

На правах рукописи

БЕЛИНСКАЯ ВИКТОРИЯ АЛЕКСАНДРОВНА

**ЯЗВЕННЫЙ КОЛИТ: МИКРОБИОМ ТОЛСТОЙ КИШКИ ПРИ
РАЗЛИЧНЫХ ФОРМАХ ЗАБОЛЕВАНИЯ**

14.01.04 – Внутренние болезни

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2021

Диссертационная работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель: Лоранская Ирина Дмитриевна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой гастроэнтерологии ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России

Научный консультант: Болдырева Маргарита Николаевна, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник ФГБУ «ГНЦ институт иммунологии» ФМБА России

Официальные оппоненты:

Ардатская Мария Дмитриевна, доктор медицинских наук, профессор, ФГБУ ДПО «Центральная государственная медицинская академия» Управления делами Президента Российской Федерации, профессор кафедры гастроэнтерологии

Шифрин Олег Самуилович, доктор медицинских наук, ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» (Сеченовский университет) Минздрава Российской Федерации, профессор кафедры пропедевтики внутренних болезней, гастроэнтерологии и гепатологии Института клинической медицины имени Н.В. Склифосовского

Ведущая организация: ГБУЗ Московский клинический научно-практический центр имени А.С. Логинова ДЗМ

Защита состоится «25» ноября 2021 г. в 12 часов на заседании диссертационного совета Д 208.071.02 при ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава РФ по адресу: 125993, г. Москва, ул. Баррикадная, д. 2/1.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава РФ по адресу: 125445, г. Москва, ул. Беломорская, д. 19/38, на сайте ФГБОУ ДПО РМАНПО <http://www.rmapo.ru/>.

Автореферат разослан « ___ » _____ 2021г.

Ученый секретарь диссертационного Совета
доктор медицинских наук,
профессор

Мазанкова Людмила Николаевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Актуальность проблемы воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК) не вызывает сомнений, что обусловлено высокой распространенностью данной патологии у лиц трудоспособного возраста, инвалидизирующим течением, развитием тяжелых осложнений, необходимостью проведения длительной и дорогостоящей терапии [Адлер Г., 2001].

Язвенный колит – хроническое заболевание толстой кишки, характеризующееся иммунным воспалением ее слизистой оболочки с обязательным вовлечением в процесс прямой кишки, имеющее рецидивирующее или непрерывное течение [Silverberg et al., 2005].

Этиологические факторы язвенного колита не установлены, а в патогенезе играют роль несколько аспектов: генетическая детерминированность, дефекты врожденного и приобретенного иммунитета, кишечная микробиота и различные факторы окружающей среды.

Роль микробиоты в развитии воспаления кишечной стенки до сих пор неясна. Может ли дисбиоз быть одной из причин заболевания, или все-таки является его следствием? [Sokol et al., 2008; Morgan et al., 2012]. Разные виды и классы бактерий оказывают различное влияние на иммунный ответ, возможно, что увеличение доли микробов с сильным провоспалительным потенциалом и уменьшение доли бактерий, способствующих формированию иммунологической толерантности, предрасполагает к развитию ВЗК [Hill D.A. et al., 2010].

Известно, что у пациентов с язвенным колитом достоверно снижено число полезных комменсальных бактерий, населяющих желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) [Frank D.N. et al., 2007; Nagao-Kitamoto H., 2017]. Несколько исследований, основанных на проведении метагеномного анализа, доказали, что, прежде всего, это представители типа *Firmicutes*.

Проблема малоизучена, а результаты проведенных к настоящему моменту исследований достаточно противоречивы. Необходимость получения новых данных об одном из звеньев патогенеза язвенного колита делает целесообразным проведение настоящего исследования.

Степень разработанности темы

Четкий и доступный алгоритм диагностики дисбиоза при язвенном колите не разработан. Большинство научных исследований, посвященных изучению нарушений микробиоты при ВЗК, проведены с использованием образцов фекалий пациентов (Aomatsu et al., 2012; Machiels et al., 2014; Swidsinski et al., 2008; Sokol et al., 2008; Sabino et al., 2016; Eackhaut et al., 2013; Andoh et al., 2011; Schwiertz et al., 2010; Martinez-Medina et al., 2006), что позволяет определить лишь состав просветной или транзитной микробиоты [Ардатская М.Д., 2010].

Более ценной считается информация о микробной колонизации кишечной стенки, полученная путем забора биоптатов слизистой оболочки толстой кишки. Таких исследований значительно меньше, и они проведены на небольших выборках (Morgan et al., 2012; Png et al., 2010; Hansen et al., 2012; Hirano et al., 2018). Это, вероятно, связано с тем, что забор биопсийного материала является сложным и трудоемким процессом с точки зрения его организации.

Методы определения состава микробиоты, применяемые на данный момент, также вызывают вопросы. Рутинное бактериологическое исследование фекалий не используется в научных целях, так как имеет множество недостатков, связанных со временем доставки материала в лабораторию, длительностью ожидания результата, ограниченностью спектра культивируемых микроорганизмов, невозможностью вырастить на питательных средах анаэробов, которые преобладают в толстой кишке.

Молекулярно-генетический метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени достоверен для оценки микробного сообщества различных органов и систем. Выполняется быстро, позволяет идентифицировать широкий спектр микроорганизмов, постоянно совершенствуется с разработкой новых праймеров [Лоранская И.Д., Болдырева М.Н., 2015].

Немногочисленность научных работ по изучению микробиома разных отделов толстой кишки при язвенном колите, отсутствие четких положений в Российских и Европейских рекомендациях по данной тематике подчеркивают важность проводимого исследования. Полученные результаты, в свою очередь, могут стать предпосылкой к внесению дополнений в существующие рекомендации по диагностике и лечению заболевания.

Цель исследования: повысить эффективность тактики ведения больных язвенным колитом за счет оценки состава микробиоты кишечника.

Задачи исследования:

1. Изучить состав пристеночной и полостной микробиоты, используя биоптаты толстой кишки, соскобы эпителиальных клеток ампулы прямой кишки и образцы фекалий у пациентов с язвенным колитом методом ПЦР в режиме реального времени.

2. Провести сравнительный анализ состава мукозной микробиоты отделов толстой кишки, вовлеченных в воспалительный процесс, и макроскопически непораженных участков при язвенном колите.

3. Выявить особенности пристеночной микробиоты при различной протяженности поражения, характере течения и эндоскопической активности язвенного колита.

4. Сопоставить состав мукозной микробиоты пациентов с язвенным колитом и пациентов группы сравнения.

5. Определить возможное влияние проводимой лекарственной терапии на состав пристеночной микробиоты при язвенном колите.

Научная новизна исследования

В рамках данного научного исследования впервые в российской популяции определен состав пристеночной и просветной микробиоты толстой кишки у пациентов с различными формами язвенного колита молекулярно-генетическим методом (ПЦР в режиме реального времени), особенности мукозной микробиоты при различной эндоскопической активности язвенного колита и проводимой лекарственной терапии, а также сопоставление с пациентами группы сравнения. Полученные данные об особенностях микробиоты при воспалительном процессе в дальнейшем будут использованы для создания диагностических систем определения нарушений микробиоценоза толстой кишки.

Теоретическая и практическая значимость работы

В настоящем научном исследовании, проведенном на пациентах с язвенным колитом в российской популяции, определен состав пристеночной и полостной микробиоты. Доказано, что при язвенном колите меняется состав мукозной микробиоты при сопоставлении с пациентами группы сравнения. Выделен род микроорганизмов

(*Bacteroides spp*), который может быть рассмотрен в качестве биомаркера воспалительного процесса в биоптатах и образцах фекалий, а также использоваться в комплексной диагностике при установке диагноза. Дополнены мировые данные об изменениях, возникающих в составе микробиоты при различном течении язвенного колита, разной эндоскопической активности и проводимой лекарственной терапии. Определено, что с помощью ПЦР в режиме реального времени можно достоверно оценить состав микробиоты у больных язвенным колитом. При невозможности забора биоптата для оценки микробиома возможно использование образцов фекалий для диагностики дисбиоза, учитывая результаты сравнения состава пристеночной и полостной микробиоты при язвенном колите.

