

АНАЛІЗ СКЛАДУ МІКРОБІОЦЕНОЗУ КИШЕЧНИКА У ПАЦІЄНТІВ З НЕСПЕЦИФІЧНО ВИРАЗКОВИМ КОЛІТОМ ТА ХВОРОБОЮ КРОНА

Дніпровський національний університет ім. Олеся Гончара (м. Дніпро)

camomile2730@gmail.com

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами. Дослідження виконані в межах науково-дослідної теми: «Перспективні для використання людиною біологічні властивості мікроорганізмів – компонентів природних і штучних біоценозів» (№ державної реєстрації 0118U003277), що виконується на кафедрі мікробіології, вірусології та біотехнології Дніпровського національного університету імені Олеся Гончара.

Вступ. В останній час виріс інтерес до мікробіоценозу шлунково-кишкового тракту, його впливу на здоров'я людини і на патогенез захворювань різної етіології. Макроорганізм і його мікрофлора складають єдину динамічно екологічну систему та при порушенні одного з його компонентів відбувається збій в коректному функціонуванні організму, що ускладнює перебіг існуючих захворювань [1,2]. При порушеннях біологічної рівноваги між людиною і мікробною флорою у кишечнику розвивається дисбактеріоз кишечника, під яким розуміють клініко-лабораторний стан організму, що пов'язаний зі зміною кількісного та якісного складу мікрофлори кишечника, з подальшим розвитком метаболічних та імунологічних порушень з можливим розвитком шлунково-кишкових розладів [3].

Запальні захворювання кишечника, що включають неспецифічно виразковий коліт та хворобу Крона, є однією з найважливіших проблем не тільки сучасної гастроентерології, а й представляє соціальну проблему, оскільки на ці патології частіше страждають особи молодого і працездатного віку. Дані захворювання характеризуються високою ймовірністю розвитку важких ускладнень, що часто призводить до інвалідизації хворих. В даний час відмічається тенденція до збільшення захворюваності на хронічно запальні процеси. Поширеність неспецифічного виразкового коліту становить 70–150 випадків, а хвороби Крона 50–70 на 100 тис. населення і, на жаль, число випадків зростає. На хронічно запальні захворювання кишечника страждають особи різних вікових категорій, навіть немовляти, але частіше їх реєструють у пацієнтів молодого віку [4,5]. Неспецифічно виразковий коліт (НВК) – це хронічно запальне захворювання ободової і прямої кишок з ураженням слизової оболонки й підслизового шару кишки, та утворенням виразок. Причини його виникнення і розвитку є стресові стани, порушення імунних реакцій організму, посилення хвороботворних властивостей кишкової флори. Запалення може поширюватися по всій слизовій оболонці товстої кишки або обмежуватися ураженням окремих її сегментів, від чого залежить перебіг хвороби. Хвороба Крона (ХК) – це хронічно запальне захворювання, що вражає весь шлунково-кишковий тракт – від порожнини рота до анального отвору. На відміну від неспецифічно виразкового коліту при хворобі Крона запаль-

ний процес поширюється на всі шари стінки кишки [6]. Як неспецифічно виразковий коліт, так і хвороба Крона вражають області з найвищими концентраціями кишкових бактерій, що в значній мірі припускає участь симбіотичних бактерій у патогенезі цих захворювань [7]. Етіологія запальних захворювань кишечника до сих пір невідома, але вважають, що в основі їх патогенезу лежать збої в роботі імунних механізмів. Порушення бактеріальної складової кишкового мікробіоценозу призводить до зниження резистентності слизових бар'єрів, до змін у метаболізмі колоніцитів, пригнічення активностей клітин кишкового епітелію, а саме метаболічної і секреторної, та впливу на місцевий імунітет [4,8,9,10].

На підставі аналізу даних вітчизняних і зарубіжних дослідників можна заключити, що в патогенезі неспецифічно виразкового коліту та хвороби Крона певна роль відводиться змінам мікробних популяцій і формуванню не адекватної імунної відповіді на антигени резидентних бактерій та їх впливу на розвиток ендотоксикозу й перебіг захворювання.

