

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
дополнительного профессионального образования
Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования
Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

Белинская Виктория Александровна

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

14.01.04 – Внутренние болезни

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
Лоранская Ирина Дмитриевна
д.м.н., профессор
заведующая кафедрой гастроэнтерологии
ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России

Научный консультант:
Болдырева Маргарита Николаевна
д.м.н., ведущий научный сотрудник
ФГБУ «ГНЦ институт иммунологии» ФМБА России

Москва – 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
Актуальность темы исследования	4
Степень разработанности темы.....	5
Цель исследования	6
Задачи исследования	6
Научная новизна исследования.....	7
Теоретическая и практическая значимость работы	7
Методология и методы исследования.....	8
Соответствие диссертации паспорту научной специальности.....	9
Основные положения, выносимые на защиту	9
Апробация работы.....	10
Публикации и участие в научных конференциях	10
Личный вклад соискателя	11
Объем и структура диссертации.....	11
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1. Язвенный колит. Современный взгляд на проблему.....	12
1.1.1. Введение.....	12
1.1.2. Эпидемиология.....	13
1.1.3. Этиология и патогенез	13
1.1.4. Клинические проявления и классификации	16
1.1.5. Методы диагностики.....	22
1.1.6. Подходы к консервативной терапии.....	24
1.2. Состав и функции микробиоты желудочно-кишечного тракта	25
1.3. Методы исследования микробиоценоза желудочно-кишечного тракта	31
1.3.1. Введение.....	31
1.3.2. Бактериологический метод.....	32
1.3.3. Метод хромато-масс-спектрометрии.....	33
1.3.4. Дыхательные тесты.....	33
1.3.5. Молекулярно-генетические методы.....	34
1.4. Изменение состава микробиоты при язвенном колите.....	37
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	50
2.1. Характеристика больных язвенным колитом.....	51
2.2. Характеристика пациентов группы сравнения	56
2.3. Общеклинические методы исследования	57
2.4. Метод полимеразной цепной реакции в режиме реального времени	58
2.5. Статистическая обработка результатов	62
ГЛАВА 3. ХАРАКТЕРИСТИКА ВЫДЕЛЕННЫХ ТИПОВ БАКТЕРИЙ И ИХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ.....	63
ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	75
4.1. Состав микробиоты у пациентов группы сравнения	75
4.2. Состав микробиоты у пациентов с язвенным колитом.....	77

4.3. Сравнение состава просветной микробиоты при различных формах язвенного колита	93
ГЛАВА 5. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	104
Заключение	113
Выводы	114
Практические рекомендации.....	115
Список сокращений	116
Список литературы	117

ВВЕДЕНИЕ

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, они проведены на небольших выборках (Morgan et al., 2012; Png et al., 2010; Hansen et al., 2012; Hirano et al., 2018). Объяснить это можно 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 с 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 исключения – больные с тяжелой или сверхтяжелой атакой язвенного колита; прием антибактериальных или пробиотических препаратов на догоспитальном этапе; наличие тяжелой сопутствующей патологии.

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

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.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Установлено, что состав фекальной и пристеночной биоты 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* ($p = 0,04$).

Апробация работы

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

По данным проведенной научно-исследовательской работы опубликовано 7 печатных работ, из них 3 – в изданиях, рекомендованных ВАК РФ.

Результаты диссертационной 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.

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 занимался написанием научных публикаций.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 136 страницах машинописного текста, состоит из введения, 5 глав, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы. В работе выделены 15 рисунков и 23 таблицы. Список литературы включает 183 источника, из которых 26 отечественных и 157 иностранных авторов.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Язвенный колит. Современный взгляд на проблему

1.1.1. Введение

На протяжении нескольких столетий представления врачей и ученых своего времени о таком патологическом состоянии как язвенный колит разительно менялись. Рассматриваемый вначале в качестве медицинского курьеза, сегодня язвенный колит получил широкую известность как одно из важнейших заболеваний, поражающих миллионы людей по всему миру вне зависимости от пола, возраста, расовой принадлежности и географии проживания. Многочисленные описания кровавой диареи длительное время относили к инфекционным заболеваниям, преимущественно к дизентерии.

Лавры первенства в открытии язвенного колита были отданы британскому врачу и биографу Samuel Wilks, описавшему в письме в *Medical Times and Gazette* (1859) результаты аутопсии 42-летней женщины, умершей после нескольких месяцев диареи и лихорадки. Парадокс заключается в том, что официально признанный первый случай язвенного колита был ошибочным. За язвенный колит была принята болезнь Крона, так как было диагностировано трансмуральное воспаление толстой кишки и терминальный илеит [26]. По мере накопления знаний менялась и терминология. В настоящее время язвенный колит – хроническое заболевание толстой кишки, характеризующееся иммунным воспалением ее слизистой оболочки [17].

1.1.2. Эпидемиология

Эпидемиологические исследования, направленные на изучение частоты возникновения и распространенности язвенного колита, особенно трудно осуществить из-за часто постепенного развития заболевания, отсутствия «золотого» стандарта для диагностики, а также недостаточной осведомленности врачей различных специальностей о данной проблеме. Тем не менее, роль эпидемиологических данных чрезвычайно важна, поскольку они могут быть полезными в выделении причинных факторов язвенного колита и разработке новых подходов к лечению и профилактике заболевания [26].

В Европе и Северной Америке распространенность язвенного колита за последние 50 лет увеличилась с 8-14/100 000 до 120-200/100 000 человек [46]. Частота встречаемости заболевания в Северной Америке колеблется от 37,5 до 238/100000. В общей сложности в Соединенных Штатах насчитывается более 1,3 миллиона пациентов с ВЗК [85].

Данные о распространенности язвенного колита в Российской Федерации ограничены. В исследовании, проведенном в Московской области в период с 1981 по 2000 гг., установлена распространенность заболевания, которая составила 19,3 на 100000 человек, что соответствует общеевропейским показателям [10].

Выделяют два пика заболеваемости язвенным колитом: первый в возрасте 20-30, а второй – 60-70 лет [46]. У пациентов пожилого возраста язвенный колит чаще всего проявляется в форме проктита и левостороннего поражения. Среди мужчин и женщин достоверной разницы не выявлено [46].

1.1.3. Этиология и патогенез

Начиная с 60-х годов прошлого века, непрерывно продолжающиеся до настоящего времени исследования все еще оставляют нерешенным вопрос об

этиологии и патогенезе ВЗК в целом, и язвенного колита в частности. Заболевание считают полиэтиологичным, возникающим в результате сочетания нескольких факторов. Достигнут значительный прогресс в понимании иммунопатогенеза, роли генетических факторов, микробиоты и окружающей среды в формировании хронического воспалительного процесса [3].

В настоящее время активно ведутся генетические исследования по установлению корреляции определенных генов и мутаций с развитием ВЗК. В различных хромосомах выделены локусы, в которых сконцентрированы гены, определяющие синтез белков, ответственных за механизмы сохранения внутреннего гомеостаза организма. Так, гены NOD2 контролируют активацию ядерного фактора каппа-В – важнейшего регулятора адекватного воспалительного ответа на различные патогенетические факторы. Гены CARD15 ответственны за продукцию альфа-дефенсинов в клетках Панета, обеспечивающих функционирование эпителиального барьера – защиту от проникновения компонентов кишечных бактерий. Фактор некроза опухоли-альфа (ФНО- α) – известный регулятор выработки провоспалительных цитокинов. Его синтез кодируется генами локуса IBD3, расположенными на 6-ой хромосоме. При язвенном колите повреждается ген множественной лекарственной резистентности MDR1, регулирующий проницаемость эпителиального барьера.

Иммунные нарушения играют ключевую роль в патогенезе ВЗК. Нормальное функционирование иммунной системы в слизистой оболочке кишки подразумевает поддержание баланса между эффекторными клетками (Т-хелперы 1/2) и регуляторными Т-клетками, которые составляют не более 10% от общей популяции Т-клеток. Регуляторные Т-клетки запускают воспалительную реакцию и затем подвергаются апоптозу. Воспаление выполняет свою функцию борьбы с патогенным фактором и затихает. Однако в результате какого-то дефекта или поломки регуляторных механизмов при развитии ВЗК регуляторные Т-клетки не подвергаются апоптозу. Путем кооперации с макрофагами они получают возможность поддержания и даже наращивания численности своей популяции за счет создания автономности замкнутого цикла. Возникает неконтролируемое

самоподдерживающееся воспаление. В его развитии ключевую роль играют цитокины, высвобождаемые активированными макрофагами (в частности, ИЛ-12 (интерлейкин)), которые поддерживают пул активированных Т-хелперов. Эти клетки, в свою очередь, секретируют интерферон-гамма, поддерживающий пул активированных макрофагов. Кроме того, все эти клетки продуцируют такой мощный цитотоксический фактор, как ФНО- α . Избыточная продукция этого фактора приводит к развитию целого каскада патологических реакций в кишечной стенке. Развивается самоподдерживающееся активное нестихающее воспаление. Активация тканевых металлопротеиназ ведет к деструкции окружающих тканей. Запуская экспрессию молекул адгезии на поверхности эндотелия и являясь мощным хемоаттрактантом, ФНО- α привлекает из сосудистого русла в зону воспаления большое количество клеток. Повышенная экспрессия молекул адгезии усиливает образование тромбина на сосудистой стенке и ведет к гиперкоагуляции с тромбированием сосудов и ишемизацией слизистой оболочки, в результате чего формируются эрозии и язвы. Так образуется характерная морфологическая картина.

Барьерная функция кишечника подразумевает наличие механизмов, направленных на поддержание гомеостаза внутренней среды организма в условиях постоянного обмена ингредиентами с внешней средой. Формально механической границей между внутренней и внешней средой организма в кишке является один слой эпителиальных клеток, выстилающих поверхность кишки. Иммунные механизмы включаются уже после преодоления патогенными факторами этой границы. Для предотвращения проникновения во внутреннюю среду микроорганизмов, механических факторов, желудочной кислоты, пищеварительных ферментов, бактериальных агентов и ксенобиотиков эпителиальные клетки строят сложные защитные конструкции, покрывающие их в виде слоя слизи.

Слизь – это гидратированный полимерный гель, предохраняющий слизистую оболочку от высыхания и облегчающий транспорт пищевого химуса. Гелеобразующая основа слизи – высокомолекулярные полимерные гликопротеины

семейства муцинов (MUC). Многочисленные представители данного семейства, каждый из которых кодируется отдельным геном, разделены на две группы. Это муцины, ассоциированные с клеточными мембранами, они составляют основу гликокаликса, выполняют защитную и сигнальную функции и секретируемые муцины, главный из которых MUC2 – основной компонент бокаловидных клеток и защитного слизистого слоя.

При язвенном колите происходит нарушение синтеза секретирующего муцина MUC2. Нарушения эти имеют структурный характер, в результате чего происходит образование неполноценных гликопротеинов, неспособных образовать достаточной толщины защитный слой и менее устойчивых к деградирующей активности пищеварительных и бактериальных ферментов. Морфологически это проявляется в заметном снижении количества бокаловидных клеток в эпителиальной выстилке крипт [7,91].

1.1.4. Клинические проявления и классификации

Клинические проявления язвенного колита зависят от протяженности поражения толстой кишки. Чаще всего пациенты предъявляют жалобы на частый жидкий стул с выделением крови, ложные позывы, императивные позывы на дефекацию. Ночная диарея – наиболее важный признак разграничения с функциональными заболеваниями, так как интенсивная физиологическая стимуляция необходима, чтобы прервать сон. Отчасти это объясняется физиологией толстой кишки, которая активно функционирует в ночные часы [26]. Любопытное предположение высказано Miner [69], связавшим стимуляцию моторики толстой кишки с присутствием в воспалительном инфильтрате эозинофилов. Их функция имеет суточные ритмы с максимальной активностью как раз между 11 и 2 часами ночи.

Тяжелое течение язвенного колита часто сопровождается появлением общей слабости, повышением температуры и снижением массы тела. Болевой синдром встречается реже, могут быть спастические боли в левых отделах живота перед походом в туалет. При проктите и левостороннем поражении толстой кишки чаще бывают ложные позывы, которые могут сочетаться с запорами [3].

Под обострением (рецидивом, атакой) понимают появление типичных симптомов заболевания в стадии клинической ремиссии, спонтанной или медикаментозно поддерживаемой. На практике признаками клинического обострения являются увеличение частоты дефекаций с выделением крови и слизи, а также характерные изменения, обнаруживаемые при эндоскопическом исследовании толстой кишки.

Ремиссией заболевания считают исчезновение основных клинических симптомов заболевания и восстановление слизистой толстой кишки. В настоящее время все большее значение приобретает термин «глубокая ремиссия», обозначающая клинико-эндоскопическую ремиссию.

В современной клинической практике используются классификации язвенного колита по протяженности поражения, характеру течения, тяжести атаки и наличию осложнений, определяющие тактику лечения, а также периодичность скрининга на колоректальный рак [86].

Для описания протяженности поражения применяется Монреальская классификация (Таблица 1), оценивающая протяженность макроскопических изменений при эндоскопическом исследовании толстой кишки [17].

Таблица 1.

Монреальская классификация язвенного колита по протяженности поражения [158]

Проктит	поражение ограничено прямой кишкой
Левосторонний колит	поражение распространяется до левого изгиба толстой кишки (включая проктосигмоидит)
Тотальный колит	поражение распространяется проксимальнее левого изгиба толстой кишки (включая субтотальный колит, а также тотальный язвенный колит с ретроградным илеитом)

В зависимости от срока от начала заболевания выделяют острое и хроническое течение [17] (Таблица 2).

Таблица 2.

Классификация язвенного колит по характеру течения

Острое	менее 6 месяцев от дебюта заболевания
Хроническое непрерывное	отсутствие более чем 6-месячных периодов ремиссии на фоне адекватной терапии
Хроническое рецидивирующее	наличие более чем 6-месячных периодов ремиссии

Тяжесть заболевания в целом определяется: тяжестью текущей атаки, наличием внекишечных проявлений и осложнений, рефрактерностью к лечению, в частности, развитием гормональной зависимости и резистентности. Для формулирования диагноза и определения тактики лечения следует определять тяжесть текущего обострения (атаки), для чего применяются простые критерии Truelove-Witts, используемые в повседневной клинической практике, и индекс активности язвенного колита (индекс Мейо; DAI), как правило, фигурирующий в клинических испытаниях [17]. Выделяют легкую, среднетяжелую и тяжелую атаки язвенного колита (Таблица 3) и (Таблица 4).

Таблица 3.

Тяжесть атаки язвенного колита согласно критериям Truelove-Witts [169]

	Легкая	Среднетяжелая	Тяжелая
Частота дефекаций с кровью	<4	≥4, если:	≥6, если:
Пульс	Нормальные значения	≤90 уд/мин	>90 уд/мин или
Температура		≤37,5°C	>37,5°C или
Гемоглобин		≥105 г/л	<105 г/л или
Скорость оседания эритроцитов (СОЭ)		≤30 мм/ч	>30 мм/ч
Контактная ранимость слизистой оболочки толстой кишки	Нет	Есть	Есть

В клинической практике нередко встречается так называемая «сверхтяжелая или крайне тяжелая атака» язвенного колита, характеризующаяся диареей более 10-15 раз в сутки, нарастающим падением гемоглобина, лихорадкой выше 38°C, тяжелой гипопроотеинемией и электролитными сдвигами, высоким уровнем С-реактивного белка [151,72]. Подходы к лечению такого колита отличаются от стандартных. В англоязычной литературе такое состояние называется «острый тяжелый язвенный колит» (acute severe ulcerative colitis) [39].

Таблица 4.

Тяжесть атаки согласно индексу активности язвенного колита (индекс Мейо)

Значение индекса	0	1	2	3
Частота стула	Обычная	на 1-2/день больше обычной	На 3-4/день больше обычной	на 5/день больше обычной
Примесь крови в стуле	Нет	Прожилки	Видимая кровь	Преимущественно кровь
Состояние слизистой оболочки	Норма	Минимальная активность (1 балл по шкале Schroeder)	Умеренная активность (2 балла по шкале Schroeder)	Выраженная активность (3 балла по шкале Schroeder)
Общая оценка состояния врачом	Норма	Удовлетворительное состояние	Состояние средней тяжести	Тяжелое состояние
Среднетяжелая и тяжелая атака констатируются при значении индекса (сумма оценок по 4 параметрам) от 6 и выше.				

Используемая в индексе Мейо шкала оценки состояния слизистой оболочки по Schroeder приведена в таблице 5 и применяется для оценки эндоскопической активности язвенного колита [17].

Таблица 5.

Классификация язвенного колита в зависимости от эндоскопической активности (по Schroeder) [149]

0	1 (минимальная активность)	2 (умеренная активность)	3 (выраженная активность)
Норма или неактивное заболевание	Легкая гиперемия, смазанный сосудистый рисунок. Легкая контактная ранимость.	Выраженная гиперемия, отсутствие сосудистого рисунка, умеренная контактная ранимость, эрозии.	Спонтанная ранимость, изъязвления.

Классификация язвенного колита в зависимости от ответа на гормональную терапию облегчает выбор рациональной лечебной тактики, поскольку целью консервативного лечения является достижение стойкой ремиссии с прекращением терапии глюкокортикостероидами (ГКС) [17]. Для этих целей выделяются:

1. Гормональная резистентность:

- в случае тяжелой атаки – отсутствие положительной динамики со стороны клинических и лабораторных показателей, несмотря на применение системных ГКС в дозе, эквивалентной 2 мг/кг массы тела преднизолона в сутки, в течение более чем 7 дней;
- в случае среднетяжелой атаки – сохранение активности заболевания при пероральном приеме ГКС в дозе, эквивалентной 1 мг/кг массы тела преднизолона, в течение 2 недель [17].

2. Гормональная зависимость:

- увеличение активности болезни, возникшее при уменьшении дозы ГКС после достижения исходного улучшения в течение 3 месяцев от начала лечения;

- возникновение рецидива болезни в течение 3 месяцев после окончания лечения ГКС [17].

У многих пациентов встречаются внекишечные проявления язвенного колита [9] (Таблица 6). Они затрагивают различные органы и системы. Часть из них развивается как «отраженная реакция» на воспалительный процесс в толстой кишке, обусловленная едиными иммунопатологическими механизмами. Другие являются составляющей самого воспалительного ответа или следствием метаболических расстройств, присущих язвенному колиту.

Таблица 6.

Внекишечные (системные) проявления язвенного колита

Аутоиммунные проявления, связанные с активностью заболевания	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Артропатии (артралгии, артриты) ▪ Поражение кожи (узловатая эритема, гангренозная пиодермия) ▪ Поражение слизистых (афтозный стоматит) ▪ Поражение глаз (увеит, ирит, иридоциклит, эписклерит)
Аутоиммунные проявления, не связанные с активностью заболевания	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Анкилозирующий спондилит (сакроилеит) ▪ Первичный склерозирующий холангит (ПСХ) ▪ Остеопороз, остеомалация ▪ Псориаз
Проявления, обусловленные длительным воспалением и метаболическими нарушениями	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Холелитиаз ▪ Стеатоз печени или стеатогепатит ▪ Тромбоз периферических вен, тромбоэмболия легочной артерии ▪ Амилоидоз

Аутоиммунные проявления, связанные с активностью воспалительного процесса, появляются вместе с основными кишечными симптомами обострения и исчезают вместе с ними на фоне лечения. Аутоиммунные проявления, не связанные с активностью процесса (в англоязычной литературе их часто называют «сопутствующими аутоиммунными заболеваниями»), имеют тенденцию к

прогрессированию независимо от фазы основного заболевания (обострение или ремиссия) и часто определяют негативный прогноз болезни [17].

1.1.5. Методы диагностики

Диагноз язвенного колита устанавливается, опираясь на анамнестические данные, клиническую картину, характерные изменения по результатам эндоскопического исследования и гистологического подтверждения.

При формулировании диагноза указывается характер течения заболевания, протяженность поражения, тяжесть текущей атаки или наличие ремиссии, наличие гормональной зависимости или резистентности, а также наличие внекишечных или кишечных осложнений [17].

Специфических лабораторных маркеров язвенного колита не существует. Обращают внимание на показатели С-реактивного белка и фибриногена. В общем анализе крови могут быть диагностированы анемия (железодефицитная, анемии хронического заболевания), лейкоцитоз (на фоне хронического воспаления или стероидной терапии), тромбоцитоз. Биохимическое исследование позволяет выявить электролитные нарушения, гипопроотеинемию и гипоальбуминемию, а также повышение щелочной фосфатазы, что является возможным проявлением ассоциированного с язвенным колитом ПСХ. Необходимо исключить инфекционную причину заболевания, выполнив анализы кала на кишечные и паразитарные инфекции, определение токсинов А и В *C. difficile*. В последние годы для оценки наличия воспаления в кишечнике (особенно в толстой кишке), а также для исключения проявлений подобных синдрому раздраженного кишечника у больных ВЗК определяют уровень фекального кальпротектина [111].

Из инструментальных методов исследования для верификации диагноза необходимо проведение ректороманоскопии, обзорной рентгенографии брюшной полости (при тяжелой атаке) для исключения токсической дилатации и перфорации

толстой кишки. Обязательной процедурой для установления диагноза, а также для решения вопроса о колэктомии является колоноскопия с илеоскопией [17].

Эндоскопическое исследование толстой кишки является основным методом диагностики, однако, специфичные эндоскопические признаки отсутствуют. Наиболее характерными являются непрерывное воспаление, ограниченное слизистой оболочкой, начинающееся в прямой кишке и распространяющееся в направлении купола слепой кишки с четкой границей воспаления. Эндоскопическую активность наилучшим образом отражают контактная ранимость (выделение крови при контакте с эндоскопом), отсутствие сосудистого рисунка и наличие или отсутствие эрозий и изъязвлений. Обнаружение стойкого сужения кишки требует обязательного исключения колоректального рака [17].

Биопсия необходима при первичной постановке диагноза, сомнениях в правильности ранее выставленного диагноза и длительном анамнезе заболевания для исключения дисплазии эпителия [17]. Рекомендуются стандартом является взятие биоптатов слизистой оболочки прямой кишки и биопсия не менее чем из 4-х других участков толстой кишки, а также слизистой оболочки подвздошной кишки.

К микроскопическим признакам язвенного колита [17] относятся: деформация крипт (разветвленность, разнонаправленность, появление крипт разного диаметра, уменьшение плотности крипт, «укорочение крипт», крипты не достигают подлежащего слоя мышечной пластинки слизистой оболочки), «неровная» поверхность слизистой в биоптате слизистой оболочки, уменьшение числа бокаловидных клеток, базальный плазмцитоз, инфильтрация собственной пластинки слизистой оболочки, наличие крипт-абсцессов и базальных лимфоидных скоплений. Степень воспалительной инфильтрации обычно уменьшается по мере удаления от прямой кишки.

При необходимости дифференциальной диагностики или при невозможности проведения полноценной илеоколоноскопии рекомендуются рентгенологические методы исследования: магнитно-резонансная томография (МРТ) и компьютерная томография (КТ) с контрастированием кишечника. При невозможности их выполнения необходимо проведение ирригоскопии с двойным контрастированием

(для оценки протяженности поражения в толстой кишке, уточнения наличия образований, стриктур и др.). Дополнительные исследования при показаниях: трансабдоминальное ультразвуковое сканирование тонкой и ободочной кишки, трансректальное ультразвуковое исследование прямой кишки и анального канала, фиброгастродуоденоскопия, видеокапсульная эндоскопия, одно- или двухбаллонная энтероскопия [17,7].

1.1.6. Подходы к консервативной терапии

Лечебные мероприятия при язвенном колите включают в себя назначение лекарственных препаратов, хирургическое лечение, психосоциальную поддержку и диетические рекомендации.

Выбор вида консервативного или хирургического лечения определяется тяжестью атаки, протяженностью поражения толстой кишки, наличием внекишечных проявлений, длительностью анамнеза, эффективностью и безопасностью ранее проводившейся терапии, а также риском развития осложнений заболевания [4,21].

Целью терапии является достижение и поддержание бесстероидной ремиссии (прекращение приема ГКС в течение 12 недель после начала терапии), профилактика осложнений, предупреждение операции, а при прогрессировании процесса, а также развитии опасных для жизни осложнений – своевременное выполнение хирургического лечения [17]. Поскольку полное излечение больных достигается только путем удаления субстрата заболевания (колпроктэктомии), при достижении ремиссии неоперированный больной должен оставаться на постоянной поддерживающей (противорецидивной) терапии [51]. Для поддержания ремиссии применяются препараты 5-аминосалициловой кислоты, иммуносупрессоры и генно-инженерные биологические препараты.

Аминосалицилаты являются базовой группой препаратов для лечения легких и среднетяжелых форм язвенного колита. К тому же они обладают незначительным числом побочных эффектов. Лекарственная форма и способ применения препарата подбираются согласно локализации и протяженности воспалительного процесса в кишке.

Для лечения стероидорезистентных и стероидозависимых форм язвенного колита применяют иммуносупрессоры (азатиоприн, 6-меркаптопурин, метотрексат и циклоспорин А). Частота побочных эффектов достигает 6-20%. Необходим расчет дозы на кг массы тела и контроль безопасности при приеме лекарственных препаратов данной группы.

Инфликсимаб, адалимумаб, голимумаб, ведолизумаб и тофацитиниб относятся к новому поколению биологических препаратов. Каждый препарат имеет свой индукционный курс с переходом на поддерживающую дозу. Лечение генно-инженерными препаратами может приводить к развитию серьезных побочных реакций, что требует тщательного мониторинга.

Показаниями к хирургическому лечению язвенного колита служат неэффективность консервативной терапии (гормональная резистентность, отсутствие эффективности проводимой биологической терапии) или невозможность ее продолжения (гормональная зависимость), кишечные осложнения (токсическая дилатация, перфорация кишки, кишечное кровотечение), а также рак толстой кишки или высокий риск его возникновения [3,17].

1.2. Состав и функции микробиоты желудочно-кишечного тракта

«Нормофлора или микробиота человека представляет собой эволюционно сложившуюся экологическую систему разнообразных микроорганизмов, населяющих открытые полости организма человека и поддерживающих

биохимическое, метаболическое и иммунологическое равновесие, необходимое для сохранения здоровья человека» [5].

Микрофлора пищеварительного тракта является самым населенным биотопом как по спектру, так и по количеству представителей, ее масса у взрослого человека составляет примерно 2,5-3,0 кг, а численность микроорганизмов измеряется в 10^{12} - 10^{14} клеток.

«В составе микрофлоры пищеварительного тракта выделяют просветную и мукозную (пристеночную). Просветная микрофлора, обеспечивающая полостное симбионтное пищеварение, обитает и функционирует в полостной среде пищеварительного тракта, а мукозная, участвующая в пристеночном пищеварении, – на поверхности слизистых оболочек в составе бактериальных биопленок. Бактериальная биопленка – сложное структурное образование, располагающееся на надэпителиальном слое слизи слизистых оболочек пищеварительного тракта, в котором изолированно функционирует мукозная микрофлора» [19].

Еще в начале XX века И.И. Мечников трофическую активность нормальной микрофлоры кишечника сравнивал с функцией печени и предлагал рассматривать ее в качестве отдельного органа, а уже сто лет спустя А.М. О'Нара и F. Shanahan отнесли микробиоту к дискретному органу [123].

Лауреат Нобелевской премии Д. Ледербергом предложил для обозначения всего генетического материала, содержащегося в микробиоте, термин «микробиом» [5]. Численность генов микробиома на 3 порядка выше, чем собственных генов человека, что послужило основанием рассматривать совокупность всех микроорганизмов в качестве «суперорганизма» [129].

В последние годы появилось такое понятие как «метагеном», включающее в себя гены человека и триллионов микроорганизмов микробиоты [5]. Активно разрабатываются новые направления, обозначенные как «протеомика» и «метабономика», изучающие совокупность экспрессируемых белков и метаболическую активность микробиоты [24].

Микробиом кишечника человека является одним из наиболее активно исследуемых микробных сообществ. Это связано с невероятной сложностью его

состава и избытием взаимодействий с организмом человека. Все чаще формулируются гипотезы о вовлеченности кишечной микробиоты в патогенез заболеваний различных органов и систем, чему с каждым годом появляется все больше подтверждений.

Формирование микробиома кишечного тракта человека – многоэтапный процесс [23]. «Внутриутробно развивающийся плод не является стерильным, а получает от матери какое-то количество индигенных микроорганизмов *in utero*. Массивная же колонизация кишечника здорового доношенного младенца начинается в момент рождения, имеет определенные закономерности и состоит из нескольких последовательных стадий. Первая стадия – «условно асептическая» – берет начало в интранатальном периоде. Вторая – стадия «нарастающей колонизации» – наступает через 10-20 ч после родов и не зависит от степени зрелости, перинатальных условий развития плода и вида вскармливания. В этот период колонизация осуществляется гетерогенными микроорганизмами, в первую очередь аэробными и условно аэробными бактериями, такими как кишечная палочка, стафилококки, клебсиеллы, энтерококки. С 3-5-го дня наступает третья стадия – «трансформация микрофлоры», в результате которой происходит вытеснение бифидофлорой других микроорганизмов. В этот период бифидобактерии становятся основной (резидентной) микрофлорой кишечника. Доминирующее положение бифидофлора начинает занимать к 5-20 дню жизни ребенка» [59].

Филогенетическое разнообразие микробиоты кишечника увеличивается с ростом и развитием ребенка и в конечном итоге приводит к формированию сложного и относительно стабильного сообщества микроорганизмов в возрасте примерно 2-3 лет [14,181].

Кишечник взрослого человека населяют более 100 триллионов (10^{14}) различных микроорганизмов, включая бактерии, вирусы, грибы и простейшие [63]. По данным молекулярных методов исследования, среди них присутствует более 600 родов бактерий. В преобладающем большинстве они являются облигатными анаэробными организмами типов *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* и

Actinobacteria. Более 90% всех представителей микробиома составляют *Firmicutes* и *Bacteroidetes* [152].

Общее количество и состав бактерий варьируют в разных сегментах желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). «В ротовой полости формируется аутохтонная микробиота. Общее число бактерий в слюне варьируемо и в среднем составляет 10^8 МК/мл, причем анаэробов больше, чем аэробов. В состав нормальной флоры ротовой полости входят *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Corynebacteria*, *Veillonella*, *Bacteroidetes*, *Fusobacteria*, *Bifidobacteria*, *Actinomycetes* и др.» [20].

Микробиота пищевода непостоянна. Количество бактерий в желудке не превышает 10^2 - 10^4 в 1 мл содержимого, что обусловлено повышенной кислотностью и воздействием ферментов. Проксимальный отдел тонкой кишки в норме содержит небольшое количество грамположительной флоры, состоящей из лактобацилл и стрептококков, их концентрация – 10^2 - 10^4 в 1 мл содержимого. По мере приближения к дистальным отделам тонкой кишки количество бактерий возрастает до 10^8 в 1 мл содержимого, анаэробы преобладают над аэробами (*Bifidobacteria*, *Bacteroidetes*, *Peptococcus*) [16].

«Основными функциями толстой кишки являются резервирование и эвакуация химуса, остаточное переваривание пищи, выделение и всасывание воды, всасывание метаболитов, электролитов и газов, формирование каловых масс, регуляция их выделения. Все перечисленное выполняется с участием кишечных эубиотических микроорганизмов. Их количество в толстой кишке составляет до 10^{12} /г содержимого, 90% представлено строгими анаэробами: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacteroidetes*, *Fusobacteria*, *Eubacteria*, *Veillonella*, *Clostridium*» [131,16].

«При исследовании количественных и качественных показателей микробиоценоза разных отделов ЖКТ здоровых людей методом ПЦР в режиме реального времени выявлены представители основных четырех типов (*Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* и *Actinobacteria*), но соотношение их различно. Так в ротовой полости преобладают ВРР-группа (*Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromones*),

Streptococcus, *Veillonella*; в тонкой кишке – ВРР-группа, *Streptococcus*, *Ruminococcus*, *Eubacterium*; в ободочной кишке – ВРР-группа, *Ruminococcus*, *Enterobacterium spp.* Доминирующие группы микроорганизмов в прямой кишке аналогичны таковым в ободочной кишке.

Общая бактериальная масса (ОБМ) разных ярусов пищеварительного тракта представлена следующим образом: наибольшая бактериальная обсемененность выявлена в ротовой полости – 7,45-7,7 lg ГЭ/обр. (геном-эквивалентов в образце), наименьшая – в тонкой кишке – 3,9-4,0 lg ГЭ/обр.; в ободочной и прямой кишке – 5,2-6,0 lg ГЭ/обр.

В составе мукозной микробиоты ротовой полости и кишечника преобладают представители типа *Bacteroidetes*. Вторую позицию занимают представители типа *Firmicutes*: *Streptococcus* в слизистой полости рта и тонкой кишки, *Ruminococcus* – в слизистой толстой кишки. На третьей позиции в слизистой полости рта и тонкой кишки также представители типа *Firmicutes* – соответственно *Veillonella* и *Ruminococcus*, в слизистой толстой кишки представители типа *Proteobacteria* – *Enterobacterium spp.* Превалирующая микрофлора исследуемых отделов ЖКТ – облигатные анаэробы» [13].