Методология и методы исследования

Предмет исследования – изменение состава микробиоты толстой кишки при язвенном колите.

Объект исследования – пациенты с различными клиническими формами и течением заболевания.

Критерии включения – пациенты с верифицированным диагнозом язвенного колита.

Критерии невключения – больные с тяжелой или сверхтяжелой атакой язвенного колита; прием антибактериальных или пробиотических препаратов на догоспитальном этапе; наличие кишечной инфекции и тяжелой сопутствующей патологии.

Методы исследования – использован комплекс лабораторных и инструментальных методов исследования, а также метод ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени для определения состава микробиома толстой кишки при язвенном колите с последующим статистическим анализом полученных результатов.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Установлено, что состав фекальной и пристеночной микробиоты у пациентов с язвенным колитом отличается незначительно ($p > 0,05$). При сопоставлении с группой сравнения в составе мукозной микробиоты пациентов с язвенным колитом преобладают бактерии рода *Bacteroides* ($p < 0,05$), которые могут быть рассмотрены в качестве биомаркера воспалительного процесса в биоптатах и образцах фекалий. Также количество *Bacteroides spp* возрастает при нарастании эндоскопической активности заболевания ($p < 0,05$).

2. Показано отсутствие статистически достоверной разницы в составе пристеночной микробиоты в зависимости от течения заболевания, протяженности поражения толстой кишки, а также между макроскопически измененными и неизмененными участками толстой кишки при язвенном колите ($p > 0,05$).

3. Определено, что лекарственные препараты оказывают влияние на состав пристеночного микробиома. Так, назначение биологической терапии в сравнении с препаратами 5-аминосалициловой кислоты сопряжено со снижением количества бактерий рода *Bifidobacterium spp* ($p = 0,05$) и *Butyricimonas* ($p = 0,04$).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертационная работа соответствует п.1. «Изучение этиологии и патогенеза заболеваний внутренних органов: сердечно-сосудистых заболеваний, патологии респираторного, желудочно-кишечного тракта, болезни почек, соединительной ткани и суставов во всем многообразии их проявлений и сочетаний» и п.3. «Совершенствование лабораторных, инструментальных и других методов обследования терапевтических больных, совершенствование диагностической и дифференциальной диагностики болезней внутренних органов» паспорта специальности 14.01.04. – Внутренние болезни.

Апробация диссертации

Диссертационное исследование одобрено на заседании Комитета по этике научных исследований ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, протокол №13 от 14.11.2017 года.

Тема диссертационного исследования утверждена на Совете терапевтического факультета ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, протокол №8 от 14.12.2017 года.

Материалы диссертации доложены и обсуждены на расширенном заседании кафедры гастроэнтерологии и кафедры терапии и полиморбидной патологии ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, протокол №3 от 15.03.2021 г.

Публикации и участие в научных конференциях

Результаты научно-исследовательской работы доложены на XIV Национальном конгрессе терапевтов (г. Москва – 2019 г.) в форме устного выступления, на 27-ой Объединенной Европейской гастроэнтерологической неделе (г. Барселона – 2019 г.) в форме стендового доклада, на 26-ой Объединенной Российской

Гастроэнтерологической неделе (онлайн – 2020 г.) в форме стендового доклада, на 28-ой Объединенной Европейской гастроэнтерологической неделе (онлайн – 2020 г.) в форме стендового доклада, на Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Левитановские чтения» (онлайн – 2020 г.) в форме устного выступления, на 47-ой научной сессии ЦНИИГ «Гастроэнтерология в меняющейся реальности» (онлайн – 2021 г.) в форме устного выступления. По материалам и результатам диссертационной работы опубликовано 7 печатных работ, из них 3 – в изданиях, рекомендованных ВАК РФ.

Внедрение результатов исследования в клиническую практику

Результаты исследования включены в учебный процесс кафедры гастроэнтерологии на циклах профессиональной переподготовки и повышения квалификации врачей по направлению «Гастроэнтерология» ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, в процесс обучения ординаторов, а также в практическую работу гастроэнтерологического отделения ФГБУ «НМИЦ колопроктологии имени А.Н. Рыжих» Минздрава России и подтверждены актами внедрения.

Личный вклад соискателя

Автор диссертационной работы провел обширный литературный поиск среди отечественных и зарубежных источников. Диссертант самостоятельно сформулировал цель и задачи исследования, а также разработал дизайн. Автор лично курировал пациентов с язвенным колитом во время госпитализации в стационар, проводил забор биологических материалов, необходимых для проведения научной работы (образцы фекалий, соскобы прямой кишки, биоптаты толстой кишки при колоноскопии). Соискатель выполнил статистическую обработку данных, дальнейшую интерпретацию и анализ полученных результатов, формулировал основные положения, выводы и практические рекомендации диссертации. Активно принимал участие в конференциях и подготовил научные публикации.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 136 страницах машинописного текста и состоит из введения, 5 глав, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы. В работе выделены 15 рисунков и

23 таблицы. Список литературы содержит 183 источника, из которых 26 отечественных и 157 иностранных авторов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

Научная работа проводилась в гастроэнтерологическом отделении на базе отдела по изучению воспалительных и функциональных заболеваний кишечника ФГБУ «НМИЦ колопроктологии имени А.Н. Рыжих» Минздрава России с 2017 по 2018 гг.

В исследование включены 70 пациентов с верифицированным диагнозом язвенного колита. Среди них были 43 (61,4%) женщины и 27 (38,6%) мужчин. Средний возраст составил $40 \pm 14,4$ лет, средняя длительность анамнеза заболевания – $7,22 \pm 6,7$ лет.

В зависимости от протяженности макроскопических изменений при эндоскопическом исследовании толстой кишки пациенты распределились следующим образом: тотальное поражение выявлено у 78,6% ($n=55$), левостороннее – у 21,4% ($n=15$). Острое течение заболевания выделено у 3 (4,3%) пациентов, хроническое рецидивирующее – у 29 (41,4%) и хроническое непрерывное – у 38 (54,3%). Эндоскопическая активность заболевания на основании классификации по Schroeder: ремиссия – 18 (25,7%), минимальная – 31 (44,3%), умеренная – 18 (25,7%), выраженная – 3 (4,3%) больных.

На момент включения в исследование пациенты получали различные схемы консервативной терапии: препараты 5-АСК (5-аминосалициловая кислота) – 33 (47,1%), 5-АСК и ГКС (глюкокортикостероиды) – 10 (14,3%), 5-АСК и иммуносупрессоры (азатиоприн – АЗА) – 15 (21,4%), генно-инженерные биологические препараты (ГИБП) (анти-ФНО- α) изолированно или в комбинации с АЗА – 12 (17,1%) пациентов.

Критерии невключения: 1) больные с тяжелой или сверхтяжелой атакой язвенного колита; 2) прием антибактериальных или пробиотических препаратов на догоспитальном этапе; 3) наличие кишечной инфекции; 4) тяжелая сопутствующая патология.

Для проведения сравнительного анализа микробиома толстой кишки набрана группа из 50 пациентов, среди которых 20 мужчин (40%) и 30 женщин (60%), проходивших обследование в ФГБУ «НМИЦ колопроктологии А.Н. Рыжих» Минздрава России. Средний

возраст – $54,5 \pm 13,7$ года. У 26 (52%) больных выявлены бессимптомные дивертикулы ободочной кишки как случайная находка при эндоскопическом исследовании, 24 (48%) пациентам установлен диагноз синдрома раздраженного кишечника с диареей или запором на основании Римских критериев IV пересмотра.