Мета дослідження. Проаналізувати особливості мікробного пейзажу кишечника у осіб різної статі та віку з хронічно запальними захворюваннями травної системи.

Об'єкт і методи дослідження. У даному дослідженні було проведено аналіз складу мікрофлори шлунково-кишкового тракту 50 пацієнтів різного віку й статі з дисбіотичним синдромом при неспецифічно виразковому коліті та хворобі Крона. Дослідження проводилось на базі науково-дослідного сектору Інституту гастроентерології НАМН України.

Визначення складу мікробіоценозу за якісними та кількісними показниками проводили методами мікробіологічного аналізу згідно з методичними матеріалами «Бактеріологіческая диагностика дисбактериоза кишечника». Видову ідентифікацію виділених мікроорганізмів представників нормальної, умовно-патогенної аеробної та анаеробної мікрофлори проводили згідно наказу №535 від 22.04.1985 року про «Унификацию микробиологических (бактериологических) методов исследования».

Для постановки клінічного діагнозу в обстежених пацієнтів було проведено визначення фекального кальпротектину методом твердофазного імуноферментного аналізу для диференціації запальних захворювань і синдрому подразненого кишечника за допомогою тест-системи *BUNHLMANN fCAL ELISA Calprotectin*.

Облік та обробка результатів здійснювалася за допомогою комп'ютерної програми *Microsoft Office Excel 2010*.

Результати досліджень та їх обговорення. З метою встановлення зв'язку між розвитком запальних захворювань кишечника та проявом дисбіотичного синдрому було проведено порівняльний аналіз

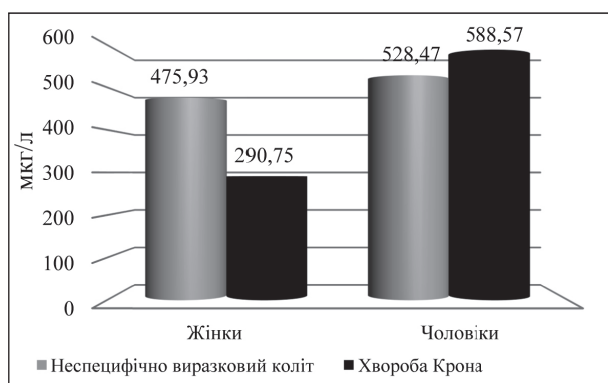


Рис. 1. Середні показники вмісту фекального кальпротектину у пацієнтів з хронічно запальними захворюваннями кишечника.

мікробного пейзажу товстої кишки у 50 пацієнтів Інституту гастроентерології НАМН України з неспецифічно виразковим колітом (НВК) та хворобою Крона (ХК). Ступінь ураження кишечника при хронічно запальних захворюваннях визначали за вмістом фекального кальпротектину (ФК), який є маркером інтестинального запалення і дозволяє неінвазивно диференціювати синдром подразненого кишечника та хронічно запальні процеси. В усіх пацієнтів показники фекального кальпротектину значно перевищували допустимі значення норми (< 50 мкг/г) характерні для синдрому подразненого кишечника та складали в середньому 483,52±37,06 мкг/л, що підтверджувало діагноз на хронічно запальні захворювання шлунково-кишкового тракту (рис. 1). Так, значення фекального кальпротектину у хворих з неспецифічно виразковим колітом в середньому складало 503,34±38,90 мкг/л, а у пацієнтів з хворобою Крона – 418,39±88,11 мкг/л, що свідчить про високу активність запального процесу та опосередковано вказує на обсяг ураження. При проведенні порівняльного аналізу результатів тесту на вміст фекального кальпротектину було встановлено, що показники концентрації ФК у жінок на фоні неспецифічно виразкового коліту та хворобі Крона в середньому були нижчими на 10% та на 51% відповідно, на відміну від чоловіків. Це вказує на більш значні ураження клітин імунної системи (нейтрофілів, макрофагів) та тканин травного тракту при розвитку хронічно запальних процесів у чоловіків.

