

М.А. Сухина^{1, 2}, С.М. Юдин², А.В. Загайнова²,
В.В. Макаров², А.В. Веселов¹, И.С. Аносов¹, И.А. Лягина¹,
Д.А. Чистякова¹, А.Л. Сафин¹, Ю.А. Шельгин¹



¹Национальный медицинский исследовательский центр колопроктологии имени А.Н. Рыжих,
Москва, Российская Федерация

²Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью,
Москва, Российская Федерация

Особенности микробиоты у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника (проспективное исследование)

Обоснование. Микробиота кишечника, с одной стороны, защищает человека от патогенов, а с другой — сама может являться одним из триггеров и/или медиаторов прогрессирования при воспалительных заболеваниях кишечника (ВЗК). ВЗК поражают преимущественно лиц молодого трудоспособного возраста. Отмечается неуклонный рост заболеваемости ВЗК в последние десятилетия во всем мире и в России. ВЗК существенно влияют на качество жизни, а осложнения приводят к необходимости выполнения хирургических вмешательств, что значительно снижает качество жизни. **Цель исследования** — изучение состава микробиоты толстой кишки, поиск особенностей микробного спектра у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника по сравнению с пациентами контрольной группы. **Методы.** Выполнено проспективное исследование пациентов с ВЗК и пациентов, находящихся на лечении в колопроктологическом стационаре, без воспалительных заболеваний кишечника за 2018–2019 гг. В исследование были включены 157 пациентов ВЗК и 150 пациентов без ВЗК. У всех пациентов исследовались биообразцы стула, которые были подвергнуты микробиологическому и метагеномному исследованию. **Результаты.** Наиболее часто в просветных фекалиях пациентов с ВЗК (в 60% случаев в титре 10^3 – 10^9 КОЕ/г) и пациентов без ВЗК (69% случаев в титре 10^3 – 10^9 КОЕ/г) присутствовали факультативно анаэробные микроорганизмы, среди которых на долю грамотригативных бактерий приходилось 52% случаев, в большей части представленных бациллами, относящимися к порядку Enterobacteriales, только 7% изолированных грамотригативных факультативно аэробных микроорганизмов являлись грамотригативными неферментирующими бактериями (ГОНФБ), представленными пятью родами: *Acinetobacter*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Ralstonia*. Грампозитивные факультативно анаэробные микроорганизмы в 89% случаев были представлены кокками родов *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Gemella*, *Globicatella*, *Granulicatella*. По результатам нашего исследования следует обратить особое внимание на присутствие в фекальной микробиоте пациентов с ВЗК редких микроаэрофильных и облигатно анаэробных микроорганизмов *Arcobacter butzleri*, *Gardnerella vaginalis*, *Aromatoleum aromaticum*, *Terrisporobacter glycolicus* (*Clostridium glycolicum*), *Solobacterium moorei*, *Alloscardovia omnicolens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Fusobacterium ulcerans* и *Dialister micraerophilus*, которые не были изолированы от пациентов без ВЗК. **Заключение.** Своевременная адекватная оценка состава и функциональных характеристик микробиоты по показателям ключевых биомаркеров позволит проводить направленную диагностику и профилактику ближайших и отдаленных последствий воспалительных заболеваний кишечника.

Ключевые слова: язвенный колит, болезнь Крона, воспалительные заболевания кишечника, кишечная микробиота, толстая кишка

Для цитирования: Сухина М.А., Юдин С.М., Загайнова А.В., Макаров В.В., Веселов А.В., Аносов И.С., Лягина И.А., Чистякова Д.А., Сафин А.Л., Шельгин Ю.А. Особенности микробиоты у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника (проспективное исследование). *Вестник РАМН.* 2022;77(3):165–171. doi: <https://doi.org/10.15690/vramn1480>

Обоснование

Обширное сообщество комменсальных микроорганизмов, обычно называемых кишечной микробиотой, колонизирует желудочно-кишечный тракт. Микробиота кишечника участвует в поддержании экосистемы кишечника двояко: с одной стороны, она обучает иммунные клетки хозяина и защищает его от патогенов, а с другой — сама может являться одним из триггеров и/или медиаторов прогрессирования воспаления при воспалительных заболеваниях кишечника (ВЗК), которые включают две основные формы — язвенный колит (ЯК) и болезнь Крона (БК) и поражают преимущественно лиц молодого трудоспособного возраста. В последние десятилетия в России, как и во всем мире, отмечается рост заболеваемости ВЗК. По данным Министерства здравоохранения России, прирост ЯК с 2012 по 2015 г. составил 31,7%, а БК — 20,4%. По данным отдельных эпидемиологических исследований, распространенность ВЗК по всей России

составляет 19,3–29,8 на 100 тыс. населения для ЯК и 3,0–4,5 на 100 тыс. населения — для БК, что позволяет отнести БК к категории редких, или орфанных, заболеваний. Но, по данным существующих немногочисленных региональных регистров, распространенность ВЗК гораздо выше. Например, в Московской области она составляет 58 на 100 тыс. населения, а в регионах, где нет единого регистра по ВЗК, — 5–12 на 100 тыс. населения. Следует признать, что данные по распространенности и заболеваемости ВЗК в России в большинстве своем недостоверны, так как изучение проводилось на малочисленных выборках и ограниченной территории [1, 2]. Таким образом, истинная распространенность ВЗК в России в целом неизвестна.