Для изучения и проведения количественной оценки состава пристеночной и транзитной микробиоты методом ПЦР в режиме реального времени у больных язвенным колитом получены следующие образцы: 1) биоптаты слизистой оболочки левых отделов толстой кишки, а также дополнительно из правых отделов толстой кишки при левостороннем поражении для изучения мукозной микробиоты; 2) образцы фекалий для исследования просветной микробиоты; 3) соскобы эпителиальных клеток ампулы прямой кишки, полученные стерильным одноразовым инструментом типа «Cytobrush», введенным на глубину 4-5 см, выполняя циркулярные движения по стенкам.

У пациентов группы сравнения для определения состава микробиома собраны биоптаты слизистой оболочки неизмененных левых отделов толстой кишки.

Полученный клинический материал помещали в пробирку типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл, содержащую транспортную среду для ПЦР исследований, и маркировали. В процессе сбора биологические образцы замораживали и хранили при температуре -20°C с последующей доставкой в лабораторию.

ПЦР-диагностика исследуемых образцов производилась с использованием детектирующего амплификатора ДТпрайм (производитель ООО «НПО ДНК-Технология», Протвино, Россия), обеспечивающего проведение полимеразной цепной реакции с автоматической регистрацией результатов в режиме «реального времени». Набор реагентов включал: смесь для ПЦР-амплификации, специфичную для всех бактерий (общая бактериальная масса – ОБМ), специфичные смеси для определяемых микроорганизмов. В одну из пробирок со смесью для амплификации добавлен внутренний контрольный образец, предназначенный для оценки эффективности протекания полимеразной цепной реакции. Одна из пробирок содержала смесь для амплификации геномной ДНК человека, предназначенную для оценки контроля взятия материала (КВМ).

Программное обеспечение, установленное на указанном оборудовании, обеспечивает получение данных в графическом и цифровом формате, удобном для трактовки и хранения результатов.

В исследуемых образцах методом ПЦР в режиме реального времени определяли следующие показатели: КВМ, ОБМ, абсолютные значения микроорганизмов с последующим расчетом относительных показателей.

Абсолютные значения показателей ОБМ, КВМ и диагностируемых микроорганизмов в результатах ПЦР в режиме реального времени представлены в виде десятичного логарифма (\log), который рассчитан по номеру «порогового» цикла, на котором прибор начинает регистрировать положительную реакцию: чем больше количество микроорганизмов присутствует в биопробе, тем раньше наступит «пороговый» цикл. Количество ДНК искомого микроорганизма в образце принято выражать в геном-эквивалентах (ГЭ/обр.), которое пропорционально количеству микроорганизма. Например, абсолютный показатель микроорганизма в результатах ПЦР в режиме реального времени равен 4,0, т.е. 10^4 ГЭ/обр.

Абсолютные значения показателей зависят от техники взятия биоматериала и способа выделения ДНК. Для более точного и объективного анализа рассчитываются относительные количественные показатели микробиоты, отражающие количество конкретных микроорганизмов по отношению к общей бактериальной массе. Относительные показатели представлены в виде разницы десятичных логарифмов соответствующей группы микроорганизмов и общей бактериальной массы. Например, ОБМ составляет 7,0 \log , абсолютный показатель микроорганизма 6,7 \log ; относительный показатель $(6,7 \log - 7,0 \log) = -0,3 \log$. Относительные показатели являются более точными и объективными, так как на них в значительно меньшей степени влияют погрешности, допускаемые как при заборе биоматериала, так и при выполнении анализа.

Первичная база данных формировалась с использованием редактора электронных таблиц Microsoft® Excel 16.37. Статистическая обработка результатов выполнена с использованием пакета прикладных программ Statistica 12.0. Описание качественных признаков производилось с помощью абсолютных и относительных показателей. Проверка нормальности распределения производилась с помощью критериев Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Уилка. Для

распределения, отличающегося от нормального, вычислялись среднее значение, стандартное отклонение, медиана (Me) и интерквартильный размах (25-й и 75-й процентиль), данные представлены в виде Me (25%;75%). Для оценки достоверности непараметрических показателей использовался U-критерий Манна-Уитни. Для исследования взаимосвязи двух переменных применялся коэффициент корреляции Пирсона (r). Статистически достоверными считались значения при $p < 0,05$.

Полученные результаты

Методом ПЦР в режиме реального времени в полученных материалах выделены микроорганизмы, относящиеся к домену *Bacteria*, четырем основным (*Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* и *Proteobacteria*) и двум редко встречающимся (*Fusobacteria* и *Verrucomicrobia*) типам, а также к домену *Archaea* (тип *Euryarchaeota*).

У пациентов группы сравнения в составе пристеночной микробиоты преобладали представители трех типов бактерий *Firmicutes* (37,4%), *Proteobacteria* (25,3%) и *Bacteroidetes* (19,6%). Типы *Actinobacteria* (9,5%), *Verrucomicrobia* (3,97%), *Fusobacteria* (2,99%) и *Euryarchaeota* (1,24%) выявлены в значительно меньшем количестве (рис.1). Общая бактериальная масса составила 5,01 log (ГЭ/обр.) (рис.2).

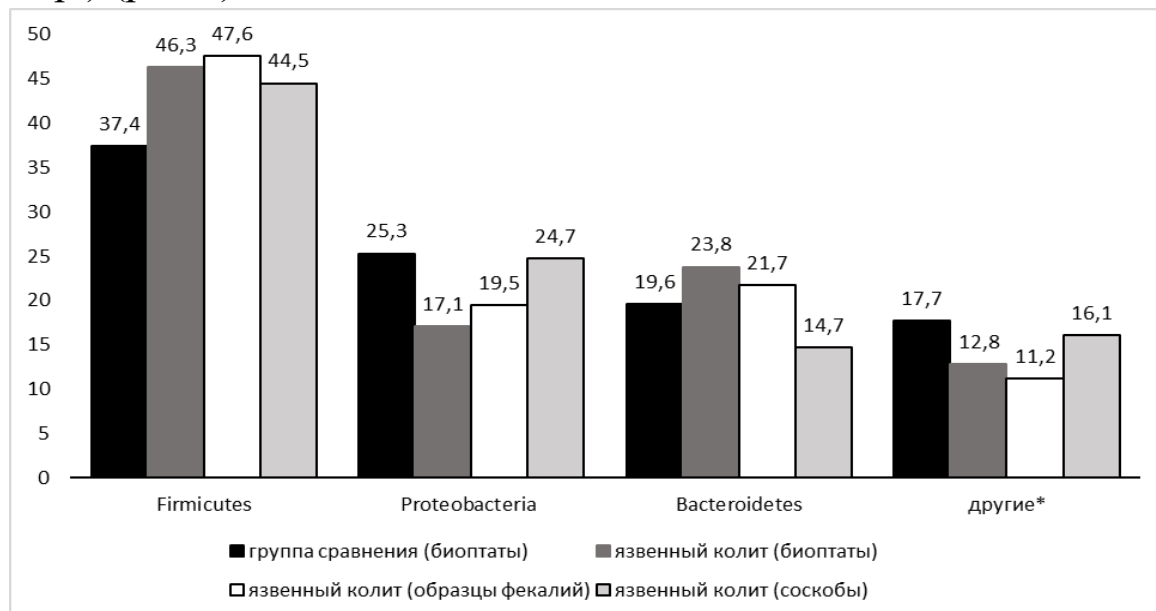


Рисунок 1. Распределение типов микроорганизмов в полученных образцах (%). Примечание: другие* (*Actinobacteria*, *Fusobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Euryarchaeota*).