Разнообразие состава кишечной биоты меняется на фоне диеты, факторов окружающей среды, стресса, образа жизни, приема пробиотиков и антибиотиков [65].

«Изменения в составе микробиома могут влиять на гомеостаз кишечника, так как микробиота выполняет множество важных функций. Трофическая (пищеварительная) функция представлена симбионтным пищеварением, которое осуществляется ферментами микрофлоры. На нем основано энергообеспечение клеток эпителиальных тканей человека, которое базируется на утилизации в рамках цикла Кребса низкомолекулярных метаболитов (короткоцепочечных жирных кислот (КЖК): уксусной, пропионовой, масляной), образующихся в результате отщепления моносахаридных фрагментов слизи, гликокаликса и продуктов экзогенного происхождения посредством внеклеточных гликозидаз анаэробов-сахаролитиков с последующим брожением этих сахаров.

Другой важный эффект – стимуляция местного иммунитета в основном за счет продукции секреторного IgA. Низкомолекулярные метаболиты сахаролитической микрофлоры, в первую очередь КЖК, лактат и др. обладают заметным бактериостатическим эффектом. Они способны ингибировать рост сальмонелл, дизентерийных шигелл, многих грибов. В то же время бактериостатический эффект не распространяется на резидентную микрофлору. С другой стороны, низкомолекулярные метаболиты, блокируя рецепторы эпителиоцитов, препятствуют адгезии патогенной микрофлоры к эпителию и обладают способностью индуцировать хемотаксис бактерий. Этот эффект дает возможность нормальной микрофлоре, не обладающей локомоторным аппаратом (например, бактероидам), но ассоциированной с подвижными видами, заселять свои экологические ниши. Большое значение имеет также взаимодействие бактерий с рецепторами иммунокомпетентных клеток.

Системные функции микробиоты осуществляются путем реализации дистанционных и внутриклеточных взаимодействий. Дистанционные взаимодействия поддерживаются за счет обмена метаболитами, в основном, низкомолекулярными и «сигнальными молекулами» микробного происхождения: монокарбоновыми и дикарбоновыми кислотами и их солями, циклическими нуклеотидами, оксикислотами, аминокислотами, аминами и др. Системная стимуляция иммунитета — одна из важнейших функций микробиоты, при отсутствии которой происходит инволюция иммунокомпетентных органов. Микробиота участвует в поддержании ионного гомеостаза организма, поскольку всасывание эпителием монокарбоновых кислот тесно сопряжено с транспортом натрия. Большое значение в реализации различных функций микробиоты имеет синтез КЖК. Независимо от индивидуальных различий в составе микрофлоры, кишечный микробиоценоз функционирует как целая экосистема и метаболический орган, который обеспечивает необходимое количество и определенный состав конечных метаболитов; основные метаболиты – КЖК. Несмотря на вариации их концентраций при измерении в кале, соотношение является стабильным параметром и составляет следующую пропорцию ацетат/пропионат/бутират

60/20/18. Одна из основных ролей кишечной микрофлоры заключается в синтезе необходимого количества КЖК в нужной пропорции» [1].

Микробное сообщество толстой кишки ответственно за синтез витаминов (витамин К, витамин В12 и фолиевой кислоты) и аминокислот, регулирование жирового обмена, продукцию цитокинов [162].

Таким образом, многообразие функций делает микробиоту кишечника полноценным участником биологических процессов макроорганизма.

1.3. Методы исследования микробиоценоза желудочно-кишечного тракта

1.3.1. Введение

Термин «дисбактериоз», который впервые употребил А. Nissle еще в 1916 г., длительное время использовался для обозначения различных нарушений в микробиоценозе толстой кишки, в последние годы в клинической практике не применяется. «Более точным считается термин «дисбиоз». Во-первых, он отражает качественные и количественные изменения в микробном составе кишечника и является альтернативой термину «эубиоз», обозначающему нормобиоценоз. Во-вторых, состав микроорганизмов, колонизирующих толстую кишку, не ограничивается бактериями, в ней обитают и грибы, включая представителей рода *Candida*, и несколько видов энтеровирусов (ротавирус, астровирус и др.), что никак «не вписывается» в термин «дисбактериоз»» [22]. В нашей стране до сих пор существует приказ Минздрава РФ от 09.06.2003 №231 «Об утверждении отраслевого стандарта «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника»» [15], хотя врачи-гастроэнтерологи в своей практической деятельности на него не опираются.

Изменения, возникающие в составе микробиоты кишечника при различных острых и хронических заболеваниях, требуют верификации. В настоящий момент

существуют несколько подходов и методов в диагностике дисбиотических нарушений.

1.3.2. Бактериологический метод

Бактериологический метод предложен в 1977 году учеными Р.В. Эпштейн-Литвак и Ф.Л. Вильшанской [25]. Методика была по-настоящему инновационной для своего времени, позволяющая выделить до 25 микроорганизмов с исследуемых образцов. Несмотря на то, что данный метод диагностики дисбиоза до сих пор широко распространен и доступен, с появлением новых молекулярно-генетических методов он теряет свою актуальность.

Бактериологический метод имеет множество недостатков: длительность получения результатов, использование дорогостоящих питательных сред, зависимость от соблюдения сроков транспортировки и качества сред, преимущественное определение внутрипросветной и транзитной флоры, неоднородность выделения микроорганизмов из разных отделов испражнений, низкая чувствительность и возможности получения ложноотрицательных результатов. Все вышеперечисленное не позволяет опираться на результаты данной методики и не должно восприниматься врачами-специалистами как руководство к действию по коррекции выявленных нарушений и проведению этиотропной терапии [1].

Единственным достоинством остается точная верификация кишечных патогенных бактерий.

1.3.3. Метод хромато-масс-спектрометрии

Метод хромато-масс-спектрометрии (ХМС) микробных маркеров разработан в России Осиповым Г.А. в 1991 году для количественного анализа таксономического (родового или видового) состава микробных сообществ в медицине, экологии и биотехнологии, определяет 35–40 показателей [1].

Достоинства метода: определение маркеров десятков микроорганизмов одновременно в одном анализе; выделение разных групп микроорганизмов: бактерий, грибов, вирусов; время одного анализа не более 3 часов; высокая чувствительность: 0.01 нг/мл маркера; селективность: определение микроорганизма до вида (при наличии видового маркера); независимость от оснащения микробиологической лаборатории и возможность прямого анализа клинических образцов без высевания; экономичность: метод не требует биологических и биохимических тестовых материалов, культуральных сред, ферментов, праймеров [1].

Недостатков у данного метода практически нет, кроме высокой стоимости, что не позволило внедрить его в широкую клиническую практику [1] в бюджетных лечебных учреждениях. Однако, в настоящее время методика набирает популярность среди пациентов частных медицинских центров, поэтому врачи-специалисты, прежде всего, гастроэнтерологи должны иметь представление о трактовке результатов исследования.

1.3.4. Дыхательные тесты

В последние два десятилетия активно применяется и внедрен в широкую клиническую практику неинвазивный и простой в исполнении метод – дыхательный водородный тест. Он используется в первую очередь для определения

мальабсорбции углеводов и диагностики синдрома избыточного бактериального роста (СИБР) в тонкой кишке [6,2].

1.3.5. Молекулярно-генетические методы

«С развитием новейших технологий все большее место занимают молекулярно-генетические методы, которые позволяют идентифицировать микроорганизмы до вида и даже штамма или показать, что микроорганизм является новым для науки, определить некультивируемые виды бактерий, расшифровывать геномы микроорганизмов, выделить различные вирусы, проводить оценку экспрессии генов (степень их активности) в норме и при различных патологических состояниях, выполнять мониторинг состояния сообществ во времени, быстро идентифицировать нарушения структуры микробиоценоза и оценивать специфические свойства отдельных микробных штаммов, что позволит определять возможность и успешность их применения в клинической практике» [11].

«Флуоресцентная гибридизация *in situ* (или метод FISH, от англ. fluorescence in situ hybridization) позволяет идентифицировать, установить местонахождение и подсчитать единичные микробные клетки, а также их кластеры. Метод основан на том, что клетки гибридизуются с флуоресцентно мечеными олигонуклеотидными зондами, комплементарными специфическим участкам гена 16S рибосомальной рибонуклеиновой кислоты (рРНК), после чего исследуются под микроскопом. Можно выбрать зонды, которые будут гибридизоваться со всеми группами бактерий, что может потребоваться для подсчета количества последних на единицу объема. А можно подбирать зонды таким образом, чтобы они были специфичны для какого-то конкретного таксона. Однако с помощью FISH бактерии не идентифицируют до вида, а определяют их принадлежность к более крупным систематическим группировкам» [11,47].

В последние годы широкое распространение получил способ определения видов микроорганизмов с помощью ПЦР. В основе метода ПЦР лежит комплементарное достраивание участка геномной дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) или РНК возбудителя, осуществляемое *in vitro* с помощью фермента термостабильной ДНК-полимеразы. В медицине метод применяется для диагностики инфекционных и наследственных заболеваний, при диагностике рака и иммунных патологий. С помощью ПЦР-диагностики определяются некоторые представители микрофлоры с внутриклеточной или мембранной локализацией [1].

Открытие ПЦР стало одним из наиболее выдающихся событий в области молекулярной биологии. Основные принципы методики и состав реактивов определены Клеппе с соавторами в 1971 году [Kleppel et al., 1971] [18].

«Метод отличается быстротой выполнения (2-3 часа) и отсутствием жестких требований к условиям хранения и транспортировки анализируемого материала в лабораторию (фекальные образцы могут храниться до 2-х суток при +4°C). В настоящее время данный метод применяется в основном для верификации инфекционной патологии. Однако как показывают современные исследования, метод ПЦР с флуоресцентной детекцией результатов в режиме реального времени может быть с успехом использован и для оценки микробиоты кишечника. Данная разновидность метода благодаря использованию флуоресцентно-меченых олигонуклеотидных зондов обладает высокой специфичностью и точностью при определении количественного соотношения определяемых микроорганизмов. При этом спектр определяемых показателей зависит только от используемой тест-системы» [1].

Еще одним современным методом является секвенирование, которое помогает расшифровывать новые геномы и идентифицировать новые виды микроорганизмов в отличие от ПЦР, так как она дает возможность идентифицировать вид микроорганизма только когда уже известна последовательность его генетического кода настолько хорошо, чтобы подобрать специфические праймеры [11].

«Наиболее распространенный способ анализа видового разнообразия бактерий основан на секвенировании гена 16S рРНК [142]. Этот ген очень удобен тем, что некоторые его участки обладают высокой консервативностью, что позволяет подобрать универсальные праймеры, а некоторые, наоборот, настолько переменчивы, что делают возможной идентификацию различных таксономических единиц. Следовательно, используя последовательности гена 16S рРНК, можно проводить оценку биоразнообразия, а также выполнять построения филогенетических деревьев, отражающих эволюционные связи.

Применение универсальных праймеров позволяет амплифицировать последовательности только бактериальной ДНК, в случае необходимости аналогичных исследований для эукариотических организмов используется ген 16S рРНК. После получения ПЦР-продуктов к ним присоединяют адаптеры, содержащие последовательности, позволяющие отличать один образец от другого, и проводят секвенирование. Затем последовательность выравнивают и классифицируют. Можно оценить, насколько обширно представлены различные роды бактерий, т. е. насколько велико биоразнообразие в данном образце.

Метод не является количественным, однако дает возможность узнать об основных, наиболее широко представленных элементах сообщества, т.е. о его структуре. Например, можно проводить сравнения микробиоты в группах здоровых людей и лиц с определенным заболеванием или оценивать динамику изменения состава микробиоты в процессе лечения» [11].

Таким образом, методов для выявления изменений в микробиоте при различных клинических состояниях несколько, но предпочтение отдается наиболее информативным и достоверным молекулярно-генетическим тестам, применяемым для определения видового разнообразия и количественного анализа микробиома кишечника. К сожалению, в настоящий момент проведение данных методов диагностики недоступно в рутинной клинической практике в связи с достаточно высокой стоимостью и недостаточным оснащением лабораторий. Не вызывает сомнений, что со временем молекулярно-генетические методы прочно войдут в стандарты диагностики дисбиоза.

1.4. Изменение состава микробиоты при язвенном колите

Значительное количество исследований показало, что нарушение состава микробных популяций в ЖКТ связано как с острыми инфекциями, так и хроническими заболеваниями, к которым относятся ВЗК, синдром раздраженного кишечника (СРК), метаболические заболевания и аутоиммунные расстройства. В настоящее время активно обсуждается взаимосвязь микробиоты кишки и иммунного ответа хозяина в патогенезе ВЗК, а также потенциальные терапевтические стратегии, связанные с влиянием на кишечную экосистему [43,14].

TLRs (toll-подобные рецепторы) – трансмембранные рецепторы. TLR2 в сочетании с TLR1 и TLR6 связывает пептидогликан, липопротеины, липотейхоевую кислоту и другие компоненты грамположительных бактерий, антигены микобактерий и грибы. TLR4 – главный рецептор для ЛПС стенки бактерий, а TLR5 – для белка (флагеллина) жгутиков бактерий. В эндосоме TLR3 взаимодействует с двунитовой вирусной РНК, TLR7 и TLR8 – с однонитевой вирусной РНК, TLR9 – с регионами CpG (цитозин-фосфат-гуанин) ДНК бактерий и вирусов. В цитоплазме клеток расположен рецептор NOD2, распознающий мурамилдипептид стенки грамположительных и грамотрицательных бактерий (Рисунок 1) [3].

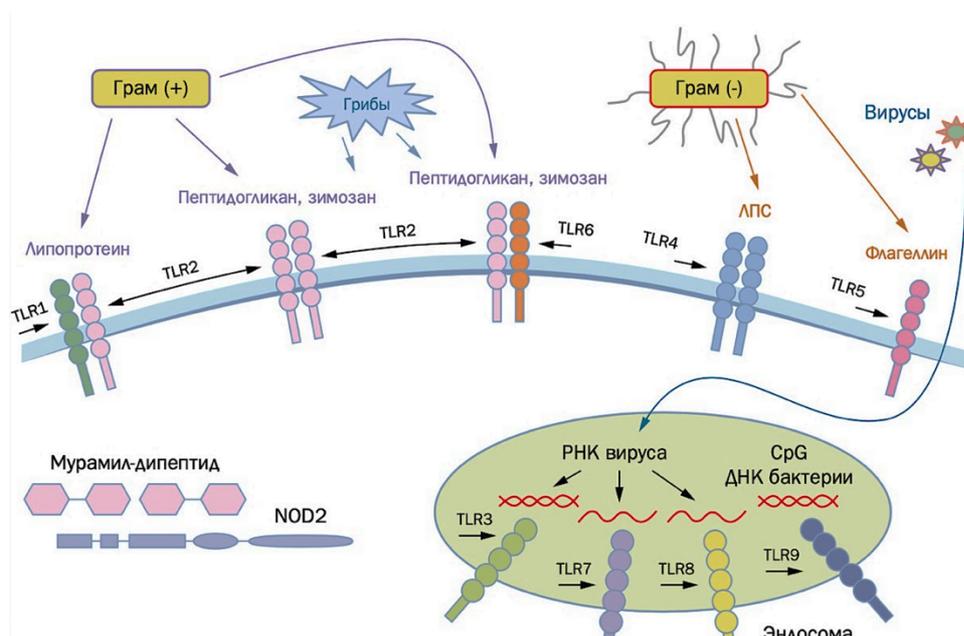


Рисунок 1. Рецепторы патоген-ассоциированных молекулярных структур (Атлас. Воспалительные заболевания кишечника: диагностика и лечение / под ред. проф. Халифа И.Л., член-корр. РАН Шельгина Ю.А. – СПб: Гиппократ, 2017. – 116 с.)

Учитывая разнообразие микробиоты кишечника человека, сложно определить специфические штаммы микроорганизмов, которые играют роль в патогенезе ВЗК. В отличие от достаточно хорошо изученной болезни Крона, наши представления о микробиоме толстой кишки при язвенном колите скудные и требуют дальнейшего изучения.

Известно, что у пациентов с язвенным колитом достоверно снижено число полезных комменсальных бактерий, населяющих желудочно-кишечный тракт [64,118]. Несколько исследований, основанных на проведении метагеномного анализа, доказали, что, прежде всего, это представители типа *Firmicutes*. Среди *Firmicutes* в кишечнике пациентов с ВЗК уменьшено количество *Clostridium* (кластеры *XIVa* и *IV*). Кластер *Clostridium XIVa* включает следующие виды: *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Lachnospira*, *Roseburia*, *Eubacterium*, *Coprococcus*, *Dorea* и *Butyrivibrio*. Кластер *Clostridium IV* состоит из *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Eubacterium* и *Anaerofilum* [160].

В организме здорового человека присутствует большая популяция грамположительных, анаэробных, комменсальных бактерий *Faecalibacterium prausnitzii* (*F. prausnitzii*), занимающая по некоторым данным от 6-8% до 20% среди всех представителей микробиоты [75,164]. Данная бактерия является одним из основных продуцентов КЖК, в частности, бутирата в кишечнике, метаболизируя полисахариды, полученные из пищи. Бутират играет ключевую роль в энергетическом обеспечении колоноцитов, улучшает функцию кишечного барьера, предотвращает транслокацию бактерий из просвета кишечника во внутреннюю среду организма и тормозит рост опухолевых клеток. КЖК обладают противовоспалительным эффектом, возникающим в результате производства регуляторных Т (Treg) клеток, а также посредством усиления регуляции секреции противовоспалительных цитокинов, таких как ИЛ-10 (интерлейкин) [55,41,132].

Machiels et al. представили результаты анализа микробиоты 127 пациентов с язвенным колитом, проведенного с помощью ПЦР в режиме реального времени и хромато-масс-спектрометрии. Установлено, что концентрация *F. prausnitzii*

($p < 0,0001$) при язвенном колите уменьшена по сравнению с группой контроля [102].

Кроме того, Varela E. et al. обнаружили, что сниженное количество *F. prausnitzii* у пациентов с язвенным колитом коррелирует с тем фактом, что рецидив заболевания возникает более одного раза в год. В свою очередь, восстановление популяции *F. prausnitzii* после рецидива связано с поддержанием длительной клинической ремиссии [171].

Филогенетический анализ показал, что существует, по крайней мере, два подтипа *F. prausnitzii* с различиями в распределении среди людей с заболеваниями кишечника и условно здоровыми. Филогруппа I составила 87% у здоровых людей, в то время как у пациентов с ВЗК - менее 50%. Напротив, филогруппа II была обнаружена у более чем у 75% пациентов с ВЗК и только у 52% здоровых людей.

Martín et al. выявили, что введение *F. prausnitzii* привело к значительному снижению тяжести ВЗК на экспериментальных моделях как тяжелого, так и умеренного колита. Они также продемонстрировали на мышинной модели, что этот вид микробиоты может предотвратить физиологическое повреждение хронического воспаления низкой степени тяжести [108,107]. Однако, некоторые свойства *F. prausnitzii*, вероятно, остаются неизвестными. Например, лечение препаратами группы месалазина и иммунодепрессантов не восстановило число *F. prausnitzii* [99].

Clostridium – это род грамположительных бактерий, в состав которого входят несколько патогенов человека, таких как возбудитель ботулизма, а также *Clostridium difficile*, являющейся важной причиной диареи. Представители *Clostridium* обычно обитают в почве и кишечнике животных и человека. Существует три основных вида *Clostridium* (*C. difficile*, *C. coccooides* и *C. leptum*), связанных с язвенным колитом.

C. difficile может продуцировать токсины А и В и вызывать развитие колита, особенно у пациентов, получающих лечение антибактериальными препаратами, что приводит к нарушениям в составе комменсальной микробиоты [35,119]. Пациенты с ВЗК наиболее подвержены воздействию *C. difficile* на фоне

иммуносупрессии и имеющегося дисбиоза [101,168]. Частота клостридиальной инфекции у взрослых больных с язвенным колитом колеблется от 2,8% до 11,1% [120]. Данная инфекция у больных после хирургического лечения язвенного колита с формированием илеоанального резервуарного анастомоза возникает в 10,7-18,3% случаев [95].

Singh H. et al. показали, что риск развития инфекции *C. difficile* при ВЗК в 4,8 раза больше по сравнению со здоровой группой. Достоверной разницы между язвенным колитом и болезнью Крона при этом не выявлено [159]. В то же время нет прямых доказательств о том, что *C. difficile* может вызвать язвенный колит, участвуя в его патогенезе. Однако появление клостридиальной инфекции в пациентов с ВЗК может провоцировать рецидив заболевания или усугубить уже имеющееся обострение [143].

Напротив, два других вида *Clostridium* – это *C. coccooides* (кластер *Clostridium XIVa*) и *C. leptum* (кластер *Clostridium IV*) достоверно связаны с развитием язвенного колита. Было показано, что кластеры *Clostridium IV* и *XIVa* играют важную роль в поддержании функций микробиоты путем производства бутирата [83,173].

Также многочисленными представителями микробиоты кишечника человека являются *Ruminococcaceae* и *Lachnospiraceae* (класс *Clostridia*). В образцах фекалий пациентов с язвенным колитом количество *Ruminococcus albus* (*R.albus*), *Ruminococcus callidus* (*R.callidus*) и *Ruminococcus bromii* (*R.bromii*) снижено в 5 раз по сравнению с контрольной группой. *R. albus* путем разложения клетчатки производит ацетат, используемый другими бактериями (*F.prausnitzii* и *Roseburia spp.*) для получения бутирата. В то время как *R.callidus* и *R.bromii* могут ферментировать сложные полисахариды, включая крахмал и ксилан, продукты деградации которых являются важными источниками энергии для микроорганизмов кишечника [62,68] (рисунок 2).

Представители типа *Bacteroidetes* составляют преобладающую часть микробиоты кишечника и играют важную роль в метаболических процессах.

Увеличение метаболизма серной аминокислоты цистеина и рибофлавина, продуцирования ЛПС, биосинтеза глутатиона, способствуют пролиферации представителей типа *Bacteroidetes*.

Участие рода *Bacteroides* в патогенезе ВЗК изучено в исследованиях на животных. У нокаутных по NOD2 мышей от *Bacteroides vulgatus* зависел усиленный воспалительный ответ в тонкой кишке [137].

Многочисленные исследования [27,77,82] указывают на то, что количество бактерий рода *Bacteroides* увеличивается у пациентов с язвенным колитом. Это, вероятно, ассоциировано с деградацией кислого муцина как источника углерода в толстой кишке и формированием воспалительного ответа.

Уменьшение пропорции рода *Bacteroides* было зарегистрировано в воспаленной слизистой оболочке по сравнению с невоспаленной слизистой пациентов с язвенным колитом ($p < 0,05$) [97], что определено в качестве предиктора рецидива заболевания [133]. Согласно последним данным, *Bacteroides* предложен в качестве биомаркера ВЗК в биоптатах [28].

Bacteroides fragilis оказывает благотворное влияние на иммунную систему хозяина. *B. fragilis* производит полисахарид А, который признан фактором симбиоза, оказывающим противовоспалительное действие, индуцируя секрецию ИЛ-10, который, в свою очередь, подавляет продукцию провоспалительных цитокинов, таких как ИЛ-17, ИЛ-23 и ФНО- α [176].

Mazmanian S.K. et al. доказали, что *B. fragilis* защищает стерильных мышей в эксперименте от развития колита, вызванного *Helicobacter hepaticus* (комменсальная бактерия с патогенным потенциалом). У животных, которые имеют в кишечнике *B. fragilis* без продукции полисахарида А, усиливалось образование провоспалительных цитокинов и возникало воспаление слизистой оболочки кишки [110]. *B. vulgatus* устраняет у гнотобиотических мышей *Escherichia coli* (*E.coli*)-индуцированный колит [174].

Другое исследование, изучающее эффекты и механизмы кишечного эпителиального рецептора витамина Д в здоровом и воспаленном состоянии,

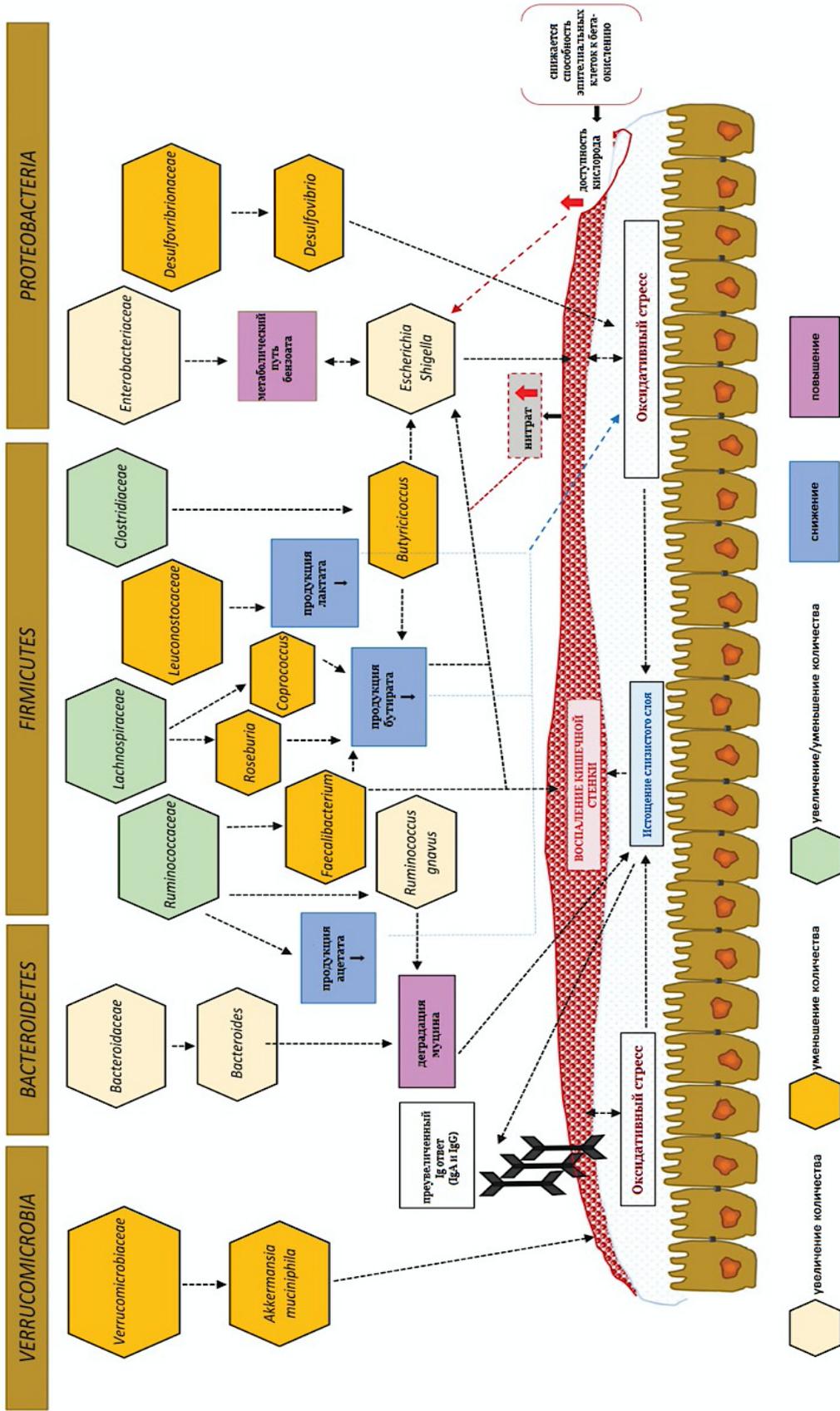


Рисунок 2. Изменения в составе кишечной микробиоты при язвенном колите (С. Rodríguez et al. Microbiota insights in clostridium difficile infection and inflammatory bowel disease. Gut Microbes, 2020, V. 12, №1, e1725220)

используя модели клеточных культур, условную модель нокаутных мышей, модели колита и образцы биопсий человека, выявило увеличение *Bacteroides* при колите и повышенные уровни *Bacteroides fragilis* в биопсии толстой кишки пациентов с ЯК [180].

А. Hirano et al. выявили, что представители типа *Bacteroidetes Butyricimonas* менее распространены у пациентов с язвенным колитом и болезнью Крона в сравнении со здоровой группой. Содержание *Butyricimonas* также имело отрицательную корреляцию с провоспалительными цитокинами [80] и было ниже как в невоспаленных, так и в воспаленных участках толстой кишки пациентов с язвенным колитом. Это позволило высказать предположение, что данный род бактерий может играть ключевую защитную роль в возникновении и развитии воспалительного процесса [73].

Исследование пристеночной микробиоты толстой кишки при язвенном колите с помощью ПЦР в реальном времени, выполненное индийскими учеными, говорит о том, что группа *Bacteroides-Prevotella-Porphyrromonas* наиболее распространена [82].

По данным литературы представители рода *Parabacteroides* повышены в составе фекальной микробиоты при болезни Крона [93], при язвенном колите пока недостаточно исследований [77,112].

Еще одни бактерии типа *Bacteroidetes* род *Alistipes* снижаются при язвенном колите [93]. В эксперименте на животных мыши в возрасте 18 месяцев и молодые особи (8 недель) были инфицированы *C difficile*, и сравнивались тяжесть заболевания, иммунный ответ и состав кишечного микробиома. Тот же эксперимент был повторен с обменом кишечной микробиоты между пожилыми и молодыми мышами до заражения. Высокая смертность наблюдалась у старых мышей с более слабой нейтрофильной мобилизацией в крови и кишечной ткани и подавленными провоспалительными цитокинами при ранней инфекции. Обмен микробиоты улучшал выживаемость и ранний иммунный ответ у мышей в возрасте. Микробиомный анализ показал, что у старых мышей имеется

значительная нехватка представителей типа *Bacteroidetes* и, в частности, *Bacteroides*, *Alistipes* [155].

Altomare A. et al. при исследовании образцов фекалий и биоптатов кишечной стенки 14 пациентов с ВЗК и 11 пациентов контрольной группы методом секвенирования 16S РНК, у первых выявили снижение концентрации представителей типа *Actinobacteria* [28].

Bifidobacterium широко используется в качестве одного из пробиотиков. Исследования показали, что он играет важную роль в лечении язвенного колита. Экспериментально продемонстрировано, что пероральное введение *Bifidobacterium* может блокировать воспаление кишечной стенки, воздействуя на клетки Tr1, приводя к выработке IL-10, тем самым ослабляя колит у мышей [81].

Pompei A. et al. была исследована способность 76 штаммов *Bifidobacterium* продуцировать фолат. Фолиевая кислота и ее соединения, также известная как витамин В₉ или фолаты, участвуют в нескольких метаболических процессах, необходимых для деления клеток. Эксперименты с фекальной культурой показали, что добавление *B. adolescentis* MB 239 может увеличить концентрацию фолата в толстой кишке [128]. В то время как анализ фекальной микробиоты пациентов с ВЗК показал уменьшение количества *B. adolescentis*.

Фактически, добавка фолиевой кислоты рекомендуется всем пациентам с ВЗК из-за ее способности регулировать пролиферацию клеток прямой кишки. Существует мнение о наличии корреляции между уменьшением биодоступности фолата и увеличением риска развития колоректального рака при длительном течении язвенного колита.

Biasco G. et al. изучили влияние фолата на пролиферацию эпителия слизистой оболочки прямой кишки у пациентов с длительным анамнезом язвенного колита. Выделено две группы больных, одна из которых получала фолиевую кислоту (15 мг/сут), другая – плацебо. Пролиферацию клеток биоптатов прямой кишки, инкубированных в культуральной среде, содержащей бромдезоксигидин (синтетический нуклеозид, аналог тимидина, используемый для выявления пролиферирующих клеток в живых тканях), анализировали с помощью

иммуногистохимических методов. Фрагменты биоптатов просматривались на момент включения в исследование и через три месяца после начала терапии. По сравнению с исходными значениями после трех месяцев лечения у пациентов, получавших фолиевую кислоту, наблюдалось значительное снижение частоты появления меченых клеток ($0,1836 \pm 0,0278$ против $0,1023 \pm 0,0255$; $p < 0,01$). Напротив, значительных пролиферативных изменений в группе плацебо не было отмечено. Эти результаты свидетельствуют о том, что добавление фолата способствует регулированию пролиферации клеток слизистой оболочки прямой кишки у пациентов с длительным анамнезом язвенного колита. Это может быть использовано для профилактики развития колоректального рака у этих пациентов [34].

Класс *Coriobacteriia* – это еще одни представители типа *Actinobacteria*, которые выявлены у пациентов с ВЗК, но недостаточно изучены. F. Imhann et al. провели исследование образцов стула 313 пациентов с ВЗК (118 больных язвенным колитом) методом секвенирования 16S РНК, в котором выявили снижение концентрации *Coriobacteriia* по сравнению с контрольной группой [77].

Численность представителей типа *Proteobacteria* при язвенном колите повышена, однако исследования, подтверждающие этот факт немногочисленны [77].

Развитие хронического колита связывают с существенным увеличением представителей семейства *Enterobacteriaceae* и формированием оксидативного стресса в кишке [78]. В недавнем исследовании высказано предложение о рассмотрении микроорганизмов *Enterobacteriaceae* в качестве биомаркера ВЗК в образцах фекалий [28]. Существует несколько метаболических изменений, которые вызывают окислительный стресс на поверхности слизистой оболочки у пациентов с ВЗК и способствуют увеличению уровня или истощению различных таксонов, использующих муцин в качестве основного источника энергии [1,112].