У всіх обстежених хворих різної статі та віку виявлені дисбіотичні порушення у складі кишкової мікрофлори (табл.).

При аналізі кількісних показників співвідношення різних представників мікробіозеноту кишечника у осіб жіночої статі встановлено значні відхилення в титрах певних асоціантів (рис. 2). Так, на фоні неспецифічно виразкового коліту та хвороби Крона спостерігалась повна або часткова елімінація одних із найважливіших симбіонтів – лактобактерій: у 44-55,6% випадків частота висіву дорівнювала нулю, а

у 56-44,4% – не перевищувала 10^4 - 10^5 КУО. Також у 25% хворих на НВК та у 44,5% пацієток з хворобою Крона зареєстровано зниження титрів біфідобактерій до 10^7 на відміну від 10^9 в нормі. Показники виявлення ентерококів та ешерихій з нормальною ферментативною активністю теж мали відхилення у 12,5-25% обстежених при хронічно запальних захворюваннях кишечника. У той же час титри представників умовно-патогенної мікрофлори в ряді випадків значно перевищували референтні значення. У 55,6% жінок з патологією хвороба Крона частота виявлення стафілококів перевищувала допустимі значення (< 10^2) і складала 10^4 - 10^6 КУО, а у пацієток з неспецифічно виразковим колітом подібні відхилення зареєстровано у 43,75% пацієток. Також наявність висо-

Таблиця.

Порівняльний аналіз якісних та кількісних показників складу мікрофлори кишечника у пацієнтів з хронічно виразковим колітом та хворобою Крона

Мікроорганізми	Референтні показники (норма)	Хворі на НВК n=32		Хворі на ХК n=18	
		Відхилення від норми	Частота відхилень	Відхилення від норми	Частота відхилень
Біфідобактерії	10^9	< 10^7 – 10^8	31,25%	< 10^7 – 10^8	38,9%
Лактобактерії	10^7 - 10^8	10^0 – 10^5	100%	10^0 – 10^5	100%
Ентерококи	10^7 - 10^8	< 10^5	21,87%	< 10^5	22,3%
Ешерихії НФА	10^7 - 10^8	< 10^3 – 10^6	28,12%	< 10^3 – 10^6	16,7%
Ешерихії гемолітичні	$\leq 10^4$	10^6 - 10^8	34,4%	10^6 - 10^8	27,8%
Протеї	$\leq 10^4$	10^7	6,25%	10^7	0%
Умовно-патогенні ентеробактерії	$\leq 10^4$	10^5 – 10^8	34,4%	10^5 – 10^8	38,9%
Стафілококи	$\leq 10^2$	10^4 - 10^6	47%	10^4 - 10^6	50%
Гриби роду <i>Candida</i>	$\leq 10^2$	10^3 - 10^6	50%	10^3 - 10^6	33,4%

ких титрів грибів роду *Candida* було встановлено для 50% жінок з НВК і 44,5% осіб з хворобою Крона при допустимій нормі не більше 10^2 . Збільшення ступеню колонізації умовно-патогенними ентеробактеріями кишечника виявлено у 22,3-33,4% обстежених пацієток з хронічно запальними захворюваннями.

Вивчення мікробного пейзажу травної системи у осіб чоловічої статі з хронічно запальними захворюваннями теж показало наявність дисбіотичного синдрому у більшості пацієнтів (рис. 3). Зміни складу мікрофлори кишечника у всіх обстежених чоловіків

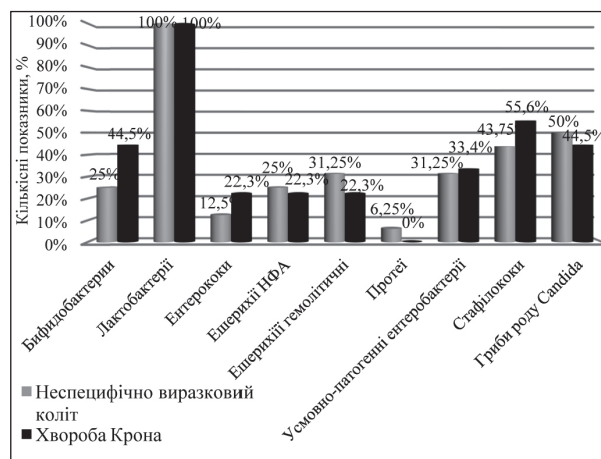


Рис. 2. Частота відхилень у складі мікробіоти кишечника жінок хворих на неспецифічно виразковий коліт та хворобу Крона.