Основную массу микроорганизмов мукозного микробиома толстой кишки пациентов группы сравнения составили представители типа *Firmicutes*, что подтверждает все имеющиеся на сегодняшний момент литературные данные. Лидирующую позицию при этом занимали *Clostridium coccoides group*, *Clostridium leptum group*– и *Clostridium leptum group*+.

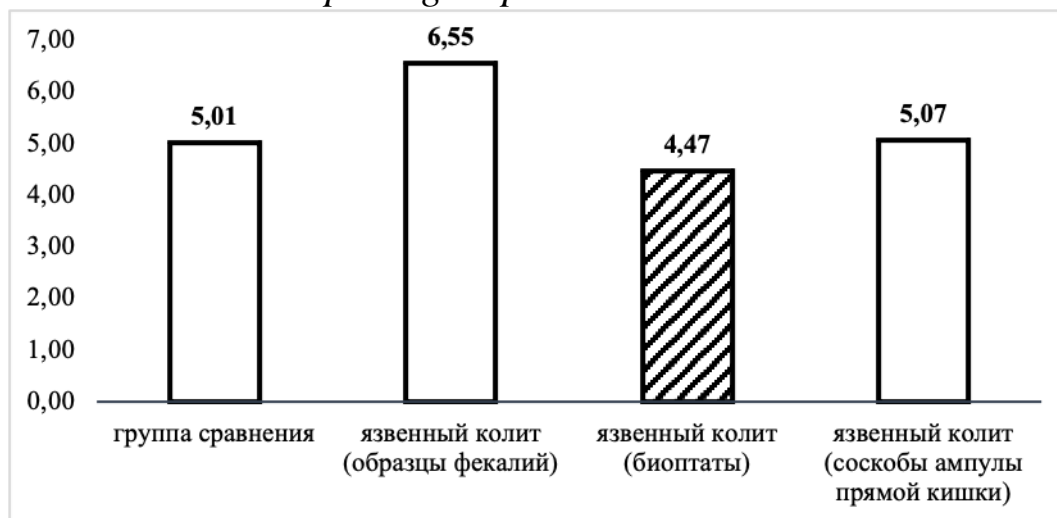


Рисунок 2. Среднее значение общей бактериальной массы (ОБМ) в образцах (log (ГЭ/обр.))

Из типа *Proteobacteria* преобладали бактерии семейства *Enterobacteriaceae*, из *Actinobacteria* – *Coriobacteriia*. Микроорганизмы родов *Bacteroides spp*, *Parabacteroides spp* и *Prevotella spp* из типа *Bacteroidetes* также представлены в достаточно большом количестве (рис.3).

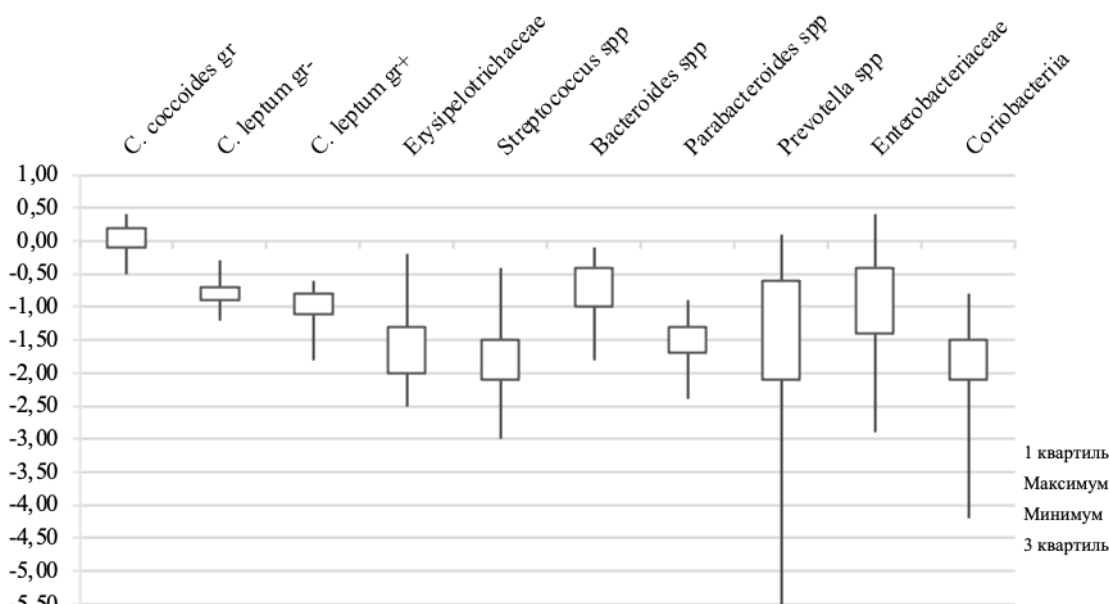


Рисунок 3. Относительное количество микроорганизмов, нормированное на ОБМ, в составе пристеночной микробиоты пациентов группы сравнения – Me(25%;75%).

Проведен молекулярно-генетический анализ состава просветной (транзитной) микробиоты при язвенном колите с использованием образцов кала. Общая бактериальная масса составила $6,55 \log$ (ГЭ/обр.) (рис.2). Основу просветной микробиоты составляют представители типа *Firmicutes* (46,7%), которые в 2 раза превышают количество *Bacteroidetes* (21,7%) (рис.1).

Главными бактериями фекального микробного сообщества являются *Bacteroides spp*, *Clostridium leptum group+* и *Clostridium coccoides group*, а также *Streptococcus spp*, *Clostridium leptum group-*, *Erysipelotrichaceae*, *Dialister+ Alisonella + Megasphaerae + Veillonella*, *Parabacteroides spp* и *Alistipes spp* (рис.4).

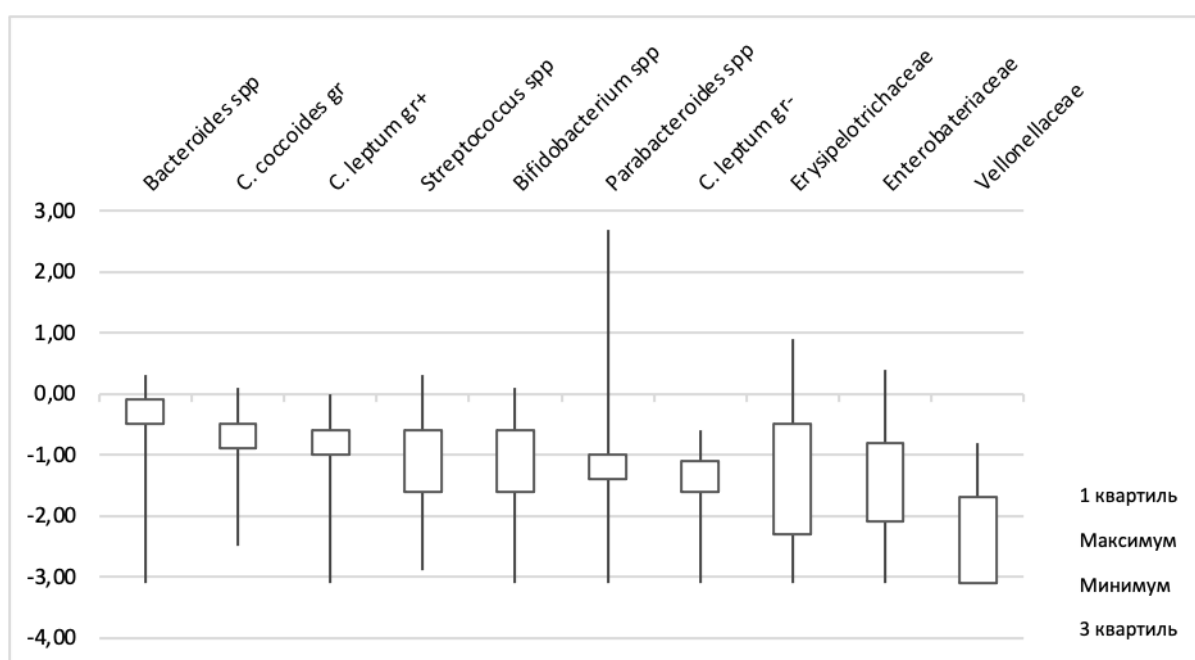


Рисунок 4. Относительное количество микроорганизмов, нормированное на ОБМ, в составе фекальной микробиоты пациентов с язвенным колитом – Me(25%; 75%)