E. coli – вид грамотрицательных палочковидных бактерий, которые по своим свойствам являются достаточно противоречивыми. Большинство штаммов *E. coli* непатогенные и являются частью нормальной микробиоты, участвуя, например, в

синтезе витаминов [139], однако серотипы O157:H7, O121, O104:H4 и O104:H21 могут вызывать тяжёлые отравления [89].

Существуют данные о том, что количество *E. coli* значительно увеличено как на мышинной модели, так и у больных язвенным колитом по сравнению с контрольной группой [117,126]. Также имеются сведения, утверждающие, что количество *E. coli* возрастает в момент активности заболевания в отличие от ремиссии воспалительного процесса или здоровых лиц [153,138].

В слизистой оболочке подвздошной кишки пациентов с болезнью Крона и в фекальных образцах пациентов с язвенным колитом обнаружено большое количество адгезивно-инвазивной *E. coli*. По-видимому, кишечная палочка действует как оппортунистический патоген и напрямую связана с заболеванием, индуцируя выработку цитокинов, таких как ФНО- α и ИЛ-8, и увеличение деградации муцина [32].

Класс *Deltaproteobacteria* включает сульфатредуцирующие бактерии, количество которых увеличивается у пациентов с ВЗК. Данные бактерии ухудшают течение заболеваний ЖКТ путем продуцирования сульфата водорода (H_2S) и других токсичных продуктов жизнедеятельности, а также путем снижения доступности полезных метаболитов, таких как бутират [115].

Devkota et al. показали, что употребление диеты с избыточным содержанием насыщенных жиров приводит к увеличению количества сульфат-редуцирующей комменсальной бактерии *Bilophila wadsworthia* (*B.wadsworthia*). Колонизация *B.wadsworthia* генетически восприимчивых ИЛ-10^{-/-} мышей приводила к Th1-опосредованному воспалению толстой кишки [109]. Rowan F. et al. установили, что другие сульфат-редуцирующие бактерии, такие как *Desulfovibrio spp.* и *Desulfuromonas spp.* распространены у пациентов с язвенным колитом в большей степени по сравнению со здоровыми добровольцами [145].

Участие микроорганизмов класса *Epsilonproteobacteria* (*Helicobacter spp.*, *Campylobacter spp.*) в ВЗК также изучается. *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) широко распространена в эпителии желудка, способна вызывать хронический гастрит, язвенную болезнь и злокачественные новообразования. Исследования показали,

что она также может быть обнаружена в толстой кишке и образцах фекалий пациентов с язвенным колитом [87]. Отношения между язвенным колитом и *H. pylori* противоречивы и сложны. Распространенность *H. pylori* у пациентов с ВЗК достаточно низкая. Engler et al. было продемонстрировано [57], что дополнительное заражение инфекцией *H. pylori* облегчало клинические и гистопатологические особенности течения экспериментально индуцированного колита, что указывает на защитную роль *H. pylori* при воспалительных заболеваниях кишечника. Тем не менее, некоторые эпидемиологические данные показали, что не было значительной корреляции между *H. pylori* и течением язвенного колита [96, 182].

Семейство *Campylobacteraceae* (класс *Epsilonproteobacteria*) участвует в патогенезе воспалительных заболеваний кишечника. Недавние исследования показывают, что представительство *Campylobacter concisus* (*C.concisus*) и *Campylobacter jejuni* (*C.jejuni*) в биоптатах или образцах фекалий пациентов с язвенным колитом больше, чем у группы сравнения. Прикрепление к эпителиальным клеткам кишки *C.concisus* и *C.jejuni* вызывает продукцию провоспалительных цитокинов, таких как ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-12 и ФНО- α [104].

Тип *Fusobacterium* представляет собой анаэробные грамотрицательные бактерии, которые являются представителями нормальной микробиоты. Однако некоторые адгезивные, инвазивные провоспалительные виды *Fusobacterium* идентифицированы как патогенные микроорганизмы при язвенном колите [124]. Исследований на данную тематику недостаточно. Относительная распространенность *Fusobacterium* в слизистой оболочке толстой кишки на моделях колита у мышей или пациентов с язвенным колитом увеличивается, среди которых 69% всех *Fusobacterium* составляет *F. nucleatum* [167,31]. Кроме того, комменсальные бактерии, включая *F. varium*, выделены в качестве возможного патогена язвенного колита. Частота определения данного микроорганизма выше у пациентов с язвенным колитом (61%), чем у пациентов с болезнью Крона (13%) или здоровых людей (29%) ($p < 0,001$ и $p = 0,021$ соответственно). Выявление *F. varium* в слизистой оболочке толстой кишки иммуногистохимическим методом установило, что их количество значительно выше при язвенном колите (84%) по

сравнению с показателями у пациентов с болезнью Крона (16%) или группой контроля (3–13%) ($p < 0,001$) [125].

Последние годы уделяется пристальное внимание представителю редкого типа *Verrucomicrobia Akkermansia muciniphila*. На сегодняшний день существуют противоречивые данные о влиянии *A. muciniphila* на здоровье человека и ее участии в различных заболеваниях. В некоторых исследованиях сообщалось о снижении уровня *A. muciniphila* при болезни Крона и язвенном колите [98,127]. Было высказано предположение об участии этой бактерии в развитии воспаления. Однако недавнее исследование с использованием моделей на животных не обнаружило какой-либо корреляции между кратковременным колитом и присутствием *A. muciniphila* в кишечнике [140].

Лекарственные препараты для лечения ВЗК также оказывают влияние на состав микробиоты кишечника. К примеру, препараты 5-аминосалициловой кислоты (5-АСК) уменьшают количество бактерий в образцах фекалий у больных с ВЗК и снижают концентрацию микроорганизмов мукозной флоры по сравнению с нелечеными пациентами [29]. Месалазин подавляет экспрессию генов, которая связана с бактериальной инвазивностью и устойчивостью к антибиотикам в *Salmonella enterica serovar Typhimurium*, что может способствовать возникновению воспаления кишечной стенки после перенесенной инфекции [150]. Кроме того, препараты 5-АСК ингибируют рост сульфатвосстанавливающих бактерий и подавляют выработку сульфидов. Действительно, у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника, которые не используют месалазин, уровень сульфидов в образцах фекалий выше [56].

О влиянии тиопуринов и глюкокортикоидов на состав кишечной микробиоты существует мало информации. Лечение тиопуринами повышает концентрацию бактерий мукозной флоры [166]. Было установлено, что данные препараты ингибируют рост *Mycobacterium avium* подвидовой паратуберкулез *in vitro* [156]. Другое исследование показало, что использование тиопуринов значительно сократило бактериальное разнообразие в образцах фекалий пациентов в ВЗК по

сравнению с другими лекарственными средствами, включая анти-ФНО- α , месалазин и кортикостероиды [178].

Влияние глюкокортикостероидов на кишечную микробиоту исследовано на животных моделях. В экспериментах на мышинной модели кортикостероиды увеличивают численность *Bifidobacterium* и *Lactobacillus*, устраняя присутствие *Mucispirillum*, известного как подавителя секреции муцина в нормальных условиях и в условиях воспаления [74]. Другое исследование на здоровых собаках не показало существенных различий в составе микробиоты при введении глюкокортикостероидов [76].

Следовательно, препараты, применяемые в настоящее время для лечения ВЗК, могут изменять состав кишечной микробиоты, но доказательства этого достаточно скудные, требуется проведение дальнейших исследований [121].

Таким образом, основываясь на результатах проведенных научных исследований, факт наличия дисбиоза у пациентов с язвенным колитом не вызывает сомнений. До сих пор остается неясным, является ли уменьшение или увеличение бактериального разнообразия причиной или следствием истощения слизистой оболочки, затем ее воспаления. Лучшее понимание изменений микробного разнообразия может привести к появлению новых подходов к лечению язвенного колита или профилактике возникновения рецидивов заболевания. Противоречивость некоторых имеющихся данных, недостаточность информации по некоторым отдельным аспектам состава микробиоты при язвенном колите послужило причиной для выполнения данного научного исследования.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

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. Протокол исследования был одобрен на заседании Комитета по этике научных исследований ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России от 14.11.2017 года.

В настоящее исследование из 387 пациентов, проходивших обследование в гастроэнтерологическом отделении, включены 70 пациентов с верифицированным диагнозом язвенного колита и соответствующие следующим критериям:

- возраст старше 18 лет;
- пациенты с различными клиническими формами и течением заболевания;
- пациенты, получавшие терапию препаратами 5-АСК, ГКС, иммуносупрессорами и/или генно-инженерными биологическими препаратами (ГИБП).

Критериями исключения являлись следующие положения:

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

Для проведения сравнительного анализа микробиома толстой кишки набрана группа из 50 пациентов, проходивших обследование в ФГБУ «НМИЦ колопроктологии А.Н. Рыжих» Минздрава России, с диагнозами синдрома раздраженного кишечника и бессимптомных дивертикулов ободочной кишки.

2.1. Характеристика больных язвенным колитом

Среди обследуемых пациентов с язвенным колитом были 43 (61,4%) женщины и 27 (38,6%) мужчин.

По результатам анализа возрастной структуры больных выявлено, что средний возраст составил $40 \pm 14,4$ лет (таблица 7).

Таблица 7.

Возрастная характеристика пациентов основной группы

Возраст (лет)	до 20	20-29	30-39	40-49	50-59	60-69	Всего
n(%)	4(5,7)	13(18,6)	21(30)	11(15,7)	12(17,1)	9(12,9)	70(100)

При этом на долю 70% (n=49) приходятся пациенты трудоспособного возраста до 50 лет, что констатирует факт высокой социальной значимости язвенного колита. В группу от 20 до 40 лет входят 48,6% (n=34) больных, что также подтверждает общемировые эпидемиологические данные о первом пике заболеваемости в период с 20 до 30 лет.

К числу пациентов язвенным колитом после 50 лет относятся 30% (n=21). Если обратить внимание на длительность заболевания у данной возрастной группы, то можно заметить, что воспалительный процесс после 50 лет манифестировал у 9 (42,8%) пациентов, у остальных 57,2% язвенный колит возник в более молодом возрасте.

В исследование включены два пациента с развитием заболевания после 62 лет. Средняя продолжительность воспалительного процесса у них составила 3 и 4 года соответственно. При этом язвенный колит протекал достаточно неблагоприятно.

В первом случае, у пациента по данным очередной плановой колоноскопии выявлены множественные полипы толстой кишки, по результатам патоморфологического исследования определялись тубулярные аденомы с умеренной дисплазией эпителия. Пациенту разъяснены риски возникновения рака

толстой кишки на фоне язвенного колита и предложено хирургическое лечение в объеме колпроктэктомии, от которого больной отказался, продолжена консервативная терапия препаратами 5-АСК. Затем пациенту неоднократно каждые три месяца проводилась тотальная колоноскопия с хромокопией 0,4% раствором индигокармина с забором поэтажной биопсии. В динамике количество полипов и участков дисплазии уменьшилось. Пациент по настоящее время продолжает медикаментозную терапию с регулярным эндоскопическим контролем.

Во втором случае, на фоне консервативного лечения у пациентки ремиссии воспалительного процесса достигнуть не удавалось. При очередной контрольной колоноскопии с забором биопсии выявлена тубулярная аденома высокой степени дисплазии эпителия прямой кишки. Выполнено хирургическое лечение в объеме колпроктэктомии с формированием постоянной илеостомы по Бруку [17].

Городские жители составили 91,4% (n=64) пациентов.

Длительность анамнеза язвенного колита имела достаточно большой временной разброс от 4-6 месяцев до 38 лет, среднее значение $7,22 \pm 6,7$ лет (таблица 8).

Таблица 8.

Распределение больных язвенным колитом по длительности заболевания

Длительность заболевания (мес и год)	n(%)
до 6 месяцев	3(4,3)
1-5 лет	33(47,1)
6-10 лет	22(31,4)
11-20 лет	8(11,4)
21-30 лет	2(2,9)
31-40 лет	2(2,9)

При опросе наиболее часто больные предъявляли жалобы на изменение частоты и консистенции стула, появление ложных позывов к дефекации и патологических примесей в стуле в виде крови или слизи. Болевой синдром, как правило, был выражен незначительно, проявлялся спастическими болями в левых или нижних отделах живота, уменьшающимися после акта дефекации. Жалобы на

боли в животе отмечали 28 (40%) пациентов. 17 (24,3%) больных беспокоило ощущение вздутия и дискомфорта в животе.

Среднее значение индекса массы тела (ИМТ) составило $23,4 \pm 2,7$ кг/м².

В зависимости от протяженности изменений при эндоскопическом исследовании толстой кишки пациенты распределились следующим образом: тотальное поражение выявлено у 78,6% (n=55), левостороннее – у 21,4% (n=15) (рисунок 3). Больные с язвенным колитом в форме проктита в исследование не включены, так как они практически всегда наблюдаются и обследуются амбулаторно.

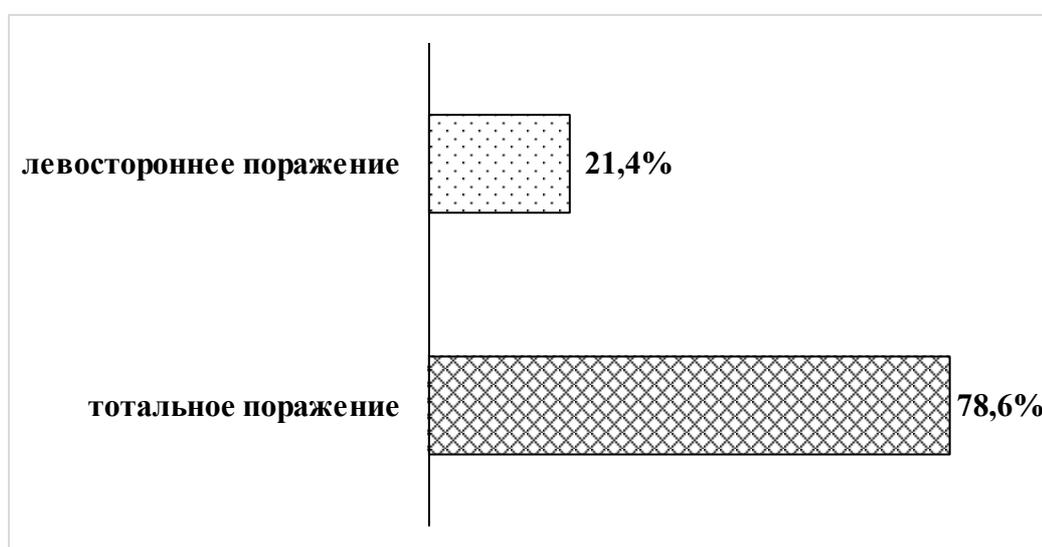


Рисунок 3. Распределение пациентов с язвенным колитом в зависимости от протяженности поражения (%)

Острое течение заболевания выявлено у 3 (4,3%) пациентов, хроническое рецидивирующее – у 29 (41,4%), а хроническое непрерывное – у 38 (54,3%) соответственно (рисунок 4).

На основании полученных данных комплексного осмотра с выполнением ректороманоскопии, забора лабораторных анализов и эндоскопического исследования толстой кишки, критериев Truelove-Witts легкая атака язвенного колита диагностирована у 38 (54,3%) и среднетяжелая – у 14 (20%) больных. Клиническая и эндоскопическая ремиссия воспалительного процесса выявлена у 18 (25,7%) пациентов (рисунок 5).



Рисунок 4. Распределение пациентов язвенным колитом в зависимости от характера течения заболевания (%)

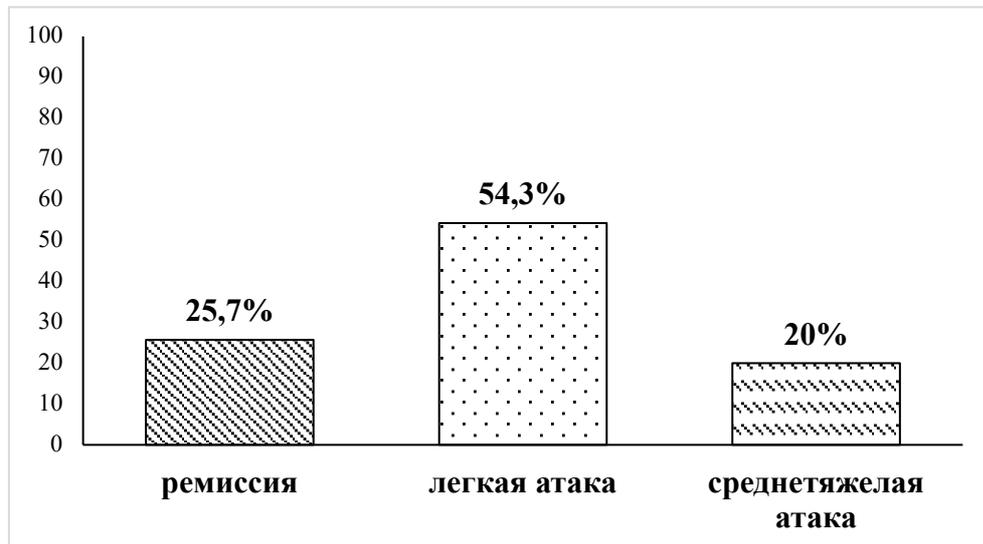


Рисунок 5. Распределение пациентов язвенным колитом в зависимости от тяжести заболевания (%)

Согласно данным анамнеза, у 32,9% (n=23) больных выделена гормональная зависимость и у 2,9% (n=2) – гормональная резистентность.

Эндоскопическая активность заболевания на основании классификации по Schroeder [149]: ремиссия – 18 (25,7%), минимальная – 31 (44,3%), умеренная – 18 (25,7%), выраженная – 3 (4,3%) (рисунок 6).

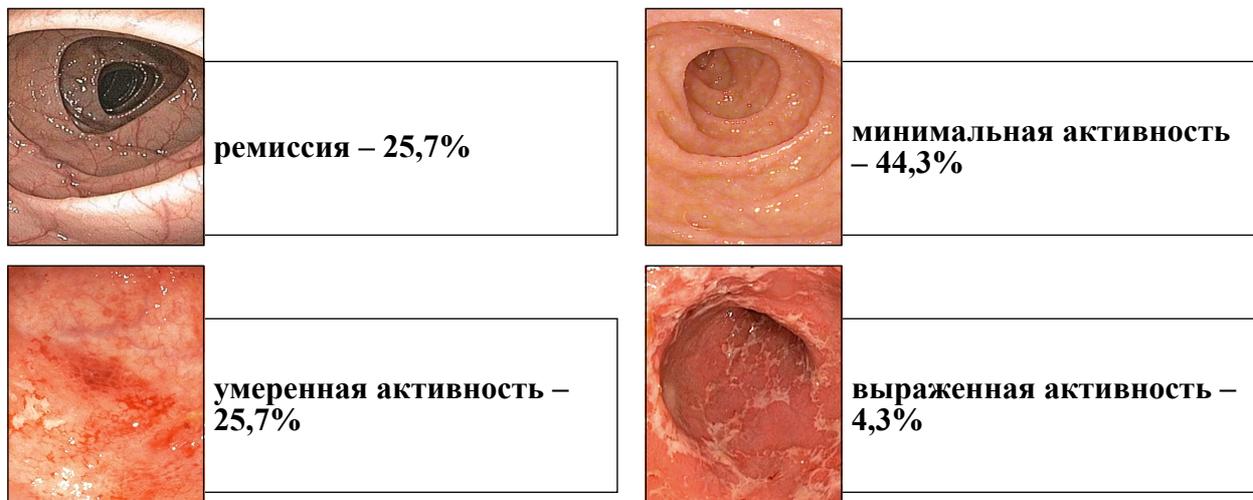


Рисунок 6. Распределение пациентов язвенным колитом в зависимости от эндоскопической активности (%)

У 6 (8,6%) пациентов диагностированы внекишечные проявления язвенного колита: первичный склерозирующий холангит (n=2), периферическая артропатия (n=1), двусторонний сакроилеит (n=2), узловатая эритема и гангренозная пиодермия (n=1).

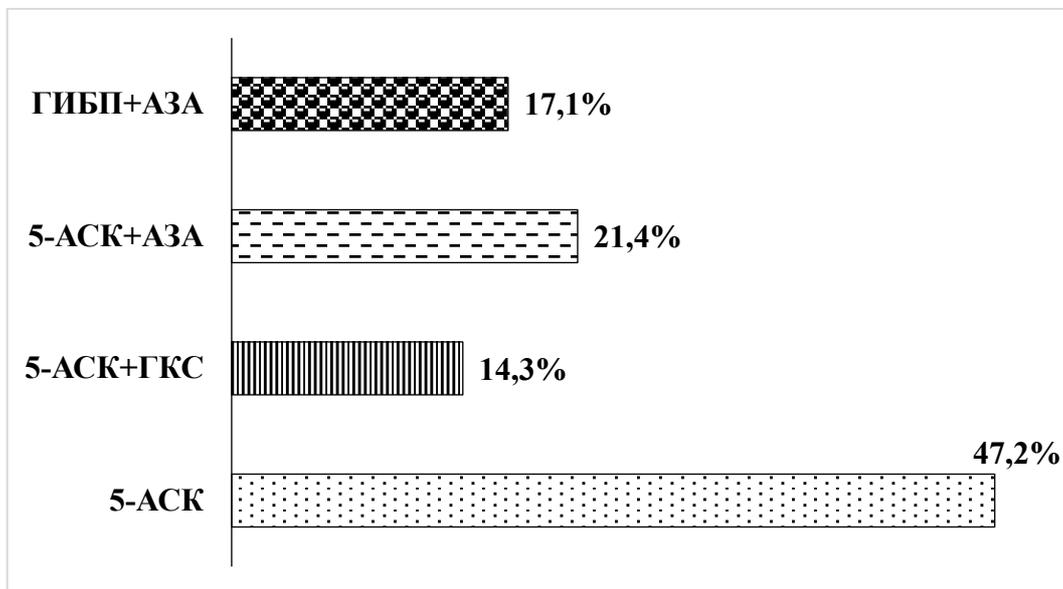


Рисунок 7. Распределение пациентов язвенным колитом в зависимости от получаемого лечения (%)

На момент включения в исследование больные получали различные схемы противорецидивной терапии (рисунок 7). Базисное лечение препаратами 5-АСК принимали 33 (47,1%) пациента. Комбинированное лечение препаратами 5-АСК и

ГКС получали 10 (14,3%) пациентов, а препаратами 5-АСК и иммуносупрессорами (азатиоприн – АЗА) – 15 (21,4%) пациентов. Терапия генно-инженерными биологическими препаратами (ГИБП) (анти-ФНО- α) изолированно или в комбинации с иммуносупрессорами (АЗА) назначена 12 (17,1%) больным, не ответившим на гормональную терапию.

2.2. Характеристика пациентов группы сравнения

Группу сравнения составили 50 пациентов, среди которых 20 мужчин (40%) и 30 женщин (60%). 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 (таблица 9). Пациенты с синдромом раздраженного кишечника разных вариантов включены в группу сравнения, основываясь на результатах научной работы, ранее выполненной на кафедре гастроэнтерологии [13], которая показала, что общая бактериальная масса в биоптатах у данных больных достоверно не отличалась от группы здоровых добровольцев.

Всем пациентам проведена тотальная колоноскопия с забором биоптатов неизменной слизистой оболочки левых отделов толстой кишки для оценки состава микробиоты методом ПЦР в режиме реального времени и сравнения с основной группой больных язвенным колитом.

Таблица 9.

Характеристика пациентов контрольной группы (n=50)

Показатель		Значение
Пол	Мужчины, n(%)	20(40)
	Женщины, n(%)	30(60)

Средний возраст, годы ($M \pm m$)		54,5±13,7
Диагноз	Бессимптомные дивертикулы ободочной кишки, $n(\%)$	26(52)
	Синдром раздраженного кишечника, $n(\%)$	24(48)

2.3. Общеклинические методы исследования

При поступлении в гастроэнтерологическое отделение у пациентов с язвенным колитом производился подробный сбор жалоб и анамнестических данных, объективный осмотр с оценкой состояния перианальной области, выполнялось пальцевое исследование прямой кишки, а также для оценки состояния слизистой оболочки прямой кишки и дистальной трети сигмовидной кишки до уровня 15-20 см проводилась ректороманоскопия ректоскопом с волоконным световодом Ре-ВС-02 (г. Санкт-Петербург).

В клинической лаборатории выполнялся стандартный набор лабораторной диагностики: общеклинический и биохимический анализ крови, коагулограмма, общий анализ мочи, копрограмма.

Бактериологическое исследование кала на патогенную флору выполнено в микробиологической лаборатории для исключения кишечных инфекций (сальмонеллеза, иерсиниоза, шигеллеза). Также проводился микробиологический анализ кала на дисбактериоз, по данным которого чаще всего обнаруживались дисбиотические нарушения микрофлоры, обусловленные снижением количества бифидобактерий и лактобактерий.

При подозрении на наличие клостридиальной инфекции выполнялся иммуноферментный анализ (ИФА) кала на токсины клостридии А и В.

Ультразвуковое исследование (УЗИ) было выполнено всем пациентам с язвенным колитом конвексным датчиком частотой 3.5 МГц и линейным датчиком частотой 7.5 МГц. При этом оценивались распространенность воспалительного

процесса, локализация поражения, состояние кишечной стенки, состояние внутренних органов брюшной полости, почек и малого таза.

Эндоскопическое исследование толстой кишки с осмотром терминального отдела подвздошной кишки является одним из основных методов диагностики, позволяющим верифицировать наличие язвенного колита. При этом были использованы диагностические фиброколоноскопы PENTAX и Olympus PCF-20.

При длительном анамнезе язвенного колита проводилась тотальная колоноскопия с хромоскопией 0,4% раствором индигокармина. Забор биоптатов слизистой оболочки толстой кишки с последующим морфологическим описанием осуществлялся для верификации диагноза, при наличии полипов или участков подозрительных на наличие дисплазии.

Для подготовки к колоноскопии назначались бесшлаковая диета в течение трех дней и препараты полиэтиленгликоля: Лавакол[®] (ЗАО «МосФарма», Россия), Пикопреп[®] (ООО «Ферринг Фармасетикалз», Германия) или Фортранс[®] (Beaufour Ipsen Pharma, Франция).

2.4. Метод полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

Для оценки состава микробиома толстой кишки у пациентов с язвенным колитом и пациентов группы сравнения применен метод ПЦР в режиме реального времени. Молекулярно-генетическая диагностика проводилась под руководством ведущего научного сотрудника ФГБУ ГНЦ Института Иммунологии ФМБА России д.м.н. Болдыревой Маргариты Николаевны. Лаборатория является научным подразделением компании ООО «НПО ДНК-Технология».

«Сущность метода ПЦР заключается в умножении (амплификации) молекул ДНК, происходящем в процессе повторяющихся циклов. Каждый цикл состоит из денатурации ДНК (при температуре 95°C), специфического взаимодействия искусственно синтезированных коротких полинуклеотидов (праймеров) с

комплементарными последовательностями мишени ДНК при понижении температуры реакционной смеси до температуры плавления праймеров, и последующей достройки новых полинуклеотидных цепей, начинающихся с праймеров, связавшихся с мишени ДНК, с помощью термостабильной ДНК-полимеразы (Taq-полимеразы). Эта схема классической ПЦР дополняется включением в реакционную смесь ДНК-зондов при проведении реакции с детекцией результатов в режиме реального времени» [200].

«Каждая молекула ДНК-зонда имеет флуоресцентную метку и гаситель флуоресценции, который акцептирует флуоресценцию, излучаемую флуоресцентным красителем, блокируя тем самым излучаемый флуоресцентный сигнал. ДНК-зонд представляет собой нуклеотидную последовательность, комплементарную амплифицируемой области мишени ДНК. В процессе синтеза ампликонов (специфичного продукта ДНК-синтеза с праймеров) зонд, связавшийся с ДНК мишени, разрушается ДНК-полимеразой, которая достраивает ампликоны с мишени ДНК. В результате разрешения ДНК-зонда действие гасителя на флуоресцентную метку прекращается, что ведет к появлению флуоресцентного излучения, которое фиксируется прибором. Количество меченых ДНК-зондов, разрушенных в процессе прохождения ПЦР, пропорционально количеству синтезированных специфических ампликонов. Уровень излученной флуоресценции, который измеряется прибором на каждом цикле амплификации, будет нарастать пропорционально увеличению количества амплификационной ДНК. Количественные измерения проводят по номеру индикаторного («порогового») цикла, на котором чувствительность прибора позволяет зафиксировать флуоресцентный сигнал: чем раньше наступает «пороговый» цикл (меньше его номер), тем большее количество мишени ДНК было в образце. ДНК-зонды, используемые для детекции продуктов амплификации ДНК ОБМ и условно-патогенных микроорганизмов (УПМ), помечены флуоресцентными метками FAM и HEX. После прохождения амплификации, по показателю индикаторного цикла программно рассчитывается количество ОБМ и каждого микроорганизма. Для оценки адекватности взятия биоматериала используется показатель – контроль

взятия материала (КВМ). Показателем правильного взятия биоматериала является достаточное количество геномной ДНК человека в пробе, которое оценивается в абсолютных значениях. Источником этой ДНК являются эпителиальные клетки, попадающие в пробу при правильной технике взятия биоматериала» [18,200].

В данном исследовании 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 исследования мукозной микробиоты;
- 2) соскобы эпителиальных клеток ампулы прямой кишки, полученные стерильным одноразовым инструментом типа «Cytobrush», введенным на глубину 4-5 см, выполняя циркулярные движения по стенкам;
- 3) образцы фекалий для исследования просветной микробиоты.

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 -20°C с последующей доставкой в лабораторию.



Рисунок 8. Детектирующий амплификатор ДТпрайм

«ПЦР-диагностика исследуемых образцов производилась с использованием детектирующего амплификатора ДТпрайм (производитель ООО «НПО ДНК-Технология», Протвино, Россия) (рисунок 8). Набор реагентов включал: смесь для ПЦР-амплификации, специфичную для всех бактерий (общая бактериальная масса), 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. Программное обеспечение, установленное на указанном оборудовании, обеспечивает получение данных в графическом и цифровом формате, удобном для трактовки и хранения результатов» [13].

«В исследуемых образцах методом ПЦР-РВ 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.» [13].

«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 $(6,7 \text{ log} - 7,0 \text{ log}) = -0,3 \text{ log}$ » [12]. Относительные показатели более точные, так как они в меньшей степени зависят от погрешностей при заборе материала и проведении анализа.

2.5. Статистическая обработка результатов

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 медианы (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 $p < 0,05$.

ГЛАВА 3. ХАРАКТЕРИСТИКА ВЫДЕЛЕННЫХ ТИПОВ БАКТЕРИЙ И ИХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ

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*).

Систематика и распределение микроорганизмов в иерархическом порядке согласно таксономическим группам выполнены с использованием базы данных Национального центра биотехнологической информации США (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>) и представлены в таблице 10.

С точки зрения количества и разнообразия идентифицированных видов, тип *Actinobacteria* представляет собой одну из крупнейших таксономических единиц среди 18 основных линий, признанных в настоящее время в пределах домена *Bacteria* [172]. Среди *Actinobacteria* встречаются патогенные микроорганизмы (например, *Mycobacterium* spp., *Nocardia* spp., *Tropheryma* spp., *Corynebacterium* spp. и *Propionibacterium* spp.), жители почвы (*Streptomyces* spp.), комменсалы растений (*Leifsonia* spp.), азотфиксирующие симбионты (*Frankia*) и обитатели желудочно-кишечного тракта (*Bifidobacterium* spp., *Coriobacteriia*).

Bifidobacterium spp. – это неподвижные неспорообразующие анаэробные бактерии, ферментирующие большое разнообразие олигосахаридов в ЖКТ, некоторые из них, которые не перевариваются хозяином, используются для увеличения числа бифидобактерий, а также других пробиотических бактерий *in situ*, и эта практика называется пребиотической концепцией [92].

Coriobacteriia – это класс грамположительных неподвижных неспорообразующих бактерий, имеющих способность ферментировать глюкозу. Эти бактерии являются нормальными обитателями ротовой полости, ЖКТ и

половых путей млекопитающих. В кишечнике они выполняют ряд важных функций: превращение солей желчных кислот и активацию пищевых полифенолов. Тем не менее, они также могут рассматриваться как патобионты, так как участвуют в ряде патологических состояний (бактериемия, периодонтит и вагиноз) [42].

Грамотрицательные бактерии, принадлежащие к типу *Bacteroidetes*, широко распространены в пищеварительном тракте. Впервые в 1898 году *Bacteroides fragilis* определен как микроорганизм, связанный с возникновением аппендицита. Хотя некоторые *Bacteroides spp.* до сих пор считаются оппортунистическими патогенами, за последние несколько десятилетий исследования показали, что многие виды *Bacteroidetes* хорошо приспособлены к условиям ЖКТ, где проживают в большом количестве и участвуют в метаболических реакциях, связанных с деградацией белков или сложных углеводов. Колонизация желудочно-кишечного тракта с помощью *Bacteroidetes* стимулируется у детей с момента рождения [106].

