

Профиль пристеночного и полостного микробиома кишечника пациентов с язвенным колитом

В.А. Купаева^{1,2}, И.Д. Лоранская¹, М.Н. Болдырева^{3,4}

¹ФГБОУ ДПО Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования Минздрава России, Москва, ²ФГБУ "НМИЦ колопроктологии им. А.Н. Рыжих" Минздрава России, Москва, ³ФГБУ "ГНЦ Институт иммунологии" ФМБА России, Москва, ⁴ООО "ДНК-Технология", Москва

Для корреспонденции: Купаева В.А., 123995, Москва, ул. Баррикад - ная, д. 2/1. victoriakupaeva@gmail.com

Для цитирования: Купаева В.А., Лоранская И.Д., Болдырева М.Н. Профиль пристеночного и полостного микробиома кишечника пациентов с язвенным колитом. Клин фармакол тер 2020;29(3):49-54. [Купаева VA, Loranskaya ID, Boldyreva MN. Intestinal and fecal microbiome in patients with ulcerative colitis. Kliniches kaya farmakologiya i terapiya = Clin Pharmacol Ther 2020;29(3):49-54 (In Russ.). DOI 10.32756/0869-5490-2020-3-49-54.

Дисбаланс бактерий, приводящий к нарушению кишечного гомеостаза наблюдаются при различных патологических состояниях, в том числе при воспалительных заболеваниях кишечника. Однако остается неясным, является ли дисбиоз одним из этиологических факторов воспаления кишечной стенки или его следствием.

Цель. Определить состав пристеночной и полостной микробиоты толстой кишки у пациентов с язвенным колитом в российской популяции методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с детекцией результатов в режиме реального времени.

Материал и методы. В исследование были включены 70 пациентов с верифицированным диагнозом язвенного колита, 43 женщины и 27 мужчин. Средний возраст составил $40,0 \pm 14,4$ лет, средняя длительность анамнеза язвенного колита — $7,2 \pm 7,0$ лет. Тотальное поражение диагностировано у 55 (78,6%) больных, левостороннее — у 15 (21,4%). Хроническое рецидивирующее течение язвенного колита отмечено у 29 (41,4%) пациентов, хроническое непрерывное — у 38 (54,3%), острое — у 3 (4,3%). Эндоскопическую активность заболевания оценивали на основании классификации Schroeder: ремиссия — 18 (25,7%), минимальная активность — 31 (44,3%), умеренная — 18 (25,7%), выраженная — 3 (4,3%). У всех пациентов с язвенным колитом и 50 пациентов с синдромом раздраженного кишечника и бессимптомными дивертикулами ободочной кишки, составивших контрольную группу, производили забор биоптатов слизистой оболочки толстой кишки и образцов фекалий. В полученных материалах определяли состав просветного и пристеночного микробиома методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени.

Результаты. В составе пристеночной и просветной микробиоты при язвенном колите преобладали три типа бактерий: *Firmicutes*, *Bacteroidetes* и *Proteobacteria*. Состав фекального и пристеночного микробиома отличался незначительно. В составе микробио-

ты при язвенном колите по сравнению с группой сравнения достоверно чаще определялись микроорганизмы рода *Bacteroides*. При левостороннем язвенном колите не выявлено достоверной разницы в составе микробиоты пораженного и непораженного отделов толстой кишки ($p > 0,05$). При хроническом рецидивирующем и непрерывном течении заболевания состав микробиоты толстой кишки достоверно не отличался ($p > 0,05$). Количество бактерий рода *Bacteroides* spp. увеличивалось при нарастании эндоскопической активности язвенного колита ($p < 0,05$), а содержание бактерий семейства *Erysipelotrichaceae* уменьшалось ($p < 0,05$).

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о том, что представители рода *Bacteroides* spp. как в биоптатах слизистой оболочки кишки, так и в образцах фекалий могут рассматриваться в качестве биомаркера язвенного колита.

