания, найдены маркеры пропионовых бактерий других видов и морфологически сходных с ними коринебактерий и актиномицетов, которые в сумме также обнаруживают избыточный рост на коже больных. Аналогичным образом оказалось, что стафилококки не являются единственным представителем кокковых форм при акне. К ним следует добавить стрептококки и руминококки.



Для акне, по данным исследования микробных маркеров в крови, в кишечнике специфичен избыточный рост клостридий, бацилл, хеликобактера, некоторых актиномицетов и *Eubacterium lentum* при дефиците других (основных) видов *Eubacterium*, лактобацилл и коринебактерий.

Алопеция

При алопеции микробное сообщество кожи, равно как и микробиота кишечника претерпевают существенные изменения. Лидерство в избыточном росте на коже приобретают анаэробы (клостридии группы гистолитикум, анаэробные пептострептококки, бактероиды) и микроскопические грибы, продуцирующие кампестерол или ситостерол. К ним присоединяются уже упоминавшиеся в связи с акне альфа-стрептококки, коринебактерии, стрептомицеты и пропионобактерии. Изменение численности микроорганизмов в зоне сальных желез составляет величину от 10 до 1000 крат. Разумно предположить, что это обстоятельство препятствует росту волос, поскольку морфологические изменения в коже приписывают в основном воспалительным процессам. Последние, как правило, связывают с наличием инфекции или избыточной колонизацией автохтонной микрофлорой.

При алопеции в кишечнике большинства обследованных обнаруживается избыточный рост суммарной микробиоты, преимущественно за счет микроскопических грибов, продуцирующих кампестерол, зубактерий, бактероидов, клостридий, стрептококков и некоторых актиномицетов.

Коррекция дисбактериозов

Бифиформ.

Недавно появились сообщения о возможности лечения острой диареи, ассоциированной с антибактериальной терапией, большими дозами пробиотиков. Так, S.Perskyp и L.Brandt (2000) установили, что нормальная человеческая бактериальная флора способна устранять поносы, ассоциированные с *Clostridium difficile* [12]. Эффект от такого лечения наблюдали также и другие авторы [13, 14]. Клиническое улучшение обычно наступало через несколько дней после начала бактериальной терапии. Бактерицидная природа фекальной флоры обеспечивает выздоровление более 95% больных с диареей, ассоциированной с *Clostridium difficile*. Она предупреждает появление хронической клостридиальной или другой инфекции, которая может вызвать у части больных хронические желудочно-кишечные нарушения (например, запор, воспалительные и функциональные заболевания кишечника). Так, показано, что запор может быть устранен ванкомицином [15] и назначением бактериальных препаратов [16]. Бактериальную терапию при ААД, ПМК и острых кишечных инфекциях следует начинать как можно раньше, не дожидаясь

бактериологического подтверждения точного диагноза [17].

Мы располагаем собственным опытом лечения 30 больных ААД бактериальным препаратом "Бифиформ". В отличие от стандартных доз (1 капсула 2 раза в день) мы применили более высокие дозы пробиотика.

Механизм действия бифиформа обусловлен быстрой колонизацией кишечника высокой концентрацией лиофилизированных бактерий (*Bifidobacterium longum* 107 и *Enterococcus faecium* 107), доставляемых в кишку энтеросолюбильной капсулой, защищающей микрофлору от агрессивного воздействия желудочного сока.

Бифиформ назначали при частоте стула 3–4 раз в день по 2 капсулы 3 раза в день. При более частом стуле начальная доза составляла 8 капсул в день в течение 2–3 дней с постепенным снижением дозы до 1 капсулы 2 раза в день. Курс лечения составил 3 нед.

Положительная динамика в состоянии больных начала появляться с первых дней приема бифиформа. Начиная со 2–3-го дня уменьшалась частота стула, в течение первой недели лечения прекращались вздутие и урчание в животе. Болевой синдром держался более продолжительно, в связи с чем дополнительно назначали но-шпу, беллатаминал или белласпон.