Далее по численности расположились представители типа *Proteobacteria* (19,5%) с основной бактерией *E. coli* и типа *Actinobacteria* (10,12%), включающие *Bifidobacterium spp* и *Coriobacteriia*. Типы *Verrucomicrobia* (1,37%), *Fusobacteria* (0,54%) и *Euryarchaeota* (0,07%) имеют наименьшее представительство.

Определение микробного состава соскобов эпителиальных клеток ампулы прямой кишки было выбрано в связи с тем, что прямая кишка всегда вовлекается в воспалительный процесс при язвенном колите. Данные образцы также представляют особый интерес, так как ранее в литературе не встречается описаний

использования этой методики забора материала при воспалительных заболеваниях кишечника. Выявлено, что общая бактериальная масса в них составляет $5,07 \log$ (ГЭ/обр.) (рис.2).

По распространенности типов бактерии расположились в следующем порядке: *Firmicutes* (44,5%), *Proteobacteria* (24,7%), *Bacteroidetes* (14,7%), *Actinobacteria* (12,7%), *Fusobacteria* (1,4%), *Verrucomicrobia* (1,12%), и *Euryarchaeota* (0,9%) (рис.1).

Согласно относительным значениям, в этих образцах наибольшее содержание имеет род сахаролитических, бутират-продуцирующих бактерий *Anaerococcus spp* (тип *Firmicutes*). Далее представлены *Clostridium leptum group+*, *Streptococcus spp*, *Erysipelotrichaceae*, *Prevotella spp*, *Clostridium coccoides group*, *Bifidobacterium spp* (рис. 5).

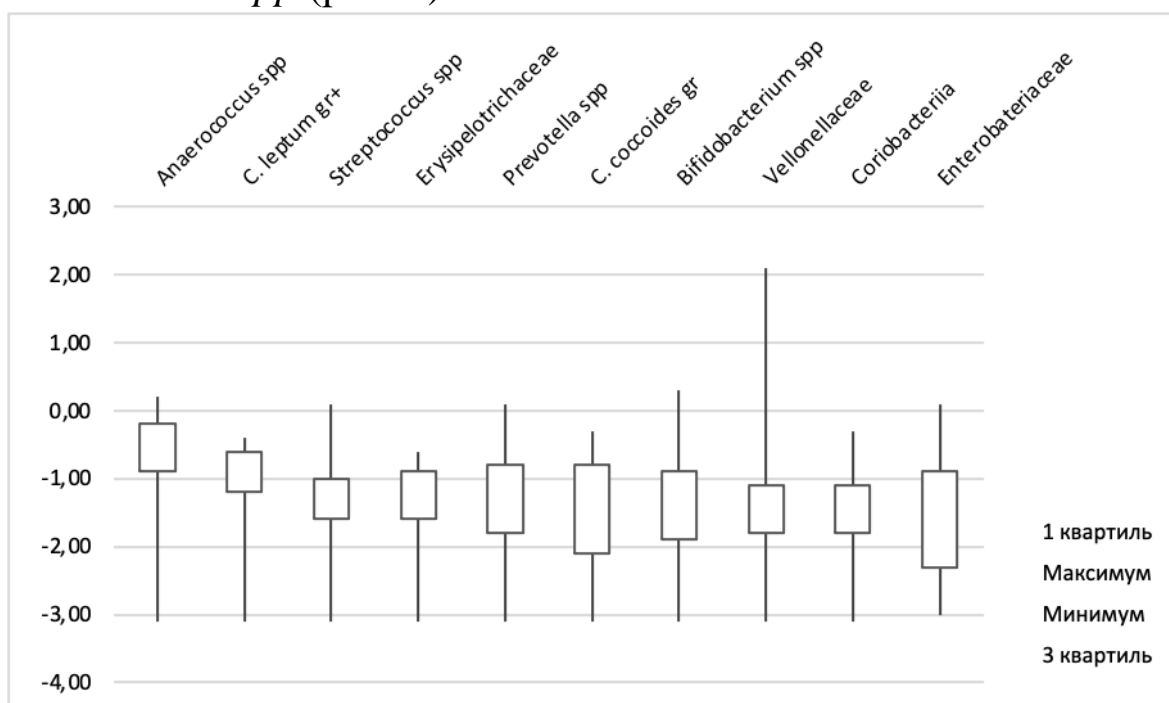


Рисунок 5. Относительное количество микроорганизмов, нормированное на ОБМ, в составе соскобов ампулы прямой кишки пациентов с язвенным колитом – Me(25%;75%).

Имеющиеся на сегодняшний момент времени данные свидетельствуют о роли пристеночной микробиоты в развитии колита. Считается, что аномальная мукозная биота связана с определенными фенотипами заболевания, может быть причиной хронического воспалительного процесса.

В проведенном исследовании прицельное внимание уделено изучению состава пристеночного микробиома при язвенном колите в целом, а также в зависимости от протяженности поражения толстой

кишки, эндоскопической активности заболевания и проводимой лекарственной терапии.

Согласно филогенетической принадлежности бактерии в образцах слизистой толстой кишки при язвенном колите расположились следующим образом в порядке убывания: *Firmicutes* (46,3%), *Bacteroidetes* (23,8%), *Proteobacteria* (17,1%), *Actinobacteria* (9,89%), *Fusobacteria* (1,82%), *Verrucomicrobia* (1,05%) (рис.1). Несмотря на суммарное преобладание представителей типа *Firmicutes*, в наибольшем количестве в образцах выявлены бактерии типа *Bacteroidetes* рода *Bacteroides*, а затем уже *Clostridium leptum group+*, *Streptococcus spp* и *Clostridium coccoides group* (рис. 6). Род *Bacteroides* вероятно связан с деградацией муцина и усиленным воспалительным ответом слизистой оболочки.