Ключевые слова. Язвенный колит, микробиота, микробиом, ПЦР в режиме реального времени.

Язвенный колит развивается в результате сочетания нескольких этиологических факторов. Достигнут значительный прогресс в понимании роли иммунитета, генетических факторов и окружающей среды в формировании хронического воспалительного процесса [1,2]. В настоящее время активно обсуждается взаимосвязь микробиоты кишки и иммунного ответа хозяина в патогенезе воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК), а также потенциальные терапевтические стратегии, связанные с влиянием на кишечную экосистему [3]. Эволюция методов диагностики микробного состава от посева кала на обогащенные питательные среды до современных молекулярно-генетических методов, позволяющих выделить генетический материал бактерий, безусловно, играет ключевую роль в нашем понимании роли микроорганизмов в развитии заболеваний различных органов

и систем человека.

Имеющиеся данные об изменениях микробиоты кишки у пациентов с язвенным колитом немногочисленны. Большинство научных исследований, посвященных этой тематике, проведены с использованием образцов фекалий, что позволяет определить лишь состав просветной микробиоты. Более ценной считают информацию о микробной колонизации кишечной стенки, полученную путем забора биоптатов слизистой оболочки толстой кишки. Таких работ значительно меньше, и они проведены на небольших выборках.

Целью нашего исследования была оценка просветного и пристеночного микробиома толстой кишки у пациентов с язвенным колитом в российской популяции методом ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени.

Материал и методы

Научная работа проводилась в гастроэнтерологическом отделении на базе отдела по изучению воспалительных и функциональных заболеваний кишечника ФГБУ «НМИЦ колопроктологии имени А.Н. Рыжих» Минздрава России с 2017 по 2018 г. Протокол исследования был одобрен на заседании Комитета по этике научных исследований ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России от 14.11.2017 года.

В исследование включали пациентов старше 18 лет с язвенным колитом, установленным на основании действующих клинических рекомендаций (2017 г.) [4]. В исследовании принимали участие пациенты с различными клиническими формами и течением заболевания, получавшие терапию препаратами 5-аминосалициловой кислоты, глюкокортикостероидами, иммуносупрессивными средствами и/или генно-инженерными биологическими препаратами.

Критерии невключения: 1) тяжелая или сверхтяжелая атака язвенного колита; 2) прием антибактериальных или пробиотических препаратов на догоспитальном этапе; 3) наличие кишечной инфекции; 4) наличие тяжелой сопутствующей патологии. Группу сравнения составили 50 пациентов с диагнозами синдрома раздраженного кишечника или бессимптомных дивертикулов ободочной кишки.

Для количественной оценки состава пристеночной микробиоты у больных язвенным колитом при колоноскопии брали биоптаты слизистой оболочки левых отделов толстой кишки, а также дополнительно биоптаты из правых отделов толстой кишки при левостороннем поражении. Для изучения просветной микробиоты использовали образцы фекалий. У пациентов группы сравнения для определения состава мукозного микробиома были взяты биоптаты слизистой оболочки неизмененных левых отделов толстой кишки.

Биологический материал помещали в пробирку типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл, содержащую транспортную среду для ПЦР исследований, и маркировали. Биологические образцы замораживали, хранили при -20°C и доставляли в лабораторию с соблюдением правил транспортировки.

ПЦР диагностика исследуемых образцов проводилась на базе ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России с использованием детектирующего амплификатора ДТпрайм (производитель ООО «ДНК-Технология», Россия), обеспечивающего проведение ПЦР с автоматической регистрацией результатов в режиме реального времени. Изучали состав и проводили количественную оценку пристеночной

и просветной микробиоты.