Воспалительные заболевания кишечника влияют на уровень жизни и часто приводят к необходимости выполнения обширных резекций участков кишки с формированием стомы, что снижает качество жизни пациента. Накапливающиеся данные свидетельствуют о том,

что различные экологические и генетические факторы способствуют возникновению ВЗК. Развитие заболевания обусловлено взаимодействием генетических, иммунных детерминант, а также факторов окружающей среды. Важнейшую роль в регуляции иммунологического гомеостаза слизистой кишечника играет кишечная микробиота. Например, показано, что полисахарид А *Bacteroides fragilis* опосредует дифференцировку Т-регуляторных клеток из наивных лимфоцитов. Энтероинвазивные *Escherichia coli* рассматривают в роли патогенов, ассоциированных с БК, а другие представители порядка *Enterobacterales* увеличивают риск развития ЯК.

Однако имеющихся данных недостаточно для всесторонней характеристики изменений кишечной микробиоты, ассоциированных с прогрессированием ВЗК. Проблема расшифровки патогенеза ВЗК крайне актуальна в контексте оптимизации терапевтических протоколов и выявления факторов риска для пациентов до развития клинически активного воспалительного процесса. Микробиота кишечника несет существенную функциональную роль в поддержании гомеостаза и здоровья человека в целом. Микробиота, заселяющая кишечник, поддерживает и регулирует оптимальный уровень метаболических процессов, протекающих в организме человека, обеспечивает защиту от условно-патогенных и патогенных микроорганизмов, а также обладает антагонистической активностью по отношению к патогенным микроорганизмам, конкурируя за сайты колонизации и пищевые субстраты и производя молекулы, которые подавляют размножение условно-патогенных и патогенных бактерий [3]. В современной литературе продемонстрировано

нарушение кишечной микробиоты у пациентов с ВЗК, что подтверждается в исследованиях на моделях колита у мышей, но четкая причинно-следственная связь между нарушением микробиоты и ВЗК до настоящего времени не установлена [4]. Не определены какие-либо конкретные микроорганизмы, способные приводить к развитию ВЗК [5, 6]. Как позволяют предположить проведенные исследования, одним из триггеров воспаления могут служить инвазивные штаммы *Escherichia coli*, которые при дефектах врожденного иммунитета, ассоциированных с рядом полиморфизмов генов, нарушают толерантность, что приводит к хронизации процесса. Появившаяся возможность полногеномного секвенирования и хромато-масс-спектрометрии патогенных и условно-патогенных бактерий дает возможность детально изучить факторы патогенности микроорганизмов, участвующих в нарушении эпителиального барьера, индукции гипервоспаления и аутовоспаления слизистой оболочки кишечника, что позволит создать метод скрининга заболевания у лиц с высоким риском его развития. В попытке дополнительно выяснить, может ли специфическое нарушение микробиоты кишечника быть связанным с ВЗК и способствует ли это патологическому воспалению, мы изучили данные литературы и провели собственное исследование, посвященное определению сходств и различий кишечной просветной микробиоты у пациентов с ВЗК и пациентов колопроктологического профиля без ВЗК (с диагнозами геморрой, анальная трещина), что позволит охарактеризовать функцию кишечной микробиоты в развитии ВЗК.

Цель исследования — изучение состава микробиоты толстой кишки, поиск особенностей кишечной микро-

166

M.A. Sukhina^{1,2}, S.M. Yudin², A.V. Zagainova², V.V. Makarov², A.V. Veselov¹, I.S. Anosov¹, I.A. Lyagina¹, D.A. Chistyakova¹, A.L. Safin¹, Yu.A. Shelygin¹

¹National Medical Research Centre for Coloproctology named after A.N. Ryzhikh, Moscow, Russian Federation

²Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks, Moscow, Russian Federation

Peculiarities of Microbiota in Patients with Inflammatory Intestinal Diseases

Background. The intestinal microbiota, on the one hand, protects a person from pathogens, on the other hand, it itself may be one of the triggers and/or mediators of progression in inflammatory bowel diseases. Inflammatory bowel disease (IBD) predominantly affects young people of working age. It noted a steady increase in the incidence of IBD in recent decades throughout the world and in Russia. Inflammatory bowel diseases significantly affect quality of life and lead to complications of having to perform surgery, which significantly reduces the quality of life. **Aims** — of the study was to investigate the composition of the microbiota of the colon, the search features of the microbial spectrum of patients with inflammatory bowel disease patients compared with control patients. **Materials and methods.** A prospective study was carried out between patients with inflammatory bowel disease and patients without inflammatory bowel disease for the period 2018–2019. The study included 157 IBD patients and 150 patients without IBD. All patients studied stool, which have been subjected to microbiological and metagenomic study. **Results.** Most often, facultative anaerobic microorganisms were present in the stool of patients with IBD (in 60%, 103–109 CFU/g) and in patients without IBD (69%, 103–109 CFU/g), the share of gram-negative bacteria accounted for 52%, in mostly represented by bacilli belonging to the order Enterobacterales, only 7% of isolated gram-negative facultative aerobic microorganisms were gram-negative non-fermenting bacteria represented by 5 genera: *Acinetobacter*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Ralstonia*. Gram-positive facultative anaerobic microorganisms in 89% were represented by cocci of the genus *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Gemella*, *Globicatella*, *Granulicatella*. **Conclusions.** According to the results of our study, special attention should be paid to the presence of rare microaerophilic and obligate anaerobic microorganisms in the fecal microbiota of patients with IBD (*Arcobacter butzleri*, *Gardnerella vaginalis*, *Aromatoleum aromaticum*, *Terrisporobacter glycolicus* (*Clostridium glycolicum*), *Solobacterium moorei*, *Alloscardovia omnicolens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Fusobacterium ulcerans*, *Dialister microaerophilus*), that have not been isolated from patients without IBD. A timely adequate assessment of the composition and functional characteristics of the microbiota in terms of key biomarkers will make it possible to carry out targeted diagnostics and prevention of the immediate and long-term consequences of inflammatory bowel diseases.