Prevotella – это род грамотрицательных бактерий, населяющих ротовую полость, влагалище и ЖКТ, редко являющихся причиной анаэробных инфекций респираторного тракта, включая аспирационную пневмонию, абсцесс легкого и другие. Был выделен в 1990 году [154]. Штаммы *Prevotella* преобладают в популяциях людей, потребляющих пищу, богатую растительной клетчаткой [94]. В ревматологической практике есть несколько исследований, указывающих на наличие корреляции между ревматоидным артритом и выявляемой при этом в большом количестве *Prevotella copri* [147].

Alistipes – грамотрицательные неспорообразующие неподвижные анаэробные бактерии являются представителями нормальной пристеночной микробиоты кишечника и продуцируют янтарную (основной конечный продукт метаболизма глюкозы) и уксусную кислоты. Устойчивы к действию желчных кислот [143].

Таблица 10.

Систематика микроорганизмов, выделенных в исследовании методом ПЦР в режиме реального времени.

Домен	Тип	Класс	Порядок	Семейство	Род	Вид
Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Bifidobacteriales	Bifidobacteriaceae	Bifidobacterium	
		Coriobacteriia	Coriobacteriales	Coriobacteriaceae		
	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Bacteroidaceae	Bacteroides	
				Odoribacteraceae	Butyricimonas	
				Prevotellaceae	Prevotella	
				Rikenellaceae	Alistipes	
				Tannerellaceae	Parabacteroides	
	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Staphylococcaceae	Staphylococcus spp	
				Lactobacillales	Enterococcaceae	Enterococcus spp
			Lactobacillaceae	Lactobacillus		
			Streptococcaceae	Streptococcus		
		Clostridia	Clostridiales	Hungateiclostridiaceae	Mageeibacillus	Mageeibacillus indolicus
				Lachnospiraceae	Blautia	Clostridium (Blautia) coccoides group
				Peptostreptococcaceae	Clostridioides	Clostridioides difficile group
				Ruminococcaceae	unclassified Ruminococcaceae	Clostridium leptum group+

						Clostridium leptum group-
		Erysipelotrichia	Erysipelotrichales	Erysipelotrichaceae		
		Negativicutes	Veillonellales	Veillonellaceae	Dialister Megasphaera Allisonella Veillonella	
		Tissierellia	Tissierellales	Peptoniphilaceae	Anaerococcus spp	
	Fusobacteria	Fusobacteriia	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae		
	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Sutterellaceae	Sutterella wadsworthensis	
Gammaproteobacteria			Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas spp	
		Enterobacterales	Enterobacteriaceae	Escherichia	Escherichia coli	
Deltaproteobacteria		Desulfovibrionales	Desulfovibrionaceae	Desulfovibrio		
Epsilonproteobacteria		Campylobacterales	Helicobacteraceae	Helicobacter spp		
			Campylobacteriaceae	Campylobacter spp		
Oligoflexia		Bdellovibrionales	Bdellovibrionaceae	Bdellovibrio		
Verrucomicrobia	Verrucomicrobiae	Verrucomicrobiales	Akkermansiaceae	Akkermansia	Akkermansia muciniphila	
Archaea	Euryarchaeota	Methanobacteria	Methanobacteriales	Methanobacteriaceae	Methanobrevibacter	

Таблица 10 (продолжение).

Систематика микроорганизмов, выделенных в исследовании методом ПЦР в режиме реального времени.

Clostridium leptum group+	Pseudoflavonifractor capillosus Bacteroides capillosus Flavonifractor plautii Clostridium orbiscindens Clostridium viride Oscillibacter valericigenes Oscillibacter ruminantium Papillibacter cinnamivorans Clostridium cellulosi Anaerotruncus colihominis Clostridium leptum Clostridium sporosphaeroides Clostridium methylpentosum Ruminococcus bromii Eubacterium desmolans Eubacterium siraeum Ruminococcus albus Ruminococcus callidus Ruminococcus flavefaciens Faecalibacterium prausnitzii Subdoligranulum variabile Clostridium cellulolyticum
Clostridium leptum group-	Hathewayia histolytica Clostridium histolyticum Clostridium limosum Clostridium botulinum Clostridium sporogenes Clostridium subterminale Clostridium cochlearium Clostridium malenominatum Clostridium tyrobutyricum Clostridium sartagoformum Clostridium tertium Clostridium septicum Clostridium celatum Clostridium acetobutylicum Clostridium beijerinckii Clostridium butyricum Clostridium baratii Eubacterium budayi Eubacterium nitritogenes Eubacterium moniliforme Eubacterium multiformeL Clostridium paraperfringens Clostridium paraputrificum Clostridium perfringens Sarcina ventriculi Clostridium fallax Clostridium putrefaciens Clostridium cadaveris

Тип *Firmicutes* является самой разнообразной и многочисленной группой кишечной микробиоты. Выделяют 4 класса *Firmicutes*: *Bacilli*, *Clostridia*, *Erysipelorichi* и *Negativicutes*. Традиционно в эту группу входят грамположительные бактерии с низким содержанием гуанина и цитозина в их

ДНК, хотя недавние исследования показали, что грамположительное окрашивание не является особенностью многих *Firmicutes*. Это может быть проиллюстрировано на примере *Faecalibacterium prausnitzii*, которая представляет собой грамотрицательно-окрашивающую бактерию, ранее классифицированную как тип *Fusobacteria* [55], но также типичные грамотрицательные бактерии, такие как члены семейства *Veillonellaceae* [105]. Большинство представителей *Clostridium spp.* и *Bacillus spp.* являются спорообразующими. Большое представительство *Firmicutes* определяет различные функции типа, которые варьируют от укрепления здоровья с помощью некоторых пробиотических видов *Lactobacillus spp.* до развития воспаления слизистой оболочки кишки из-за патогенных свойств *Clostridium difficile*. Подавляющее большинство в настоящее время некультивируемых бактерий принадлежит к типу *Firmicutes* [134].

Первый представитель класса *Bacilli*, выделенный из ЖКТ, обнаружен в 1900 году *Bacillus acidophilus*. *Lactobacilli* составляют бактериальную группу, которой уделяется особое научное внимание, главным образом из-за заявлений о поддержания здоровья и долголетия, предложенных Мечниковым в начале девятнадцатого века, и их последующего применения в качестве пробиотиков.

В тонкой кишке *Lactobacillus spp.* представляют одну из преобладающих групп, полученных путем культивирования. Тем не менее, хотя молекулярные исследования могут подтвердить их присутствие в верхнем кишечном тракте, они также показали, что *Lactobacillus spp.* весьма переменчивы и не так распространены в этом месте, например, как *Streptococcus* или *Veillonella* [36,37].

Представители родов *Streptococcus* и *Enterococcus* принадлежат к порядку *Lactobacillales*. Они являются одной из доминирующих бактериальных фракций в верхней части тонкой кишки. Наиболее ранний изолят этой группы, *Enterococcus faecalis*, был впервые высеян в 1899 году от случая эндокардита, и только через 7 лет он был извлечен из кишечных проб. *Streptococcus* и *Enterococcus spp.* являются одними из первых установленных видов микроорганизмов в желудочно-кишечном тракте младенца, которые обнаружены уже в первый день жизни [161]. Хотя это раннее присутствие в составе микробиоты кишечника предполагает важную роль в

экосистеме, данные о роли *Streptococcus* и *Enterococcus spp.* в поддержании здоровья человека противоречивы. *Enterococcus spp.* широко признан как условно-патогенный штамм, хотя этот вид может проявлять и пробиотические свойства [122].

Род *Staphylococcus spp.*, который обычно связан с кожей человека, можно обнаружить и в ЖКТ. Эти бактерии являются одними из самых ранних колонизаторов кишечника, особенно у детей, родившихся путем операции кесарева сечения [53]. Увеличение численности представителей, принадлежащих к роду *Staphylococcus*, как в верхних, так и в нижних отделах ЖКТ, связано с целиакией, хотя избыток этих микроорганизмов может быть истощено при выведении глютена из рациона пациентов [45].

Класс *Clostridia* включает бактерии, которые являются доминирующими и часто выявляются в нижних отделах ЖКТ: *Clostridiaceae*, *Christensenellaceae*, *Eubacteriaceae*, *Lachnospiraceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Ruminococcaceae* [66].

Наиболее распространенным и разнообразным кишечным семейством является *Lachnospiraceae*. Оно объединяет 24 разных рода. Штаммы *Lachnospiraceae* также являются в кишечнике с раннего возраста. Анализ микробиоты детей и взрослых показал, что эта группа бактерий преобладает как у маленьких детей, так и у взрослых людей [141]. Несколько представителей семейства *Lachnospiraceae* являются производителями бутирата, включая виды *Anaerostipes*, *Butyrivibrio*, *Coprococcus*, *Roseburia*, *Eubacterium rectale* и *Eubacterium hallii*. Бутират может использоваться в качестве источника энергии клетками кишечного эпителия. Он обладает антиканцерогенными и противовоспалительными свойствами [70]. Кроме того, недавнее исследование показывает, что бутират, продуцируемый кишечными микроорганизмами, оказывает благотворное влияние на метаболизм глюкозы и энергетический гомеостаз [49]. Уменьшение относительной численности *Lachnospiraceae*, продуцирующих бутират, связано с колоректальным раком [175], язвенным колитом [136] и сахарным диабетом 2 типа [130].

Blautia недавно описанный род бактерий, который составляет от 2,5% до 16% от общей микробиоты. Общая черта *Blautia spp.* – это использование водорода и диоксида углерода с образованием ацетата. Эта группа бактерий значительно истощена у пожилых людей [33] и в образцах слизистой оболочки больных колоректальным раком [40].

Напротив, повышенные уровни *Blautia spp.* наблюдаются при синдроме раздраженного кишечника [135], что может объяснять частые жалобы таких пациентов на повышенное газообразование и вздутие живота.

Члены семейства *Peptostreptococcaceae*, в принципе, связаны с ухудшенным здоровьем, и наиболее убедительным примером этого является *Clostridium difficile*. Хотя *C. difficile* может присутствовать в небольших количествах у здоровых субъектов без проявления патогенных свойств, многие штаммы продуцируют токсины и являются общепризнанными патогенами, вызывающими тяжелую диарею. Кроме того, недавние исследования показали, что *Peptostreptococcus spp.* имеют повышенную распространенность у пациентов с язвенным колитом [136] и колоректальным раком [175,40].

Класс *Negativicutes* включает бактерии, которые ранее были отнесены к кластеру *Clostridium IX*, распределенные по следующим родам: *Acidamoinococcus*, *Dialister*, *Megamonas*, *Megasphaera*, *Phascolarctobacterium* и *Veillonella*.

Штаммы *Negativicutes* являются асахаролитическими и используют конечные продукты метаболизма сахара других желудочно-кишечных бактерий (таких как лактат или сукцинат) для производства пропионата, образуя важную трофическую цепь. Пропионат является полезным продуктом, так как он обладает противовоспалительным потенциалом, используется жировой тканью и печенью, играет роль в ощущении сытости, влияет на гомеостаз глюкозы и энергии и улучшает чувствительность к инсулину [49].

В верхних отделах желудочно-кишечного тракта род *Veillonella spp.* является незаменимым компонентом микробиоты [170], где образует трофическую цепь с продуцирующими лактат и ацетат *Streptococcus spp.* [183]. В настоящее время недостаточно данных о роли и участии *Veillonella spp.* в поддержании здоровья

человека, хотя несколько исследований показали увеличение численности *Veillonella spp.* в образцах кала пациентов с раздраженным кишечником [146], что может указывать на усиленный транзит микробиоты подвздошной кишки в нижнюю часть желудочно-кишечного тракта.

Erysipelotrichi представляют собой класс бактерий в типе *Firmicutes*, который был введен в бактериальную систематику в 2009 году для размещения членов ранее созданного семейства *Erysipelotrichaceae* [100]. Есть несколько исследований, которые связывают *Erysipelotrichi* с нарушением здоровья человека. Сообщалось о повышенном количестве *Erysipelotrichi* у пациентов, страдающих раком толстой кишки [40]. Эксперименты на животных модели показали, что количество микроорганизмов этой группы увеличено при употреблении диеты с высоким содержанием жира [61]. Кроме того, показано, что численность *Erysipelotrichaceae* коррелирует с вызванной дефицитом холина жировой болезнью печени [163]. Холин является важным компонентом диеты, и недавно обнаружено, что холин и фосфатидилхолин превращаются кишечной микробиотой в триметиламин, который затем метаболизируется в проатерогенный триметиламин-N-оксид, связывая диету и микробиоту с сердечно-сосудистыми заболеваниями [88].

Представители типа *Proteobacteria* составляют около 1% от общей микробиоты и являются грамотрицательными бактериями. Включают пять различных классов: *Alpha-*, *Beta-*, *Gamma-*, *Delta-* и *Epsilonproteobacteria*.

Род *Sutterella* и *Parasutterella* относятся к классу *Betaproteobacteria* и наиболее часто встречаются в кишечнике [113]. *Sutterella wadsworthensis* – это микроорганизм, который редко обсуждается в литературе и впервые был описан как потенциальный желудочно-кишечный патоген в 1996 году [177]. Mukhopadhyaya et al. изучили распространенность этого организма у взрослых, в том числе с язвенным колитом и нормальной толстой кишкой, и частота встречаемости в обеих группах было одинакова. На основании чего было высказано предположение, что *Sutterella wadsworthensis* является обычным кишечным комменсалом [113].

В пределах класса *Gammaproteobacteria* обнаружено девять различных семейств. *E. coli* был первым бактериальным изолятом, выделенным из образцов

фекалий человека в 1885 году [157]. *E. coli* принадлежит к семейству *Enterobacteriaceae*, которое является самым разнообразным и распространенным среди всех желудочно-кишечных *Proteobacteria*. Большинство представителей *Enterobacteriaceae* связывают с развитием диареи, хотя они не обязательно вызывают какие-либо симптомы и фактически являются одними из первых, обнаруженных в желудочно-кишечном тракте новорожденных [60]. *E. coli* является наиболее распространенным представителем этого семейства. Штаммы кишечной палочки могут проявлять различные свойства, варьирующие от пробиотических [90] до патогенных, вызывающих диарею или инфекционный процесс [144].

Восемь разных представителей *Pseudomonas spp.* могут быть обнаружены в ЖКТ человека. Среди них наиболее распространенной является *Pseudomonas aeruginosa*, может действовать как условно-патогенный микроорганизм у пациентов с подавленной иммунной системой пациентов, нарушать эпителиальный барьер и вызывать развитие сепсиса [179].

Сульфатредуцирующие бактерии, ассоциированные с ЖКТ человека, относящиеся к классу *Deltaproteobacteria*, включают *Desulfobacter spp.*, использующие ацетат, *Desulfovibrio spp.*, использующие лактат и H₂, и *Desulfobulbus spp.* [68]. Эта группа родственных бактерий была предметом многочисленных исследований, потому что конечный продукт их метаболизма – сероводород – является высокотоксичным соединением, которое ингибирует окисление бутирата в колоноцитах [30].

Класс *Epsilonproteobacteria* представлен двумя основными родами: *Campylobacter* и *Helicobacter*. К роду *Campylobacter* относят представителей, обитающих на слизистых оболочках желудочно-кишечного, орального и мочеполового тракта. Первое сообщение о выделении *Campylobacter* из ЖКТ человека датируется 1946 г. Виды этого рода в основном считаются патогенными организмами, вовлеченными в диарейные заболевания. Однако *Campylobacter hominis* был выделен из ЖКТ здорового субъекта [92].

Исследование микроаэрофильной фекальной микробиоты детей выявило разнообразную и распространенную колонизацию видов *Campylobacter* как

здоровых, так и детей, страдающих воспалительными заболеваниями кишечника [71]. Наличие *Campylobacter spp.* в составе микробиоты кишечника может вызвать водянистую или кровавую диарею [134]. Однако присутствие *Campylobacter spp.* также может оставаться бессимптомным.

Представители рода *Helicobacter spp.* являются спиралевидными бактериями, которые были обнаружены в слизистой оболочке желудка человека еще в 1906 году. Они получили исключительное внимание, как только установлено, что *Helicobacter pylori* вызывает язву желудка и двенадцатиперстной кишки. *Helicobacter spp.* в основном расположены в желудке, могут быть обнаружены в других отделах ЖКТ здоровых людей, но в совсем небольших концентрациях [71].

Fusobacteria является еще одним типом часто обнаруживаемых желудочно-кишечных бактерий, большинство из которых относится к роду *Fusobacterium*. Эти бактерии являются неспорообразующими, грамотрицательными, анаэробными бациллами. Первая запись о *Fusobacterium spp.* берет свое начало в 1886 году, когда *Bacillus fusiforme* (в настоящее время известный как *Fusobacterium necrophorum*) был объявлен возбудителем, связанным с аппендицитом. Хотя данные бактерии были выделены достаточно в больших количествах из кишечника здоровых людей, недавние исследования показали, что большинство случаев острого аппендицита связаны с местной инфекцией *Fusobacterium spp.* [165], а также повышенная численность *Fusobacterium spp.* ассоциируется с язвенным колитом [136].

В настоящее время в кишечнике человека обнаружены только два вида в пределах типа *Verrucomicrobia*. *Akkermansia muciniphila* была описана в 2004 году как уникальная желудочно-кишечная бактерия человека, способная расти на кишечной слизи в качестве единственного источника углерода [50]. Эта бактерия широко распространена и обнаружена в фекальном материале людей всех возрастных групп [44], и, хотя частота ее встречаемости варьирует между субъектами, она, вероятно, является одним из представителей основной микробиоты. Физиологической и метаболической активностью *A. muciniphila* является их способность фиксироваться к эпителиальным клеткам кишечника,

формировать плотный монослой и активно деградировать муцин (относится к муцин-деградирующим бактериям). *A. muciniphila* может использовать слизь в качестве источника углерода, азота и энергии, и, следовательно, как следствие его метаболизма, он производит короткоцепочечные жирные кислоты (ацетат, пропионат, 1,2-пропандиол и сукцинат) [67].

Литературные данные показывают, что *A. muciniphila* важна для здоровья человека, поскольку снижение численности связано с острым аппендицитом [165], язвенным колитом [136], атопическими заболеваниями [38]. Недавнее исследование предполагает, что *A. muciniphila* играет ключевую роль в ожирении, поскольку ее доставка в двенадцатиперстную кишку регулирует увеличение жировой массы, метаболическую эндотоксемию, воспаление жировой ткани и резистентность к инсулину в эксперименте на животных моделях [58].

Домен *Bacteria* являются доминирующим, но не исключительным компонентом желудочно-кишечной микробиоты человека. *Archaea* – домен одноклеточных микроорганизмов, не имеющих ядра. Всего восемь видов *Archaea* связаны с ЖКТ. В раннем исследовании по культивированию, которое датируется 1968 г., один метаногенный вид идентифицирован как *Methanobrevibacter ruminantium*. Сегодня *Methanobrevibacter smithii* признан самым распространенным и часто эксклюзивным метаногеном микробиоты [54].

Метаногенные *Archaea* были тщательно изучены, так как процесс синтеза метана из углекислого газа и водорода приводит к значительному удалению газа в желудочно-кишечном тракте. Роль метаногенных *Archaea* может быть особенно актуальна для вздутия живота, которое является одним из симптомов функциональных нарушений пищеварения, и недавнее исследование показало четырехкратное снижение метаногенных *Archaea* у пациентов с синдромом раздраженного кишечника по сравнению с контрольной группой [135].

ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

4.1. Состав микробиоты у пациентов группы сравнения

У пациентов группы сравнения в полученных биоптатах левых отделов толстой кишки методом ПЦР в режиме реального времени определен состав пристеночной микробиоты (Таблица 11). Средняя общая бактериальная масса составила 5,01 log (ГЭ/обр.). (рисунок 14).

Таблица 11.

Абсолютное и относительное количество представителей пристеночной микробиоты у пациентов группы сравнения (разница log (ГЭ/обр.) группы микроорганизмов и ОБМ – медиана (25%;75%)).

	Абс.	Относ.
<i>Clostridium leptum group</i> ⁺	4,02	-0,99 (-0,80; -1,10)
<i>Streptococcus spp</i>	3,21	-1,80 (-1,50; -2,10)
<i>Clostridium coccoides group</i>	5,03	0,02 (0,20; -0,10)
<i>Clostridium difficile group</i>	2,89	-2,12 (-1,60; -2,50)
<i>Bacteroides spp</i>	4,29	-0,72 (-0,40; -1,00)
<i>Bifidobacterium spp</i>	1,89	-3,12 (-2,20; -4,30)
<i>Methanobrevibacter spp</i>	0,67	-4,34 (-3,90; -5,20)
<i>Parabacteroides spp</i>	3,48	-1,53 (-1,30; -1,70)
<i>Alistipes spp</i>	2,78	-2,23 (-1,40; -2,70)
<i>Fusobacteriaceae</i>	1,61	-3,40 (-1,80; -5,10)
<i>Akkermansia muciniphila</i>	2,14	-2,87 (-1,80; -4,20)
<i>Butyricimonas</i>	2,65	-2,36 (-2,00; -2,50)
<i>Desulfovibrio spp</i>	2,96	-2,05 (-1,60; -2,30)
<i>Coriobacteriia</i>	3,22	-1,79 (-1,50; -2,10)
<i>Enterococcus spp</i>	0,65	-4,36 (-3,50; -5,20)
<i>Staphylococcus spp</i>	0,46	-4,55 (-4,30; -5,20)

<i>Anaerococcus spp</i>	0,04	-4,97 (-4,70; -5,20)
<i>Helicobacter spp</i>	0,04	-4,97 (-4,70; -5,20)
<i>Bdelovibrio</i>	0,01	-5,00 (-4,80; -5,20)
<i>Sutterella wadsworthensis</i>	1,91	-3,10 (-1,90; -4,50)
<i>Dialister+Alisonella+Megasphaerae+Veillonella</i>	3,21	-1,80 (-1,50; -1,90)
<i>Pseudomonas spp</i>	1,93	-3,08 (-2,40; -3,40)
<i>Enterobacteriaceae</i>	4,11	-0,90 (-0,40; -1,40)
<i>Campylobacter spp</i>	0,11	-4,90 (-4,70; -5,20)
<i>Mageebacillus indolicus</i>	0,00	-5,01 (-4,80; -5,20)
<i>Prevotella spp</i>	3,34	-1,67 (-0,60; -2,10)
<i>Clostridium leptum group-</i>	4,23	-0,78 (-0,70; -0,90)
<i>Erysipelotrichaceae</i>	3,38	-1,63 (-1,30; -2,00)
<i>Escherichia coli</i>	2,52	-2,49 (-1,60; -3,00)
<i>Lactobacillaceae</i>	0,62	-4,39 (-3,20; -5,20)

В образцах 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 (рисунок 9).

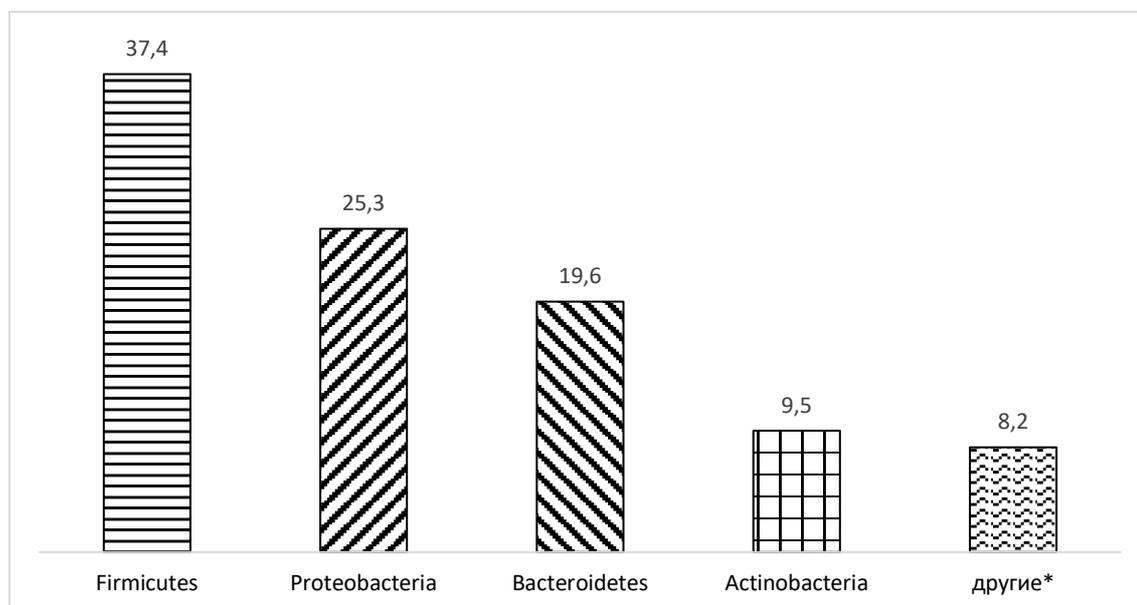


Рисунок 9. Распределение типов бактерий в составе пристеночной микробиоты пациентов группы сравнения (%) (другие*: *Verrucomicrobia*, *Fusobacteria* и *Euryarchaeota*)

Основную массу микроорганизмов мукозной микробиоты толстой кишки пациентов группы сравнения составили представители типа *Firmicutes*, что подтверждает все имеющиеся на сегодняшний момент литературные данные. Лидирующую позицию при этом занимают бактерии *Clostridium coccoides group*, *Clostridium leptum group*⁻ и *Clostridium leptum group*⁺.

Из типа *Proteobacteria* преобладают бактерии семейства *Enterobacteriaceae*, из *Actinobacteria* – *Coriobacteriia*.

Микроорганизмы родов *Bacteroides spp*, *Parabacteroides spp* и *Prevotella spp* из типа *Bacteroidetes* также представлены в достаточно большом количестве (рисунок 10).

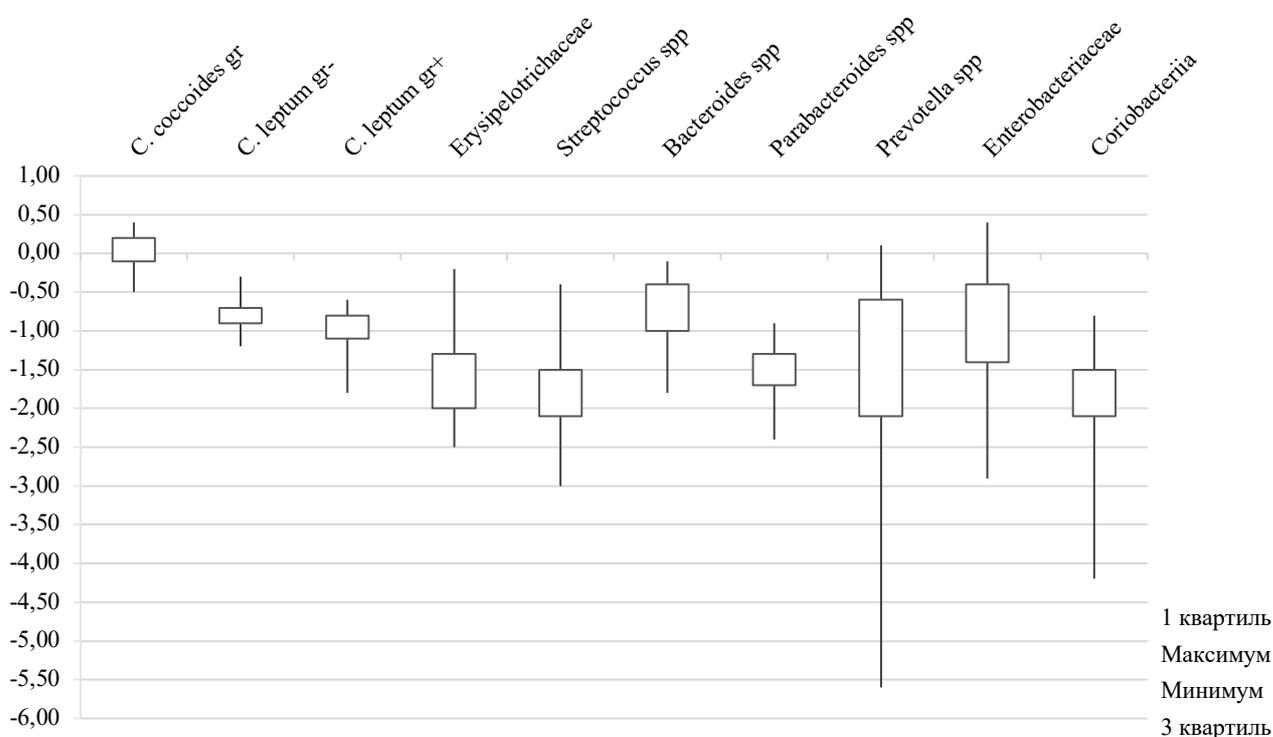


Рисунок 10. Состав пристеночной микробиоты пациентов группы сравнения (относительное количество микроорганизмов) – медиана (25%;75%)

4.2. Состав микробиоты у пациентов с язвенным колитом

В собранных образцах (биопсии, образцы стула и соскобы эпителиальных клеток ампулы прямой кишки) пациентов с язвенным колитом определен состав микроорганизмов методом ПЦР в реальном времени. Три группы образцов были выбраны в качестве исследуемого материала для комплексного подхода к оценке как мукозной (пристеночной), так и просветной (транзитной) микробиоты, что позволило получить исчерпывающие данные об особенностях состава микробиоты при язвенном колите в российской популяции.

В данной научной работе проведен молекулярно-генетический анализ состава просветной (транзитной) микробиоты при язвенном колите, используя образцы кала (Таблица 12). Общая бактериальная масса составила 6,55 log (ГЭ/обр.) (рисунок 14).

Таблица 12.

Состав фекальной микробиоты у пациентов с язвенным колитом, выраженный в абсолютных и относительных значениях (разница log (ГЭ/обр.) группы микроорганизмов и ОБМ – медиана (25%;75%)).

	Абс.	Относ.
<i>Clostridium leptum group</i> ⁺	5,74	-0,81 (-1,00; -0,60)
<i>Streptococcus spp</i>	5,43	-1,12 (-1,60; -0,60)
<i>Clostridium coccooides group</i>	5,80	-0,75 (-0,90; -0,50)
<i>Clostridium difficile group</i>	4,15	-2,32 (-2,70; -2,10)
<i>Bacteroides spp</i>	5,99	-0,47 (-0,50; -0,10)
<i>Bifidobacterium spp</i>	5,21	-1,19 (-1,60; -0,60)
<i>Methanobrevibacter spp</i>	0,07	-3,01 (-3,10; -3,10)
<i>Parabacteroides spp</i>	5,01	-1,35 (-1,40; -1,00)
<i>Alistipes spp</i>	4,37	-1,68 (-2,40; -1,00)
<i>Fusobacteriaceae</i>	0,55	-3,04 (-3,10; -3,10)
<i>Akkermansia muciniphila</i>	1,39	-2,72 (-3,10; -3,10)
<i>Butyricimonas</i>	3,33	-2,59 (-3,10; -2,30)
<i>Desulfovibrio spp</i>	3,15	-2,45 (-3,10; -2,00)
<i>Coriobacteriia</i>	4,95	-1,51 (-1,90; -1,00)
<i>Enterococcus spp</i>	2,34	-3,02 (-3,10; -3,10)
<i>Staphylococcus spp</i>	1,86	-3,06 (-3,10; -3,10)

<i>Anaerococcus spp</i>	2,31	-3,06 (-3,10; -3,10)
<i>Helicobacter spp</i>	0,03	-3,10 (-3,10; -3,10)
<i>Bdelovibrio</i>	1,59	-3,10 (-3,10; -3,10)
<i>Sutterella wadsworthensis</i>	2,32	-2,51 (-3,10; -1,70)
<i>Dialister+Alisonella+Megasphaerae+Veillonella</i>	5,06	-1,41 (-1,70; -1,10)
<i>Pseudomonas spp</i>	1,98	-2,89 (-3,10; -3,00)
<i>Enterobacteriaceae</i>	5,05	-1,45 (-2,10; -0,80)
<i>Campylobacter spp</i>	0,86	-3,09 (-3,10; -3,10)
<i>Mageebacillus indolicus</i>	0,09	-3,10 (-3,10; -3,10)
<i>Prevotella spp</i>	3,26	-2,09 (-3,10; -0,80)
<i>Clostridium leptum group-</i>	5,15	-1,38 (-1,60; -1,10)
<i>Erysipelotrichaceae</i>	5,13	-1,41 (-2,30; -0,50)
<i>Escherichia coli</i>	4,82	-1,57 (-2,60; -0,80)
<i>Lactobacillaceae</i>	4,18	-2,08 (-3,10; -1,60)

Основу просветной микробиоты составляют представители типа *Firmicutes* (46,7%), которые в 2 раза превышают количество *Bacteroidetes* (21,7%) (рисунок 11).