В образцах определяли следующие параметры: 1) общая бактериальная масса (ОБМ) – показатель, по которому можно судить об общем количестве бактерий, присутствующих в данной пробе; 2) абсолютные значения показателей, которые зависят от техники взятия биоматериала и способа выделения ДНК и представлены в виде десятичного логарифма (log); 3) относительные значения показателей микробного состава, которые отражают количество конкретных микроорганизмов по отношению к ОБМ и применяются для более точного анализа. Например, ОБМ составляет 6,0 log, абсолютный показатель микроорганизма – 5,7 log; относительный показатель $(5,7 \log - 6,0 \log) = -0,3 \log$. Количество ДНК искомого микроорганизма в образце принято выражать в геном-эквивалентах (ГЭ/обр.), которое пропорционально количеству микроорганизма.

Статистическая обработка результатов выполнена с использованием пакета прикладной программы Statistica 12.0. Качественные признаки представлены в виде абсолютных и относительных показателей. Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. Для распределения, отличающегося от нормального, вычисляли среднее значение, стандартное отклонение, медиану (Me) и интерквартильный размах (25-й и 75-й процентиль). Данные представлены в виде Me (25%;75%). Для оценки достоверности различий непараметрических показателей использовали U-критерий Манна-Уитни. Для исследования взаимосвязи двух переменных применяли коэффициент корреляции Пирсона (r). Статистически достоверными считали значения при $p < 0,05$.

Результаты

В исследование были включены 70 пациентов с язвенным колитом (43 женщины и 27 мужчин; средний возраст – $40,0 \pm 14,4$ лет) (табл. 1). Средняя длительность анамнеза язвенного колита – $7,2 \pm 7,0$ лет. Тотальное поражение диагностировано у 55 (78,6%) больных, левостороннее – у 15 (21,4%). Хроническое рецидивирующее течение язвенного колита наблюдалось у 29

ТАБЛИЦА 1. Характеристика пациентов с язвенным колитом (n=70)

Показатели	Значение
Женщины, n (%)	43 (61,4)
Средний возраст, годы	$40,0 \pm 14,4$
Длительность анамнеза, годы	$7,2 \pm 7,0$
Протяженность поражения, n (%)	
тотальное	55 (78,6)
левостороннее	15 (21,4)
Течение заболевания, n (%)	
острое	3 (4,3)
хроническое рецидивирующее	29 (41,4)
хроническое непрерывное	38 (54,3)
Эндоскопическая активность, n (%)	
ремиссия	18 (25,7)
минимальная	31 (44,3)
умеренная	18 (25,7)
выраженная	3 (4,3)
Лечение, n (%)	
5-АСК	33 (47,1)
5-АСК + ГКС	10 (14,3)
5-АСК + АЗА	15 (21,4)
ГИБП + АЗА	12 (17,1)

Примечание: 5-АСК – 5-аминосалициловая кислота, ГКС – глюкокортикостероиды, АЗА – азатиоприн, ГИБП – генно-инженерные биологические препараты

ТАБЛИЦА 2. Систематика микроорганизмов, выделенных 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	<i>M. indolicus</i>	
					Lachnospiraceae	Blautia	<i>C. (Blautia) coccoides gr</i>	
					Peptostreptococcaceae	Clostridioides unclassified	<i>C. difficile gr</i>	
					Ruminococcaceae	Ruminococcaceae	<i>C. leptum gr+</i>	
							<i>C. leptum gr-</i>	
				Erysipelotrichia	Erysipelotrichales	Erysipelotrichaceae		
	Fusobacteria	Negativicutes		Veillonellales	Veillonellaceae	Dialister		
						Megasphaera		
					Allisonella			
					Veillonella			
					Anaerococcus spp.			
			Tissierellia	Tissierellales	Peptoniphilaceae			
		Fusobacteriia	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae				
Proteobacteria		Betaproteobacteria	Burkholderiales	Sutterellaceae	Sutterella wadsworthensis			
		Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas spp.			
			Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Escherichia	<i>E. coli</i>		
	Deltaproteobacteria	Desulfovibrionales	Desulfovibrionaceae	Desulfovibrio				
	Epsilonproteobacteria	Campylobacteriales	Helicobacteraceae	Helicobacter spp.				
			Campylobacteriaceae	Campylobacter spp.				
	Oligoflexia	Bdellovibrionales	Bdellovibrionaceae	Bdellovibrio				
Verrucomicrobia	Verrucomicrobiae	Verrucomicrobiales	Akkermansiaceae	Akkermansia	<i>A. muciniphila</i>			
Archaea	Euryarchaeota	Methanobacteria	Methanobacteriales	Methanobacteriaceae	Methanobrevibacter			