Keywords: ulcerative colitis, Crohn's disease, inflammatory bowel disease, intestinal microbiota, colon

For citation: Sukhina MA, Yudin SM, Zagainova AV, Makarov VV, Veselov AV, Anosov IS, Lyagina IA, Chistyakova DA, Safin AL, Shelygin YuA. Peculiarities of Microbiota in Patients with Inflammatory Intestinal Diseases. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2022;77(3):165–171. doi: <https://doi.org/10.15690/vramn1480>

биоты у пациентов с ВЗК в сравнении с характеристиками кишечной микробиоты у пациентов без ВЗК.

Методы

Дизайн исследования

Критерии включения: пациенты с воспалительными и невоспалительными заболеваниями кишечника в возрасте старше 18 лет.

Критерии не включения: возраст моложе 18 лет, отсутствие подписанного информированного согласия на участие в исследовании.

Гипотеза — влияние специфических микроорганизмов или их ассоциаций на развитие воспалительных заболеваний кишечника.

Условия проведения

Исследование проводилось на базе ФГБУ «НМИЦ колопроктологии им. А.Н. Рыжих» Минздрава России.

Продолжительность исследования

Исследование продолжалось в период с 2018 по 2019 г.

Описание медицинского вмешательства

Всем пациентам были разъяснены процедуры и возможные риски, подписаны соответствующие информированные согласия, а также согласие на персональную обработку данных. У всех пациентов исследовались биобразцы просветных фекалий, которые были подвергнуты микробиологическому и метагеномному исследованию.

Исходы исследования

Основной исход исследования. Изучение состава микробиоты кишечника проводили с использованием расширенного спектра селективных и неселективных питательных сред. Такой подход позволил удовлетворить потребности широкого спектра микроорганизмов. Посев фекалий проводили согласно принятым методикам на следующие питательные среды. Для выделения факультативно-анаэробных и аэробных микроорганизмов использовали колумбийский агар (Columbia Agar Base (Eur. Pharm.)), кровяной агар (Blood agar, «Pronadisa» Conda (Испания)), агар Эндо (Endo Agar, «Pronadisa» Conda (Испания)), сальмонелла-шигелла (Salmonella Shigella Agar (SS Agar)), агар Левина (Levine Agar (EMB)), хромогенный агар для сальмонелл (Salmonella Chromogenic Agar), агар Сабуро с декстрозой и хлорамфениколом (Sabouraud Dextrose Agar w/Chloramphenicol), висмут-сульфитный агар (Bismuth Sulfite Agar (Wilson Blair)), для энтеробактерий и энтерококков — хромогенный агар для уропатогенных бактерий (Urinary Tract Infections Chromogenic Agar (UTIC)), для выделения стафилококков — маннит-солевой агар (Mannitol Salt Agar (MSA) (Charman Medium USP)), для неферментирующих грамотрицательных бактерий — Клед агар, энтерококковый агар. Лактобациллы культивировали на селективной среде Де Мана, Рогоза и Шарпа (MRS Agar, «Pronadisa» Conda (Испания)). Для других прихотливых микроаэрофильных микроорганизмов применяли шоколадный агар с факторами роста. Строгие анаэробы выделяли на агаре Шадлера (Schaefer Agar) с необходимыми добавками, основном агаре для анаэробов, анаэробном агаре (Anaerobic Agar), усиленном агаре для клостридий (Reinforced Clostridial Agar), среде Вилкинса–Чалгрена (Wilkins Chalgren

Medium), бифидобактерии культивировали на плотной селективной среде для бифидобактерий (Bifidobacterium Agar), для выделения труднокультивируемых облигатно анаэробных бактерий использовали тиогликолевую среду (Thioglycollate USP Medium ISO 7937). Для изолирования прихотливых микроорганизмов применяли сердечно-мозговой агар с экстрактом (Brain Heart Infusion Agar) с необходимыми добавками.

Для культивирования микроаэрофилов использовали CO₂-инкубатор (Sheldon, США) с концентрацией CO₂ 5%. Облигатные анаэробы выделяли в анаэробной станции Vacutron (Sheldon, США) в атмосфере трехкомпонентной газовой смеси (N₂ — 80%; CO₂ — 10%; H₂ — 10%). Идентификацию микроорганизмов осуществляли с помощью времяпролетного масс-спектрометра с матричной лазерной десорбцией/ионизацией MALDI-TOF MicroFlex с программным обеспечением Maldi BioTyper (Bruker Daltonics, Германия) версии 3.0 методом экстракции рибосомальных белков. При получении значений SCORE > 2,0 культуру считали с высокой вероятностью идентифицированной до вида. При значениях SCORE в диапазоне 1,7–2,0 культуру считали идентифицированной до рода. Для всех трудноидентифицируемых штаммов (при значении SCORE < 2,0) проводили секвенирование последовательностей гена 16S рРНК. ДНК культур выделяли с использованием набора реагентов для выделения ДНК «Набор DNeasy Blood & Tissue Kit для выделения ДНК из тканей, клеток, крови, дрожжей, бактерий и вирусов» (Qiagen GmbH, Германия). Для секвенирования использовали два фрагмента ДНК: ампликон длиной ~440 п.н., соответствующий позициям 339–785 гена 16S рРНК, и ампликон длиной ~1340 п.н., соответствующий позициям 42–1380 гена 16S рРНК. Амплификацию проводили с использованием автоматического амплификатора Light Cycler-96 (Roche, Германия). Секвенирование осуществляли на приборе MiSeq (Illumina, США) с использованием набора для секвенирования MiSeq Reagent Kit v3 (Illumina, США) согласно протоколу производителя. Для видовой идентификации использовали свободно доступный в Интернете программный пакет BLAST (National Center for Biotechnology Information, США).