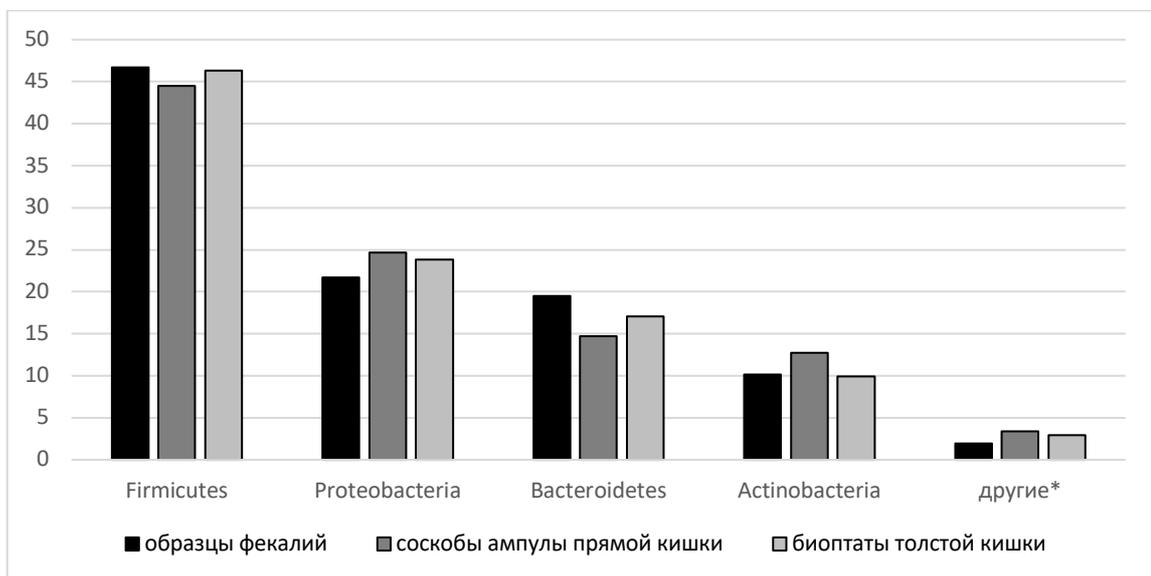


Рисунок 11. Распределение типов бактерий у пациентов с язвенным колитом (%) (другие*: *Verrucomicrobia*, *Fusobacteria* и *Euryarchaeota*)

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* (рисунок 12).

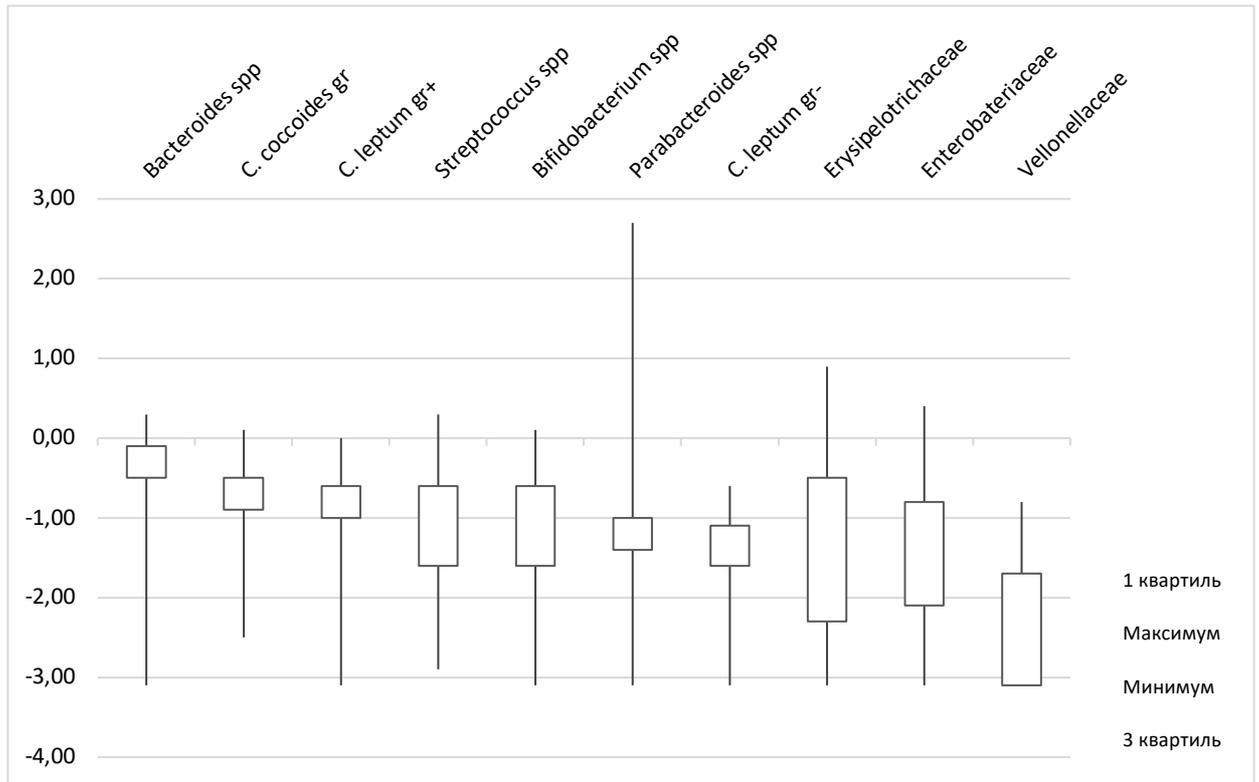


Рисунок 12. Состав фекальной микробиоты пациентов с язвенным колитом (относительное количество микроорганизмов) – медиана (25%;75%)

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 (рисунок 11).

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.) (рисунок 14).

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%) (рисунок 11).

Согласно относительным значениям, в этих образцах наибольшее содержание имеет род сахаролитических, бутират-продуцирующих бактерий *Anaerococcus spp* (тип *Firmicutes*) (Таблица 13). Далее представлены *Clostridium leptum group+*, *Streptococcus spp*, *Erysipelotrichaceae*, *Prevotella spp*, *Clostridium coccoides group*, *Bifidobacterium spp* (рисунок 13).

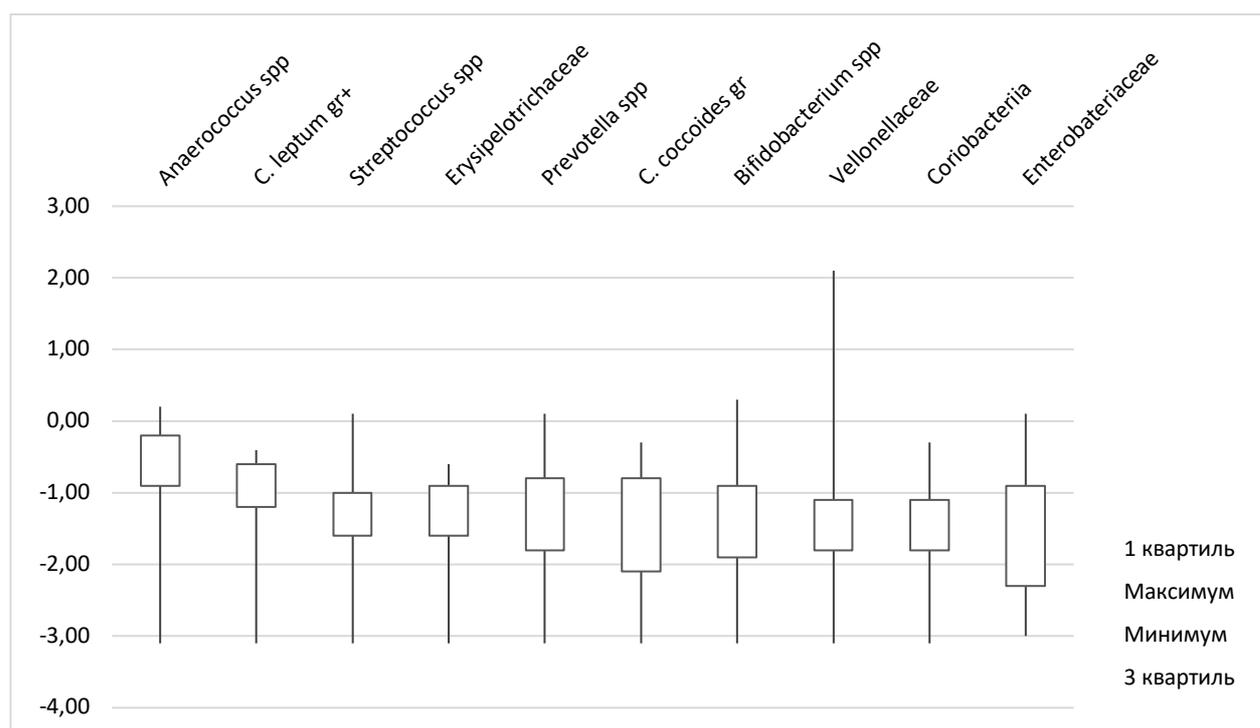


Рисунок 13. Состав микробиоты в соскобах ампулы прямой кишки пациентов с язвенным колитом (относительное количество микроорганизмов) – медиана (25%;75%)

Таблица 13.

Состав микробиоты пациентов с язвенным колитом в соскобах ампулы прямой кишки, выраженный в абсолютных и относительных значениях (разница \log (ГЭ/обр.) группы микроорганизмов и ОБМ) – медиана (25%;75%).

	Абс.	Относ.
<i>Clostridium leptum group+</i>	3,64	-1,18 (-1,20; -0,60)
<i>Streptococcus spp</i>	3,77	-1,26 (-1,60; -1,00)
<i>Clostridium coccoides group</i>	3,56	-1,45 (-2,10; -0,80)
<i>Clostridium difficile group</i>	2,62	-2,32 (-2,60; -2,10)

<i>Bacteroides spp</i>	3,09	-1,69 (-3,10; -0,90)
<i>Bifidobacterium spp</i>	3,56	-1,46 (-1,90; -0,90)
<i>Methanobrevibacter spp</i>	0,68	-2,97 (-3,10; -3,10)
<i>Parabacteroides spp</i>	2,39	-2,33 (-3,10; -1,80)
<i>Alistipes spp</i>	1,47	-2,67 (-3,10; -2,40)
<i>Fusobacteriaceae</i>	1,14	-2,80 (-3,10; -2,50)
<i>Akkermansia muciniphila</i>	0,90	-2,75 (-3,10; -2,20)
<i>Butyricimonas</i>	1,29	-2,84 (-3,10; -2,60)
<i>Desulfovibrio spp</i>	1,20	-2,85 (-3,10; -2,80)
<i>Coriobacteriia</i>	3,38	-1,54 (-1,80; -1,10)
<i>Enterococcus spp</i>	1,29	-2,87 (-3,10; -2,70)
<i>Staphylococcus spp</i>	3,26	-1,61 (-2,60; -0,80)
<i>Anaerococcus spp</i>	4,37	-0,63 (-0,90; -0,20)
<i>Helicobacter spp</i>	0,00	-3,09 (-3,10; -3,10)
<i>Bdelovibrio</i>	0,61	-3,07 (-3,10; -3,10)
<i>Sutterella wadsworthensis</i>	0,62	-2,88 (-3,10; -3,10)
<i>Dialister+Alisonella+Megasphaerae+Veillonella</i>	3,29	-1,52 (-1,80; -1,10)
<i>Pseudomonas spp</i>	2,68	-2,30 (-3,00; -2,00)
<i>Enterobacteriaceae</i>	3,47	-1,56 (-2,30; -0,90)
<i>Campylobacter spp</i>	0,81	-2,95 (-3,10; -3,00)
<i>Magebacillus indolicus</i>	0,00	-3,09 (-3,10; -3,10)
<i>Prevotella spp</i>	3,51	-1,40 (-1,80; -0,80)
<i>Clostridium leptum group-</i>	3,40	-1,60 (-2,00; -1,20)
<i>Erysipelotrichaceae</i>	3,69	-1,34 (-1,60; -0,90)
<i>Escherichia coli</i>	1,75	-2,54 (-3,10; -2,10)
<i>Lactobacillaceae</i>	2,75	-1,98 (-3,00; -1,30)

При сравнении биоты образцов фекалий и соскобов эпителиальных клеток ампулы прямой кишки выявлено, что в последних достоверно снижена концентрация родов *Clostridium coccoides group*, *Bacteroides spp*, *Parabacteroides spp*, *Alistipes spp*, *Bifidobacterium spp*, *Butyricimonas*, *Desulfovibrio spp*, *Sutterella wadsworthensis* и *Escherichia coli*, и, наоборот, больше бактерий семейства *Fusobacteriaceae*, родов *Enterococcus spp*, *Staphylococcus spp* и *Prevotella spp*. ($p < 0,05$) (Таблица 14).

Сравнение состава микробиоты пациентов с язвенным колитом в соскобах ампулы прямой кишки и образцах фекалий, выраженное в относительных значениях (разница \log (ГЭ/обр.) группы микроорганизмов и ОБМ) – медиана (25%;75%).

	Язвенный колит (образцы фекалий)	Язвенный колит (соскобы ампулы прямой кишки)	Значение p
ОБМ	6,55	5,07	0,0000
<i>Clostridium leptum group</i> ⁺	-0,81 (-1,00; -0,60)	-1,18 (-1,20; -0,60)	0,7124
<i>Streptococcus spp</i>	-1,12 (-1,60; -0,60)	-1,26 (-1,60; -1,00)	0,0974
<i>Clostridium coccoides group</i>	-0,75 (-0,90; -0,50)	-1,45 (-2,10; -0,80)	0,0000
<i>Clostridium difficile group</i>	-2,32 (-2,70; -2,10)	-2,32 (-2,60; -2,10)	0,6371
<i>Bacteroides spp</i>	-0,47 (-0,50; -0,10)	-1,69 (-3,10; -0,90)	0,0000
<i>Bifidobacterium spp</i>	-1,19 (-1,60; -0,60)	-1,46 (-1,90; -0,90)	0,0337
<i>Methanobrevibacter spp</i>	-3,01 (-3,10; -3,10)	-2,97 (-3,10; -3,10)	0,1467
<i>Parabacteroides spp</i>	-1,35 (-1,40; -1,00)	-2,33 (-3,10; -1,80)	0,0000
<i>Alistipes spp</i>	-1,68 (-2,40; -1,00)	-2,67 (-3,10; -2,40)	0,0000
<i>Fusobacteriaceae</i>	-3,04 (-3,10; -3,10)	-2,80 (-3,10; -2,50)	0,0031
<i>Akkermansia muciniphila</i>	-2,72 (-3,10; -3,10)	-2,75 (-3,10; -2,20)	0,6613
<i>Butyricimonas</i>	-2,59 (-3,10; -2,30)	-2,84 (-3,10; -2,60)	0,0015
<i>Desulfovibrio spp</i>	-2,45 (-3,10; -2,00)	-2,85 (-3,10; -2,80)	0,0003
<i>Coriobacteriia</i>	-1,51 (-1,90; -1,00)	-1,54 (-1,80; -1,10)	0,8053
<i>Enterococcus spp</i>	-3,02 (-3,10; -3,10)	-2,87 (-3,10; -2,70)	0,0247
<i>Staphylococcus spp</i>	-3,06 (-3,10; -3,10)	-1,61 (-2,60; -0,80)	0,0000
<i>Anaerococcus spp</i>	-3,06 (-3,10; -3,10)	-0,63 (-0,90; -0,20)	0,0000
<i>Helicobacter spp</i>	-3,10 (-3,10; -3,10)	-3,09 (-3,10; -3,10)	0,7697
<i>Bdelovibrio</i>	-3,10 (-3,10; -3,10)	-3,07 (-3,10; -3,10)	0,5568
<i>Sutterella wadsworthensis</i>	-2,51	-2,88	0,0098

	(-3,10; -1,70)	(-3,10; -3,10)	
<i>Dialister+Alisonella+ Megasphaerae+Veillonella</i>	-1,41 (-1,70; -1,10)	-1,52 (-1,80; -1,10)	0,4007
<i>Pseudomonas spp</i>	-2,89 (-3,10; -3,00)	-2,30 (-3,00; -2,00)	0,0000
<i>Enterobacteriaceae</i>	-1,45 (-2,10; -0,80)	-1,56 (-2,30; -0,90)	0,3786
<i>Campylobacter spp</i>	-3,09 (-3,10; -3,10)	-2,95 (-3,10; -3,00)	0,0079
<i>Magebacillus indolicus</i>	-3,10 (-3,10; -3,10)	-3,09 (-3,10; -3,10)	0,8828
<i>Prevotella spp</i>	-2,09 (-3,10; -0,80)	-1,40 (-1,80; -0,80)	0,0007
<i>Clostridium leptum group-</i>	-1,38 (-1,60; -1,10)	-1,60 (-2,00; -1,20)	0,0237
<i>Erysipelotrichaceae</i>	-1,41 (-2,30; -0,50)	-1,34 (-1,60; -0,90)	0,0731
<i>Escherichia coli</i>	-1,57 (-2,60; -0,80)	-2,54 (-3,10; -2,10)	0,0000
<i>Lactobacillaceae</i>	-2,08 (-3,10; -1,60)	-1,98 (-3,00; -1,30)	0,2903

Многочисленные исследования, проведенные на животных моделях, свидетельствуют о роли пристеночной микробиоты в развитии колита. Считается, что аномальная мукозная биота связана с определенными фенотипами заболевания, и может быть причинным фактором хронического воспалительного процесса.

В данной работе прицельное внимание уделено изучению состава пристеночного микробиома при язвенном колите (таблица 15) в целом, а также в зависимости от протяженности поражения толстой кишки, эндоскопической активности заболевания и проводимой лекарственной терапии.

Таблица 15.

Состав пристеночной микробиоты у пациентов с язвенным колитом, выраженный в абсолютных и относительных значениях (разница \log (ГЭ/обр.) группы микроорганизмов и ОБМ) – медиана (25%;75%).

	Абс.	Относ.
<i>Clostridium leptum group+</i>	3,90	-0,64 (-0,70; -0,40)
<i>Streptococcus spp</i>	3,53	-0,94 (-1,30; -0,40)
<i>Clostridium coccoides group</i>	3,87	-0,63 (-0,80; -0,50)
<i>Clostridium difficile group</i>	2,20	-2,29 (-2,70; -1,90)
<i>Bacteroides spp</i>	4,09	-0,39 (-0,40; -0,10)

<i>Bifidobacterium spp</i>	3,06	-1,40 (-1,70; -0,90)
<i>Methanobrevibacter spp</i>	0,00	-3,09 (-3,10; -3,10)
<i>Parabacteroides spp</i>	3,14	-1,33 (-1,50; -1,00)
<i>Alistipes spp</i>	2,40	-1,90 (-2,70; -1,30)
<i>Fusobacteriaceae</i>	1,04	-2,56 (-3,10; -1,70)
<i>Akkermansia muciniphila</i>	0,60	-2,80 (-3,10; -3,10)
<i>Butyricimonas</i>	1,51	-2,50 (-3,10; -2,00)
<i>Desulfovibrio spp</i>	1,15	-2,68 (-3,10; -2,20)
<i>Coriobacteriia</i>	2,58	-1,70 (-3,10; -0,90)
<i>Enterococcus spp</i>	0,54	-2,96 (-3,10; -3,10)
<i>Staphylococcus spp</i>	1,68	-2,43 (-3,10; -1,90)
<i>Anaerococcus spp</i>	0,79	-2,90 (-3,10; -3,00)
<i>Helicobacter spp</i>	0,00	-3,09 (-3,10; -3,10)
<i>Bdelovibrio</i>	0,27	-3,03 (-3,10; -3,10)
<i>Sutterella wadsworthensis</i>	0,97	-2,68 (-3,10; -2,40)
<i>Dialister+Alisonella+Megasphaerae+Veillonella</i>	3,13	-1,36 (-1,60; -0,90)
<i>Pseudomonas spp</i>	2,60	-1,84 (-2,30; -1,20)
<i>Enterobacteriaceae</i>	3,22	-1,25 (-1,80; -0,70)
<i>Campylobacter spp</i>	0,09	-3,08 (-3,10; -3,10)
<i>Mageebacillus indolicus</i>	0,00	-3,09 (-3,10; -3,10)
<i>Prevotella spp</i>	2,39	-1,71 (-3,10; -0,70)
<i>Clostridium leptum group-</i>	3,39	-1,08 (-1,20; -0,90)
<i>Erysipelotrichaceae</i>	2,61	-1,78 (-2,00; -1,30)
<i>Escherichia coli</i>	1,45	-2,38 (-3,10; -1,50)
<i>Lactobacillaceae</i>	0,75	-2,87 (-3,10; -2,80)

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%), и *Euryarchaeota* (0,0%) (рисунок 11).

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. Род *Bacteroides* вероятно связан с деградацией муцина и усиленным воспалительным ответом слизистой оболочки.

Если сопоставить составы мукозного микробиома группы сравнения и группы пациентов с язвенным колитом, то можно констатировать существенные различия, представленные в таблице 16.

Таблица 16.

Сравнение состава пристеночной микробиоты пациентов с язвенным колитом и контрольной группы, выраженное в относительных значениях (разница log (ГЭ/обр.) группы микроорганизмов и ОБМ) – медиана (25%;75%).

	Язвенный колит (биоптаты)	Группа сравнения	Значение p
ОБМ	4,47	5,01	0,0000
<i>Clostridium leptum group</i> ⁺	-0,64 (-0,70; -0,40)	-0,99 (-0,80; -1,10)	0,0000
<i>Streptococcus spp</i>	-0,94 (-1,30; -0,40)	-1,80 (-1,50; -2,10)	0,0000
<i>Clostridium coccoides group</i>	-0,63 (-0,80; -0,50)	0,02 (0,20; -0,10)	0,0000
<i>Clostridium difficile group</i>	-2,29 (-2,70; -1,90)	-2,12 (-1,60; -2,50)	0,0804
<i>Bacteroides spp</i>	-0,39 (-0,40; -0,10)	-0,72 (-0,40; -1,00)	0,0000
<i>Bifidobacterium spp</i>	-1,40 (-1,70; -0,90)	-3,12 (-2,20; -4,30)	0,0000
<i>Methanobrevibacter spp</i>	-3,09 (-3,10; -3,10)	-4,34 (-3,90; -5,20)	0,0000
<i>Parabacteroides spp</i>	-1,33 (-1,50; -1,00)	-1,53 (-1,30; -1,70)	0,0001
<i>Alistipes spp</i>	-1,90 (-2,70; -1,30)	-2,23 (-1,40; -2,70)	0,1033
<i>Fusobacteriaceae</i>	-2,56 (-3,10; -1,70)	-3,40 (-1,80; -5,10)	0,0207
<i>Akkermansia muciniphila</i>	-2,80 (-3,10; -3,10)	-2,87 (-1,80; -4,20)	0,0781
<i>Butyricimonas</i>	-2,50 (-3,10; -2,00)	-2,36 (-2,00; -2,50)	0,0307
<i>Desulfovibrio spp</i>	-2,68 (-3,10; -2,20)	-2,05 (-1,60; -2,30)	0,0000
<i>Coriobacteriia</i>	-1,70 (-3,10; -0,90)	-1,79 (-1,50; -2,10)	0,1705
<i>Enterococcus spp</i>	-2,96 (-3,10; -3,10)	-4,36 (-3,50; -5,20)	0,0000
<i>Staphylococcus spp</i>	-2,43 (-3,10; -1,90)	-4,55 (-4,30; -5,20)	0,0000

<i>Anaerococcus spp</i>	-2,90 (-3,10; -3,00)	-4,97 (-4,70; -5,20)	0,0000
<i>Helicobacter spp</i>	-3,09 (-3,10; -3,10)	-4,97 (-4,70; -5,20)	0,0000
<i>Bdelovibrio</i>	-3,03 (-3,10; -3,10)	-5,00 (-4,80; -5,20)	0,0000
<i>Sutterella wadsworthensis</i>	-2,68 (-3,10; -2,40)	-3,10 (-1,90; -4,50)	0,5708
<i>Dialister+Alisonella+ Megasphaerae+Veillonella</i>	-1,36 (-1,60; -0,90)	-1,80 (-1,50; -1,90)	0,0000
<i>Pseudomonas spp</i>	-1,84 (-2,30; -1,20)	-3,08 (-2,40; -3,40)	0,0000
<i>Enterobacteriaceae</i>	-1,25 (-1,80; -0,70)	-0,90 (-0,40; -1,40)	0,0100
<i>Campylobacter spp</i>	-3,08 (-3,10; -3,10)	-4,90 (-4,70; -5,20)	0,0000
<i>Mageebacillus indolicus</i>	-3,09 (-3,10; -3,10)	-5,01 (-4,80; -5,20)	0,0000
<i>Prevotella spp</i>	-1,71 (-3,10; -0,70)	-1,67 (-0,60; -2,10)	0,5690
<i>Clostridium leptum group-</i>	-1,08 (-1,20; -0,90)	-0,78 (-0,70; -0,90)	0,0000
<i>Erysipelotrichaceae</i>	-1,78 (-2,00; -1,30)	-1,63 (-1,30; -2,00)	0,5161
<i>Escherichia coli</i>	-2,38 (-3,10; -1,50)	-2,49 (-1,60; -3,00)	0,4063
<i>Lactobacillaceae</i>	-2,87 (-3,10; -2,80)	-4,39 (-3,20; -5,20)	0,0000

Средняя общая бактериальная масса в биоптатах слизистой толстой кишки пациентов с язвенным колитом (4,47 log (ГЭ/обр.)) снижена по сравнению с другими образцами (рисунок 14), что, вероятно, связано с наличием хронического воспалительного процесса в кишечной стенке и меньшим бактериальным разнообразием в ней (p=0,0000).

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 + Megasphaerae + Veillonella*) преобладают в образцах при язвенном колите (p=0,0000) (рисунок 15).

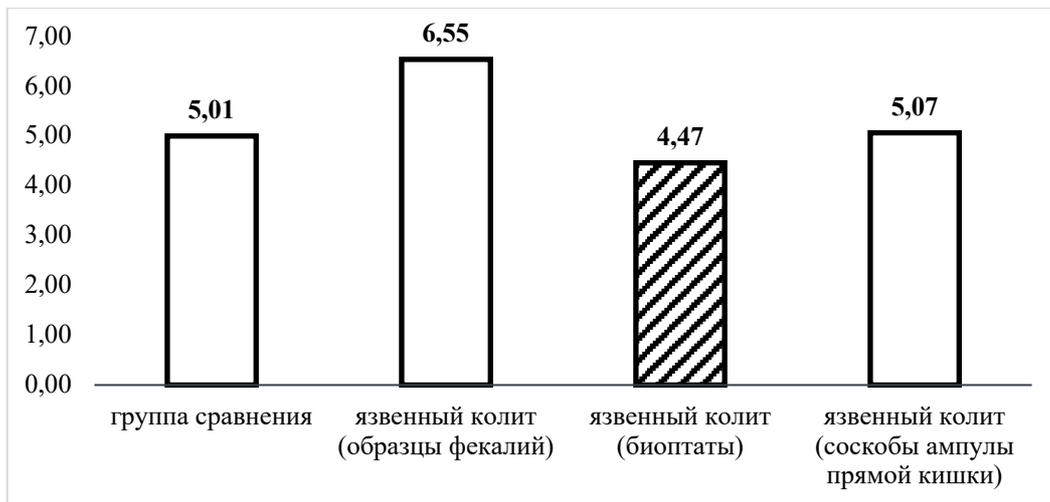


Рисунок 14. Среднее значение общей бактериальной массы (ОБМ) в образцах (log (ГЭ/обр.))

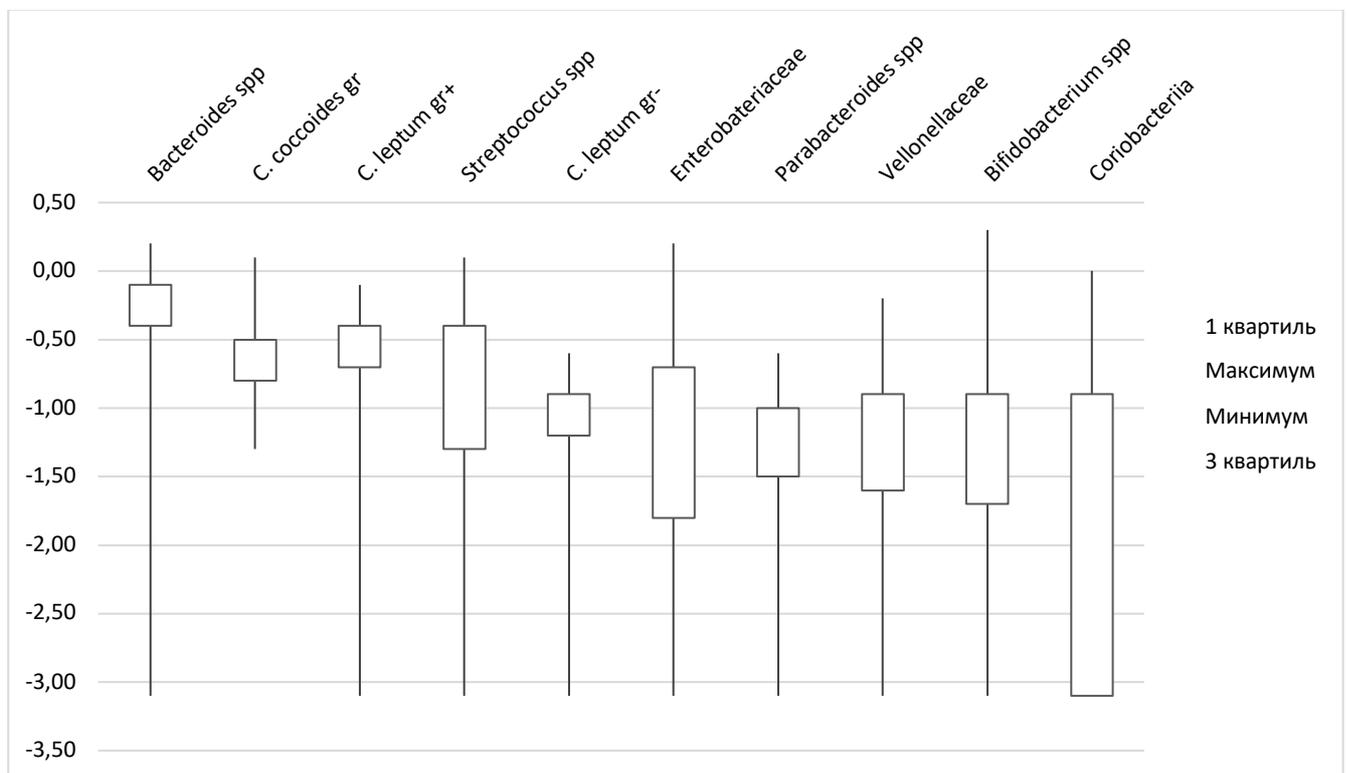


Рисунок 15. Составе пристеночной микробиоты пациентов с язвенным колитом (относительное количество микроорганизмов) – медиана (25%;75%)

Концентрация *Clostridium difficile* group и семейства *Erysipelotrichaceae* у респондентов обеих групп достоверно не отличалась, ($p=0,0804$) и ($p=0,5161$) соответственно. Представители родов *Enterococcus* spp, *Staphylococcus* spp, *Anaerococcus* spp и *Mageebacillus* выявлены в незначительных количествах в двух группах, но при язвенном колите их содержание больше ($p=0,0000$).

Бактерии семейства *Lactobacillaceae* определены в небольшом количестве в образцах слизистой толстой кишки как в основной, так и в группе сравнения, но в последней их концентрация значительно снижена ($p=0,0000$).

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 ($p=0,0000$).

Бактерии родов *Helicobacter spp*, *Campylobacter spp* и *Bdelovibrio* представлены в небольшом количестве в биоптатах толстой кишки, но при этом, их концентрация повышена при воспалительном процессе ($p=0,0000$).

Род *Sutterella wadsworthensis* и вид *Escherichia coli* при сравнении с группой сравнения не имеют достоверной статистической разницы ($p=0,5708$) и ($p=0,4063$), и по всей видимости, не принимают участие в воспалительном ответе.

Немногочисленный тип *Actinobacteria* представлен бактериями рода *Bifidobacterium spp* и *Coriobacteriia*. При сравнении содержания *Bifidobacterium spp* между группой сравнения и группой язвенного колита, данные бактерии достоверно преобладают у второй ($p=0,0000$).

Количество представителей семейства *Fusobacteriaceae* типа *Fusobacteria* при язвенном колите увеличено ($p=0,0207$).

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.

Род *Methanobrevibacter spp* (тип *Euryarchaeota*) хоть и представлен в минимальной относительной концентрации в образцах биоптатов пациентов как группы сравнения, так и основной группы, тем не менее при язвенном колите его содержание увеличено ($p=0,0000$).

Принято считать, что существуют различия между составом мукозной и транзитной микробиоты. В данном исследовании проведено сравнение бактериального состава пристеночной (биоптаты толстой кишки) и просветной (образцы фекалий) микробиоты пациентов с язвенным колитом. Достоверной статистической разницы по количеству представителей основных типов бактерий не получено ($p>0,05$) (таблица 17).

Таблица 17.

Сравнение состава пристеночной и транзитной микробиоты пациентов с язвенным колитом, выраженное в относительных значениях (разница \log (ГЭ/обр.) группы микроорганизмов и ОБМ) – медиана (25%;75%).

