

РОЛЬ КИШЕЧНОЙ МИКРОФЛОРЫ В ПАТОГЕНЕЗЕ БОЛЕЗНИ КРОНА

Н.Л. АКОПЯН, А.М. МАНВЕЛЯН, М.А. БАЛАЯН, А.З. ПЕПОЯН

Институт молекулярной биологии НАН РА, 0014, Ереван

Crohn's disease is an inflammatory disease of the gastrointestinal tract with unknown etiology. Based on widely discussed bacterial hypothesis of the origin of disease, the intestinal microflora of Crohn's disease patients was studied. Thus, the results of these investigations showed that there is an obvious deviation from the norm in the gut microflora of CD patients, which may have the primary role in the initiation of the Crohn's disease.

Болезнь Крона - кишечная микрофлора

Болезнь Крона (БК) - хроническое, неспецифическое, гранулематозное воспалительное заболевание желудочно-кишечного тракта, с характерными поражениями и трансмуральным воспалением. Болезнь может захватывать весь пищеварительный тракт от ротовой полости до ануса, но чаще поражает терминальные отделы тонкого кишечника (илеум). БК вместе с имеющим много общих патофизиологических и эпидемиологических характеристик язвенным колитом образует группу - воспалительная болезнь кишечника [10].

Случаи болезни описаны повсеместно, однако наиболее часто она встречается в Северной Европе и в Северной Америке [2, 11]. Частота возникновения составляет 2-4 случая на 100000 жителей в год, а общая распространенность заболевания колеблется в пределах 40-60 случаев на 100000. Болезнь чаще встречается среди евреев - примерно в 6 раз чаще, чем у других наций. Как показали наши исследования, в Армении распространенность заболевания значительно ниже по сравнению с другими странами.

В большинстве случаев болезнь начинается между 15 - 35 годами жизни, но есть и второй пик повышенной заболеваемости - после 60 лет [7].

До настоящего времени точная причина болезни Крона остаётся неизвестной. Среди причин называются генетические [4, 9], инфекционные, иммунологические [3] и экологические факторы [12]. Наиболее широко обсуждается инфекционная природа заболевания [14]. Предполагается связь БК с персиниями, хламидиями, вирусами, нарушениями микробиоценоза кишечника. В литературе обсуждаются несколько взаимно неисключающих гипотез, связанных с ролью микроорганизмов в этиологии БК: невыявленный до сих пор патоген, чрезмерное бактериальное перемещение

через слизистую оболочку кишки; аномальный ответ иммунной системы на нормальные кишечные бактерии; нарушение баланса между комменсальными и вредными кишечными бактериями (дисбиоз) [15]. Однако первичная роль какого-либо бактериального фактора в возникновении болезни Крона остается в настоящее время недоказанной.

Таким образом, дополнительно к генетическим и иммунологическим исследованиям важным представляется изучение кишечной микрофлоры у больных БК.

Целью данного исследования являлось выяснение роли кишечной микрофлоры в возникновении и развитии БК.

Материал и методика. Исследовалась кишечная микрофлора 26 добровольцев с болезнью Крона (средний возраст 47,6 лет с доминированием пациентов мужского пола Медицинского центра "Эребуни" и Медицинского центра имени "Сурб Нерсес Мец"), и кишечная микрофлора 30 здоровых лиц (контроль). За 2-3 недели до исследования ни один из пациентов не принимал антибиотиков, гормональных препаратов, радиотерапии и других иммуностимулирующих препаратов.

Свежий фекальный образец (1 г) растворяли в 9 мл физиологического раствора и выдерживали 2 мин. Осадок удаляли с помощью центрифугирования на низкой скорости, а надосадок постепенно разбавляли в физиологическом растворе. Для первичной идентификации энтеробактерий разбавленный раствор высевали на агаре МакКонки, после чего проводили дальнейший анализ, используя селективную среду и известные биохимические тесты [8, 13].

Идентификацию энтерококков проводили на основе роста на желчном агаре (Bile Esculin Agar) (пептический перевар животной ткани 5 г/л, мясной экстракт 3 г/л, Oxgall 40 г/л, эскулин 1 г/л, железа цитрат 0,5 г/л, агар-агар 15 г/л, pH 6,6±0,2), идентификацию *Streptococcus* проводили на KF стрептококковом агаре (полипептон 10 г/л, дрожжевой экстракт 10 г/л, натрия хлорид 5 г/л, натрия глицерофосфат 10 г/л, мальтоза 20 г/л, лактоза 1 г/л, натрия азид 0,4 г/л, агар 20 г/л, pH 7,2).