Дополнительные исходы исследования. Биобразцы подвергались метагеномному исследованию.

Анализ в подгруппах

При статистической обработке данных для определения различий в частоте встречаемости микроорганизмов в зависимости от заболевания использовали точный тест Фишера. В качестве описательной статистики для характеристики степени микробной обсемененности использовали медиану и интерквартильное расстояние (ИКР). Видовое разнообразие оценивали по индексу разнообразия Шеннона.

Методы регистрации исходов

В исследовании оценивался количественный и качественный состав микробиоты в каждой группе.

Этическая экспертиза

До начала исследования было получено разрешение местного этического комитета ФГБУ «ГНЦК им. А.Н. Рыжих» Минздрава России (№ 4 от 06.02.2018), в настоящее время — ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр колопроктологии имени А.Н. Рыжих» Минздрава России.

Статистический анализ

Принципы расчета размера выборки. Выборка рассчитана согласно необходимости достижения коэффициента мощности исследования.

Методы статистического анализа данных. При статистической обработке данных для определения различий в частоте встречаемости микроорганизмов в зависимости от заболевания использовали точный тест Фишера. В качестве описательной статистики для характеристики степени микробной обсемененности использовали медиану и интерквартильное расстояние (ИКР). Видовое разнообразие оценивали по индексу разнообразия Шеннона.

Результаты

Объекты (участники) исследования

В исследование были включены 157 пациентов с ВЗК — 84 пациента с БК и 73 пациента с ЯК, среди которых 41 мужчина и 34 женщины в возрасте от 18 до 85 лет (средний возраст — 33 года). В качестве группы сравнения были обследованы 150 пациентов колопроктологического профиля без ВЗК (100 пациентов с геморроем, 34 пациента с диагнозом трансфинктерный свищ прямой кишки и 16 пациентов с дивертикулярной болезнью ободочной кишки), 60 мужчин и 90 женщин, в возрасте от 30 до 71 года (средний возраст — 52 года).

Основные результаты исследования

Из полученного биоматериала было изолировано 4328 штаммов микроорганизмов, относящихся к 412 видам. Микробиологический пейзаж просветной микробиоты у пациентов с невоспалительными заболеваниями (геморрой, анальная трещина) был представлен 261 ви-

дом, насчитывающим 2384 штамма, из биоматериала от пациентов с ВЗК было выделено порядка 1944 штаммов, принадлежащих к 261 виду микроорганизмов.

Все полученные биообразцы просветных фекалий подверглись секвенированию 16Sp РНК с целью определения микробного пейзажа, составляющего кишечный микробиом. На рис. 1 представлены данные, полученные в результате секвенирования, по распределению групп микроорганизмов, населяющих кишечный микросимбиоз у пациентов с ВЗК и без ВЗК. В результате метагеномного исследования у больных ВЗК выявлено увеличение средней доли протеобактерий как просветной, так и пристеночной микробиоты. В то же время средняя доля фирмикутов в пристеночной микробиоте была снижена (см. рис. 1, А).

На уровне семейств в просветной микробиоте больных ВЗК наблюдалось снижение средней относительной представленности семейства Enterobacteriaceae и увеличение Sphingomonadaceae, Burkholderiaceae, Xanthomonadaceae, Comamonadaceae. Паттерны изменения состава просветной микробиоты подобны микробиоте пациентов с ВЗК, однако также выявляется снижение представленности семейств Ruminococcaceae и Lachnospiraceae (см. рис. 1, Б). Данные наблюдения согласуются с опубликованными ранее работами [7–12]. Для получения наиболее полной картины кишечного микробиома данные секвенирования были интегрированы с данными, полученными микробиологическими методами, с целью определения жизнеспособных микроорганизмов, изучения биологических свойств значимых бактерий и функциональных взаимодействий представителей кишечной микробиоты.

Видовой спектр кишечной микробиоты включал представителей разных таксономических групп. Наи-