	Язвенный колит (биоптаты)	Язвенный колит (образцы фекалий)	Значение p
ОБМ	4,47	6,55	0,0000
<i>Clostridium leptum group</i> ⁺	-0,64 (-0,70; -0,40)	-0,81 (-1,00; -0,60)	0,0005
<i>Streptococcus spp</i>	-0,94 (-1,30; -0,40)	-1,12 (-1,60; -0,60)	0,0702
<i>Clostridium coccoides group</i>	-0,63 (-0,80; -0,50)	-0,75 (-0,90; -0,50)	0,0683
<i>Clostridium difficile group</i>	-2,29 (-2,70; -1,90)	-2,32 (-2,70; -2,10)	0,5036
<i>Bacteroides spp</i>	-0,39 (-0,40; -0,10)	-0,47 (-0,50; -0,10)	0,4544
<i>Bifidobacterium spp</i>	-1,40 (-1,70; -0,90)	-1,19 (-1,60; -0,60)	0,0443
<i>Methanobrevibacter spp</i>	-3,09 (-3,10; -3,10)	-3,01 (-3,10; -3,10)	0,8890
<i>Parabacteroides spp</i>	-1,33 (-1,50; -1,00)	-1,35 (-1,40; -1,00)	0,8775
<i>Alistipes spp</i>	-1,90 (-2,70; -1,30)	-1,68 (-2,40; -1,00)	0,0351
<i>Fusobacteriaceae</i>	-2,56 (-3,10; -1,70)	-3,04 (-3,10; -3,10)	0,0042
<i>Akkermansia muciniphila</i>	-2,80 (-3,10; -3,10)	-2,72 (-3,10; -3,10)	0,7610

<i>Butyricimonas</i>	-2,50 (-3,10; -2,00)	-2,59 (-3,10; -2,30)	0,7014
<i>Desulfovibrio spp</i>	-2,68 (-3,10; -2,20)	-2,45 (-3,10; -2,00)	0,0312
<i>Coriobacteriia</i>	-1,70 (-3,10; -0,90)	-1,51 (-1,90; -1,00)	0,6039
<i>Enterococcus spp</i>	-2,96 (-3,10; -3,10)	-3,02 (-3,10; -3,10)	0,3849
<i>Staphylococcus spp</i>	-2,43 (-3,10; -1,90)	-3,06 (-3,10; -3,10)	0,0000
<i>Anaerococcus spp</i>	-2,90 (-3,10; -3,00)	-3,06 (-3,10; -3,10)	0,0670
<i>Helicobacter spp</i>	-3,09 (-3,10; -3,10)	-3,10 (-3,10; -3,10)	0,7721
<i>Bdelovibrio</i>	-3,03 (-3,10; -3,10)	-3,10 (-3,10; -3,10)	0,3826
<i>Sutterella wadsworthensis</i>	-2,68 (-3,10; -2,40)	-2,51 (-3,10; -1,70)	0,1935
<i>Dialister+Alisonella+ Megasphaerae+Veillonella</i>	-1,36 (-1,60; -0,90)	-1,41 (-1,70; -1,10)	0,2104
<i>Pseudomonas spp</i>	-1,84 (-2,30; -1,20)	-2,89 (-3,10; -3,00)	0,0000
<i>Enterobacteriaceae</i>	-1,25 (-1,80; -0,70)	-1,45 (-2,10; -0,80)	0,1577
<i>Campylobacter spp</i>	-3,08 (-3,10; -3,10)	-3,09 (-3,10; -3,10)	0,7721
<i>Mageebacillus indolicus</i>	-3,09 (-3,10; -3,10)	-3,10 (-3,10; -3,10)	0,8857
<i>Prevotella spp</i>	-1,71 (-3,10; -0,70)	-2,09 (-3,10; -0,80)	0,0521
<i>Clostridium leptum group-</i>	-1,08 (-1,20; -0,90)	-1,38 (-1,60; -1,10)	0,0000
<i>Erysipelotrichaceae</i>	-1,78 (-2,00; -1,30)	-1,41 (-2,30; -0,50)	0,2994
<i>Escherichia coli</i>	-2,38 (-3,10; -1,50)	-1,57 (-2,60; -0,80)	0,0000
<i>Lactobacillaceae</i>	-2,87 (-3,10; -2,80)	-2,08 (-3,10; -1,60)	0,0000

При сравнении микробного состава биоптатов левых отделов толстой кишки и соскобов эпителиальных клеток ампулы прямой кишки при язвенном колите получены существенные различия в основных бактериальных представителях (Таблица 18).

В образцах соскобов ампулы прямой кишки достоверно снижено количество превалирующих микроорганизмов мукозной микробиоты: *Bacteroidetes* (*Bacteroides spp*, *Parabacteroides spp*, *Alistipes spp*, *Butyricimonas*) ($p < 0,05$) и *Firmicutes* (*Clostridium leptum group+*, *Clostridium leptum group-*, *Clostridium*

coccoides group, Streptococcus spp) ($p < 0,05$). При этом увеличено количество бактерий рода *Staphylococcus spp, Anaerococcus spp, Erysipelotrichaceae* ($p < 0,05$).

Таблица 18.

Сравнение состава микробиоты пациентов с язвенным колитом в соскобах ампулы прямой кишки и биоптатах толстой кишки, выраженное в относительных значениях (разница \log (ГЭ/обр.) группы микроорганизмов и ОБМ) – медиана (25%;75%).

	Язвенный колит (биоптаты)	Язвенный колит (соскобы ампулы прямой кишки)	Значение p
ОБМ	4,47	5,07	0,0001
<i>Clostridium leptum group</i> ⁺	-0,64 (-0,70; -0,40)	-1,18 (-1,20; -0,60)	0,0006
<i>Streptococcus spp</i>	-0,94 (-1,30; -0,40)	-1,26 (-1,60; -1,00)	0,0002
<i>Clostridium coccoides group</i>	-0,63 (-0,80; -0,50)	-1,45 (-2,10; -0,80)	0,0000
<i>Clostridium difficile group</i>	-2,29 (-2,70; -1,90)	-2,32 (-2,60; -2,10)	0,6751
<i>Bacteroides spp</i>	-0,39 (-0,40; -0,10)	-1,69 (-3,10; -0,90)	0,0000
<i>Bifidobacterium spp</i>	-1,40 (-1,70; -0,90)	-1,46 (-1,90; -0,90)	0,8546
<i>Methanobrevibacter spp</i>	-3,09 (-3,10; -3,10)	-2,97 (-3,10; -3,10)	0,1736
<i>Parabacteroides spp</i>	-1,33 (-1,50; -1,00)	-2,33 (-3,10; -1,80)	0,0000
<i>Alistipes spp</i>	-1,90 (-2,70; -1,30)	-2,67 (-3,10; -2,40)	0,0000
<i>Fusobacteriaceae</i>	-2,56 (-3,10; -1,70)	-2,80 (-3,10; -2,50)	0,5441
<i>Akkermansia muciniphila</i>	-2,80 (-3,10; -3,10)	-2,75 (-3,10; -2,20)	0,3890
<i>Butyricimonas</i>	-2,50 (-3,10; -2,00)	-2,84 (-3,10; -2,60)	0,0098
<i>Desulfovibrio spp</i>	-2,68 (-3,10; -2,20)	-2,85 (-3,10; -2,80)	0,1988
<i>Coriobacteriia</i>	-1,70 (-3,10; -0,90)	-1,54 (-1,80; -1,10)	0,6782
<i>Enterococcus spp</i>	-2,96 (-3,10; -3,10)	-2,87 (-3,10; -2,70)	0,1697
<i>Staphylococcus spp</i>	-2,43 (-3,10; -1,90)	-1,61 (-2,60; -0,80)	0,0000
<i>Anaerococcus spp</i>	-2,90 (-3,10; -3,00)	-0,63 (-0,90; -0,20)	0,0000

<i>Helicobacter spp</i>	-3,09 (-3,10; -3,10)	-3,09 (-3,10; -3,10)	1,0000
<i>Bdelovibrio</i>	-3,03 (-3,10; -3,10)	-3,07 (-3,10; -3,10)	0,7600
<i>Sutterella wadsworthensis</i>	-2,68 (-3,10; -2,40)	-2,88 (-3,10; -3,10)	0,2026
<i>Dialister+Alisonella+ Megasphaerae+Veillonella</i>	-1,36 (-1,60; -0,90)	-1,52 (-1,80; -1,10)	0,0594
<i>Pseudomonas spp</i>	-1,84 (-2,30; -1,20)	-2,30 (-3,00; -2,00)	0,0003
<i>Enterobacteriaceae</i>	-1,25 (-1,80; -0,70)	-1,56 (-2,30; -0,90)	0,0156
<i>Campylobacter spp</i>	-3,08 (-3,10; -3,10)	-2,95 (-3,10; -3,00)	0,0171
<i>Mageebacillus indolicus</i>	-3,09 (-3,10; -3,10)	-3,09 (-3,10; -3,10)	1,0000
<i>Prevotella spp</i>	-1,71 (-3,10; -0,70)	-1,40 (-1,80; -0,80)	0,1461
<i>Clostridium leptum group-</i>	-1,08 (-1,20; -0,90)	-1,60 (-2,00; -1,20)	0,0000
<i>Erysipelotrichaceae</i>	-1,78 (-2,00; -1,30)	-1,34 (-1,60; -0,90)	0,0001
<i>Escherichia coli</i>	-2,38 (-3,10; -1,50)	-2,54 (-3,10; -2,10)	0,3181
<i>Lactobacillaceae</i>	-2,87 (-3,10; -2,80)	-1,98 (-3,00; -1,30)	0,0000

Таким образом, микробиота ампулы прямой кишки как терминального отдела желудочно-кишечного тракта имеет свои особенности отличные от биоты толстой кишки у пациентов с язвенным колитом, что не позволяет рекомендовать использование соскоба в качестве быстрого и доступного способа диагностики дисбиотических нарушений.

4.3. Сравнение состава просветной микробиоты при различных формах язвенного колита

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 ($p > 0,05$) (таблица 19).

Сравнение состава пристеночной микробиоты пациентов с язвенным колитом при тотальном и левостороннем поражении, выраженное в относительных значениях (разница \log (ГЭ/обр.) группы микроорганизмов и ОБМ) – медиана (25%;75%).

	Тотальное поражение	Левостороннее поражение	Значение p
ОБМ	4,50	4,37	0,6521
<i>Clostridium leptum group+</i>	-0,60 (-0,70; -0,40)	-0,79 (-0,90; -0,40)	0,5242
<i>Streptococcus spp</i>	-0,94 (-1,30; -0,40)	-0,95 (-1,30; -0,80)	0,6624
<i>Clostridium coccoides group</i>	-0,63 (-0,80; -0,50)	-0,61 (-0,80; -0,40)	0,4064
<i>Clostridium difficile group</i>	-2,31 (-2,70; -2,00)	-2,20 (-2,70; -1,40)	0,7045
<i>Bacteroides spp</i>	-0,36 (-0,40; -0,10)	-0,47 (-0,60; 0,00)	0,8412
<i>Bifidobacterium spp</i>	-1,36 (-1,70; -0,80)	-1,54 (-1,90; -1,10)	0,2552
<i>Methanobrevibacter spp</i>	-3,09 (-3,10; -3,10)	-3,10 (-3,10; -3,10)	0,8356
<i>Parabacteroides spp</i>	-1,37 (-1,60; -1,00)	-1,17 (-1,30; -0,90)	0,0833
<i>Alistipes spp</i>	-1,98 (-3,10; -1,40)	-1,61 (-2,00; -1,00)	0,0648
<i>Fusobacteriaceae</i>	-2,59 (-3,10; -1,80)	-2,47 (-3,10; -1,50)	0,8524
<i>Akkermansia muciniphila</i>	-2,78 (-3,10; -3,10)	-2,86 (-3,10; -3,10)	0,9373
<i>Butyricimonas</i>	-2,50 (-3,10; -2,00)	-2,51 (-3,10; -2,00)	0,9886
<i>Desulfovibrio spp</i>	-2,69 (-3,10; -2,20)	-2,63 (-3,10; -1,80)	0,8244
<i>Coriobacteriia</i>	-1,68 (-3,10; -0,80)	-1,79 (-3,10; -1,00)	0,5430
<i>Enterococcus spp</i>	-2,95 (-3,10; -3,10)	-3,02 (-3,10; -3,10)	0,9943
<i>Staphylococcus spp</i>	-2,44 (-3,10; -1,80)	-2,41 (-3,10; -1,90)	0,8078
<i>Anaerococcus spp</i>	-2,87 (-3,10; -2,90)	-2,99 (-3,10; -3,10)	0,6114
<i>Helicobacter spp</i>	-3,09 (-3,10; -3,10)	-3,10 (-3,10; -3,10)	0,8356
<i>Bdelovibrio</i>	-3,02 (-3,10; -3,10)	-3,03 (-3,10; -3,10)	0,9088
<i>Sutterella wadsworthensis</i>	-2,70 (-3,10; -2,40)	-2,62 (-3,10; -1,50)	0,9543
<i>Dialister+Alisonella+ Megasphaerae+Veillonella</i>	-1,37 (-1,70; -0,90)	-1,31 (-1,60; -0,90)	0,7747
<i>Pseudomonas spp</i>	-1,87 (-2,40; -1,10)	-1,72 (-2,00; -1,20)	0,4228
<i>Enterobacteriaceae</i>	-1,23 (-1,80; -0,60)	-1,31 (-1,80; -1,10)	0,5149
<i>Campylobacter spp</i>	-3,08 (-3,10; -3,10)	-3,10 (-3,10; -3,10)	0,7528
<i>Mageebacillus indolicus</i>	-3,09 (-3,10; -3,10)	-3,10 (-3,10; -3,10)	0,8356
<i>Prevotella spp</i>	-1,65 (-3,00; -0,70)	-1,91 (-3,10; -0,60)	0,4698

<i>Clostridium leptum group-</i>	-1,10 (-1,20; -0,90)	-1,02 (-1,20; -0,80)	0,6939
<i>Erysipelotrichaceae</i>	-1,73 (-2,00; -1,20)	-1,95 (-3,10; -1,40)	0,2078
<i>Escherichia coli</i>	-2,32 (-3,10; -1,40)	-2,61 (-3,10; -2,20)	0,3028
<i>Lactobacillaceae</i>	-2,86 (-3,10; -2,80)	-2,88 (-3,10; -2,70)	0,6886

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 здоровая слизистая, достоверной статистической разницы в составе микробиоты правых и левых отделов не получено ($p>0,05$) (Таблица 20).

Таблица 20.

Сравнение состава пристеночной микробиоты пациентов с язвенным колитом при левостороннем поражении (правые и левые отделы), выраженное в относительных значениях (разница \log (ГЭ/обр.) группы микроорганизмов и ОБМ) – медиана (25%;75%).

	Левостороннее поражение (левые отделы толстой кишки)	Левостороннее поражение (правые отделы толстой кишки)	Значение р
ОБМ	4,37	4,45	0,8357
<i>Clostridium leptum group+</i>	-0,79 (-0,90; -0,40)	-0,70 (-0,80; -0,60)	0,3952
<i>Streptococcus spp</i>	-0,95 (-1,30; -0,80)	-0,99 (-1,30; -0,70)	0,9504
<i>Clostridium coccoides group</i>	-0,61 (-0,80; -0,40)	-0,65 (-0,90; -0,40)	0,4937
<i>Clostridium difficile group</i>	-2,20 (-2,70; -1,40)	-2,44 (-3,10; -1,90)	0,4068
<i>Bacteroides spp</i>	-0,47 (-0,60; 0,00)	-0,51 (-0,80; -0,10)	0,7875
<i>Bifidobacterium spp</i>	-1,54 (-1,90; -1,10)	-1,46 (-2,00; -1,00)	0,5203
<i>Methanobrevibacter spp</i>	-3,10 (-3,10; -3,10)	-3,10 (-3,10; -3,10)	0,9835
<i>Parabacteroides spp</i>	-1,17 (-1,30; -0,90)	-1,20 (-1,40; -0,90)	0,6334
<i>Alistipes spp</i>	-1,61 (-2,00; -1,00)	-1,72 (-2,10; -1,20)	0,5203
<i>Fusobacteriaceae</i>	-2,47 (-3,10; -1,50)	-2,61 (-3,10; -1,60)	0,7244
<i>Akkermansia muciniphila</i>	-2,86 (-3,10; -3,10)	-2,80 (-3,10; -3,10)	0,9339

<i>Butyricimonas</i>	-2,51 (-3,10; -2,00)	-2,42 (-3,10; -1,90)	0,7557
<i>Desulfovibrio spp</i>	-2,63 (-3,10; -1,80)	-2,64 (-3,10; -2,00)	0,9669
<i>Coriobacteriia</i>	-1,79 (-3,10; -1,00)	-2,12 (-3,10; -1,00)	0,5203
<i>Enterococcus spp</i>	-3,02 (-3,10; -3,10)	-2,95 (-3,10; -3,10)	0,9504
<i>Staphylococcus spp</i>	-2,41 (-3,10; -1,90)	-2,69 (-3,10; -2,30)	0,2540
<i>Anaerococcus spp</i>	-2,99 (-3,10; -3,10)	-3,07 (-3,10; -3,10)	0,5476
<i>Helicobacter spp</i>	-3,10 (-3,10; -3,10)	-3,02 (-3,10; -3,10)	0,7716
<i>Bdelovibrio</i>	-3,03 (-3,10; -3,10)	-2,99 (-3,10; -3,10)	0,5897
<i>Sutterella wadsworthensis</i>	-2,62 (-3,10; -1,50)	-2,68 (-3,10; -2,10)	0,9174
<i>Dialister+Alisonella+ Megasphaerae+Veillonella</i>	-1,31 (-1,60; -0,90)	-1,27 (-1,50; -1,00)	0,9669
<i>Pseudomonas spp</i>	-1,72 (-2,00; -1,20)	-2,13 (-2,70; -1,70)	0,1354
<i>Enterobacteriaceae</i>	-1,31 (-1,80; -1,10)	-1,46 (-1,90; -1,00)	0,7089
<i>Campylobacter spp</i>	-3,10 (-3,10; -3,10)	-3,10 (-3,10; -3,10)	0,9835
<i>Mageebacillus indolicus</i>	-3,10 (-3,10; -3,10)	-3,10 (-3,10; -3,10)	0,9835
<i>Prevotella spp</i>	-1,91 (-3,10; -0,60)	-1,76 (-3,10; -0,50)	0,7400
<i>Clostridium leptum group-</i>	-1,02 (-1,20; -0,80)	-0,85 (-1,10; -0,60)	0,1013
<i>Erysipelotrichaceae</i>	-1,95 (-3,10; -1,40)	-1,79 (-2,00; -1,40)	0,3507
<i>Escherichia coli</i>	-2,61 (-3,10; -2,20)	-2,43 (-3,10; -1,80)	0,5203
<i>Lactobacillaceae</i>	-2,88 (-3,10; -2,70)	-2,90 (-3,10; -2,50)	0,9010

Язвенный колит – это заболевания, 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 течения язвенного колита не выявлено достоверной статистической разницы ($p>0,05$) (Таблица 21).

Таблица 21.

Сравнение состава пристеночной микробиоты пациентов с язвенным колитом при хроническом течении, выраженное в относительных значениях (разница \log (ГЭ/обр.) группы микроорганизмов и ОБМ) – медиана (25%;75%).

	Хроническое непрерывное течение	Хроническое рецидивирующее течение	Значение р
ОБМ	4,54	4,41	0,6216
<i>Clostridium leptum group+</i>	-0,69 (-0,80; -0,50)	-0,58 (-0,70; -0,40)	0,3860

<i>Streptococcus spp</i>	-1,03 (-1,30; -0,60)	-0,89 (-1,30; -0,40)	0,3236
<i>Clostridium coccooides group</i>	-0,48 (-0,80; -0,50)	-0,67 (-0,80; -0,50)	0,3299
<i>Clostridium difficile group</i>	-2,29 (-2,70; -1,90)	-2,32 (-2,90; -2,00)	0,9546
<i>Bacteroides spp</i>	-0,27 (-0,30; -0,10)	-0,47 (-0,60; -0,10)	0,0864
<i>Bifidobacterium spp</i>	-1,39 (-1,70; -0,90)	-1,48 (-1,90; -0,80)	0,6396
<i>Methanobrevibacter spp</i>	-3,10 (-3,10; -3,10)	-3,10 (-3,10; -3,10)	0,8594
<i>Parabacteroides spp</i>	-1,27 (-1,40; -0,90)	-1,37 (-1,50; -1,00)	0,4944
<i>Alistipes spp</i>	-1,75 (-2,40; -1,20)	-2,04 (-3,10; -1,40)	0,1697
<i>Fusobacteriaceae</i>	-2,48 (-3,10; -1,60)	-2,63 (-3,10; -2,40)	0,5024
<i>Akkermansia muciniphila</i>	-2,86 (-3,10; -3,10)	-2,70 (-3,10; -3,10)	0,5562
<i>Butyricimonas</i>	-2,54 (-3,10; -2,10)	-2,47 (-3,10; -1,90)	0,4944
<i>Desulfovibrio spp</i>	-2,66 (-3,10; -2,20)	-2,72 (-3,10; -2,30)	0,7326
<i>Coriobacteriia</i>	-1,76 (-3,10; -1,00)	-1,58 (-2,90; -0,80)	0,3330
<i>Enterococcus spp</i>	-2,91 (-3,10; -3,10)	-3,04 (-3,10; -3,10)	0,4253
<i>Staphylococcus spp</i>	-2,46 (-3,10; -1,90)	-2,38 (-3,10; -1,80)	0,3826
<i>Anaerococcus spp</i>	-2,89 (-3,10; -3,00)	-2,91 (-3,10; -3,10)	0,7710
<i>Helicobacter spp</i>	-3,10 (-3,10; -3,10)	-3,10 (-3,10; -3,10)	0,8594
<i>Bdelovibrio</i>	-2,99 (-3,10; -3,10)	-3,09 (-3,10; -3,10)	0,6083
<i>Sutterella wadsworthensis</i>	-2,73 (-3,10; -3,00)	-2,69 (-3,10; -2,40)	0,7953
<i>Dialister+Alisonella+ Megasphaerae+Veillonella</i>	-1,46 (-1,80; -1,00)	-1,24 (-1,40; -0,90)	0,2367
<i>Pseudomonas spp</i>	-1,95 (-2,70; -1,20)	-1,74 (-2,20; -1,20)	0,3791
<i>Enterobacteriaceae</i>	-1,37 (-1,80; -1,00)	-1,14 (-1,70; -0,60)	0,1798
<i>Campylobacter spp</i>	-3,09 (-3,10; -3,10)	-3,10 (-3,10; -3,10)	0,7184
<i>Mageebacillus indolicus</i>	-3,10 (-3,10; -3,10)	-3,10 (-3,10; -3,10)	0,8594
<i>Prevotella spp</i>	-1,88 (-3,10; -1,00)	-1,62 (-2,80; -0,70)	0,2936
<i>Clostridium leptum group-</i>	-1,15 (-1,20; -0,90)	-1,01 (-1,20; -0,80)	0,2994
<i>Erysipelotrichaceae</i>	-1,76 (-2,10; -1,30)	-1,77 (-2,00; -1,20)	0,8495
<i>Escherichia coli</i>	-2,58 (-3,10; -2,20)	-2,21 (-3,10; -1,40)	0,2293
<i>Lactobacillaceae</i>	-2,92 (-3,10; -3,00)	-2,84 (-3,10; -2,80)	0,7807

Эндоскопическая активность воспалительных заболеваний кишечника играет важную роль в оценке тяжести атаки заболевания, определении дальнейшей тактики ведения и лечения пациента. В данное исследование включены больные язвенным колитом с разной степенью эндоскопической активности, от ремиссии до

выраженной активности (классификации по Schroeder), с целью сравнения микробного состава. При этом получены следующие результаты, представленные в таблице 22.

Микробный состав в ремиссии воспалительного процесса более разнообразен по сравнению с минимальной и умеренной активностью ($p < 0,05$) и не отличается от выраженной. 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.

Данных о влиянии проводимой медикаментозной терапии язвенного колита на состав бактерий практически нет. В настоящей работе проведено сравнение микробного состава в зависимости от получаемой пациентами группы лекарственных препаратов. Установлено, что при лечении салицилатами в комбинации с ГКС увеличено количество *Sutterella wadsworthensis* ($p = 0,02$) и *E. coli* ($0,04$). При приеме азатиоприна снижена концентрация *Clostridium leptum group+* ($p = 0,01$). Назначение анти-ФНО- α в сравнении с препаратами 5-АСК сопряжено со снижением 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 анти-ФНО- α и комбинации 5-АСК+АЗА отличается по двум показателям: уменьшение количества *Erysipelotrichaceae* ($p = 0,03$) и *Coriobacteriia* ($p = 0,03$) при ГИБП (таблица 23).

Для попытки установления зависимости между значением С-реактивного белка как основного лабораторного маркера воспалительного процесса при язвенном колите и составом пристеночной микробиоты проводился корреляционный анализ с применением критерия Пирсона (r). Выявлено, что с уровнем С-реактивного белка коррелирует всего одна бактерия из всего

выделенного спектра. Представители семейства *Erysipelotrichaceae* имеют среднюю отрицательную связь ($r = -0,313$, $p = 0,008$). То есть при нарастании воспаления количество этих бактерий снижается, и наоборот.

Таким образом, в ходе данной научной работы был определен состав пристеночной и полостной микробиоты у пациентов с язвенным колитом в различных образцах, проведено сопоставление результатов с группой сравнения. Выявлены особенности микробного разнообразия, преобладающие группы бактерий и биомаркеры заболевания. Показано, что микробный состав не зависит от протяженности поражения слизистой оболочки толстой кишки и характера течения язвенного колита. Установлены особенности содержания различных родов и видов бактерий в зависимости от различной эндоскопической активности заболевания и проводимой лекарственной терапии.

Таблица 22.

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

	Эндоскопическая ремиссия ¹	Минимальная активность ²	Умеренная активность ³	Выраженная активность ⁴	Значение p					
					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 group</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
<i>Clostridium difficile group</i>	-2,31 (-2,50; -2,10)	-2,19 (-2,50; -1,80)	-2,49 (-3,00; -2,30)	-1,97 (-2,10; -1,70)	0,47	0,17	0,13	0,06	0,47	0,10
<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>Bifidobacterium spp</i>	-1,39 (-1,90; -0,70)	-1,39 (-1,70; -1,10)	-1,51 (-1,90; -1,00)	-0,93 (-1,30; -0,70)	0,72	0,49	0,51	0,68	0,15	0,16
<i>Methanobrevibacter spp</i>	-3,10 (-3,10; -3,10)	-3,08 (-3,10; -3,10)	-3,10 (-3,10; -3,10)	-3,10 (-3,10; -3,10)	0,72	0,99	0,96	0,72	0,88	0,96
<i>Parabacteroides spp</i>	-1,38 (-1,70; -1,00)	-1,37 (-1,60; -1,00)	-1,27 (-1,30; -1,00)	-1,00 (-1,10; -0,90)	0,80	0,25	0,17	0,31	0,15	0,39
<i>Alistipes spp</i>	-1,82 (-2,70; -1,30)	-2,01 (-3,10; -1,30)	-1,84 (-3,10; -1,20)	-1,63 (-2,40; -1,10)	0,37	0,76	0,73	0,32	0,41	0,84
<i>Fusobacteriaceae</i>	-2,63 (-3,10; -2,00)	-2,38 (-3,10; -1,40)	-2,72 (-3,10; -3,10)	-3,10 (-3,10; -3,10)	0,31	0,81	0,48	0,16	0,18	0,58
<i>Akkermansia muciniphila</i>	-2,68 (-3,10; -3,10)	-2,88 (-3,10; -3,10)	-2,72 (-3,10; -3,10)	-3,10 (-3,10; -3,10)	0,78	0,96	0,58	0,80	0,61	0,58
<i>Butyrivimonas</i>	-2,64 (-3,10; -2,30)	-2,49 (-3,10; -2,00)	-2,49 (-3,10; -1,90)	-1,90 (-2,10; -1,60)	0,58	0,61	0,06	0,93	0,11	0,25
<i>Desulfovibrio spp</i>	-2,62 (-3,10; -2,10)	-2,68 (-3,10; -2,30)	-2,79 (-3,10; -2,20)	-2,30 (-3,10; -1,50)	0,80	0,33	0,55	0,40	0,38	0,37
<i>Coriobacteriia</i>	-1,59 (-1,90; -1,00)	-1,79 (-3,10; -1,00)	-1,83 (-3,10; -0,90)	-0,77 (-1,00; -0,50)	0,52	0,55	0,07	0,96	0,08	0,09
<i>Enterococcus spp</i>	-3,01 (-3,10; -3,10)	-2,99 (-3,10; -3,10)	-2,84 (-3,10; -2,70)	-3,10 (-3,10; -3,10)	0,66	0,65	0,58	0,36	0,74	0,48

<i>Staphylococcus spp</i>	-2,61 (-3,10; -2,10)	-2,36 (-3,10; -1,60)	-2,34 (-3,10; -1,80)	-2,70 (-3,10; -1,90)	0,44	0,34	0,62	0,98	0,41	0,37
<i>Anaerococcus spp</i>	-2,89 (-3,10; -2,70)	-2,90 (-3,10; -2,90)	-2,89 (-3,10; -3,10)	-2,97 (-3,10; -2,70)	1,00	0,64	1,00	0,55	0,98	0,80
<i>Helicobacter spp</i>	-3,10 (-3,10; -3,10)	-3,08 (-3,10; -3,10)	-3,10 (-3,10; -3,10)	-3,10 (-3,10; -3,10)	0,72	0,99	0,96	0,72	0,88	0,96
<i>Bdelovibrio</i>	-3,08 (-3,10; -3,10)	-2,97 (-3,10; -3,10)	-3,04 (-3,10; -3,10)	-3,10 (-3,10; -3,10)	0,65	1,00	0,92	0,69	0,74	0,92
<i>Sutterella wadsworthensis</i>	-2,59 (-3,10; -2,00)	-2,69 (-3,10; -2,30)	-2,82 (-3,10; -3,10)	-2,33 (-3,10; -1,40)	0,92	0,43	0,58	0,36	0,40	0,23
<i>Dialister+Alisonella+ Megasphaera+Veillonella</i>	-1,29 (-1,50; -1,10)	-1,22 (-1,60; -0,80)	-1,73 (-2,10; -1,20)	-1,00 (-1,10; -0,90)	0,25	0,10	0,08	0,02	0,63	0,07
<i>Pseudomonas spp</i>	-2,13 (-2,70; -1,60)	-1,67 (-2,30; -1,00)	-1,78 (-2,30; -1,10)	-2,10 (-3,10; -1,40)	0,07	0,12	0,88	0,77	0,54	0,48
<i>Enterobacteriaceae</i>	-1,38 (-2,30; -0,60)	-1,19 (-1,80; -0,50)	-1,26 (-1,80; -0,90)	-1,00 (-1,20; -0,60)	0,55	0,96	0,69	0,71	0,74	0,45
<i>Campylobacter spp</i>	-3,10 (-3,10; -3,10)	-3,08 (-3,10; -3,10)	-3,08 (-3,10; -3,10)	-3,10 (-3,10; -3,10)	0,72	0,79	0,96	0,97	0,88	0,92
<i>Magebacillus indolicus</i>	-3,10 (-3,10; -3,10)	-3,08 (-3,10; -3,10)	-3,10 (-3,10; -3,10)	-3,10 (-3,10; -3,10)	0,72	0,99	0,96	0,72	0,88	0,96
<i>Prevotella spp</i>	-1,97 (-3,10; -1,10)	-1,62 (-3,00; -0,60)	-1,67 (-3,10; -0,80)	-1,33 (-3,10; -0,10)	0,30	0,48	0,39	0,72	0,67	0,51
<i>Clostridium leptum group-</i>	-1,15 (-1,20; -1,00)	-1,06 (-1,20; -0,80)	-1,08 (-1,20; -0,90)	-0,93 (-1,20; -0,60)	0,09	0,38	0,29	0,52	0,74	0,55
<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
<i>Escherichia coli</i>	-2,24 (-3,10; -1,40)	-2,23 (-3,10; -1,30)	-2,06 (-3,10; -1,70)	-1,60 (-2,00; -1,30)	0,76	0,66	0,39	0,45	0,29	0,39
<i>Lactobacillaceae</i>	-2,93 (-3,10; -3,10)	-2,75 (-3,10; -2,40)	-2,72 (-3,10; -2,20)	-2,77 (-3,10; -2,10)	0,20	0,47	0,80	0,73	0,86	0,96

Таблица 23.

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) – медиана (25%;75%).