Все больные хорошо переносили бифиформ. Побочных и аллергических реакций не отмечено.

До лечения у больных ААД при традиционном бактериологическом исследовании кала выявлялся дисбактериоз толстой кишки, отмечалось снижение представителей нормальной флоры толстой кишки (бифидо- и лактобактерий, бактероидов), увеличение условно-патогенных микроорганизмов и микроорганизмов со сниженными ферментативными свойствами. Патогенные микроорганизмы не высевались. После 3-недельного курса лечения бифиформом в кале увеличивалось содержание бифидо- и лактобактерий, клостридии не выявлялись, условно-патогенные микроорганизмы определялись в допустимых количествах.

Следует отметить, что если положительная динамика в клиническом течении заболевания начинала появляться со 2–3-го дня лечения бифиформом, то дисбиотические изменения кишечника восстанавливались более медленно.

Вероятно, во-первых, одного пробиотика, даже бинарного и при десятикратной дозе не достаточно для быстрой стимуляции роста всех бактерий, находящихся в дефиците (тем более инородных пробиотическим микроорганизмам). Во-вторых – как видно из рис 11, довольно часто полярность изменения концентрации ключевых микробов оказывается в противофазе. Вы стимулируете бифидобактерии – а их и так оказывается избыток. Больной не отвечает на пробиотик. В третьих – на восстановление численности медленно растущих микробов требуется продолжительное время.

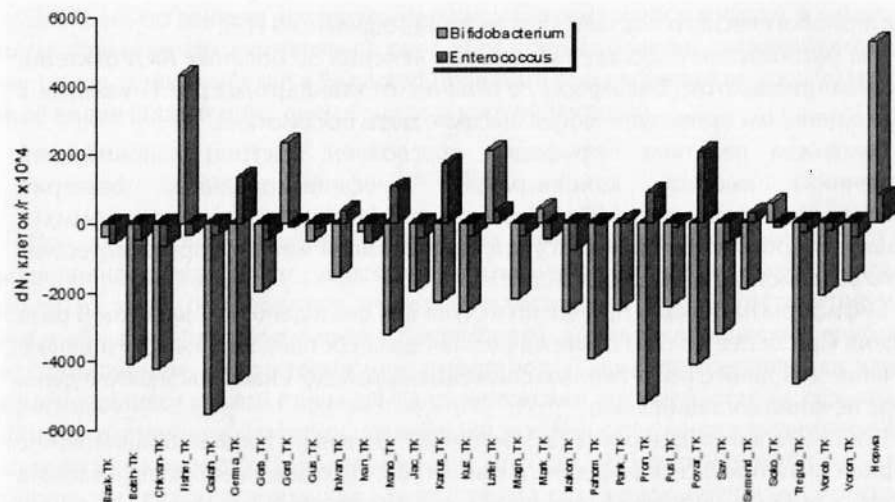


Рис. 11. Изменение концентрации бифидобактерий и энтерококков в пристеночном слое тонкого кишечника больных диареей, ассоциированной с антибиотиками и СРК. Нулевая линия – норма, а по вертикальной оси отложено изменение численности микроорганизмов. В плюсовую сторону – избыточный рост, в минусовую – дефицит колонизации.

Гепон

Гепон – синтетический тетрадекапептид, копирующий фрагмент 324-337 шарнирной области эзрина. Известно, что белок эзрин активно участвует в процессах движения клетки, в образовании контакта клетки с другими клетками и внеклеточным матриксом, в поддержании формы клетки, а также в передаче сигналов активации с клеточной мембраны на уровень генов, определяющих функционирование клетки.

Действуя на клетки иммунной системы, Гепон активирует определенные механизмы иммунитета и потому относится к фармакологической группе иммуномодуляторов. Иммуномодулирующие свойства Гепона: индуцирует интерфероны, активирует нейтрофилы, активирует моноциты и привлекает их в зону воспаления, усиливает синтез антител против чужеродных антигенов, повышает эффективность иммунной защиты от инфекций.