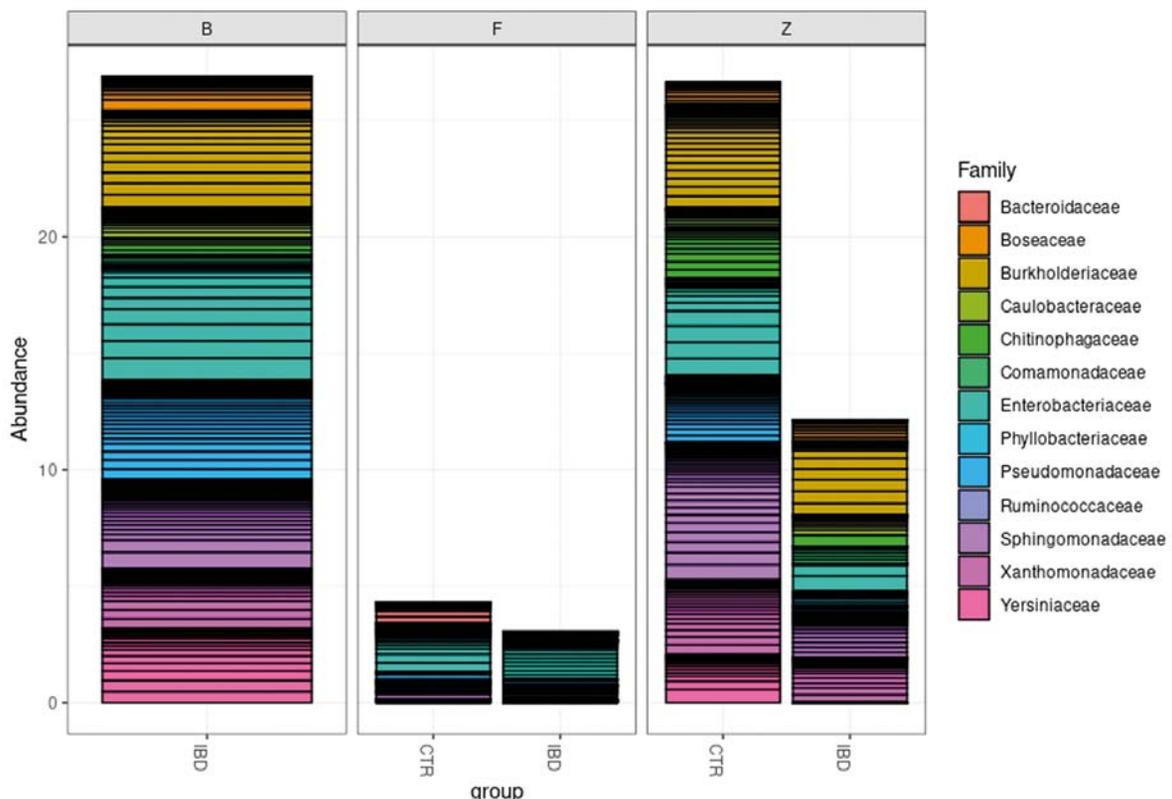


Рис. 1. Спектр таксономических групп микроорганизмов, составляющих кишечный микробиом пациентов с ВЗК (IBD) и без ВЗК (CTR) по данным секвенирования 16s РНК

более часто из просветных фекалий пациентов с ВЗК (в 60% случаев в титре 10^8 – 10^9 КОЕ/г) и от пациентов без ВЗК (69% случаев в титре 10^8 – 10^9 КОЕ/г) встречались факультативно анаэробные микроорганизмы, среди которых на долю грамотригативных бактерий приходилось 52%, в большей части представленные бациллами, относящимися к порядку Enterobacteriales, только 7% изолированных грамотригативных факультативно аэробных микроорганизмов являлись грамотригативными неферментирующими бактериями (ГОНФБ), представленными пятью родами: *Acinetobacter*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Ralstonia*.

Грампозитивные факультативно анаэробные микроорганизмы в 89% случаев были представлены кокками родов *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Gemella*, *Globicatella*, *Granulicatella*. В 11% случаев из биообразцов кишечной микробиоты пациентов с ВЗК изолировались грампозитивные факультативно анаэробные бациллы, представленные родами *Pseudarthrobacter*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Rothia*, *Bacillus*, *Exiguobacterium*, *Listeria*, *Paenibacillus*, *Glutamicibacter*, *Oceanobacillus*. А соотношение облигатно анаэробной, микроаэрофильной, факультативно анаэробной и облигатно аэробной микробиоты распределилось следующим образом: на долю облигатных аэробов, представленных в основном грамотригативными неферментирующими бактериями, приходилось 3% от всех изолированных микроорганизмов, факультативно анаэробные бактерии составляли 24%, также как и микроаэрофилы (22%), которые в основном были представлены родом *Lactobacillus*. Следует отметить, что на долю облигатно анаэробных микроорганизмов приходилось более половины (51%) от всех изолированных бактерий. Среди строгих анаэробов доминирующее положение занимали представители спорообразующих грампозитивных бактерий порядка Clostridiales (рода *Clostridium*, *Clostridioides*, *Terrisporobacter*, *Eubacterium*, *Ruminococcus*, *Peptostreptococcus*), второе место по представленности в кишечной микробиоте пациентов с ВЗК занимает род *Bifidobacterium*. Помимо этих микроорганизмов часто выделялись актинобактерии (рода *Actinomyces*, *Cutibacterium*, *Eggerthella*, *Collinsella*, *Alloscardovia*), представители семейства Erysipelotrichaceae (*Solobacterium*, *Coprobaecillus*), Veillonellaceae (*Veillonella*, *Megasphaera*), бактерии группы Bacteroidetes/Chlorobi (*Parabacteroides*, *Bacteroides*, *Prevotella*), гаммапротеобактерии (*Dichelobacter*), фузобактерии (*Fusobacterium*), беттапротеобактерии (*Aromatoleum*), эпсилонпротеобактерии (*Arcobacter*). У пяти пациентов с ЯК была изолирована *Gardnerella vaginalis*.

Видовой состав кишечной микробиоты пациентов без ВЗК отличался от такового у пациентов с ВЗК. Облигатные аэробы, включающие грамотригативные неферментирующие бактерии, были выделены у 2% пациентов. К факультативным анаэробам относилась большая часть изолированных микроорганизмов (56%), что в 2 раза выше, чем у пациентов с ВЗК ($p < 0,05$), а микроаэрофильные бактерии составляли 16% от всей изолированной микробиоты, которые были представлены родом *Lactobacillus*. Следует отметить, что на долю строгих анаэробов приходилось 24% всех изолированных бактерий (это в 2 раза меньше, чем в микробиоте пациентов с ВЗК). Среди облигатно анаэробных бактерий доминирующее положение занимали представители спорообразующих грампозитивных бактерий порядка Clostridiales (рода *Clostridium*, *Clostridioides*, *Terrisporobacter*, *Eubacterium*, *Ruminococcus*, *Peptostreptococcus*), второй

по распространению определялся род *Bifidobacterium*. Помимо этих микроорганизмов часто встречались актинобактерии (рода *Actinomyces*, *Cutibacterium*, *Eggerthella*, *Collinsella*, *Alloscardovia*), представители семейства Erysipelotrichaceae (*Solobacterium*, *Coprobaecillus*), Veillonellaceae (*Veillonella*, *Megasphaera*), бактерии группы Bacteroidetes/Chlorobi (*Parabacteroides*, *Bacteroides*, *Prevotella*), гаммапротеобактерии (*Dichelobacter*), фузобактерии (*Fusobacterium*), беттапротеобактерии (*Aromatoleum*), эпсилонпротеобактерии (*Arcobacter*).