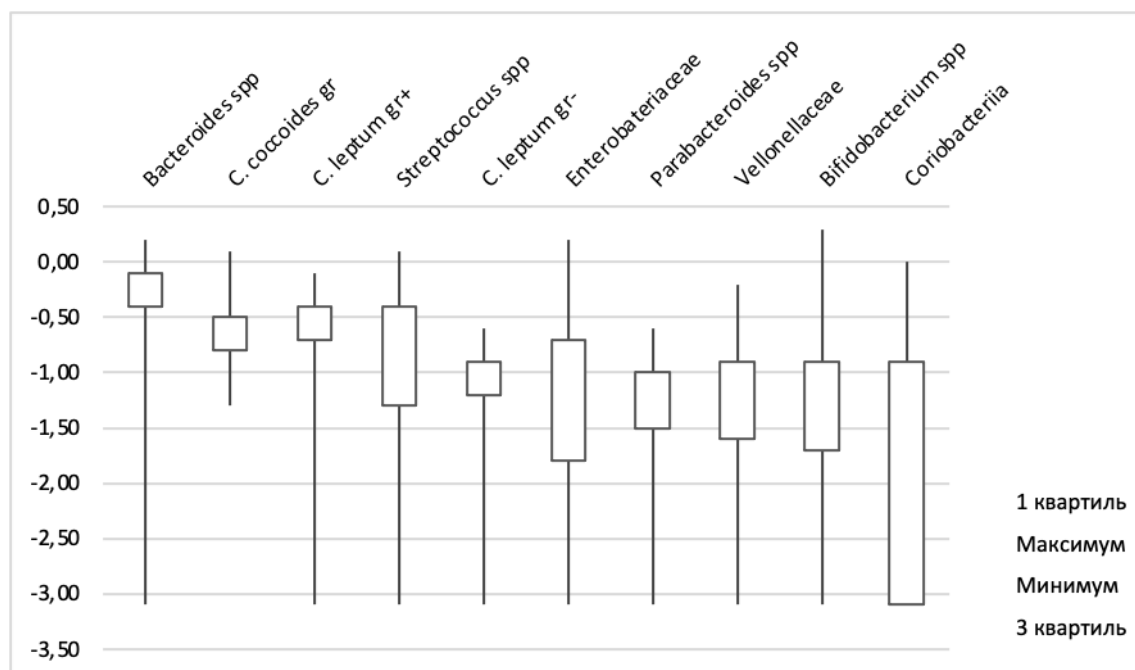


Рисунок 6. Относительное количество микроорганизмов, нормированное на ОБМ, в составе пристеночной микробиоты пациентов с язвенным колитом – Me(25%; 75%)

Если сравнить составы мукозного микробиома группы сравнения и группы пациентов с язвенным колитом, то можно констатировать существенные различия.

Средняя ОБМ в биоптатах слизистой толстой кишки пациентов с язвенным колитом составила 4,47 log (ГЭ/обр.) (рис.2), что по сравнению с другими образцами и группой сравнения, говорит о меньшем бактериальном разнообразии в ней ($p=0,0000$), вероятно, связанным с наличием хронического воспалительного процесса.

Clostridium leptum group+ и *Streptococcus spp* являются самыми многочисленными представителями типа *Firmicutes* в составе пристеночной микробиоты пациентов с язвенным колитом по сравнению с группой сравнения ($p=0,0000$). Количество *Clostridium coccoides group*, наоборот, снижено при язвенном колите ($p=0,0000$). Представители семейства *Veillonellaceae* (*Dialister* + *Alisonella* + *Megasphaera* + *Veillonella*) преобладают в образцах при язвенном колите ($p=0,0000$).

Из представителей типа *Bacteroidetes* количество микроорганизмов рода *Bacteroides spp* ($p=0,0000$) и рода *Parabacteroides spp* ($p=0,0001$) достоверно увеличено при язвенном колите. *Alistipes spp* и *Prevotella spp* не имеют достоверной статистической разницы, а количество *Butyricimonas*, наоборот, снижено ($p=0,0307$).

Тип *Proteobacteria* занимает третье место по распространённости бактериального состава в мукозной микробиоте при язвенном колите. Наибольшее содержание отмечено у микроорганизмов рода *Pseudomonas spp* в основной группе пациентов ($p=0,0000$). Концентрация представителей семейства *Enterobacteriaceae* и *Desulfovibrio spp* снижена при язвенном колите ($p=0,0100$) и ($p=0,0000$).

Не выявлено достоверной статистической разницы между двумя группами пациентов по содержанию единственного представителя типа *Verrucomicrobia Akkermansia muciniphila* ($p=0,0781$), в связи с чем можно предположить, что *A.muciniphila* не принимает активного участия в развитии воспалительного ответа слизистой оболочки.

Одной из задач настоящего исследования было определение состава пристеночной микробиоты в зависимости от протяженности поражения толстой кишки при язвенном колите. В данной работе при сравнении составов микробиоты при тотальном и левостороннем поражении не получено статистически достоверной разницы.

При левостороннем поражении образцы биопсии были взяты не только из пораженного левого отдела толстой кишки, но и из правых отделов, не вовлеченных в воспалительный процесс макроскопически. Несмотря на то, что в левых отделах эндоскопически определялась различная активность воспалительного процесса от ремиссии до выраженной активности, а в правых отделах

толстой кишки выявлена неизменная слизистая, достоверной статистической разницы в составе микробиоты правых и левых отделов не получено ($p > 0,05$) (рис. 7).

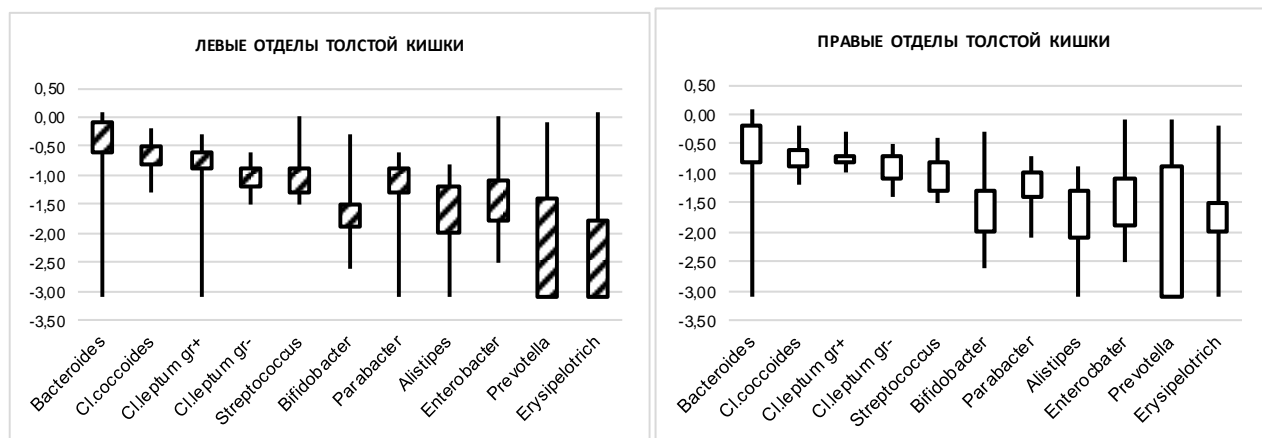


Рисунок 7. Относительное количество микроорганизмов, нормированное на общую бактериальную массу, в образцах биопсии при левостороннем язвенном колите (разница $\log(\Gamma\text{Э}/\text{образец})$ группы микроорганизмов и ОБМ – $Me(25\%;75\%)$)

Язвенный колит – это заболевание, которое имеет хроническое течение, при этом оно может быть как рецидивирующее, с длительными периодами ремиссии, так и непрерывное, более агрессивное и снижающее качество жизни. Однако при сравнении состава микробиоты толстой кишки в зависимости от характера течения заболевания не выявлено достоверной статистической

разниц
ы ($p >$
0,05)
(рис.
8).