В отличие от большинства известных иммуномодуляторов Гепон обладает противовоспалительными свойствами, противовирусной активностью, способностью к активации местного иммунитета, повышению устойчивости слизистой оболочки к инфекциям.

Применение Гепона сопровождалось положительной клинико-лаборатор-

ной динамикой. Начиная с 2-3 микроклизм Гепоном, нормализовывался стул, исчезал метеоризм и постепенно уменьшался болевой синдром. У 1/3 больных отмечалось усиление выделения слизи с калом, что не являлось основанием для отмены препарата.

В бактериологических анализах кала до и после терапии Гепоном получен положительный результат: у всех больных количество бифидо- и лактобактерий увеличивалось на 1-2 порядка и достигало нижней границы нормы. Одновременно из посевов кала полностью исчезали кандиды, кокковая флора и протей, снижалось содержание клебсиелл и клостридий (Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология, 2003, №3, с.66-69. Активатор местного иммунитета Гепон в комплексной терапии дисбиотических нарушений кишечника. Парфенов А.И., Ручкина И.Н., Атауллаханов Р.И.). Аналогичная тенденция отмечена при ГХ-МС исследовании биоптатов тонкого кишечника больных до и после лечения гепоном (рис. 12).

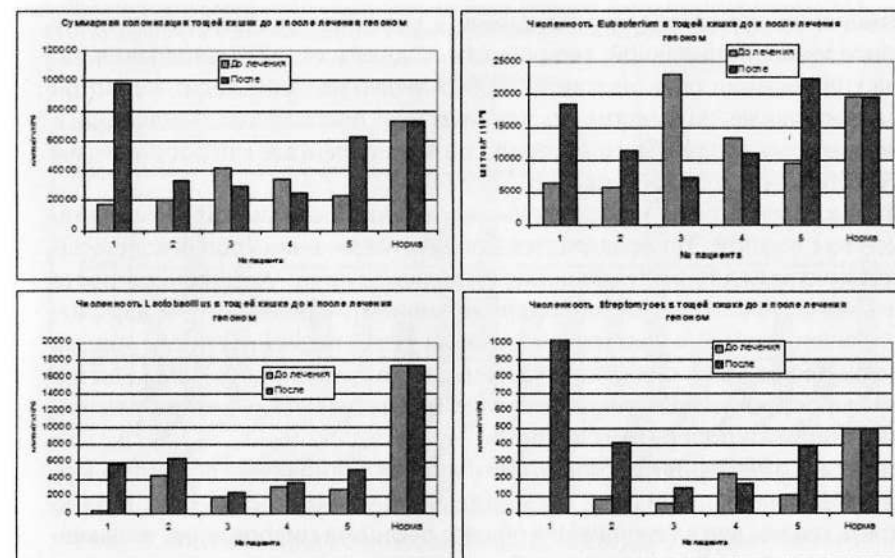


Рис. 12. Сопутствующее иммуномодулирующему действию гепона изменение общей численности и концентрации ключевых компонентов микробиоты тонкого кишечника. Видна тенденция нормализации состава микробного сообщества.

Энтерол

Применение масс-спектрометрического метода дало возможность измерить численность более 50 таксонов микроорганизмов кишечника не только в фекалиях, но и в отделах самого кишечника, путем анализа их маркеров (жирных кислот) непосредственно в биоптатах, полученных при интестиноскопии и колоноскопии, а также в крови тех же пациентов.