Дополнительные результаты исследования

Наиболее важную роль в обеспечении микробного равновесия играют лактобациллы и бифидобактерии [13–17]. В группе пациентов с ВЗК колонизация кишечника лактобациллами оказалась выше (76,5%), но при этом титр не превышал 10^5 КОЕ/г. Соотношение лактобациллы и бифидобактерии в группе пациентов с ВЗК составляло 3:1 (76,5–23,5%), в то время как лактобациллы и бифидобактерии выделялись с одинаковой частотой (53–47%) у пациентов без ВЗК. Доминирующие виды лактобацилл (встречается более чем в 50%) у пациентов с ВЗК были представлены *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum* и *Lactobacillus salivarius*. У пациентов без ВЗК состав доминирующих видов лактобактерий был иной: в 90% случаях встречались *Lactobacillus plantarum* и *Lactobacillus paracasei*, и в 50% *Lactobacillus salivarius* и *Lactococcus lactis*. При этом титр лактобактерий, изолированных из кишечной микробиоты у пациентов без ВЗК, был выше, чем у пациентов с ВЗК (10^6 – 10^8 КОЕ/г).

Бифидобактерии статистически чаще выделялись у пациентов без ВЗК, чем у пациентов с ЯК и БК (23,5 и 18,5% соответственно; $p < 0,05$). Видовой состав был представлен *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium catenulatum*, *Bifidobacterium pseudocatenulatum*, *Bifidobacterium animals*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium adolescentis*.

Нежелательные явления

В ходе исследования нежелательных явления не было отмечено.

Обсуждение

Резюме основного результата исследования

Результаты проведенного нами исследования показали различия состава просветной микробиоты у пациентов без ВЗК и с ВЗК в общем количестве изолированных микросимбионтов, микроорганизмов, населяющих кишечный микросимбиоз [18–22].

В результате анализа соотношения групп бактерий с разными типами дыхания оказалось, что у пациентов с ВЗК половина (51%) изолируемых микроорганизмов представлена строгими анаэробами, в то время как доля факультативных анаэробов составляла 24%, что существенно меньше (в 2,125 раза) количества облигатно анаэробных микроорганизмов и составляет $\frac{1}{4}$ часть от всего многообразия бактерий кишечной микробиоты. На долю микроаэрофильных бактерий приходилось 22% всех изолируемых из кишечного биотопа микроорганизмов, и 3% составляли представители грамотригативных неферментирующих микроорганизмов, относящихся к облигатным аэробам. В группе пациентов без ВЗК доля облигатно анаэробных и микроаэрофильных бактерий среди об-

щей численности изолированных микроорганизмов была ниже, чем эти показатели у пациентов с ВЗК. Обращают внимание изолированные из микробиоты пациентов с ВЗК пять штаммов, относящихся к спорообразующим облигатно анаэробным бактериям рода *Clostridium spp.*, не идентифицируемых до вида ни одним из доступных методов, включая классическую идентификацию микроорганизмов, основанную на биохимической активности бактерии, и современные методы, основанные на времяпролетной лазерной десорбции ионизации и 16Sp РНК-секвенировании. Возможно, эти штаммы являются штаммами *de novo* и подлежат дальнейшему изучению для определения их роли в микросимбиозе кишки у пациентов с ВЗК.

Обсуждение основного результата исследования

Анализ данных, полученных в результате исследования видового состава кишечных микросимбиозов обследуемых пациентов, показал, что микросимбиоз при ВЗК имеет особенные отличия от микробиоценоза пациентов, имеющих другие заболеваний толстой кишки. Полученные нами результаты свидетельствуют о возможной роли кишечной микробиоты в иницировании и развитии ВЗК. Наш анализ выдвигает на первый план общие выводы о том, что микробиота, благоприятствующая протеолитической ферментации и молочнокислым бактериям, увеличивается при ВЗК, тогда как количество бактерий, продуцирующих бутират, обычно уменьшается. Во-вторых, вариации состава кишечной микробиоты у пациентов с ВЗК в основном касаются *Firmicutes*, *Proteobacteria* и *Bacteroidetes*. В пределах *Firmicutes* типовые разновидности, такие как роды *Roseburia*, *Coprococcus*, *F. prausnitzii* и *Streptococcus*, наблюдались у пациентов либо с БК, либо с ЯК, при этом фиксировалось уменьшение количества *F. prausnitzii*. Что касается типа *Proteobacteria*, то опубликованные данные [10, 23–25] и данные проведенного нами исследования показывают количественное изменение у пациентов с БК и ЯК по сравнению с контрольными группами, особенно из *Escherichia*, *Bifidobacteria*, *Desulfovibrio*, *Neisseria*, *Stenotrophomonas*, *Ochrobactrum* и *Achromobacter*. Что касается *Bacteroidetes*, наблюдаются вариации родов *Prevotella*, *Parabacteroides*, *Elizabethkingia* у пациентов с ВЗК.