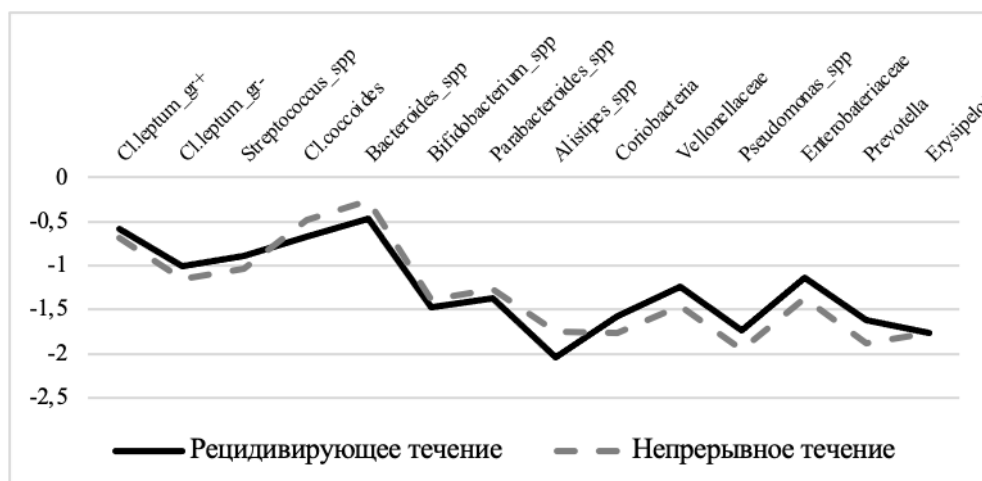


Рисунок 8. Относительное количество микроорганизмов, нормированное на общую бактериальную массу, в образцах биопсии при хроническом течении язвенного колита (разница $\log(\text{ГЭ}/\text{образец})$ группы микроорганизмов и ОБМ – Ме(25%;75%)

Эндоскопическая активность воспалительных заболеваний кишечника играет важную роль в оценке тяжести атаки заболевания, определении дальнейшей тактики ведения и лечения пациента. В исследование включены больные язвенным колитом с разной степенью эндоскопической активности, от ремиссии до выраженной активности (классификации по Schroeder), с целью сравнения микробного состава.

Микробный состав в ремиссии воспалительного процесса более разнообразен по сравнению с минимальной и умеренной активностью ($p < 0,05$). Количество *Clostridium leptum group+*, *Streptococcus spp* и *Clostridium coccoides group* достоверно снижено в ремиссии при сопоставлении с минимальной активностью ($p < 0,05$).

Количество *Bacteroides spp* возрастает с увеличением активности заболевания ($p < 0,05$). Также с усилением эндоскопической активности воспаления достоверно уменьшается количество бактерий семейства *Erysipelotrichaceae* ($p < 0,05$). По остальным бактериям значимых различий не получено (табл. 1).

Таблица 1.

Сравнение состава пристеночной микробиоты пациентов с язвенным колитом в зависимости от эндоскопической активности, выраженное в относительных значениях (разница $\log(\text{ГЭ}/\text{обр.})$ группы микроорганизмов и ОБМ) – Ме(25%; 75%)

	Активность воспаления				Значение p					
	Ремиссия ₁	Минимальная ₂	Умеренная ₃	Выраженная ₄	P1-2	P1-3	P1-4	P2-3	P2-4	P3-4
ОБМ	4,83	4,27	4,42	4,63	0,02	0,05	0,62	0,88	0,49	0,51
<i>Clostridium leptum group+</i>	-0,77 (-0,90; -0,70)	-0,61 (-0,70; -0,40)	-0,56 (-0,60; -0,40)	-0,63 (-0,70; -0,60)	0,00	0,01	0,19	0,98	0,40	0,34
<i>Streptococcus spp</i>	-1,16 (-1,50; -0,60)	-0,86 (-1,30; -0,30)	-0,86 (-1,10; -0,60)	-1,00 (-1,40; -0,60)	0,04	0,10	0,73	0,66	0,45	0,69
<i>Clostridium coccoides</i>	-0,76 (-0,80; -0,60)	-0,55 (-0,70; -0,40)	-0,64 (-0,90; -0,40)	-0,57 (-0,70; -0,50)	0,01	0,16	0,12	0,51	1,00	0,88

group										
<i>Bacteroides spp</i>	-0,61 (-0,90; -0,20)	-0,22 (-0,10; 0,00)	-0,17 (-0,30; 0,00)	-0,40 (-0,70; -0,10)	0,01	0,01	0,15	0,03	1,00	0,19
<i>Erysipelotrichaceae</i>	-1,59 (-1,90; -1,20)	-1,74 (-2,10; -1,30)	-3,01 (-3,10; -3,10)	-2,90 (-3,10; -2,70)	0,63	0,00	0,01	0,00	0,06	0,23

Данные о влиянии проводимой медикаментозной терапии язвенного колита на состав микробиоты, имеющиеся на настоящий момент времени, немногочисленны и противоречивы. Мы разделили пациентов на группы в зависимости от получаемой терапии и провели сравнение пристеночной микробиоты между ними.

Установлено, что при лечении салицилатами в комбинации с ГКС увеличено количество *Sutterella wadsworthensis* ($p=0,02$) и *E. coli* ($p=0,04$). При приеме азатиоприна снижена концентрация *Clostridium leptum group+* ($p=0,01$). Назначение ГИБП (анти-ФНО- α) в сравнении с препаратами 5-АСК приводит к снижению количества бактерий рода *Bifidobacterium spp* ($p=0,05$) и *Butyricimonas* ($p=0,04$). При сравнении комбинаций 5-АСК+ГКС и 5-АСК+АЗА получено единственное различие в снижении семейства *Erysipelotrichaceae* ($p=0,04$) при назначении комбинации с ГКС. Сопоставление терапии препаратами анти-ФНО- α и комбинации 5-АСК+АЗА показало уменьшение количества *Erysipelotrichaceae* ($p=0,03$) и *Coriobacteriia* ($p=0,03$) при биологической терапии (табл. 2).

Таблица 2.

Сравнение состава пристеночной микробиоты пациентов с язвенным колитом в зависимости от проводимой лекарственной терапии, выраженное в относительных значениях (разница \log (ГЭ/обр.) группы микроорганизмов и ОБМ) – Me(25%;75%).

	Проводимая лекарственная терапия				Значение p					
	5-АСК ₁	5-АСК+ ГКС ₂	5-АСК+ АЗА ₃	ГИБП+ АЗА ₄	P1-2	P1-3	P1-4	P2-3	P2-4	P3-4
ОБМ	4,35	4,54	4,69	4,45	0,27	0,24	0,95	0,76	0,82	0,33
<i>Clostridium leptum group+</i>	-0,55 (-0,60; -0,40)	-0,63 (-0,70; -0,50)	-0,86 (-0,90; -0,60)	-0,62 (-0,85; -0,30)	0,16	0,01	0,47	0,35	0,90	0,45
<i>Bifidobacterium spp</i>	-1,27 (-1,70; -0,70)	-1,30 (-1,90; -1,00)	-1,43 (-1,60; -1,10)	-1,80 (-2,20; -1,35)	0,76	0,70	0,05	0,98	0,16	0,11
<i>Butyricimonas</i>	-2,36 (-3,10; -1,90)	-2,61 (-3,10; -2,10)	-2,49 (-3,10; -2,00)	-2,83 (-3,10; -2,80)	0,29	0,33	0,04	0,98	0,26	0,25
<i>Coriobacteriia</i>	-1,56	-2,04	-1,36	-2,25	0,22	0,76	0,06	0,17	0,60	0,03

	(-2,90; -0,90)	(-3,10; -1,10)	(-1,70; -0,80)	(-3,10; -1,70)						
<i>Sutterella wadsworthensis</i>	-2,79 (-3,10; -3,10)	-2,05 (-3,10; -1,40)	-2,65 (-3,10; -2,00)	-2,97 (-3,10; -3,10)	0,02	0,42	0,44	0,10	0,01	0,20
<i>Erysipelotrichaceae</i>	-1,74 (-2,00; -1,20)	-2,06 (-2,50; -1,80)	-1,39 (-1,90; -0,80)	-2,13 (-3,10; -1,55)	0,16	0,26	0,12	0,04	0,95	0,03
<i>Escherichia coli</i>	-2,61 (-3,10; -2,40)	-1,97 (-2,70; -1,50)	-2,41 (-3,10; -1,50)	-2,07 (-3,10; -1,35)	0,04	0,48	0,16	0,26	0,90	0,43

Заключение

В исследовании проведена комплексная оценка просветного и пристеночного микробиома толстой кишки при различных формах язвенного колита в российской популяции методом ПЦР в режиме реального времени. С применением молекулярно-генетического метода в полученных материалах идентифицировано 7 типов и 30 родов микроорганизмов.