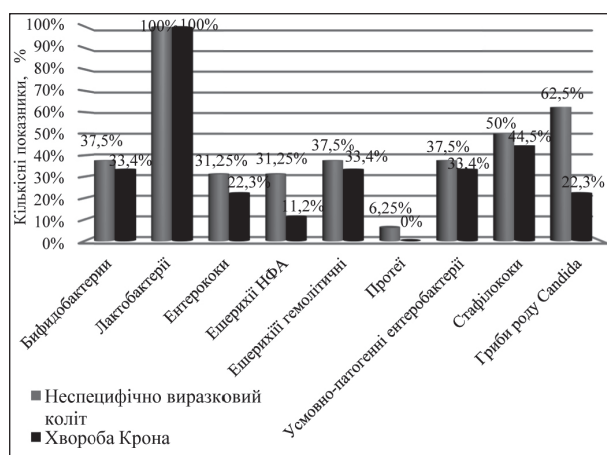


Рис. 3. Частота відхилень у складі мікробіоти кишечника чоловіків хворих на неспецифічно виразковий коліт та хворобу Крона.

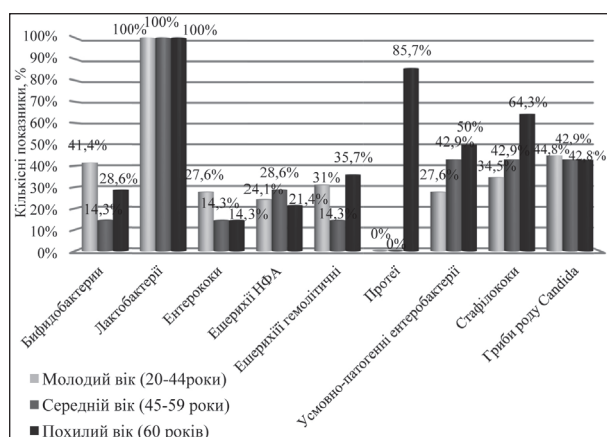


Рис. 4. Частота відхилень у складі мікрофлори кишечника пацієнтів різних вікових груп з дисбіотичним синдромом при хронічно запальних захворюваннях кишечника.

у більшому ступені проявлялись у відсутності або значному зниженні кількості лактобактерій. В результаті проведеного порівняльного аналізу у пацієнтів хворих на НВК відхилення в кількісних показниках асоціантів мікробіоценозу реєструвалися частіше, ніж у осіб з хворобою Крона: у більшій кількості випадків зареєстровано зниження симбіотичних бактерій (біфідобактерій на 4,1%, ентерококів на 8,95% і кишкової палички з нормальною ферментативною активністю на 20,05%) та збільшення титрів представників умовно-патогенної мікрофлори (стафілококів на 5,5%, ентеробактерій на 4,1% та грибів роду *Candida* на 40,1%).

Одержані дані свідчать, що при неспецифічно виразковому коліті дисбіотичні порушення мікрофлори кишечнику були більш виражені в чоловіків у порівнянні з жінками. Число випадків, коли спостерігали зменшення кількості таких представників нормофлори, як біфідобактерій, ентерококів та кишкової палички з нормальною ферментативною активністю, перевищувало у чоловічої групи ніж у жіночої в середньому на 12,5%. Також виявлення *E. coli* гемолітичної, умовно-патогенних ентеробактерій, стафілококів та грибів роду *Candida* в титрах більш високим за референтні показники спостерігалось частіше у чоловіків в середньому на 7,8%.