	5-АСК ₁	5-АСК+ГКС ₂	5-АСК+АЗА ₃	ГИБП+АЗА ₄	Значение p					
					p ₁₋₂	p ₁₋₃	p ₁₋₄	p ₂₋₃	p ₂₋₄	p ₃₋₄
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>Streptococcus spp</i>	-0,83 (-1,30; -0,40)	-1,21 (-1,40; -0,90)	-0,79 (-1,30; -0,40)	-1,23 (-1,75; -0,50)	0,16	0,86	0,23	0,20	0,90	0,29
<i>Clostridium coccooides group</i>	-0,59 (-0,80; -0,50)	-0,56 (-0,70; -0,50)	-0,60 (-0,80; -0,40)	-0,81 (-1,10; -0,55)	0,74	0,91	0,07	0,76	0,19	0,20
<i>Clostridium difficile group</i>	-2,26 (-2,70; -1,90)	-2,17 (-2,50; -1,80)	-2,29 (-2,70; -2,00)	-2,48 (-3,05; -1,95)	0,70	0,71	0,32	0,51	0,24	0,42
<i>Bacteroides spp</i>	-0,38 (-0,40; -0,10)	-0,47 (-0,70; -0,10)	-0,45 (-0,50; 0,00)	-0,26 (-0,35; -0,05)	0,84	0,56	0,36	0,76	0,62	0,92
<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>Methanobrevibacter spp</i>	-3,10 (-3,10; -3,10)	-3,04 (-3,10; -3,10)	-3,09 (-3,10; -3,10)	-3,10 (-3,10; -3,10)	0,65	0,72	0,99	0,89	0,72	0,79
<i>Parabacteroides spp</i>	-1,18 (-1,40; -1,00)	-1,45 (-1,60; -1,00)	-1,57 (-1,90; -1,00)	-1,34 (-1,60; -1,15)	0,45	0,20	0,17	0,80	0,84	0,81
<i>Alistipes spp</i>	-1,82 (-2,40; -1,30)	-2,04 (-3,10; -1,10)	-1,99 (-3,10; -1,30)	-1,88 (-2,70; -1,35)	0,64	0,45	0,91	0,96	0,90	0,66
<i>Fusobacteriaceae</i>	-2,35 (-3,10; -1,40)	-2,76 (-3,10; -2,50)	-2,67 (-3,10; -1,70)	-2,87 (-3,10; -3,10)	0,33	0,38	0,14	0,82	0,67	0,46
<i>Akkermansia muciniphila</i>	-2,79 (-3,10; -3,10)	-2,88 (-3,10; -3,10)	-2,81 (-3,10; -3,10)	-2,74 (-3,10; -2,65)	0,98	0,98	0,80	0,98	0,82	0,85
<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>Desulfovibrio spp</i>	-2,56	-2,67	-2,75	-2,92	0,59	0,33	0,09	0,89	0,39	0,41

	(-3,10; -2,10)	(-3,10; -2,20)	(-3,10; -2,30)	(-3,10; -3,10)						
<i>Coriobacteriia</i>	-1,56 (-2,90; -0,90)	-2,04 (-3,10; -1,10)	-1,36 (-1,70; -0,80)	-2,25 (-3,10; -1,70)	0,22	0,76	0,06	0,17	0,60	0,03
<i>Enterococcus spp</i>	-3,01 (-3,10; -3,10)	-3,02 (-3,10; -3,10)	-2,81 (-3,10; -2,60)	-2,99 (-3,10; -3,10)	0,85	0,48	0,95	0,70	0,97	0,61
<i>Staphylococcus spp</i>	-2,45 (-3,10; -1,90)	-2,42 (-3,10; -1,80)	-2,52 (-3,10; -1,90)	-2,28 (-3,05; -1,65)	0,87	0,40	0,49	0,42	0,64	0,25
<i>Anaerococcus spp</i>	-2,88 (-3,10; -3,10)	-2,84 (-3,10; -2,70)	-2,97 (-3,10; -3,00)	-2,89 (-3,10; -2,85)	0,76	0,99	0,93	0,82	0,87	0,98
<i>Helicobacter spp</i>	-3,10 (-3,10; -3,10)	-3,04 (-3,10; -3,10)	-3,09 (-3,10; -3,10)	-3,10 (-3,10; -3,10)	0,65	0,72	0,99	0,89	0,72	0,79
<i>Bdelovibrio</i>	-3,07 (-3,10; -3,10)	-2,97 (-3,10; -3,10)	-2,91 (-3,10; -3,10)	-3,10 (-3,10; -3,10)	0,45	0,36	0,89	0,98	0,45	0,39
<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>Dialister+Alisonella+ Megasphaera+Veillonella</i>	-1,33 (-1,40; -0,90)	-1,29 (-1,50; -0,90)	-1,49 (-1,80; -1,10)	-1,34 (-1,65; -0,95)	0,73	0,71	0,63	0,39	0,45	0,86
<i>Pseudomonas spp</i>	-1,79 (-2,30; -1,20)	-1,76 (-2,50; -1,10)	-1,97 (-3,10; -1,30)	-1,86 (-2,30; -1,15)	0,86	0,53	0,94	0,62	0,92	0,71
<i>Enterobacteriaceae</i>	-1,30 (-1,80; -0,90)	-1,00 (-1,40; -0,40)	-1,49 (-2,30; -0,70)	-0,99 (-1,45; -0,45)	0,20	0,69	0,12	0,17	0,90	0,18
<i>Campylobacter spp</i>	-3,09 (-3,10; -3,10)	-3,04 (-3,10; -3,10)	-3,09 (-3,10; -3,10)	-3,10 (-3,10; -3,10)	0,74	0,86	0,89	0,89	0,72	0,79
<i>Mageebacillus indolicus</i>	-3,10 (-3,10; -3,10)	-3,04 (-3,10; -3,10)	-3,09 (-3,10; -3,10)	-3,10 (-3,10; -3,10)	0,65	0,72	0,99	0,89	0,72	0,79
<i>Prevotella spp</i>	-1,86 (-3,00; -1,10)	-1,60 (-3,10; -0,50)	-1,43 (-2,10; -0,70)	-1,73 (-3,10; -0,60)	0,63	0,20	0,83	0,87	0,72	0,66
<i>Clostridium leptum group-</i>	-1,06 (-1,20; -0,90)	-0,97 (-1,10; -0,90)	-1,18 (-1,20; -0,80)	-1,13 (-1,15; -0,85)	0,27	0,82	0,68	0,27	0,60	0,63
<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
<i>Lactobacillaceae</i>	-2,88 (-3,10; -2,70)	-2,73 (-3,10; -2,40)	-2,97 (-3,10; -3,10)	-2,82 (-3,10; -2,95)	0,23	0,57	0,97	0,10	0,32	0,56

ГЛАВА 5. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Воспалительные заболевания кишечника, в частности, язвенный колит, характеризующиеся хроническим тяжелым течением, разнообразной клинической картиной, трудностью постановки диагноза и постоянным поддерживающим дорогостоящим лечением, представляют собой одну из актуальных проблем современной гастроэнтерологии. Обусловлено это отсутствием единого понимания этиологии и патогенеза данных заболеваний. Многочисленные теории отводят значительную роль в развитии колита генетической предрасположенности, нарушениям врожденного и приобретенного иммунитета и различным факторам окружающей среды. Роль микробиоты также однозначно до сих пор неясна. Могут ли изменения микробного состава толстой кишки быть провоцирующим фактором развития воспаления или его следствием?

Чем больше у нас появляется знаний и представлений о составе и функции микробиоты организма человека, в том числе, биоты желудочно-кишечного тракта, как одного из самых заселенных микроорганизмами отделов человеческого тела, тем лучше мы осознаем, что находимся лишь в начале сложного пути. Эволюция методов диагностики микробного состава от посева кала на обогащенные питательные среды до современных молекулярно-генетических методик, позволяющих выделить генетический материал бактерий, безусловно, играет ключевую роль в нашем понимании данного вопроса и попытках установить роль микроорганизмов в развитии заболеваний различных органов и систем человека.

Большинство научных исследований, посвященных изучению нарушений микробиоты при воспалительных заболеваниях кишечника, 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 микробиоты. Более ценной считается информация о микробной колонизации кишечной стенки, полученная

путем забора биоптатов 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).

Именно поэтому целью настоящего исследования стала комплексная оценка просветного и пристеночного микробиома при различных формах язвенного колита в российской популяции методом ПЦР в режиме реального времени. Данный метод позволяет в полной мере идентифицировать и оценить количество родов и видов бактерий в собранных образцах.

С помощью современных методов диагностики предпринята попытка приблизиться к пониманию изменений, происходящих в микробиоте кишечника при язвенном колите, определению вероятных этиопатогенетических агентов и выделению возможных мишеней воздействия в качестве дополнительных методов лечения заболевания.

В настоящее исследование из 387 пациентов с язвенным колитом, проходивших лечение 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., вошли 70 пациентов, соответствующие критерия включения. Респондентам в условиях ФГБУ «НМИЦ колопроктологии имени А.Н. Рыжих» Минздрава России проведено комплексное обследование: оценка лабораторных показателей, копрологическое и бактериологическое исследование кала, тотальная колоноскопия с илеоскопией и биопсией, при необходимости с хромоскопией, ультразвуковое исследование кишечника и брюшной полости.

На основании результатов обследования верифицирован диагноз язвенного колита. Протяженность поражения устанавливалась согласно Монреальской классификации язвенного колита [158], тяжесть атаки – критериям Truelove-Witts [169], эндоскопическая активность – классификации по Schroeder [149].

Среди пациентов с язвенным колитом было 43 женщины (61,4%) и 27 мужчин (38,6%). Средний возраст составил $40 \pm 14,4$ года. При этом на долю 70% (n=49) приходились пациенты трудоспособного возраста до 50 лет, а в группу от 20

до 40 лет входили 48,6% (n=34) больных. Средняя длительность заболевания составила $7,22 \pm 6,99$ лет.

Практически всех пациентов беспокоили изменение частоты и консистенции стула, появление ложных позывов к дефекации и патологических примесей в стуле в виде крови или слизи. Жалобы на боли в животе отмечали 28 (40%) больных. 17 (24,3%) пациентов беспокоило ощущение вздутия и дискомфорта в животе.

Тотальный колит диагностирован в 78,6% (n=55), левосторонний колит – 21,4% (n=15) случаев. Хроническое рецидивирующее течение выявлено у 29 (41,4%), хроническое непрерывное – у 38 (54,3%) и острое – у 3 (4,3%) пациентов.

На основании критериев Truelove-Witts легкая атака язвенного колита диагностирована у 38 (54,3%) и среднетяжелая – у 14 (20%) больных. Клиническая ремиссия воспалительного процесса выявлена у 18 (25,7%) пациентов. У 32,9% (n=23) больных выделены гормональная зависимость и у 2,9% (n=2) – гормональная резистентность. Эндоскопическая активность заболевания на основании классификации по Schroeder: ремиссия – 18 (25,7%), минимальная – 31 (44,3%), умеренная – 18 (25,7%), выраженная – 3 (4,3%).

У 6 (8,6%) пациентов диагностированы внекишечные проявления язвенного колита: первичный склерозирующий холангит (n=2), периферическая артропатия (n=1), двусторонний сакроилеит (n=2), узловатая эритема и гангренозная пиодермия (n=1).

Базисную терапию препаратами 5-АСК получали – 33 (47,1%), 5-АСК + ГКС – 10 (14,3%), 5-АСК + АЗА – 15 (21,4%), ГИБП отдельно или в комбинация с АЗА – 12 (17,1%) пациентов.

Для решения поставленных задач у больных язвенным колитом получены следующие образцы: биоптаты слизистой оболочки левых отделов толстой кишки, а также дополнительно из правых отделов толстой кишки при левостороннем поражении для исследования мукозной микробиоты; соскобы эпителиальных клеток ампулы прямой кишки, полученные стерильным одноразовым инструментом типа «Cytobrush», введенным на глубину 4-5 см, выполняя

циркулярные движения по стенкам; образцы фекалий для исследования просветной микробиоты.

У 50 пациентов группы сравнения для определения микробиома собраны биоптаты слизистой оболочки неизмененных левых отделов толстой кишки.

Методом ПЦР в режиме реального времени в полученных материалах (275 образцов) выделено 30 родов микроорганизмов, относящихся 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*). Абсолютные значения микроорганизмов нормированы на ОБМ с целью получения относительных значений, которые являются более достоверными для сравнения.

В ходе исследования проведено подробное изучение микробиоты во всех собранных образцах, сравнения микробных составов между собой, а также с контрольной группой. Наибольшая бактериальная обсемененность по сравнению с контрольными образцами выявлена в образцах фекалий – ОБМ 6,55 log (ГЭ/обр.), а наименьшая – в биоптатах толстой кишки при язвенном колите 4,47 log (ГЭ/обр.), что, вероятно, обусловлено наличием хронического воспалительного процесса.

Информация, которая существует на настоящий момент относительно изменения в соотношении типов бактерий при ВЗК в общем и при язвенном колите, в частности, несколько противоречива. По результатам достаточно крупного и известного исследования Frank D.N. et al., опубликованного в 2007 году, где с использованием 16S секвенирования рРНК в образцах биоптатов 68 пациентов с болезнью Крона, 61 пациента с язвенным колитом и 61 пациента контрольной группы, выявлено увеличение количества представителей типа *Proteobacteria* и снижение *Firmicutes* и *Bacteroidetes* при воспалении. Неоднозначным является соотношение рода *Bacteroides* в типе *Bacteroidetes*. В работах Kabeerdoss J. et al. и Imhann F. et al. показано, что количество представителей рода *Bacteroides* увеличено в биоптатах при язвенном колите по сравнению с контрольной группой. Согласно последним данным, роду *Bacteroides*

отводится значительная роль, Altomare A. et al. он даже предложен в качестве биомаркера ВЗК в биоптатах.

В исследовании суммарно в составе пристеночной биоты преобладают представители типа *Firmicutes*, *Bacteroidetes* и *Proteobacteria*.

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 заболевания в биоптатах и образцах фекалий. Увеличение количества бактерий рода *Bacteroides spp*, вероятно, ассоциировано с деградацией кислого муцина как источника углерода в толстой кишке, что приводит к истощению слизистого слоя и формированию воспалительного ответа в слизистой оболочке кишечной стенки. Также установлено, что количество *Bacteroides spp* достоверно возрастает при увеличении эндоскопической активности заболевания ($p < 0,05$), что говорит о возможности рассматривать данный род бактерий в качестве предиктора рецидива заболевания.

В литературе большое внимание уделяется представителям класса *Clostridia*, так как они являются одними из самых многочисленных обитателей кишечника человека и выполняют множество функций. В данном классе бактерии кишечника в большинстве своем представлены кластерами *Clostridium IV* и *XIVa*. Группа кластеров *Clostridium IV*, также называется группой *C. leptum*, включает 4 микроорганизма: *C. leptum*, *C. sporosphaeroides*, *C. cellulosi* и *F. prausnitzii*. Кластер *Clostridium XIVa*, также известный как группа *C. coccoides*, состоит из 21 вида.

Существуют данные о том, что кластер *Clostridium IV* (*C. leptum group*), преимущественно *F. prausnitzii*, снижается у пациентов с язвенным колитом. Стоит обратить внимание на некоторые различия между семействами и родами, особенно для семейств *Clostridiaceae*, *Ruminococcaceae* и *Lachnospiraceae*. Bajer L. et al. сообщают об уменьшении количества родов *Coprococcus* и *Roseburia*, относящихся к семейству *Lachnospiraceae*, при язвенном колите. Напротив, в семействе *Clostridiaceae* некоторые виды, по-видимому, находятся в увеличенных пропорциях у этих пациентов, такие как *Clostridium symbiosum* (*C. coccoides group*).

В данной работе представительство *C. coccooides group* достоверно снижено при язвенном колите по сравнению с образцами группы сравнения, где они, наоборот, преобладают ($p < 0,05$). Количество бактерий, относящихся к условной группе *C. leptum+*, достоверно увеличено при наличии воспаления, *C. leptum-*, наоборот, снижено.

Несмотря на многочисленные данные о свойствах *Clostridium difficile group* и способности отягощать течение воспалительных заболеваний, по полученным результатам у пациентов не было получено достоверной разницы между концентрацией *Clostridium difficile group* в двух группах. Токсины А и В также были отрицательны. Это позволяет сделать вывод о том, что клостридиальный колит или болезнь является самостоятельной нозологией, которая может возникать дополнительно, наслаиваясь на имеющийся язвенный колит, и не имеет корреляции с активностью воспаления.

Бактерия *Mageebacillus indolicus* как представитель класса *Clostridia* ранее не описана в материалах по язвенному колиту. Упоминание о ней есть нескольких публикациях по биоте женского генитального тракта. В исследовании в образцах она представлена в малом количестве, но при язвенном колите в большей концентрации по сравнению с группой сравнения.

О роли класса *Bacilli* (тип *Firmicutes*) в развитии воспаления информации несколько меньше. Imhann F. et al. показали, что при язвенном колите повышено содержание семейств *Enterococcaceae* и *Lactobacillaceae*. В работе Lo Presti et al. *Streptococcus* связаны с микробиотой при ВЗК. Возможное участие *Streptococcus* в воспалительном статусе было также предложено в других исследованиях, в которых сообщалось о взаимодействии стрептококковых факторов вирулентности с иммунными клетками, вызывающими воспалительный ответ в различных органах (Herrera et al., 2009; Rooks et al., 2014).

Мы показали, что в составе пристеночной биоты при язвенном колите представители *Staphylococcus spp*, *Enterococcus spp*, *Lactobacillus* и *Streptococcus* достоверно преобладают над группой сравнения.

Представители семейства *Erysipelotrichaceae* по нашим данным не имеют статистической разницы с группой сравнения. Lo Presti et al. говорят об этом семействе микроорганизмов как потенциальном биомаркере для СРК. При установлении корреляции между уровнем С-реактивного белка и *Erysipelotrichaceae* выявлена средняя отрицательная связь ($r=-0,313$, $p=0,008$). То есть при нарастании воспаления количество бактерий этого семейства снижается, и наоборот. Также количество бактерий этого семейства уменьшается ($p<0,05$) при нарастании эндоскопической активности заболевания. Трактовать данные результаты достаточно сложно из-за недостаточного объема знаний относительно этих представителей микробиоты. Есть информация по ассоциации *Erysipelotrichaceae* и ФНО- α , но это требует дальнейшего изучения [52,116].

Информации о представителях семейства *Veillonellaceae* немного. Независимо от локализации и активности заболевания у пациентов с ВЗК Altomare et al. было выявлено статистически значимое увеличение *Veillonella dispar* в мукозной микробиоте. В данной работе семейство *Veillonellaceae* (*Dialister* + *Alisonella* + *Megasphaerae* + *Veillonella*) также достоверно превышено в слизистой толстой кишки при язвенном колите.

В литературе найти сведения о роде бактерий *Anaerococcus spp* (семейство *Peptoniphilaceae*) и их участии в воспалении не удалось, но по нашим результатам его содержание повышено при наличии колита.

Если вернуться к обсуждению типа *Proteobacteria*, включающего 6 семейств, то многие авторы говорят о важной роли данного типа и увеличении его количества при ВЗК, причем как в пристеночной, так и фекальной микробиоте. Прежде всего речь идет о семействе *Enterobacteriaceae* и *E. coli*. Этот факт безусловно имеет место быть, в первую очередь при болезни Крона. Altomare et al. даже указывают на *Enterobacteriaceae* как на биомаркер ВЗК в образцах стула. Однако, все эти работы выполнены с включением больных как язвенным колитом, так и болезнью Крона и оцениваются в совокупности. Вероятно, поэтому в проведенном исследовании, выполненном изолированно у пациентов с язвенным колитом, получены иные результаты. Тип *Proteobacteria* в составе пристеночной

биоты занимает лишь третье место после *Firmicutes* и *Bacteroidetes*. Концентрация семейства *Enterobacteriaceae* и рода *Desulfovibrio* достоверно снижена при язвенном колите. Содержание *E. coli* и *Sutterella wadsworthensis* достоверно не отличается от группы сравнения. Бактерии родов *Helicobacter spp*, *Bdelovibrio*, *Pseudomonas spp* и *Campylobacter spp* представлены в незначительных количествах, и, вероятно, не принимают активного участия в воспалительном ответе.

Мы показали, что число *Bifidobacterium spp* (тип *Actinobacteria*) достоверно увеличено в образцах при язвенном колите, а *Coriobacteriia* не изменено. В литературе об этом сведений мало, также, как и о семействе *Fusobacteriaceae*. Представители этого семейства превалируют при наличии воспаления.

Австралийские ученые Png C. W. et al. в исследовании, проведенном на 46 пациентах с ВЗК и 20 пациентах контроля методом ПЦР в режиме реального времени, показали, что *A. muciniphila* снижена при наличии воспаления. В проведенной работе мы не обнаружили статистической разницы *A. muciniphila* между двумя группами в биоптатах толстой кишки. Однако при проведении корреляционного анализа между значениями С-реактивного белка как одного из лабораторных маркеров активного воспаления и *A. muciniphila* выявлена умеренная положительная связь ($r=0,404$, $p=0,001$). Это говорит о том, что при повышении одного показателя, достоверно увеличивается и другой.

Исследований, в которых проведено сравнение микробных составов фекальной и мукозной биоты, немного. Lo Presti et al. показали, что при ВЗК содержание *Blautia*, *Clostridiaceae*, *Coprococcus*, *Erysipelotrichaceae*, *Lactobacillus* и *Streptococcus* выше в стуле по сравнению с образцами слизистой оболочки. В их работу входили как пациенты с язвенным колитом, так и с болезнью Крона.

По полученным данным составы пристеночной микробиоты и образцов фекалий также различаются. На уровне типов основу фекальной биоты также составляют три типа бактерий *Firmicutes*, *Bacteroidetes* и *Proteobacteria*, но концентрация их в два раза больше. Содержание *Lactobacillaceae*, *E. coli*, *Pseudomonas spp*, *Desulfovibrio spp*, *Alistipes spp*, *Bifidobacterium* достоверно увеличено в образцах стула при язвенном колите.

Сравнить результаты, полученные после взятия соскобов эпителиальных клеток ампулы прямой кишки, нет возможности, так в предыдущих исследованиях, посвященных воспалительным заболеваниям кишечника, подобная методика забора материала не применялась, и настоящие данные являются оригинальными.

Также впервые проведено сравнение биоты в зависимости от течения язвенного колита. Относительно роли микроорганизмов в эндоскопической активности заболевания данных немного. Bharadwaj R.S. et al. провели исследование методом 16S секвенирования рРНК на биопсийном материале в активности и ремиссии ВЗК. В работу было включено 22 пациента. Обнаружено, что бактериальные сообщества, принадлежащие к родам *Stenotrophomonas*, *Parabacteroides*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Ochrobactrum* и *Achromobacter*, доминируют во время острой фазы ВЗК по сравнению с фазой ремиссии.

По полученным данным, несмотря на включение в исследование пациентов с разной эндоскопической активностью, от ремиссии до тяжелой атаки, различия получены лишь по нескольким бактериям.

Относительно влияния лекарственных препаратов на состав биоты данных немного. В основном ученые ссылаются либо на эксперименты *in vitro*, либо на работы с совсем малочисленной выборкой. В проведенном исследовании показано, что каких-то значительных изменений микробиоты не происходит в зависимости от принимаемой группы лекарственных препаратов, но некоторые особенности присутствуют.

Заключение

В исследовании проведена комплексная оценка просветного и пристеночного микробиома 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 нашим данным микробный состав в них отличается от образцов биопсии и 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 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 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, и 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 сокращений

FISH (*англ.* fluorescence in situ hybridization) – флуоресцентная гибридизация *in situ*

5-АСК – 5-аминосалициловая кислота

АЗА – азатиоприн

ГИБП – генно-инженерные биологические препараты

ВЗК – воспалительные заболевания кишечника

ГКС – глюкокортикостероиды

ГЭ/обр. – геном-эквивалентов в образце

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДТпрайм – детектирующий амплификатор

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

ИЛ-10 – интерлейкин-10

ИМТ – индекс массы тела

ИФА – иммуноферментный анализ

КЖК – короткоцепочечные жирные кислоты

КТ – компьютерная томография

ЛПС – липополисахарид

МРТ – магнитно-резонансная томография

ОБМ – общая бактериальная масса

ПСХ – первичный склерозирующий холангит

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

РНК – рибонуклеиновая кислота

СИБР – синдром избыточного бактериального роста

СОЭ – скорость оседания эритроцитов

СРК – синдром раздраженного кишечника

УЗИ – ультразвуковое исследование

УПМ – условнопатогенные микроорганизмы

ФНО- α – фактор некроза опухоли-альфа

ХМС – хромато-масс-спектрометрия

Список литературы

1. Ардатская М.Д. Дисбиоз (дисбактериоз) кишечника: современное состояние проблемы, комплексная диагностика и лечебная коррекция / М.Д. Ардатская и др. // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2015. – №117(5). – С. 13-50.
2. Ардатская М.Д. Синдром избыточного бактериального роста и нарушение процессов пищеварения и всасывания / М.Д. Ардатская // Поликлиника. — 2009. — № 2. — С. 38-40.
3. Атлас. Воспалительные заболевания кишечника: диагностика и лечение / под ред. проф. Халифа И.Л., член-корр. РАН Шелыгина Ю.А. – СПб: Гиппократ, 2017. – 116 с.
4. Белоусова Е.А. Лечение язвенного колита легкого и среднетяжелого течения / Е.А. Белоусова, Н.В. Никитина, О.М. Цодикова // Фарматека. – 2013. – №2. – С. 42-46.
5. Бондаренко В.М. Дисбактериоз кишечника как клинико-лабораторный синдром: современное состояние проблемы / В.М. Бондаренко, Т.В. Мацулевич // М. – 2007.
6. Гастроэнтерология: руководство для врачей / под ред. Е.И. Ткаченко. – СПб.: ООО Издательство «СпецЛит», 2013. – 637 с.
7. Головенко О.В. Воспалительные заболевания кишечника. Клинические, эндоскопические, морфологические аспекты диагностики. Принципы современной терапии / О.В. Головенко [и др.]. – М.: Прима Принт, 2017. – 180 с.
8. Григорьев А.В. Морфология желудочно-кишечного бактериального биотопа / А.В. Григорьев // в кн. Желудочно-кишечный тракт как среда обитания бактерий. – М. СИЛМА. – 2004. – 123 с.

9. Григорьева Г.А. О проблеме системных проявлений ВЗК / Г.А. Григорьева, Н.Ю. Мешалкина // Фарматека. – 2011. – №15. – С. 44-49.
10. Златкина А.Р. Эпидемиологические исследования воспалительных заболеваний кишечника в Московской области / А.Р. Златкина, Е.А. Белоусова, И.В. Никулина // Колопроктология. – 2003. – №2(4). – С. 3-5.
11. Кардымон О.Л. Молекулярно-генетические методы для исследования микробиома кишечника / О.Л. Кардымон, А.В. Кудрявцева // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2016. – №26(4). – С. 4-13.
12. Лаврентьева О.А. Особенности микрофлоры желудочно-кишечного тракта при различных клинических формах синдрома раздраженного кишечника: диссертация ... кандидата медицинских наук: 14.01.04 / Лаврентьева Ольга Алексеевна – Москва, 2013. – 134 с.
13. Лоранская И.Д. Состав мукозной микрофлоры желудочно-кишечного тракта при синдроме раздраженного кишечника / И.Д. Лоранская, М.Н. Болдырева, О.А. Лаврентьева // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2013. – №3. – С. 15-22.
14. Лоранская И.Д. Характеристика микробиома при воспалительных заболеваниях кишечника / И.Д. Лоранская, И.Л. Халиф, М.Н. Болдырева, В.А. Купаева // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2018. – №153(5). – С. 104–111.
15. ОСТ 91500.11.0004-2003 Приказ Минздрава РФ от 09.06.2003 №231 «Об утверждении отраслевого стандарта «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника»»
16. Пристеночная микрофлора кишечника / И.Д. Лоранская [и др.] – М.: Прима Принт, 2015. – 100 с.
17. Проект клинических рекомендаций по диагностике и лечению язвенного колита // Колопроктология. – 2019. – Т.18. – №4. – С. 7-36.
18. Ребриков Д.В. ПЦР в реальном времени / Д.В. Ребриков, Д.Ю. Трофимов, Г.А. Саматов // М.: Лаборатория знаний, 7-е изд., 2019. – 223 с.:ил.

19. Рыбальченко О.В. Структура и функции бактериальных биопленок симбиотических и условно-патогенных бактерий / О.В. Рыбальченко, В.М. Бондаренко, О.Г. Орлова // Верхневолжский мед. журн. – 2013. – № 4. – С. 37-42.
20. Ткаченко Е.И. Питание, микробиоценоз и интеллект человека / Е.И. Ткаченко. – СПб.: СпецЛит, 2006. – 590 с.
21. Халиф И.Л. Лечебная тактика при язвенном колите / И.Л. Халиф // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2006. – Т.16. – №3. – С. 58-62.
22. Циммерман Я.С. Эубиоз и дисбиоз желудочно-кишечного тракта: мифы и реалии / Я.С. Циммерман // Клиническая медицина. – 2013. – №1. – С. 4-11.
23. Чаплин А.В. Микробиом человека / А.В. Чаплин, Д.В. Ребриков, М.Н. Болдырева // Вестник РГМУ. – 2017. – №2. – С. 5-13.
24. Чернин В.В. Симбионтное пищеварение человека. Физиология. Клиника, диагностика и лечение его нарушений. Изд. 2-е, переработ. и дополн. / В.В. Чернин, А.И. Парфенов и др. // Тверь: ООО «Издательство «Триада». – 2013. – 232 с.
25. Эпштейн-Литвак Р.В. Бактериологическая диагностика дисбактериоза кишечника / Р.В. Эпштейн-Литвак, Ф.Л. Вильшанская // Метод. рекоменд. – М., 1977.
26. Язвенный колит: Руководство для врачей. – М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2009. – 424 с.: ил.
27. Alipour M. Mucosal barrier depletion and loss of bacterial diversity are primary abnormalities in paediatric ulcerative colitis / M. Alipour, D. Zaidi, R. Valcheva et al. // J Crohns Colitis. – 2016. – №10(4). – P.462-471.
28. Altomare A. Gut mucosal-associated microbiota better discloses inflammatory bowel disease differential patterns than fecal microbiota / A. Altomare, L. Putignani, F. Del Chierico et al. // Dig Liver Dis. – 2019. – №51(5). – P. 648–656.
29. Andrews C.N. Mesalazine (5-aminosalicylic acid) alters fecal bacterial profiles, but not mucosal proteolytic activity in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome

- / C.N. Andrews, T.A. Griffiths, J. Kaufman et al. // *Aliment Pharmacol Ther.* – 2011. – №34(3). – P. 374–83.
30. Attene-Ramos M.S. Evidence that hydrogen sulfide is a genotoxic agent / M.S. Attene-Ramos, E.D. Wagner, M.J. Plewa // *Mol Cancer Res.* – 2006. – №4. – P. 9–14.
31. Bashir A. *Fusobacterium nucleatum*, inflammation, and immunity: the fire within human gut / A. Bashir, A.Y. Miskeen, Y.M. Hazari et al. // *Tumour Biol.* – 2016. – №37. – P. 2805-10.
32. Baumgart M. Culture independent analysis of ileal mucosa reveals a selective increase in invasive *Escherichia coli* of novel phylogeny relative to depletion of Clostridiales in Crohn's disease involving the ileum / M. Baumgart, B. Dogan, M. Rishniw et al. // *Isme J.* – 2007. – №1(5). – P. 403–418.
33. Biagi E. Through ageing, and beyond: gut microbiota and inflammatory status in seniors and centenarians / E. Biagi, L. Nylund, M. Candela et al. // *PLoS One.* – 2010. – №5: e10667.
34. Biasco G. Folic acid supplementation and cell kinetics of rectal mucosa in patients with ulcerative colitis / G. Biasco, U. Zannoni, G.M. Paganelli et al. // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* – 1997. – №6. – P.469-471.
35. Bien J. The intestinal microbiota dysbiosis and *Clostridium difficile* infection: is there a relationship with inflammatory bowel disease? / J. Bien, V. Palagani, P. Bozko // *Therap Adv Gastroenterol.* – 2013. – №6. – C. 53–68.
36. Booiijink C.C.G.M. Analysis of diversity and function of the human small intestinal microbiota. PhD, Wageningen University, Wageningen, the Netherlands. – 2009.
37. Booiijink C.C.G.M. High temporal and inter-individual variation detected in the human ileal microbiota / C.C.G.M. Booiijink, S. El-Aidy, M. Rajilic-Stojanovic et al. // *Environ Microbiol.* – 2010. – №12. – P. 3213–3227.
38. Candela M. Unbalance of intestinal microbiota in atopic children / M. Candela, S. Rampelli, S. Turrone et al. // *BMC Microbiol.* – 2012. – №12. – P.95.
39. Chen J.H. IBD Sydney Organisation and the Australian Inflammatory Bowel Diseases Consensus Working Group. Review article: acute severe ulcerative colitis

- evidence-based consensus statements / J.H. Chen, J.M. Andrews, V. Kariyawasam et al. // *Aliment. Pharmacol. Ther.* – 2016 Jul. – №44(2). – P. 127-44.
40. Chen W. Human intestinal lumen and mucosa-associated microbiota in patients with colorectal cancer / W. Chen, F. Liu, Z. Ling et al. // *PLoS One.* – 2012. – №7: e39743.
41. Chen W.X. Enteric microbiota leads to new therapeutic strategies for ulcerative colitis / W.X. Chen, L.H. Ren, R.H. Shi // *World J Gastroenterol.* – 2014. – №20. – P. 15657-63.
42. Clavel T. “The family Coriobacteriaceae,” in *The Prokaryotes* / T. Clavel, P. Lepage, C. Charrier // Eds. Rosenberg, E., DeLong, E. F., Lory, S., Stackebrandt, E., Thompson, F. (Berlin, Heidelberg: Springer). – 2014.
43. Clemente J.C. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view / J.C. Clemente, L.K. Ursell, L.W. Parfrey et al. // *Cell.* – 2012. – №148. – P. 1258-70.
44. Collado M.C. Intestinal integrity and *Akkermansia muciniphila*, a mucin-degrading member of the intestinal microbiota present in infants, adults, and the elderly / M.C. Collado, M. Derrien, E. Isolauri // *Appl Environ Microbiol.* – 2007. – №73. – P. 7767–7770.
45. Collado M.C. Specific duodenal and faecal bacterial groups associated with paediatric coeliac disease / M.C. Collado, E. Donat, C. Ribes-Koninckx // *J Clin Pathol.* – 2009. – №62. – P. 264–269.
46. Cosnes J. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases / J. Cosnes, C. Gower-Rousseau, P. Seksik // *Gastroenterology.* – 2011. – №140. – P. 1785–94.
47. Costabile A. Effect of breadmaking process on in vitro gut microbiota parameters in irritable bowel syndrome / A. Costabile, S. Santarelli, S.P. Claus et al. // *PLoS One.* – 2014. – №9(10):e111225.