Установлено, какие типы бактерий преобладают в составе пристеночной и просветной микробиоты при язвенном колите. При сравнении микробных составов фекальной и мукозной биоты не было получено значительной разницы по основным родам и видам бактерий, за исключением представителей *Clostridium leptum group+* ($p=0,0005$) и *Clostridium leptum group-* ($p=0,0000$), количество которых достоверно больше в составе пристеночного микробиома. Это говорит о том, что в диагностике дисбиоза при язвенном колите с применением молекулярно-генетических методов возможно использование образцов фекалий. Что нельзя сказать о заборе соскобов эпителиальных клеток ампулы прямой кишки. По полученным данным микробный состав в них отличается от такового в биопсии и образцах фекалий.

При анализе состава пристеночной и просветной микробиоты пациентов с язвенным колитом и дальнейшем сопоставлении этих данных с группой сравнения выделен преобладающий род микроорганизмов – род *Bacteroides spp* ($p<0,05$), который может быть рассмотрен в качестве биомаркера воспалительного процесса в биоптатах и образцах фекалий и в качестве предиктора рецидива заболевания.

Также в ходе исследования показаны особенности состава микробиоты в зависимости от протяженности поражения толстой кишки при язвенном колите и проводимой лекарственной терапии,

что дополняет имеющиеся на настоящий момент данные мировой литературы.

Таким образом, значительные изменения в составе микробиоты при язвенном колите могут быть рассмотрены в качестве медиатора в активации врожденного и адаптивного иммунитета и развития воспаления кишечной стенки. Полученные сведения могут быть использованы в дальнейших исследованиях, посвященных данной тематике.

Выводы

1. В составе пристеночной и просветной микробиоты толстой кишки при язвенном колите преобладают три типа бактерий: *Firmicutes*, *Bacteroidetes* и *Proteobacteria*. Состав фекальной и пристеночной биоты достоверно не отличается ($p > 0,05$).

2. При сопоставлении с группой сравнения установлено, что в составе мукозной и транзитной микробиоты пациентов с язвенным колитом достоверно преобладают бактерии рода *Bacteroides spp* ($p < 0,05$), которые могут быть рассмотрены в качестве биомаркера воспалительного процесса в биоптатах и образцах фекалий, а также предиктора рецидива заболевания.

3. Не выявлено статистически достоверной разницы в составе пристеночной микробиоты в зависимости от течения заболевания, протяженности поражения толстой кишки, а также между макроскопически измененным и непораженным участком толстой кишки при левостороннем язвенном колите ($p > 0,05$).

4. Состав мукозной микробиоты у пациентов с ремиссией воспалительного процесса более разнообразен по сравнению с таковым у больных с минимальной и умеренной эндоскопической активностью ($p < 0,05$). Количество *Clostridium leptum group+*, *Streptococcus spp* и *Clostridium coccoides group* достоверно снижено в ремиссии заболевания ($p < 0,05$). Количество *Bacteroides spp* возрастает при увеличении активности заболевания ($p < 0,05$), а количество бактерий семейства *Erysipelotrichaceae* уменьшается ($p < 0,05$).

5. На фоне приема азатиоприна снижена концентрация *Clostridium leptum group+* ($p = 0,01$). Назначение терапии анти-ФНО- α препаратами в сравнении с 5-АСК сопряжено со снижением количества бактерий рода *Bifidobacterium spp* ($p = 0,05$) и *Butyricimonas*

($p=0,04$), а при сопоставлении с 5-АСК+азатиоприн – уменьшением количества *Erysipelotrichaceae* ($p=0,03$) и *Coriobacteriia* ($p=0,03$) при биологической терапии.

Практические рекомендации

1. Метод полимеразной цепной реакции с детекцией результатов в режиме реального времени является современным молекулярно-генетическим методом, который позволяет быстро получить достоверную информацию о составе микробиоты в различных образцах, и может быть рекомендован для широкого практического применения.

2. Бактерии рода *Bacteroides* могут быть рассмотрены в качестве биомаркера воспалительного процесса в биоптатах и образцах фекалий, использоваться в комплексной диагностике для постановки диагноза, а также – в качестве предиктора рецидива язвенного колита.

3. Определение состава микробиоты при язвенном колите может осуществляться как в образцах фекалий, так и в образцах биопсии слизистой оболочки толстой кишки. Забор биоптатов слизистой оболочки может производиться только из левых отделов толстой кишки, так как полученный результат полностью отражает ее микробный состав при язвенном колите любой протяженности.

4. Взятие соскоба эпителиальных клеток ампулы прямой кишки с целью определения состава микробиоты при язвенном колите не может быть рекомендовано для диагностических целей, так как микробный состав в данном образце имеет отличный состав от мукозной и просветной микробиоты толстой кишки.

Список работ автора, опубликованных по теме диссертации

1. Белинская В.А. (Купаева В.А.) Характеристика микробиома при воспалительных заболеваниях кишечника / И.Д. Лоранская, И.Л. Халиф, М.Н. Болдырева, В.А. Белинская (В.А. Купаева) // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2018. – №153(5). – С.104–111; 8/2; ИФ – 0,373.
2. Белинская В.А. (Купаева В.А.) Оценка состояния микробиома толстой кишки при язвенном колите / В.А. Белинская (В.А. Купаева),

И.Д. Лоранская // Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. – 2019. – №2. – С. 25-25.1.

3. Belinskaya V. (Kupaeva V.) Gut microbiome of patients with ulcerative colitis / V. Belinskaya (V. Kupaeva), M. Shapina, B. Nanaeva, M. Boldyreva, I. Loranskaya // United European Gastroenterology Journal. Abstract Issue. – 2019. – Vol.7(8S). – P. 320.

4. **Белинская В.А. (Купаева В.А.) Особенности микробиоты кишечника при язвенном колите / В.А. Белинская (В.А. Купаева), И.Д. Лоранская, М.Н. Болдырева, Б.А. Нанаева, М.В. Шапина // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2020. – №179(7). – С.78–85; 8/1,6; ИФ – 0,373.**

5. Белинская В.А. (Купаева В.А.) Состав мукозной микробиоты при различном лечении язвенного колита / В.А. Белинская (В.А. Купаева), И.Д. Лоранская, М.Н. Болдырева, М.В. Шапина, Б.А. Нанаева // Материалы Двадцать шестой объединенной российской гастроэнтерологической недели. Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2020. – №30(5). – С. 28.

6. Belinskaya V. (Kupaeva V.) Ulcerative colitis: characteristics of intestinal microbiota in Russian population / V. Belinskaya (V. Kupaeva), I. Loranskaya, M. Boldyreva, M. Shapina, B. Nanaeva // United European Gastroenterology Journal. Abstract Issue. – 2020. – Vol.8(8S). – P. 300.

7. **Белинская В.А. (Купаева В.А.) Профиль пристеночного и полостного микробиома кишечника пациентов с язвенным колитом / В.А. Белинская (В.А. Купаева), И.Д. Лоранская, М.Н. Болдырева // Клиническая фармакология и терапия. – 2020. – №29(3). – С. 49-54; 6/2; ИФ – 0,625.**

Список сокращений

5-АСК – 5-аминосалициловая кислота

АЗА – азатиоприн

ВЗК – воспалительные заболевания кишечника

ГИБП – генно-инженерные биологические препараты

ГКС – глюкокортикостероиды

ГЭ/обр. – геном-эквивалентов в образце

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДТпрайм – детектирующий амплификатор

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ФНО- α – фактор некроза опухоли-альфа