(41,4%) пациентов, хроническое непрерывное — у 38 (54,3%), острое — у 3 (4,3%). Эндоскопическую активность заболевания оценивали на основании классификации Schroeder. Ремиссия язвенного колита выявлена у 18 (25,7%) больных, минимальная активность — у 31 (44,3%), умеренная — у 18 (25,7%), выраженная — у 3 (4,3%).

Группу сравнения составили 50 пациентов (30 женщин и 20 мужчин, средний возраст $54,5 \pm 13,6$ лет). У 26 (52,0%) из них при эндоскопии диагностировали бессимптомные дивертикулы ободочной кишки, а у 24 (48,0%) — синдром раздраженного кишечника.

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 (филотип Euryarchaeota). Систематика и распределение микроорганизмов в иерархическом порядке согласно таксономическим группам выполнены с использованием базы данных Национального центра биотехнологической информации США (табл. 2) [5].

Общая бактериальная масса в образцах фекалий пациентов с язвенным колитом составила $6,55 \log$ (ГЭ/обр.). Основу просветной микробиоты в основной группе составили представители типа Firmicutes (46,7%), доля которых в 2 раза превышала таковую Bacteroidetes

(21,7%) (рис. 1). Главными бактериями фекального микробного сообщества были Bacteroides spp., Clostridium leptum group+ и Clostridium coccoides group, а также Streptococcus spp, Clostridium leptum group-, Erysi pelotrichaceae, Veillonellaceae (Dialister + Alisonella + Megasphaera + Veillonella), Parabacteroides spp. и Alistipes spp. (рис. 2). Далее по численности расположились представители типа Proteobacteria (19,5%) с основной бактерией E. coli и типа Actinobacteria (10,1%), включающие Bifidobacterium spp. и Coriobacteriia. Филотипы Verrucomicrobia (1,4%), Fusobacteria (0,5%) и Eury arc haeota (0,1%) имели

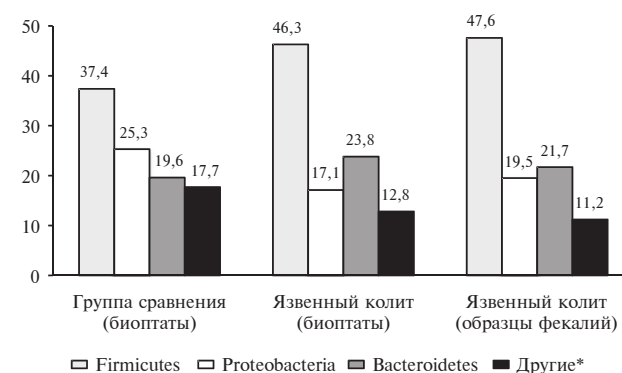


Рис. 1. Распределение (%) типов микроорганизмов в полученных образцах. *Другие: Actinobacteria, Fusobacteria, Verrucomicrobia, Euryarchaeota