При визначенні складу мікрофлори травного тракту у пацієнтів з хворобою Крона відмінності у відхиленнях в титрах окремих представників мікробіоти варіювали у жінок і чоловіків, за виключенням лактобактерій, які зовсім не висілились або були виявлені в знижених титрах.

На наступному етапі представляло інтерес проаналізувати зміни складу мікрофлори кишечнику при відповідних патологіях у хворих різного віку (рис. 4). Серед обстежених пацієнтів з хронічно запальними захворюваннями найбільше було осіб молодого віку від 20 до 44 років (n=29), людей середнього віку 45-59 років було найменше (n=7), а також хворих старше за 60 років – 14 пацієнтів.

У всіх пацієнтів незалежно від їх віку спостерігалось значне зниження титрів лактобактерій. Число випадків, коли реєстрували зменшення кількості біфідобактерій відносно норми, перевищувало серед осіб 20-44 років і складало 41,4%, а найменшу кількість пацієнтів зі зниженими показниками біфідобактерій було виявлено в групі середнього віку 45-59 років – 14,3%. Також спостерігалось зниження вмісту ентерококів у складі мікрофлори товстої кишки у 14,3-27,6% пацієнтів всіх вікових груп. В той же час було виявлено досить високий ступінь колонізації кишечника умовно-патогенною мікрофлорою у обстежених з хронічно запальними процесами різного віку.

Так, найвища частота виявлення бактерій роду *Proteus* – 85,7%, стафілококів – 64,3%, умовно-патогенних ентеробактерій – 50% і гемолітичних ешерихій – 35,7% випадків встановлена у осіб похилого віку. В інших групах пацієнтів показники відхилень титрів умовно-патогенних бактерій коливались з меншою частотою. В усіх обстежених різного віку частота виявлення дріжджоподібних грибів роду *Candida* була на високому рівні та складала 42,8% – 44,9% випадків.

Таким чином, за результатами проведених досліджень показано суттєві відхилення кількісних та якісних показників складу мікробіоценозу кишечника у хворих різної статі й віку з хронічно запальними процесами [11].

Висновки. Встановлено, що мікробний пейзаж кишечника у 50 обстежених хворих з хронічно запальними процесами відрізняється значними порушеннями рівноваги у бік зменшення титрів симбіонтів – лактобактерій, біфідобактерій, ентерококів, типових ешерихій та збільшення кількості представників умовно-патогенних ентеробактерій і грибів роду *Candida*. Показано більш значний прояв інтестинального запалення кишечника за показниками фекального кальпротектину у чоловіків порівняно з жінками. У осіб чоловічої статі хворих на неспецифічно виразковий коліт рівень дисбалансу мікробіоценозу кишечника виявився більш вираженим, на відміну від пацієнтів з хворобою Крона. Висока частота захворюваності на хронічно запальні процеси кишечнику з відповідними дисбіотичними порушеннями реєструвалась в групі осіб віком від 20 до 44 років. У той же час кількісні показники колонізації умовно-патогенними видами мікроорганізмів були вищими у осіб похилого віку.

Можна заключити, що ураження кишечнику, спричинені патологіями неспецифічно виразкового

коліту та хвороби Крона, відіграють провідну роль у розвитку дисбактеріозу. Одержані дані є основою для вивчення залежності між глибиною вираженості патогенезу даних захворювань та тривалістю дисбіотичних порушень.

Перспективи подальших досліджень. Проведений моніторинг свідчить про необхідність подаль-

шого вивчення взаємозв'язку між ступенем прояву запальних процесів шлунково-кишкового тракту і змінами мікробного пейзажу біотопу та розробки методів корекції й терапевтичних заходів як для відновлення мікробіоценозу, так і для боротьби з хронічними захворюваннями кишечника.