В дальнейшем мы планируем продолжить накапливать информацию о состоянии микробиоты у пациентов с ВЗК и расширить исследование, включив в него изучение пристеночной микробиоты толстой кишки с целью определения этиологической роли микроорганизмов, составляющих пристеночную и просветную микробиоту кишки, что позволит создать диагностические критерии неинвазивной диагностики воспалительных заболеваний кишечника и разработать методы коррекции микробиоты у пациентов с ВЗК. Проведенное исследование дало возможность создать, а в перспективе пополнить коллекцию этиологически значимых микроорганизмов кишечной микробиоты, выделенных от пациентов с ЯК, БК и невоспалительными заболеваниями кишечника.

Среди этих микроорганизмов будет возможно выявить бактерии, являющиеся триггерами и/или медиаторами возникновения и прогрессирования ВЗК, с од-

ной стороны, и определить кандидатные пробиотические штаммы, с другой.

Своевременная адекватная оценка состава и функциональных характеристик микробиоты по показателям ключевых биомаркеров позволит проводить направленную диагностику и профилактику ближайших и отдаленных последствий ВЗК.

Ограничения исследования

Ограничений в исследовании не было выявлено.

Заключение

Полученные нами результаты свидетельствуют о возможной роли кишечной микробиоты в иницировании и развитии ВЗК. Наш анализ выдвигает на первый план общие выводы о том, что микробиота, благоприятствующая протеолитической ферментации и молочнокислым бактериям, увеличивается при ВЗК, тогда как количество бактерий, продуцирующих бутират, обычно уменьшается, уровень сульфат- и сульфит-редуцирующих бактерий увеличивается (*Clostridium spp.*, кроме *C. butyricum*). Во-вторых, вариации состава кишечной микробиоты у пациентов с ВЗК в основном касаются *Firmicutes*, *Proteobacteria* и *Bacteroidetes*.

Дополнительная информация

Источник финансирования. Исследования выполнены, рукопись подготовлена и публикуется за счет финансирования по месту работы авторов.

Конфликт интересов. Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

Участие авторов. М.А. Сухина — дизайн исследования, проведение микробиологических и молекулярно-генетических исследований биоматериала, анализ полученных данных, написание статьи; С.М. Юдин — прочел и одобрил направление рукописи на публикацию (разделил ответственность за изложенные данные с коллективом авторов); А.В. Загайнова — прочел и одобрил направление рукописи на публикацию (разделил ответственность за изложенные данные с коллективом авторов); В.В. Макаров — прочел и одобрил направление рукописи на публикацию (разделил ответственность за изложенные данные с коллективом авторов); А.В. Веселов — прочел и одобрил направление рукописи на публикацию (разделил ответственность за изложенные данные с коллективом авторов); И.А. Аносов — сбор и анализ биоматериала от пациентов без ВЗК; И.А. Лягина — выполнение микробиологических исследований, анализ результатов исследования; Д.А. Чистякова — выполнение микробиологических исследований, анализ результатов исследования; А.Л. Сафин — сбор и анализ биоматериала от пациентов с ВЗК; Ю.А. Шельгин — прочел и одобрил направление рукописи на публикацию (разделил ответственность за изложенные данные с коллективом авторов).

ЛИТЕРАТУРА

1. Khalif IL, Shapina MV. Inflammatory bowel disease treatment in Eastern Europe: current status, challenges and needs. *Curr Opin Gastroenterol.* 2017;33(4):230–233. doi: <https://doi.org/10.1097/MOG.0000000000000370>
2. Belousova E, Khalif I. Tu1290 Social, Demographic and Clinical Features of Inflammatory Bowel Disease in Russia. *Gastroenterology.* 2012;142(5):S–794. doi: [https://doi.org/10.1016/s0016-5085\(12\)63083-2](https://doi.org/10.1016/s0016-5085(12)63083-2)