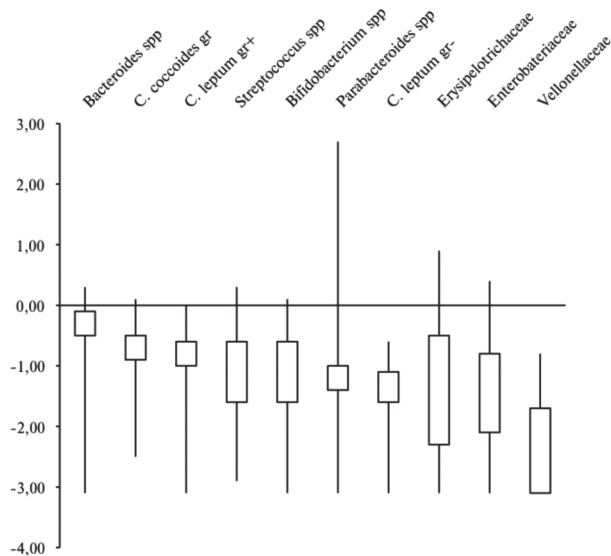


Рис. 2. Относительное количество микроорганизмов, нормированное на ОБМ, в составе фекальной микробиоты пациентов с язвенным колитом

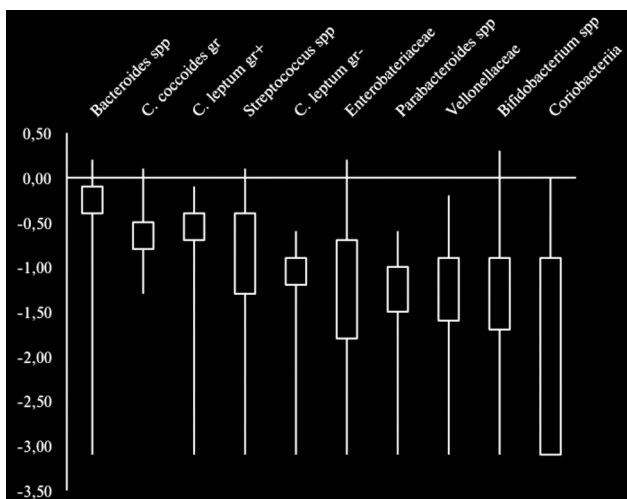


Рис. 3. Относительное количество микроорганизмов, нормированное на ОБМ, в составе пристеночной микробиоты пациентов с язвенным колитом

наименьшее представительство (рис. 1).

Согласно филотипической принадлежности бактерии в образцах слизистой оболочки толстой кишки при язвенном колите расположились следующим образом в порядке убывания: *Firmicutes* (46,3%), *Bacteroidetes*

(23,8%), *Proteobacteria* (17,1%), *Actinobacteria* (9,9%), *Fusobacteria* (1,8%) и *Verrucomicrobia* (1,1%) (рис. 1). Общая бактериальная масса составила 4,47 log (ГЭ/обр.).

Относительное количество микроорганизмов, нормированное на ОБМ, в составе фекальной и пристеночной микробиоты пациентов с язвенным колитом приведено на рис. 2 и 3. В составе пристеночного микробиома пациентов основной группы преобладали *Bacteroides* spp., *Clostridium coccoides* group, *Clostridium leptum* group+, *Streptococcus* spp, *Clostridium leptum* group+ (рис. 3).

При сравнении бактериального состава пристеночной (биоптаты толстой кишки) и просветной (образцы фекалий) микробиоты пациентов с язвенным колитом существенных различий по основным представителям не выявили ($p > 0,05$).

На предыдущем этапе исследования у пациентов с язвенным колитом не выявлено статистически достоверной разницы состава пристеночной микробиоты в зависимости от течения заболевания, протяженности поражения толстой кишки, а также между пораженным и непораженным участком толстой кишки при левосторонней локализации воспалительного процесса ($p > 0,05$) [6].

Эндоскопическая активность воспалительных заболеваний кишечника играет важную роль в оценке тяжести атаки заболевания, определении дальнейшей тактики ведения и лечения пациента. Микробный состав у пациентов с ремиссией воспалительного процесса был более разнообразным по сравнению с таковым у больных с минимальной и умеренной активностью ($p < 0,05$) и не отличался от состава микробиоты у пациентов с выраженной активностью. Количество *Clostridium leptum* group+, *Streptococcus* spp. и *Clostridium coccoides* group было достоверно снижено в ремиссии заболевания по сравнению с таковым при минимальной активности язвенного колита ($p < 0,05$). Количество *Bacteroides* spp. возросло при увеличении активности заболевания ($p < 0,05$), в то время как количество бактерий семейства *Erysipelotrichaceae* достоверно уменьшалось ($p < 0,05$) (табл. 3). При анализе количества остальных бактерий значимых различий не выявлено.