Для селективного выделения *Clostridium* был использован агар (Clostridial Agar, Sigma) (гидролизат казеина 17 г/л, папаиновый перевар соевой муки 3 г/л, глюкоза 6 г/л, натрия хлорид 2,5 г/л, натрия тиогликолят 1,8 г/л, л-цистин 0,25 г/л, формальдегида сульфоксидат-натрий 1 г/л, неомицина сульфат 0,15 г/л, натрия азид 0,2 г/л, агар-агар 14,5 г/л, pH 7).

Для обнаружения бактерий *Roseburia* и *Acidovorans* были использованы селективные среды и современные молекулярно-биологические методы [5].

Результаты и обсуждение. Наши исследования выявили существенное уменьшение количества грамположительных бактерий, принадлежащих группе XIVa Low-G+C в кишечнике больных, и одновременное увеличение количества других бактерий (*Proteobacteria*, *Clostridia*, *Enterococcus* и *Streptococcus*), представленных в небольшом количестве у здоровых людей (рис. 1). Энтерококки и стрептококки продуцируют лактат, который вызывает ряд желудочно-кишечных расстройств у детей и постхирургических больных [16].

Дальнейшие эксперименты позволили выявить два рода, представленные в недостаточном количестве у пациентов с БК (было показано, что эти бактерии представляют существенную часть кишечной микрофлоры здорового человека). Одним из них является *Roseburia*. В частности, представители рода *Roseburia* являются продуцентами бутирата [1, 5], который является предпочтительным источником энергии для эпителия толстого кишечника и играет важную роль в поддержании здорового состояния кишечника и в профилактике колитов и рака толстой кишки [6].

Представители рода *Roseburia* также используют крахмал, выделяя большое количество бутирата. Вторым родом, выявленным в небольшом количестве у больных БК, является недавно описанный род *Acidovorans*. Представители этого рода используют молочную кислоту в качестве единственного источника энергии. Многие бактерии выделяют лактат как один из конечных продуктов, тогда как разновидности *Acidovorans* утилизируют его.

Молекулярное разнообразие микрофлоры кишечника у здоровых людей



Молекулярное разнообразие микрофлоры кишечника у пациентов с БК



*- *Proteobacteria*, *Enterococci*, *Streptococci* и *Clostridia*

Рис. 1. Распределение основных бактериальных филумов, low-G+С грамположительных бактерий (группы XIVa и IV) и CFB, в кишечнике здоровых лиц и пациентов с БК.

Как показано на рис.1, у пациентов с БК имеет место чрезмерный рост лактат-продуцирующих бактерий и уменьшение количества бутират-продуцирующих бактерий, утилизирующих лактат. Данный композиционный видовой дисбаланс может быть причиной обострения симптомов заболевания у БК пациентов.

Таким образом, было показано очевидное отклонение от нормы кишечной микрофлоры больных БК, что может играть решающую роль в развитии заболевания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Barcenilla A.S., Pryde E., Martin J.C., Duncan S.H., Stewart C.S., Henderson C., Flint H. J. Appl. Environ. Microbiol. 66, 1654-1661, 2000.
2. Bernstein, Charles N. The American Journal of Gastroenterology. 101, 7, 1559-1568, 2006.
3. Cobrin G.M., Abreu M.T. Immunol Rev. 206, 277-95, 2005.
4. Cuthbert A., Fisher S., Mirza M., et al. Gastroenterology, 122, 4, 867-74, 2002.
5. Duncan S.H., Hold G.L., Barcenilla A., Stewart C., Flint H. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52, 5, 1615-20, 2002.
6. Hague A., Paraskeva C. Eur. J. Cancer Prev. 4, 359-64, 1995.
7. Hanauer, Stephen B. New England Journal of Medicine, 334, 13, 841-848, 1996.
8. Holt J.G., Krieg N.R., Smeath P.H., Staley J.T., Williams S.T. (ed.), 9th ed; 1994.
9. Hugot J.P., Chamaillard M., Zouali H., Lesage S., Cezard J.P., Belaiche J., et al. Nature. 411, 599-603, 2001.
10. Kleer C.G., Appelman H.D. Surg Clin North Am. 81, 13-30, 2001.
11. Loftus E.V., Schoenfeld P., Sandborn W.J. Alimentary Pharmacology & Therapeutics 16, 1, 51-60, 2002.
12. Morris D.L., Montgomery S.M. BMJ. 321, 1291, 2000.
13. Murray P.R., Baron E.J., Pfaller M.A., Tenover P.C., Tencken R.H. (eds): Manual of Clinical Microbiology. 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, DC, 1995.
14. Naser S.A., Collins M.T. Inflamm Bowel Dis. 11, 12, 1123, 2005.
15. Tamboli C.P., Neut C., Desreumaux P., Colombel J.F. Gut. 53, 1-4, 2004.
16. Uribarri J., Oh M.S., et al. Medicine (Baltimore). 77, 73-82, 1998.