Література

1. Yakovenko EP, Ivanov AN, Kazarina AV, Mamatkhodzhayev RKH, Pokhal'skaya OYu, Grigor'yeva YuV. Narushenie normalnogo sostava kishhechnykh bakteriy: klinicheskoe znachenie i voprosy terapii. Rus. med. zhurn. 2008 Jan 5;10(2):6-11. [in Russian].
2. Knyazev OV. Korrektsiya mikroflory i kishhechnika u bolnykh yazvennyim kolitom. Eksperimentalnaya klinicheskaya enterologiya. 2011;4(5):91-6. [in Russian].
3. Baranovskiy AYU, Kondrashina EA. Disbakterioz kishhechnika. Piter: SPb; 2007. 240 s. [in Russian].
4. Belousova EA. Yazvennyy kolit i bolezнь Krona. Tver: OOO «Izdatelstvo «Triada»; 2002. 128 s. [in Russian].
5. Stepanov YuM, Scherbynina MB, Kononov IN. Suchasni metodi doslidzhenya v gastroenterologii: metod. posib. Dnipropetrovs'k; 2006. 155 s. [in Ukrainian].
6. Parray FQ, Wani ML, Malik AA, Wani SN, Bijli AH, Irshad I, et al. Ulcerative colitis: a challenge to surgeons. Int. J. Prev. Med. 2012 Nov;3(11):749-63.
7. Sartor RB. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. Gastroenterology. 2008;134:577-94.
8. Garcia Rodriguez C. Toll-like receptor 4 dependent pathways as sensors of endogenous «danger» signals. New evidences and potential therapeutic targets. Immunologia. 2007;26(4):210-5.
9. Cummings JH, Macfarlane GT, Macfarlane S. Intestinal bacteria and ulcerative colitis. Curr. Iss. Intest. Microbiol. 2003 Mar;4(1):9-20.
10. Mack DR, Ahrne S, Hyde L, Wei S, Hollingsworth MA. Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of Lactobacillus strains to intestinal epithelial cells in vitro. Gut. 2003 Jun;52(6):827-33.
11. Brandtzaeg P, Isolauri E, Prescott SL, editors. The interaction of the microorganism and the host: tolerance or allergy. North Carolina. 2009;64:121-37.

АНАЛІЗ СКЛАДУ МІКРОБІОЦЕНОЗУ КИШЕЧНИКА У ПАЦІЄНТІВ З НЕСПЕЦИФІЧНО ВИРАЗКОВИМ КОЛІТОМ ТА ХВОРОБОЮ КРОНА

Маланчук О. І., Гаврилюк В. Г., Скляр Т. В., Соколова І. Є.

Резюме. Проведений моніторинг прояву дисбіотичного синдрому на фоні хронічно запальних захворювань кишечника серед жінок і чоловіків різного віку. Встановлено значні порушення рівноваги у бік зменшення титрів симбіонтів – лактобактерій до 10^5 -0 КУО, біфідобактерій – 10^8 - 10^7 , ентерококів – 10^5 , типових ешерихій – 10^6 - 10^3 та збільшення кількості представників умовно-патогенних ентеробактерій до 10^8 - 10^5 КУО, стафілококів – 10^6 - 10^4 і грибів роду *Candida* – 10^6 - 10^3 . Показано більш значний прояв інтестинального запалення кишечника за показниками фекального кальпротектину у чоловіків порівняно з жінками. У осіб чоловічої статі хворих на неспецифічно виразковий коліт рівень дисбалансу мікробіоценозу кишечника виявився більш вираженим, на відміну від пацієнтів з хворобою Крона. Встановлена висока частота відхилень у складі мікрофлори при неспецифічно виразковому коліті та хворобі Крона в осіб молодого віку, а найменш уразливими виявились особи 45-59 років.

Ключові слова: дисбіоз кишечника, неспецифічно виразковий коліт, хвороба Крона, фекальний кальпротектин.

АНАЛИЗ СОСТАВА МИКРОБИОЦЕНОЗА КИШЕЧНИКА У ПАЦИЕНТОВ С НЕСПЕЦИФИЧЕСКИ ЯЗВЕННЫМ КОЛИТОМ И БОЛЕЗНЬЮ КРОНА

Маланчук О. И., Гаврилюк В. Г., Скляр Т. В., Соколова И. Е.