C-реактивный белок является основным лабораторным маркером воспалительного процесса при язвенном колите. С содержанием C-реактивного белка отрицательно коррелировало только количество представителей семейства *Erysipelotrichaceae* ($r = -0,313$, $p = 0,008$).

ТАБЛИЦА 3. Сравнение состава пристеночной микробиоты пациентов с язвенным колитом в зависимости от эндоскопической активности (разница log (ГЭ/обр.) группы микроорганизмов и ОБМ)

	Эндоскопическая ремиссия (1)	Минимальная активность (2)	Умеренная активность (3)	Выраженная активность (4)	p1-2	p1-3	p1-4	p2-3	p2-4	p3-4
ОБМ	4,83	4,27	4,42	4,63	0,02	0,05	0,62	0,88	0,49	0,51
<i>Clostridium leptum</i> gr+	-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</i> spp.	-1,16 (-1,50;-0,60)	-0,86 (-1,30;-0,30)	-0,86 (-1,10;-0,60)	-1,00 (-1,40;-0,60)	0,04	0,10	0,73	0,66	0,45	0,69
<i>Clostridium coccoides</i> gr	-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>Bacteroides</i> spp.	-0,61 (-0,90;-0,20)	-0,22 (-0,10; 0,00)	-0,17 (-0,30; 0,00)	-0,40 (-0,70;-0,10)	0,01	0,01	0,15	0,03	1,00	0,19
<i>Erysipelotrichaceae</i>	-1,59 (-1,90;-1,20)	-1,74 (-2,10;-1,30)	-3,01 (-3,10;-3,10)	-2,90 (-3,10;-2,70)	0,63	0,00	0,01	0,00	0,06	0,23

ТАБЛИЦА 4. Сравнение состава пристеночной микробиоты пациентов с язвенным колитом и группы сравнения (разница log (ГЭ/обр.) группы микроорганизмов и ОБМ)

	Язвенный колит	Группа сравнения	p
ОБМ	4,47	5,01	0,0000
<i>Clostridium leptum</i> gr+	-0,64 (-0,70;-0,40)	-0,99 (-0,80;-1,10)	0,0000
<i>Streptococcus</i> spp.	-0,94 (-1,30;-0,40)	-1,80 (-1,50;-2,10)	0,0000
<i>Clostridium coccoides</i> gr	-0,63 (-0,80;-0,50)	0,02 (0,20; -0,10)	0,0000
<i>Clostridium difficile</i> gr	-2,29 (-2,70;-1,90)	-2,12 (-1,60;-2,50)	0,0804
<i>Bacteroides</i> spp.	-0,39 (-0,40;-0,10)	-0,72 (-0,40;-1,00)	0,0000
<i>Bifidobacterium</i> spp.	-1,40 (-1,70;-0,90)	-3,12 (-2,20;-4,30)	0,0000
<i>Methanobrevibacter</i> spp.	-3,09 (-3,10;-3,10)	-4,34 (-3,90;-5,20)	0,0000
<i>Parabacteroides</i> spp.	-1,33 (-1,50;-1,00)	-1,53 (-1,30;-1,70)	0,0001
<i>Alistipes</i> spp.	-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</i> spp.	-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</i> spp.	-2,96 (-3,10;-3,10)	-4,36 (-3,50;-5,20)	0,0000
<i>Staphylococcus</i> spp.	-2,43 (-3,10;-1,90)	-4,55 (-4,30;-5,20)	0,0000
<i>Anaerococcus</i> spp.	-2,90 (-3,10;-3,10)	-4,97 (-4,70;-5,20)	0,0000
<i>Helicobacter</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+</i>	-1,36 (-1,60;-0,90)	-1,80 (-1,50;-1,90)	0,0000
<i>Megasphaera+Veillonella</i>			
<i>Pseudomonas</i> spp.	-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</i> spp.	-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</i> spp.	-1,71 (-3,10;-0,70)	-1,67 (-0,60;-2,10)	0,5690
<i>Clostridium leptum</i> gr-	-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