Результаты количественного анализа широкого круга микроорганизмов кишечника в двух его отделах одновременно позволили выявить сложную картину перестройки микробиоты в результате применения в качестве регулирующего средства – пробиотика энтерола, представляющего собой препарат дрожжей *Saccharomyces boulardii*. Результаты анализа биоптатов тощей кишки и фекалий пяти пациентов с СРК выявили тотальный дефицит колонизации при одновременном увеличении численности отдельных представителей микробного сообщества. Сопоставление микробных профилей до и после курса лечения энтеролом показали, что в тонком кишечнике происходят изменения, одинаково направленные у всех обследованных в сторону восстановления нормальной микробиоты. Однако ее восстановления до уровня колонизации практически здоровых людей не происходит, несмотря на положительные результаты по клиническим показателям. Тенденций к специфическому воздействию энтерола на определенные микроорганизмы или их группы при этом не выявлено.

Энтерол более активен по отношению к микроорганизмам тощей кишки по сравнению с толстой. Это проявляется в общем увеличении уровня колонизации при исходном дефиците микробиоты, а также в преимущественном росте количества отдельных видов микроорганизмов. Это проявляется в двукратном увеличении общего уровня колонизации у всех пациентов после приема энтерола. Кроме того, стабильно увеличивается численность большинства видов микроорганизмов. Причем этот рост не специфичен: у разных пациентов стимулируется рост разных видов.

В фекалиях изменения происходят хаотично, как в отношении общего содержания в них микроорганизмов, так и отдельных членов сообщества. Можно усмотреть тенденцию к усугублению общего дефицита микрофлоры, подавлению клостридий перфрингенс, лактобацилл, энтерококков, некоторых зубактерий и пропионовых бактерий. У всех пациентов многократно в сравнении с контрольной группой снижено общее содержание бактерий в фекалиях. Хотя действие энтерола несомненно изменяет численность ряда микроорганизмов в сторону нормы, но по сумме микробов он либо слабо увеличивается, не достигая нормы, либо происходит уменьшение общей численности за счет, например, существенного уменьшения избытка клостридий перфрингенс и лактобацилл на фоне роста концентрации организмов других таксонов.

Параллельно проведенное измерение концентрации микробных маркеров

микроорганизмов в крови и реконструкции по ним микроэкологического статуса организма-хозяина показало, что эти данные количественно отражают суммарные изменения микробиоты тощей кишки и фекалий. Это наблюдение дает повод для неинвазивного мониторинга колонизации кишечника, используя данные микробной диагностики крови и фекалий методом газовой хроматографии – масс спектрометрии.

ДеНол

Воспроизводимым эффектом лечения является оптимизация общего уровня колонизации тощей кишки и концентрации отдельных микроорганизмов. То есть нивелирование дисбактериоза в сторону нормы: уменьшение концентрации микробов, проявляющих избыточный рост, и увеличение численности дефицитных микробов.

На примере бифидобактерий (Рис.2) можно усматривать тенденцию к стабилизирующей роли: уменьшение до нормы в результате лечения и отсутствие эффекта при исходном нормальном их содержании.

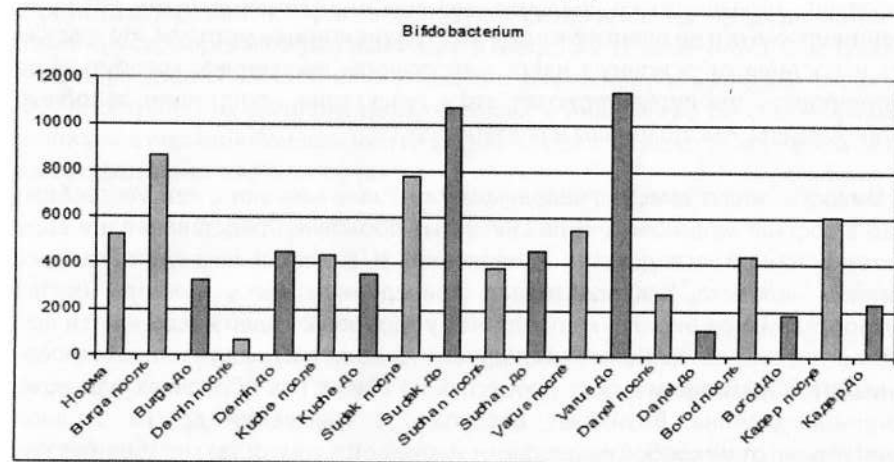


Рис. 13. Оптимизация количества бифидобактерий под действием денола.