48. Darfeuille-Michaud A. High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease / A. Darfeuille-Michaud, J. Boudeau, P. Bulois et al. // *Gastroenterology*. – 2004. – №127. – P.412-421.
49. De Vadder F. Microbiota-generated metabolites promote metabolic benefits via gut-brain neural circuits / F. De Vadder, P. Kovatcheva-Datchary, D. Goncalves et al. // *Cell*. – 2014. – №156. – P. 84–96.
50. Derrien M. *Akkermansia muciniphila* gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium / M. Derrien, E.E. Vaughan, C.M. Plugge // *Int J Syst Evol Microbiol*. – 2004. – №54. – P. 1469–1476.
51. Dignass A. Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis part 2: current management / A. Dignass, J. O. Lindsay, A. Sturm et al. // *Journal of Crohn's and Colitis*. – 2012. – №6(10). – P. 991-1030.
52. Dinh D.M. Intestinal microbiota, microbial translocation, and systemic inflammation in chronic HIV infection / D.M. Dinh, G.E. Volpe, C. Duffalo et al. // *J. Infect. Dis*. – 2015. – №211. – P. 19–27.
53. Dominguez-Bello M.G. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns / M.G. Dominguez-Bello, E.K. Costello, M. Contreras // *P Natl Acad Sci USA*. – 2010. – №107. – P. 11971–11975.
54. Dridi B. High prevalence of *Methanobrevibacter smithii* and *Methanosphaera stadtmanae* detected in the human gut using an improved DNA detection protocol / B. Dridi, M. Henry, A. El Khechine // *PLoS One*. – 2009. – №4: e7063.
55. Duncan S.H. Growth requirements and fermentation products of *Fusobacterium prausnitzii*, and a proposal to reclassify it as *Faecalibacterium prausnitzii* gen. nov., comb. nov. / S.H. Duncan, G.L. Hold, H.J. Harmsen et al. // *Int J Syst Evol Microbiol*. – 2002. – №52. – P. 2141-6.
56. Edmond L.M. The effect of 5-aminosalicylic acid-containing drugs on sulfide production by sulfate-reducing and amino acid-fermenting bacteria / L.M.

- Edmond, M.J. Hopkins, E.A. Magee et al. // *Inflamm Bowel Dis.* – 2003. – №9(1). – P. 10-7.
57. Engler D.B. Helicobacter pylori-specific protection against inflammatory bowel disease requires the NLRP3 inflammasome and IL-18 / D.B. Engler, I. Leonardi, M.L. Hartung et al. // *Inflamm Bowel Dis.* – 2015. – №21(4). – P. 854-61.
58. Everard A. Cross-talk between Akkermansia muciniphila and intestinal epithelium controls diet-induced obesity / A. Everard, C. Belzer, L. Geurts et al. // *P Natl Acad Sci USA.* – 2013. – №110. – P. 9066–9071.
59. Fanaro S. Intestinal microflora in early infancy: composition and development / S. Fanaro, R. Chierici, P. Guerrini et al. // *Acta paediatr. suppl.* – 2003. – V.91(441). – P.48-55.
60. Favier C.F. Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates / C.F. Favier, E.E. Vaughan, W.M. de Vos // *Appl Environ Microbiol.* – 2002. – №68. – P. 219–226.
61. Fleissner C.K. Absence of intestinal microbiota does not protect mice from diet-induced obesity / C.K. Fleissner, N. Huebel, M.M. Abd El-Bary et al. // *Br J Nutr.* – 2010. – №104. – P. 919–929.
62. Flint H.J. Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis / H.J. Flint, E.A. Bayer, M.T. Rincon et al. // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2008. – №6. – P.121-131.
63. Floch M.H. Intestinal microecology in health and wellness / M.H. Floch // *J Clin Gastroenterol.* – 2011. – №45. – P.108-10.
64. Frank D.N. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases / D.N. Frank, A.L. St Amand, R.A. Feldman et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2007. – №104. – P.13780-85.
65. Frick J.S. The gut microflora and its variety of roles in health and disease / J.S. Frick, I.B. Autenrieth // *Curr Top Microbiol Immunol.* – 2013. – №358. – P. 273–89.

66. Garrity G.M. The revised road map to the manual. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn, Part A, Introductory Essays. – 2005. – Vol. 2 (Brenner K, Staley JT & Garrity GM, eds), pp. 159–220. Springer, New York.
67. Geerlings S.Y. *Akkermansia muciniphila* in the human gastrointestinal tract: when, where, and how? / S.Y. Geerlings, I. Kostopoulos, W.M. de Vos et al. // *Microorganisms*. –2018. – №6 (3). – P. 75.
68. Gibson G.R. Use of a three-stage continuous culture system to study the effect of mucin on dissimilatory sulfate reduction and methanogenesis by mixed populations of human gut bacteria / G.R. Gibson, J.H. Cummings, G.T. Macfarlane // *Appl Environ Microbiol*. – 1988. – №54. – P. 2750–2755.
69. Griffin M.G. Refractory distal colitis – explanations and options / M.G. Griffin, P.B. Miner // *Aliment Pharmacol Ther*. – 1996. – №10(1). – P. 39-48.
70. Hamer H. M. Review article: the role of butyrate on colonic function / H.M. Hamer, D. Jonkers, K. Venema et al. // *Aliment Pharmacol Ther*. – 2008. – №27. – P. 104–119.
71. Hansen R. The microaerophilic microbiota of de-novo paediatric inflammatory bowel disease: the BISCUIT study / R. Hansen, S.H. Berry, I. Mukhopadhyaya et al. // *PLoS One*. – 2013. – №8: e58825.
72. Hindryckx P. Acute severe ulcerative colitis: from pathophysiology to clinical management / P. Hindryckx, V. Jairath, G. D'Haens // *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol*. – 2016. – 13(11). – P. 654-664.
73. Hirano A. Comparison of the microbial community structure between inflamed and non-inflamed sites in patients with ulcerative colitis / A. Hirano, J. Umeno, Y. Okamoto // *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. – 2018. – V.33. – №9. – P.1590-1597.
74. Huang E.Y. Using corticosteroids to reshape the gut microbiome: implications for inflammatory bowel diseases / E.Y. Huang, T. Inoue, V.A. Leone et al. // *Inflamm Bowel Dis*. – 2015. – №21(5). – P. 963-72.
75. Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome // *Nature*. – 2012. – №486. – 207-14.

76. Igarashi H. Effect of oral administration of metronidazole or prednisolone on fecal microbiota in dogs / H. Igarashi, S. Maeda, K. Ohno et al. // *PLoS One*. – 2014. – №9(9):e107909.
77. Imhann F. Interplay of host genetics and gut microbiota underlying the onset and clinical presentation of inflammatory bowel disease / F. Imhann, A. Vich Vila, M.J. Bonder et al. // *Gut*. – 2018. – №67(1). – P. 108–119.
78. Jacobs J.P. A disease-associated microbial and metabolomics state in relatives of pediatric inflammatory bowel disease patients / J.P. Jacobs, M. Goudarzi, N. Singh et al. // *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. – 2016. – №2(6). – P.750-766.
79. Jalanka-Tuovinen J. Intestinal microbiota in healthy adults: temporal analysis reveals individual and common core and relation to intestinal symptoms / J. Jalanka-Tuovinen, A. Salonen // *PLoS One*. – 2011. – №6: e23035.
80. Jangi S. Alterations of the human gut microbiome in multiple sclerosis / S. Jangi, R. Gandhi, L. M. Cox et al. // *Nature Communications*. – 2016. – V.7. – article 12015.
81. Jeon S.G. Probiotic *Bifidobacterium breve* induces IL-10-producing Tr1 cells in the colon / S.G. Jeon, H. Kayama, Y. Ueda et al. // *PLoS Pathog*. – 2012. – №8: e1002714.
82. Kabeerdoss J. Alterations of mucosal microbiota in the colon of patients with inflammatory bowel disease revealed by real time polymerase chain reaction amplification of 16S ribosomal ribonucleic acid / J. Kabeerdoss, P. Jayakanthan, S. Pugazhendhi et al. // *Indian J Med Res*. – 2015. – №142(1). – P. 23-32.
83. Kabeerdoss J. *Clostridium leptum* group bacteria abundance and diversity in the fecal microbiota of patients with inflammatory bowel disease: a case-control study in India / J. Kabeerdoss, V. Sankaran, S. Pugazhendhi et al. // *BMC Gastroenterol*. – 2013. – №13. –P. 20.
84. Kang S. Dysbiosis of fecal microbiota in Crohn's disease patients as revealed by a custom phylogenetic microarray / S. Kang, S.E. Denman, M. Morrison et al. // *Inflamm. Bowel Dis*. – 2010. – №16. – P.2034-42.

85. Kappelman M.D. The prevalence and geographic distribution of Crohn's disease and ulcerative colitis in the United States / M.D. Kappelman, S.L. Rifas-Shiman, K. Kleinman // *Clin Gastroenterol Hepatol.* – 2007. – №5. – P. 1424-1429.
86. Katsanos K.H. Dysplasia and cancer in inflammatory bowel disease 10 years after diagnosis: results of a population-based European collaborative follow-up study / K.H. Katsanos, S. Vermeire, D.K. Christodoulou et al. // *Digestion.* – 2007. – №75. – P. 113–21.
87. Keenan J.I. Helicobacter species in the human colon / J.I. Keenan, C.R. Beaugie, B. Jasmann et al. // *Colorectal Dis.* – 2010. – №12. – P. 48-53.
88. Koeth R.A. Intestinal microbiota metabolism of l-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis / R.A. Koeth, Z. Wang, B.S. Levison et al. // *Nat Med.* – 2013. – №19. – P. 576–585.
89. Kosek M. The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000 / M. Kosek, C. Bern, R.L. Guerrant // *Bull World Health Organ.* – 2003. – №81. – P. 197-204.
90. Kruis W. Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine / W. Kruis, P. Fric, J. Pokrotnieks et al. // *Gut.* – 2004. – №53. – P. 1617–1623.
91. Kucharzik T. Recent understanding of IBD pathogenesis: implications for future therapies / T. Kucharzik, C. Maaser, A. Luger et al. // *Inflamm Bowel Dis.* – 2006. – №12(11). – P. 1068-83.
92. Lawson A.J. *Campylobacter hominis* sp. nov., from the human gastrointestinal tract / A.J. Lawson, S.L.W. On, J.M.J. Logan // *Int J Syst Evol Microbiol.* – 2001. – №51. – P. 651–660.
93. Lewis D.J. Inflammation, antibiotics, and diet as environmental stressors of the gut microbiome in pediatric Crohn's disease / D.J. Lewis, E.Z. Chen, R.N. Baldasson et al. // *Cell Host Microbe.* – 2015. – №18(4). – P. 489-500.
94. Ley R. Gut microbiota in 2015: *Prevotella* in the gut: choose carefully / R. Ley // *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology.* – 2016. – №13(2). – P. 69-70.

95. Li Y. Risk factors and outcome of PCR-detected *Clostridium difficile* infection in ileal pouch patients / Y. Li, J. Qian, E. Queener et al. // *Inflamm Bowel Dis.* –2013. –№19. – P. 397-403.
96. Liu J.Y. *Helicobacter pylori* infection and inflammatory bowel disease: is there a link? / J.Y. Liu, Y.P. Li, Y.T. Huang et al. // *Biomed Res Int.* – 2014. – №20. – P. 6374-85.
97. Lo Presti A. Fecal and mucosa microbiota profiling in irritable bowel syndrome and inflammatory bowel disease / A. Lo Presti, F. Zorzi, Del Chierico et al. // *Front Microbiol.* – 2019. – №10. – P. 1655.
98. Lopez-Siles M. Alterations in the abundance and co-occurrence of *Akkermansia muciniphila* and *Faecalibacterium prausnitzii* in the colonic mucosa of inflammatory bowel disease subjects / M. Lopez-Siles, N. Enrich-Capó, X. Aldeguer et al. // *Front Cell Infect Microbiol.* – 2018. – №8. – P. 281.
99. Lopez-Siles M. Changes in the abundance of *Faecalibacterium prausnitzii* phylogroups I and II in the intestinal mucosa of inflammatory bowel disease and patients with colorectal cancer / M. Lopez-Siles, M. Martinez-Medina, R. Suris-Valls et al. // *Inflamm Bowel Dis.* – 2016. – №22. – C. 28–41.
100. Ludwig W. Revised road map to the phylum Firmicutes. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* – 2009. – Vol. 3 (The Firmicutes) (De Vos P, dGarrity G, Jones D et al., eds), pp. 1–13. Springer-Verlag, New York.
101. Mabardy A. IBD: a growing and vulnerable cohort of hospitalized patients with *Clostridium difficile* infection / A. Mabardy, J. McCarty, A. Hackford et al. // *Am Surg.* – 2017. – №83. – P. 605-9.
102. Machiels K. A decrease of the butyrate-producing species *Roseburia hominis* and *Faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis / K. Machiels, M. Joossens, J. Sabino et al. // *Gut.* – 2014. – №63. – P. 1275–83.
103. Magnusson M.K. Anti-TNF therapy response in patients with ulcerative colitis is associated with colonic antimicrobial peptide expression and microbiota

- composition / M.K. Magnusson, H. Strid, M. Sapnara et al. // *J Crohns Colitis*. – 2016. – №10(8). – 943-52.
104. Man S.M. Host attachment, invasion, and stimulation of proinflammatory cytokines by *Campylobacter concisus* and other non-*Campylobacter jejuni* *Campylobacter* species / S.M. Man, N.O. Kaakoush, S.T. Leach et al. // *J. Infect. Dis.* – 2010. – №202. – P.1855-65.
105. Marchandin H. *Negativicoccus succinicivorans* gen. nov., sp. nov., isolated from human clinical samples, emended description of the family Veillonellaceae and description of *Negativicutes* classis nov., *Selenomonadales* ord. nov. and *Acidaminococcaceae* fam. nov. in the bacterial phylum *Firmicutes* / H. Marchandin, C. Teyssier, J. Campos et al. // *Int J Syst Evol Microbiol.* – 2010. – №60. – P. 1271–1279.
106. Marcobal A. *Bacteroides* in the infant gut consume milk oligosaccharides via mucus-utilization pathways / A. Marcobal, M. Barboza, D. Erica et al. // *Cell Host Microbe*. – 2011. – №10. – P. 507– 514.
107. Martín R. *Faecalibacterium prausnitzii* prevents physiological damages in a chronic low-grade inflammation murine model / R. Martín, S. Miquel, F. Chain et al. // *BMC Microbiol.* – 2015. – №15. – P. 67.
108. Martín R. The commensal bacterium *Faecalibacterium prausnitzii* is protective in DNBS-induced chronic moderate and severe colitis models / R. Martín, F. Chain, S. Miquel et al. // *Inflamm Bowel Dis.* – 2014. – №20. P. 417–30.
109. Martinez-Medina M. *Escherichia coli* in chronic inflammatory bowel diseases: An update on adherent invasive *Escherichia coli* pathogenicity / M. Martinez-Medina, L.J. Garcia-Gil // *World J Gastrointest Pathophysiol.* – 2014. – №5(3). – P.213-27.
110. Mazmanian S. K. A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease / S. K. Mazmanian, J.L. Round, D.L. Kasper // *Nature*. – 2008. – №453. – P.620-625.

111. Mindenmark M. Rulling out IBD estimation of the possible economic effects of preendoscopic screening with F-calprotectin / M. Mindenmark, A. Larsson // *Clin. Biochem.* – 2012. – №45. – P. 552-5.
112. Morgan X.C. Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment / X.C. Morgan, T.L. Tickle, H. Sokol et al. // *Genome Biol.* – 2012. – №13(9). – R79.
113. Mukhopadhyia I. A comprehensive evaluation of colonic mucosal isolates of *Sutterella wadsworthensis* from inflammatory bowel disease / I. Mukhopadhyia, R. Hansen, C.E. Nicholl et al. // *PloS one.* – 2011. – №6(10): e27076.
114. Mukhopadhyia I. IBD-what role do Proteobacteria play? / I. Mukhopadhyia, R. Hansen, E.M. El-Omar et al. // *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* – 2012. – №9. – P.219-230.
115. Muyzer G. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria / G. Muyzer, A.J. Stams // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2008. – №6. – P.441-454.
116. Nadeem O Kaakoush. Insights into the Role of Erysipelotrichaceae in the Human Host / *Front Cell Infect Microbiol.* – 2015. – V.5 – A. 84.
117. Nagao-Kitamoto H. Functional characterization of inflammatory bowel disease-associated gut dysbiosis in gnotobiotic mice / H. Nagao-Kitamoto, A.B. Shreiner, M.G. III Gilliland et al. // *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* – 2016. – №2. – P. 468-81.
118. Nagao-Kitamoto H. Host-microbial Cross-talk in Inflammatory Bowel Disease / H. Nagao- Kitamoto, N. Kamada // *Immune Netw.* – 2017. – №17(1). – P.1-12.
119. Navaneethan U. Clostridium difficile infection and inflammatory bowel disease: understanding the evolving relationship / U. Navaneethan, P.G. Venkatesh, B. Shen // *World J Gastroenterol.* – 2010. – №16. – P. 4892-904.
120. Negrón M.E. Clostridium difficile infection worsens the prognosis of ulcerative colitis / M.E. Negrón, H.W. Barkema, K. Rioux et al. // *Can J Gastroenterol Hepatol.* – 2014. – №28. – P. 373-380.

121. Nishida A. Gut microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel disease / A. Nishida, R. Inoue, O. Inatomi et al. // *Clin J Gastroenterol.* – 2018. – №11(1). – P. 1-10.
122. O Cuiv P. (2013) Draft genome sequence of *Enterococcus faecalis* PC1.1, a candidate probiotic strain isolated from human feces / P. O Cuiv, E.S. Klaassens, W.J. Smith et al. // *Genome Announc.* – 2013. – 1: e00160–00112.
123. O’Hara A.M. The gut flora as a forgotten organ / A.M. O’Hara, F. Shanahan // *EMBO.* – 2006. – №7. – P. 688–693.
124. Ohkusa T. Commensal bacteria can enter colonic epithelial cells and induce proinflammatory cytokine secretion: a possible pathogenic mechanism of ulcerative colitis / T. Ohkusa, T. Yoshida, N. Sato et al. // *J Med Microbiol.* – 2009. – №58. – P. 535–45.
125. Ohkusa T. *Fusobacterium varium* localized in the colonic mucosa of patients with ulcerative colitis stimulates species-specific antibody / T. Ohkusa, N. Sato, T. Ogihara et al. // *J Gastroenterol Hepatol.* – 2002. – №17. – P. 849–53.
126. Pilarczyk-Zurek M. Possible role of *Escherichia coli* in propagation and perpetuation of chronic inflammation in ulcerative colitis / M. Pilarczyk-Zurek, A. Chmielarczyk, T. Gosiewski et al. // *BMC Gastroenterol.* – 2013. – №13. – P. 61.
127. Png C.W. Mucolytic bacteria with increased prevalence in IBD mucosa augment in vitro utilization of mucin by other bacteria / C.W. Png, S.K. Lindén, K.S. Gilshenan et al. // *Am J Gastroenterol.* – 2010. – №105(11). – P. 2420-2428.
128. Pompei A. Folate production by bifidobacteria as a potential probiotic property / A. Pompei, L. Cordisco, A. Amaretti et al. // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2007. – №73. – P. 179-185.
129. Popat R. The social behaviour of bacterial pathogens / R. Popat, S. Crusz, S. Doggle // *Brit. Med. Bullet.* – 2008. – V.87. – P. 63-75.
130. Qin J. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes / J. Qin, Y. Li, Z. Cai et al. // *Nature.* – 2012. – №490. – P. 55–60.
131. Qin J.J. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing / J.J. Qin, R.Q. Li, J. Raes et al. // *Nature.* – 2010. – №464. – P. 59-65.

132. Qiu X. Faecalibacterium prausnitzii upregulates regulatory T cells and anti-inflammatory cytokines in treating TNBS-induced colitis / X. Qiu, M. Zhang, X. Yang et al. // *J Crohns Colitis*. – 2013. – №7. – e558–68.
133. Rajca S. Alterations in the intestinal microbiome (dysbiosis) as a predictor of relapse after infliximab withdrawal in Crohn's disease / S. Rajca, V. Grondin, E. Louis et al. // *Inflamm Bowel Dis*. – 2014. – №20(6). – P. 978–986.
134. Rajilic-Stojanovic M. Diversity of the human gastrointestinal tract microbiota revisited / M. Rajilic-Stojanovic, H. Smidt // *Environ Microbiol*. – 2007. – №9. – P. 2125–2136.
135. Rajilic-Stojanovic M. Global and deep molecular analysis of microbiota signatures in fecal samples from patients with irritable bowel syndrome / M. Rajilic-Stojanovic, E. Biagi, H.G. Heilig et al. // *Gastroenterology*. – 2011. – №141. – P. 1792–1801.
136. Rajilic-Stojanovic M. Phylogenetic analysis of dysbiosis in ulcerative colitis during remission / M. Rajilic-Stojanovic, F. Guarner, F. Shanahan et al. // *Inflamm Bowel Dis*. – 2013a. – №19. – P. 481–488.
137. Ramanan D. Bacterial sensor Nod2 prevents inflammation of the small intestine by restricting the expansion of the commensal bacteroides vulgatus / D. Ramanan, M.S. Tang, R. Bowcutt et al. // *Immunity*. – 2014. – №41. – P. 311–24.
138. Rehman A. Transcriptional activity of the dominant gut mucosal microbiota in chronic inflammatory bowel disease patients / A. Rehman, P. Lepage, A. Nolte et al. // *J Med Microbiol*. – 2010. – №59. – P. 1114–22.
139. Reid G. Can bacterial interference prevent infection? / G. Reid, J. Howard, B.S. Gan // *Trends Microbiol*. – 2001. – V.9. – №9. – P. 424–428.
140. Ring C. Akkermansia muciniphila strain ATCC BAA-835 does not promote short-term intestinal inflammation in gnotobiotic interleukin-10-deficient mice / C. Ring, R. Klopffleisch, K. Dahlke et al. // *Gut Microbes*. – 2019. – №10(2). – P. 180–203.

141. Ringel-Kulka T. Intestinal microbiota in healthy U.S. young children and adults – a high throughput microarray analysis / T. Ringel-Kulka, J. Cheng, Y. Ringel // PLoS One. – 2013. – №8: e64315.
142. Rodriguez C. Faecal microbiota characterisation of horses using 16 rdna barcoded pyrosequencing, and carriage rate of clostridium difficile at hospital admission / C. Rodriguez, B. Taminiau, B. Brévers et al. // BMC Microbiol. – 2015. – №15. – P. 181.
143. Rodríguez C. Microbiota insights in Clostridium difficile infection and inflammatory bowel disease / C. Rodríguez, E. Romero, L. Garrido-Sanchez et al. // Gut Microbes. – 2020. – 25 P.
144. Ron E.Z. Host specificity of septicemic Escherichia coli: human and avian pathogens / E.Z. Ron // Curr Opin Microbiol. – 2006. – №9. – P.28.
145. Rowan F. Desulfovibrio bacterial species are increased in ulcerative colitis / F. Rowan, N.G. Docherty, M. Murphy et al. // Dis. Colon Rectum. – 2010. – №53. – P.1530-36.
146. Saulnier D.M. Gastrointestinal microbiome signatures of pediatric patients with irritable bowel syndrome / D.M. Saulnier, K. Riehle, T-A. Mistretta et al. // Gastroenterology. – 2011. – №141. – P. 1782– 1791.
147. Scher J.U. Expansion of intestinal *Prevotella copri* correlates with enhanced susceptibility to arthritis / J.U. Scher, A.Szczesnak, , R.S. Longman et al. // eLife. – 2013. – №2: e01202.
148. Schrempf H. Recognition and degradation of chitin by streptomycetes / H. Schrempf // Antonie Leeuwenhoek. – 2001. – №79. – P. 285–289.
149. Schroeder K.W. Coated oral 5-aminosalicylic acid therapy for mildly to moderately active ulcerative colitis. A randomized study / K.W. Schroeder, W.J. Tremaine, D.M. Ilstrup // N. Engl. J. Med. – 1987. – №317. P. 1625-9.
150. Schultz B.M. A potential role of salmonella infection in the onset of inflammatory bowel diseases / B.M. Schultz, C.A. Paduro, G.A. Salazar et al. // Front Immunol. – 2017. – №8. P. 191.

151. Seah D. Review article: the practical management of acute severe ulcerative colitis / D. Seah, P. De Cruz // *Aliment. Pharmacol. Ther.* – 2016. – №43(4). – P. 482-513.
152. Sender R. Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body / R. Sender, S. Fuchs, R. Milo // *PLoS Biol.* – 2016. – №14(8):e1002533.
153. Sha S. The biodiversity and composition of the dominant fecal microbiota in patients with inflammatory bowel disease / S. Sha, B. Xu, X. Wang et al. // *Diagn Microbiol Infect Dis.* – 2013. – №75. – P. 245-51.
154. Shah H. N. Prevotella, a new genus to include *Bacteroides melaninogenicus* and related species formerly classified in the genus *Bacteroides* / H. N. Shah, D. M. Collins // *International Journal of Systematic Bacteriology.* – 1990. – №40(2). – P. 205–208.
155. Shin J.H. Innate Immune response and outcome of *Clostridium difficile* infection are dependent on fecal bacterial composition in the aged host / J.H. Shin, Y. Gao, II JH M., et al. // *J Infect Dis.* – 2018. – №217(2). –P. 188-197.
156. Shin S.J. Thiopurine drugs azathioprine and 6-mercaptopurine inhibit *Mycobacterium paratuberculosis* growth in vitro / S.J. Shin, M.T. Collins // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2008. – №52(2). – 418-26.
157. Shulman S.T. Theodor Escherich: the first pediatric infectious diseases physician? / S.T. Shulman, H.C. Friedmann, R.H. Sims // *Clin Infect Dis.* – 2007. – №45. – P. 1025–1029.
158. Silverberg M.S. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: report of a working party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology / M.S. Silverberg, J. Satsangi, T. Ahmad et al. // *Can. J. Gastroenterol.* – 2005. №19(Suppl A). – P. 5-36.
159. Singh H. Higher incidence of *Clostridium difficile* infection among individuals with inflammatory bowel disease / H. Singh, Z. Nugent, Yu et al. // *Gastroenterology.* – 2017. – №153. – P. 430–8.e2.

160. Sokol H. Specificities of the fecal microbiota in inflammatory bowel disease / H. Sokol, P. Seksik, L. Rigottier-Gois et al. // *Inflamm. Bowel Dis.* – 2006. – № 12. – P.106–111.
161. Solis G. Establishment and development of lactic acid bacteria and bifidobacteria microbiota in breast-milk and the infant gut / G. Solis, C.G. de los Reyes-Gavilan, N. Fernandez et al. // *Anaerobe.* – 2010. – №16. – P. 307–310.
162. Sonnenburg J.L. Diet-microbiota interactions as moderators of human metabolism / J.L. Sonnenburg, F. Backhed // *Nature.* – 2016. – №535. – P.56-64.
163. Spencer M.D. Association between composition of the human gastrointestinal microbiome and development of fatty liver with choline deficiency / M.D. Spencer, T.J. Hamp, Reid R.W. et al. // *Gastroenterology.* – 2011. – №140. – P. 976–986.
164. Suau A. *Fusobacterium prausnitzii* and related species represent a dominant group within the human fecal flora / A. Suau, V. Rochet, A. Sghir et al. // *Syst Appl Microbiol.* – 2001. – №24. – P. 139-45.
165. Swidsinski A. Acute appendicitis is characterised by local invasion with *Fusobacterium nucleatum/necrophorum* / A. Swidsinski // *Gut.* – 2011. – №60. – P. 34–40.
166. Swidsinski A. Azathioprine and mesalazine-induced effects on the mucosal flora in patients with IBD colitis / A. Swidsinski, V. Loening-Baucke, S. Bengmark et al. // *Inflamm Bowel Dis.* – 2007. – №13(1). – 51-6.
167. Tahara T. *Fusobacterium* detected in colonic biopsy and clinicopathological features of ulcerative colitis in Japan / T. Tahara, T. Shibata, T. Kawamura et al. // *Dig Dis Sci.* – 2015. – №60. – P.205-10.
168. Tang Y.M. *Clostridium difficile* infection in inflammatory bowel disease: challenges in diagnosis and treatment / Y.M. Tang, C.D. Stone // *Clin J Gastroenterol.* – 2017. – №10. – P. 112-23.
169. Truelove S.C. Cortisone in ulcerative colitis; final report on a therapeutic trial / S.C. Truelove, L.J. Witts // *Br. Med. J.* – 1955. – №2. – 1041-8.

170. van den Bogert B. Microarray analysis and barcoded pyrosequencing provide consistent microbial profiles depending on the source of human intestinal samples / B. van den Bogert, W.M. de Vos, E.G. Zoetendal // *Appl Environ Microbiol.* – 2011. – №77. – P. 2071–2080.
171. Varela E. Colonisation by *Faecalibacterium prausnitzii* and maintenance of clinical remission in patients with ulcerative colitis / E. Varela, C. Manichanh, M. Gallart et al. // *Aliment Pharmacol Ther.* – 2013. – №38. – P. 151-61.
172. Vendura M. Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum / M. Vendura, C. Canchava, A. Tauch // *Microbiol Mol Biol Rev.* – 2007. – №71(3). – P. 495-548
173. Vermeiren J. Decreased colonization of fecal *Clostridium coccoides*/*Eubacterium rectale* species from ulcerative colitis patients in an in vitro dynamic gut model with mucin environment / J. Vermeiren, P. Van den Abbeele, D. Laukens et al. // *FEMS Microbiol Ecol.* – 2012. – №79. – P. 685-96.
174. Waidmann M. *Bacteroides vulgatus* protects against *Escherichia coli*-induced colitis in gnotobiotic interleukin-2-deficient mice / M. Waidmann, O. Bechtold, J.S. Frick et al. // *Gastroenterology.* – 2003. – №125. – P.162-177.
175. Wang T. Structural segregation of gut microbiota between colorectal cancer patients and healthy volunteers / T. Wang, G. Cai, Y. Qiu et al. // *ISME J.* – 2012. – №6. – P. 320–329.
176. Wexler H. M. *Bacteroides*: the good, the bad, and the nitty-gritty / H. M. Wexler // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2007. – №20. – P.593-621.
177. Wexler H.M. *Sutterella wadsworthensis* gen. nov., sp. nov., bile-resistant microaerophilic campylobacter gracilis-like clinical isolates / H.M. Wexler, D. Reeves, P.H. Summanen et al. // *Int J Syst Evol Microbiol.* – 1996. – №46(1). – P.252.
178. Wills E.S. Fecal microbial composition of ulcerative colitis and Crohn's disease patients in remission and subsequent exacerbation / E.S. Wills, D.M. Jonkers, P.H. Savelkoul et al. // *PLoS One.* – 2014. – №9(3):e90981.

179. Wu L. Recognition of host immune activation by *Pseudomonas aeruginosa* / L. Wu, O. Estrada, O. Zaborina et al. // *Science*. – 2005. – №309. – P. 774–777.
180. Wu S. Intestinal epithelial vitamin D receptor deletion leads to defective autophagy in colitis / S. Wu, Y.G. Zhang, R. Lu et al. // *Gut*. – 2015. – №64. – P. 1082–94.
181. Yatsunenکو T. Human gut microbiome viewed across age and geography / T. Yatsunenکو, F.E. Rey, M.J. Manary et al. // *Nature*. – 2012. – №486. – P. 222-7.
182. Yu Q. Enterohepatic *Helicobacter* species as a potential causative factor in inflammatory bowel disease: a meta-analysis / Q. Yu, S. Zhang, L. Li et al. // *Medicine (Baltimore)*. – 2015. – №94: e1773.
183. Zoetendal E.G. The human small intestinal microbiota is driven by rapid uptake and conversion of simple carbohydrates / E.G. Zoetendal, J. Raes, B. van den Bogert et al. // *ISME J*. – 2012. – №6. – P. 1415–1426.