Резюме. Проведен мониторинг проявления дисбиотического синдрома на фоне хронически воспалительных заболеваний среди женщин и мужчин разного возраста. Установлены значительные нарушения равновесия в сторону уменьшения титров симбионтов – лактобактерий до 10^5 - 10^0 КОЕ, бифидобактерий – 10^8 - 10^7 , энтерококков – 10^5 , типичных эшерихий – 10^6 - 10^3 и увеличение количества представителей условно-патогенных энтеробактерий до 10^8 - 10^5 КОЕ, стафилококков – 10^6 - 10^4 и грибов рода *Candida* – 10^6 - 10^3 . Показано более значительное проявление интестинального воспаления кишечника с показателями фекального кальпротектина у мужчин по сравнению с женщинами. У лиц мужского пола больных неспецифическим язвенным колитом уровень дисбаланса микробиоценоза кишечника оказался более выраженным в отличие от лиц женского пола. Установлена высокая частота отклонений в составе микрофлоры при неспецифическом язвенном колите и болезни Крона у лиц молодого возраста, а наименее уязвимыми оказались лица 45-59 лет.

Ключевые слова: дисбиоз кишечника, неспецифический язвенный колит, болезнь Крона, фекальный кальпротектин.

ANALYSIS OF THE COMPOSITION OF THE INTESTINAL MICROBIOCENOSIS IN PATIENTS WITH NON-SPECIFIC ULCEROUS COLITIS AND CROHN'S DISEASE

Malanchuk O. I., Gavrilyuk V. G., Sklyar T. V., Sokolova I. E.

Abstract. The manifestations of dysbiotic syndrome were monitored in the setting of chronically inflammatory diseases among women and men of different ages. Significant imbalances were found in the direction of reducing the titers of symbionts – lactobacilli to 10^5 -0 CFU, bifidobacteria – 10^8 - 10^7 , enterococci – 10^5 , typical Escherichia –

10^6 - 10^3 and increasing the number of representatives of opportunistic enterobacteria to 10^8 - 10^5 CFU, staphylococci – 10^6 - 10^4 and fungi of the genus *Candida* – 10^6 - 10^3 .

A more significant manifestation of intestinal inflammation of the intestine in terms of fecal calprotectin in men compared with women was shown. In males of patients with nonspecific ulcerative colitis, the level of imbalance of intestinal microbiocenosis was more pronounced in contrast to females. The number of cases when there was a decrease in the number of the main representatives of normal flora exceeded in the male group than in the female group by an average of 12.5%. Also, the identification of opportunistic pathogenic microflora and fungi of the genus *Candida* in the titer of higher reference indicators was observed more often in men by an average of 7.8%. However, in Crohn's disease, the frequency of registration of deviations in the titers of individual microbiota varied among women and men.

The high incidence of chronic inflammatory bowel disease with the corresponding dysbiotic disorders was recorded in the group of people aged 20 to 44 years. All patients, regardless of their age, showed a significant decrease in lactobacillus titers. The number of cases when a decrease in the number of bifidobacteria was recorded, enterococci relative to the norm, exceeded among young people and was 41.4% and 27.6%, respectively. At the same time, the quantitative indices of colonization of opportunistic microorganisms of the digestive tract were higher in the elderly. The frequency of detection of yeast-like fungi of the genus *Candida* was at a high level in all the examined age groups and was 42.8% – 44.9%.

It can be concluded that intestinal lesions caused by pathologies of nonspecific ulcerative colitis and Crohn's disease play a leading role in the development of dysbacteriosis. The data obtained are the basis for studying the relationship between the depth of the pathogenesis of these diseases and the duration of dysbiotic disorders.

Key words: intestinal dysbiosis, nonspecific ulcerative colitis, Crohn's disease, fecal calprotectin.

Рецензент – проф. Дудченко М. О.

Стаття надійшла 17.02.2019 року