Аналогичным образом на денол реагируют другие основные обитатели кишечника – зубактерии (*E. moniliforme*, *E. nodatum*, *E. sabureum* и пр.) а также пропионовые бактерии. К сожалению, исходный нормальный уровень лактобацилл в большинстве случаев понижается под действием препарата. Концентрации клостридий пропионикум и гистолитикум при исходном низком уровне (на один-два порядка ниже нормы) после лечения увеличиваются и достигают в ряде случаев нормального уровня. Численность *C. difficile* не превышает нормы у обследованных пациентов. Тем не менее, их количество, как правило, уменьшается после лечения от 20% до

шести раз. Численность актинобактерий (*Actinomyces*, *Streptomyces*, *Nocardia*), грибов и цитомегаловируса также имеет тенденцию к снижению. Заметно уменьшается количество энтерококков и стафилококков, изначально превышавших норму. Можно предположить, что для снижения больших концентраций энтерококков требуется увеличение дозировки препарата.

Заключение. Как быть с дисбактериозом?

Коррекция дисбактериоза кишечника остается проблематичной. Врачей - специалистов в этой области по существу нет и не может быть пока у нас нет рутинного метода его анализа. Сейчас это искусство терапии вслепую. Масс-спектрометрический метод может претендовать на метод массового контроля пристеночной микробиоты кишечника по микробным маркерам в крови. Во-первых, другого способа нет. Во-вторых, экономически это оправдано тем, что метод оказывается дешевле распространенного сейчас культурально-биохимического. Это при том, что ГХ-МС метод определяет, причем количественно, гораздо более широкий круг микроорганизмов, в том числе не культивируемых и не идентифицируемых традиционным методом. Но они как раз и составляют основную часть микрофлоры кишечника, которую надо регулировать при дисбактериозах, это – эубактерии, клостридии, аэробные актиномицеты, лактобациллы и бактериоды.

Микробы живут вместе с человеком уже более миллиона лет. Их сообщество в составе муцинового геля слизистых оболочек представляется в виде многоклеточной псевдоткани (биопленки) и является жизненно важным органом человека. Как показывают приведенные здесь примеры состав микроорганизмов биопленки постоянен у здоровых людей и изменяется при патологических состояниях. Как следствие изменяется доля участия микроорганизмов в физиологических процессах на слизистых оболочках или коже организма-хозяина. Возникает дисбаланс в снабжении других органов зависимыми от микробов веществами, нарушается гомеостаз метаболических процессов, стабильность иммунной системы. Если возмущение превосходит компенсаторные ресурсы организма происходит не предсказуемый пока каскад нарушений физиологических, биохимических и иммунных процессов с клинически очевидными последствиями. Как оказывается, кишечные, кожные, кардиоваскулярные, мочеполовые и другие заболевания причинно-следственно связаны с изменением микрофлоры местной локализации и кишечной, как депо микроорганизмов в теле человека. Данные молекулярных методов, в том числе и масс-спектрометрия микробных маркеров, полученные в конце XX века, заставляют по-новому относиться к регулированию взаимоотношений хозяина с собственной микрофлорой. Концепция моно-

этиологичности заболеваний микробного происхождения, деление микробов на патогенные и непатогенные должны быть пересмотрены. Все микробы, обитающие в организме человека, одновременно пребывают в этих двух ипостасях. Любой из них может быть причиной воспалительных процессов. Даже, казалось бы, святые лактобациллы и бифидобактерии оказываются причиной, например, гнойничковых поражений кожи промежности. Исключение составляют лишь агенты особо опасных инфекций, возбудители чумы, холеры, сибирской язвы и других. Хотя есть и «исключения из исключений», например, носительство возбудителей бруцеллеза или туберкулеза. Самый парадоксальный случай – возбудитель смертельно опасного заболевания – газовой гангрены – *Clostridium perfringens* является одним из самых распространенных видов микроорганизмов толстого кишечника и фекалий.