3. Lynch SV, Pedersen O. The Human Intestinal Microbiome in Health and Disease. *N Engl J Med.* 2016;375(24):2369–2379. doi: <https://doi.org/10.1056/NEJMra1600266>
4. Littman DR, Pamer EG. Role of the commensal microbiota in normal and pathogenic host immune responses. *Cell Host Microbe.* 2011;10(4):311–323. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.10.004>
5. Nishida A, Inoue R, Inatomi O, et al. Gut microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Clin J Gastroenterol.* 2018;11(1):1–10. doi: <https://doi.org/10.1007/s12328-017-0813-5>
6. Yu LC-H. Microbiota dysbiosis and barrier dysfunction in inflammatory bowel disease and colorectal cancers: exploring a common ground hypothesis. *J Biomed Sci.* 2018;25(1):79. doi: <https://doi.org/10.1186/s12929-018-0483-8>
7. Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, et al. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104(34):13780–13785. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.0706625104>
8. Gophna U, Sommerfeld K, Gophna S, et al. Differences between Tissue-Associated Intestinal Microfloras of Patients with Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. *J Clin Microbiol.* 2006;44(11):4136–4141. doi: <https://doi.org/10.1128/jcm.01004-06>
9. El Mouzan M. Fecal microbiota profile in newly-diagnosed crohn disease in children: data from a middle eastern population. *Morressier;* 2016. doi: <https://doi.org/10.26226/morressier.57d034d1d462b80292383670>
10. Kostic AD, Xavier RJ, Gevers D. The Microbiome in Inflammatory Bowel Disease: Current Status and the Future Ahead. *Gastroenterology.* 2014;146(6):1489–1499. doi: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.02.009>
11. Kang S, Im J. Dysbiosis of the faecal microbiota in patients with Crohn's disease and their unaffected relatives. *Gut.* 2011;60(5):631–637. doi: <https://doi.org/10.1136/gut.2010.223263>
12. Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, et al. Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105(43):16731–16736. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.0804812105>
13. Round J, Mazmanian S. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(5):313–323. doi: <https://doi.org/10.1038/nri2515>
14. Biedermann L, Rogler G. The intestinal microbiota: its role in health and disease. *Eur J Pediatr.* 2015;174(2):151–167. doi: <https://doi.org/10.1007/s00431-014-2476-2>
15. Azad MAK, Sarker M, Li T, et al. Probiotic Species in the Modulation of Gut Microbiota: An Overview. *Biomed Res Int.* 2018;2018:9478630. doi: <https://doi.org/10.1155/2018/9478630>
16. Mazmanian S, Round J, Kasper D. A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. *Nature.* 2008;453(7195):620–625. doi: <https://doi.org/10.1038/nature07008>
17. Sheehan D, Moran C, Shanahan F. The microbiota in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol.* 2015;50(5):495–507. doi: <https://doi.org/10.1007/s00535-015-1064-1>
18. Бухарин О.В., Перунова Н.Б. *Микросимбиозноз.* — Екатеринбург: УрО РАН, 2014. [Buharin OV, Perunova NB. *Mikrosimbioznoz.* Ekaterinburg: Uro RAN; 2014. (In Russ.)]
19. Бухарин О.В., Перунова Н.Б. Симбиотические взаимоотношения человека и микроорганизмов // *Физиология человека.* — 2012. — Т. 38. — № 1. — С. 128–138. [Buharin OV, Perunova NB. Simbioticheskie vzaimootnosheniya cheloveka i mikroorganizmov // *Fiziologiya cheloveka.* 2012;38(1):128–138. (In Russ.)]
20. Nagao-Kitamoto H, Kamada N. Host-microbial Cross-talk in Inflammatory Bowel Disease. *Immune Netw.* 2017;17(1):1–12. doi: <https://doi.org/10.4110/in.2017.17.1.1>
21. Schirmer M, Garner A, Vlamakis H, et al. Microbial genes and pathways in inflammatory bowel disease. *Nat Rev Microbiol.* 2019;17(8):497–511. doi: <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0213-6>
22. Colquhoun C, Duncan M, Grant G. Inflammatory Bowel Diseases: Host-Microbial-Environmental Interactions in Dysbiosis. *Diseases.* 2020;8(2):13. doi: <https://doi.org/10.3390/diseases8020013>
23. Alam M, Amos G, Murphy A, et al. Microbial imbalance in inflammatory bowel disease patients at different taxonomic levels. *Gut Pathog.* 2020;12:1. doi: <https://doi.org/10.1186/s13099-019-0341-6>
24. Vijay A, Valdes AM. Role of the gut microbiome in chronic diseases: a narrative review. *Eur J Clin Nutr.* 2022;76(4):489–501. doi: <https://doi.org/10.1038/s41430-021-00991-6>
25. Шендеров Б.А. *Медицинская и микробная экология и функциональное питание:* в 3 т. Т. 3: Пробиотики и функциональное питание. — М.: ГРАНТЪ, 2001. — 286 с. [Shenderov BA. *Medicinskaya i mikrobnaya ekologiya i funktsional'noe pitanie:* v 3 t. T. 3: Probiotiki i funktsional'noe pitanie M.: GRANT; 2001. 286 s. (In Russ.)]

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Сухина Марина Алексеевна, к.б.н. [Marina A. Sukhina, PhD in Biology]; **адрес:** 123423, Москва, ул. Саляма Адиля, д. 2 [address: 2 Salama Adilya str., 123423, Moscow, Russia]; **e-mail:** marinamari272015@gmail.com, **SPIN-код:** 9577-5290, **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0003-4795-0751>

Юдин Сергей Михайлович, д.м.н., профессор [Sergei M. Yudin, MD, PhD, Professor]; **e-mail:** yudin@cspmpz.ru, **SPIN-код:** 9706-5936, **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0003-2199-8474>

Загайнова Анжелика Владимировна, к.б.н. [Angelika V. Zagainova, PhD in Biology]; **e-mail:** angelikaangel@mail.ru, **SPIN-код:** 6642-7819, **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0003-4772-9686>

Макаров Валентин Владимирович, к.б.н. [Valentin V. Makarov, PhD in Biology]; **e-mail:** makarov@cspmpz.ru, **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-1907-0098>

Веселов Алексей Викторович, к.м.н. [Alexei V. Veselov, MD, PhD]; **e-mail:** a_veselov82@mail.ru, **SPIN-код:** 9333-8673, **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0003-3115-1787>

Аносов Иван Сергеевич, к.м.н. [Ivan A. Anosov, MD, PhD]; **e-mail:** ivaansv@yandex.ru, **SPIN-код:** 4062-6344, **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-9015-2600>

Лягина Ирина Анатольевна [Irina A. Lyagina]; **e-mail:** lyagina59@mail.ru, **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-5434-9062>

Чистякова Дарья Алексеевна [Daria A. Chistyakova]; **e-mail:** mushka1994@list.ru, **SPIN-код:** 7628-3590, **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-2486-081X>

Сафин Антон Лоперович, к.м.н. [Anton L. Safin, MD, PhD]; **e-mail:** antonyz@rambler.ru, **SPIN-код:** 9418-0508, **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-8013-3863>

Шельгин Юрий Анатольевич, д.м.н., профессор, академик РАН [Yuri A. Shelygin, MD, PhD, Professor, Academician of the RAS]; **e-mail:** info@gnck.ru, **SPIN-код:** 7989-8228, **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-8480-9362>