Должна быть пересмотрена и концепция антибиотикотерапии. Ее фундамент – микробная моноэтиологичность и резистентность штаммов к антибиотикам в монокультуре *in vitro* – не адекватны форме существования микробного сообщества человека в норме и патологии. То же самое относится и к пробиотикотерапии которая в основном базируется на представлении о доминирующей роли бифидобактерий в микробиоте кишечника. В результате из поля зрения микробиолога, врача и биотехнолога выпадают эубактерии, клостридии и актиномицеты, которых в кишечнике по современным оценкам на порядок больше, чем бифидобактерий. Однако такие перемены в умах и традициях требуют времени.

Литература

Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж., Рэфф М., Робертс К., Уотсон Дж. Молекулярная биология клетки. М. Мир. 1986.

Белобородова Н.В., Осипов Г.А. Гомеостаз малых молекул микробного происхождения и его роль во взаимоотношениях микроорганизмов с хозяином. //Вестник РАМН. -1999. Т.16, -№7, с. 25-31.

Вейант Р., Мосс У., Холлис Д., Джордан Дж., Кук Э., Дейншвар М. Определитель нетривиальных патогенных грамотрицательных бактерий. М. Мир, 1999, С. 612-783

Митрука Б.М. Применение газовой хроматографии в микробиологии и медицине. М. Медицина, 1978.

Определитель бактерий Берджи. Под ред. Дж.Хоулта и др. М.Мир, 1997, т.1,2, 638с.

Осипов Г.А., Парфенов А.И., Верховцева Н.В., Ручкина И.Н., Курчавов В.А., Бойко Н.Б., Рогатина Е.Л. Клиническое значение исследования микроорганизмов слизистой оболочки кишечника культурально-биохимическим и хромато-масс-спектрометрическими методами. Эксп. Клин. Гастроэнтерология, 2003; (4): 59-67

Турова Е.С., Осипов Г.А. Изучение структуры микробного сообщества, активного в биотрансформации минералов железа в каолине. Микробиология, 1996, 65(5), 682-689.

Физиология человека, гл.18, Функция крови, Т.2, С.414-430. Под ред. Р.Шмидта и Г.Тевса. М.Мир, 1996.

Шендеров Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание. Издание в 3-х томах, Т1. М. Грант, 1998

Шеховцова Н.В., Осипов Г.А., Верховцева Н.В., Певзнер Л.А. Анализ липидных биомаркеров в породах архейского кристаллического фундамента. Международная конференция по бактериальной палеонтологии. Тезисы докладов. Москва, 24-25 мая 2002г.

Beloborodova N.V., Osipov G.A. 2000. Small molecules originating from microbes(SMOM) and their role in microbes-host relationship.// Microb. Ecol.Heal.Dis., SCUP, 12: 12-21.

Chemical Methods in Bacterial Systematics (1985) (Goodfellow, M. and Minnikin, D.E., Eds.), Acad. Press, London - Toronto

Manual of Clinical Microbiology. 5-th ed. Editor in Chief - Albert Balows. Washington, 1991, pp. 317-318.

Shekhovtsova N.V., Osipov G.A., Verkhovtseva N.V., Pevzner L.A. Analysis of lipid biomarkers in rocks of the Archean crystalline basement //Proceedings of SPIE.- 2003.- Vol.4939.- P. 160 – 168

Stead, D.E., Sellwood, J.E., Wilson, J., Viney, J. Evaluation of a commercial microbial identification system based on fatty acid profiles for rapid, accurate identification of plant pathogenic bacteria. J.Appl.Bacteriol. 1992, 72, 315-321. 25.

ДЛЯ ЗАПИСЕЙ