У пациентов как основной группы, так и группы сравнения в пристеночной микробиоте преобладали представители типа *Firmicute*. При язвенном колите в наибольшем количестве в образцах слизистой оболочки толстой кишки были выявлены бактерии типа *Bacteroidetes* рода *Bacteroides* и в меньшем количестве – *Clostridium leptum* group+, *Streptococcus* spp. и *Clostridium coccoides* group. Количество *Clostridium coccoides* group было снижено при наличии воспаления (p=0,0000). Представители семейства *Veillonellaceae* (*Dialister* + *Alisonella* + *Megasphaera* + *Veillonella*) преобладали в образцах слизистой оболочки толстой кишки при язвенном колите (p=0,0000). Количество *Clostridium difficile* group, *Escherichia coli* и *Akkermansia muciniphila* достоверно не отличалось в двух группах (табл. 4). Вероятно, данные микроорганизмы не принимают активного участия в воспалительном ответе при язвенном колите.

Обсуждение

Данные об изменении соотношения филотипов бактерий при ВЗК в целом и при язвенном колите в частности несколько противоречивы. В достаточно крупном исследовании D. Frank и соавт. [7], опубликованном в 2007 г., было проведено 16S секвенирование рНК в образцах биоптатов толстой кишки у 68 пациентов с

болезнью Крона, 61 пациента с язвенным колитом и 61 пациента контрольной группы. У пациентов с ВЗК выявлено увеличение количества представителей типа *Proteobacteria* и снижение количества *Firmicutes* и *Bacteroidetes*. В нашем исследовании в составе пристеночной и просветной микробиоты при язвенном колите преобладали три типа бактерий: *Firmicutes*, *Bacteroidetes* и *Proteobacteria*. При этом состав фекальной и пристеночной биоты отличался незначительно.

Неоднозначны данные об участии бактерий рода *Bacteroides* в развитии воспаления. Представители этого рода, вероятно, связаны с деградацией муцина и усиленным воспалительным ответом слизистой оболочки. В предыдущих исследованиях было выявлено увеличение количества представителей рода *Bacteroides* в биоптатах толстой кишки при язвенном колите по сравнению с контрольной группой [8,9]. Согласно последним данным, роду *Bacteroides* отводится значительная роль в формировании воспалительного ответа. A. Altomare и соавт. [10] предложили использовать увеличение количества *Bacteroides* в биоптатах толстой кишки в качестве биомаркера ВЗК. В нашем исследовании количество представителей рода *Bacteroides* в биоптатах толстой кишки пациентов основной группы превышало таковое в группе сравнения (p<0,05). Полученные данные подтверждают, что увеличение количества бактерий этого рода в биоптатах толстой кишки и образцах фекалий может быть биомаркером язвенного колита.

О роли представителей класса *Bacilli* (тип *Firmicutes*) в развитии воспаления информации несколько меньше. F. Imhann и соавт. [9] показали, что при язвенном колите повышено содержание представителей семейств *Enterococcaceae* и *Lactobacillaceae*. В исследовании Lo Presti и соавт. [11] выявлено изменение количества *Streptococcus* в составе микробиоты толстой кишки при ВЗК. О возможном участии *Streptococcus* в развитии воспаления свидетельствуют также результаты других исследований, в которых выявлено взаимодействие стрептококковых факторов вирулентности с иммунными клетками, вызывающими воспалительный ответ в различных органах. Мы показали, что в составе пристеночной биоты при язвенном колите содержание *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Lactobacillus* и *Streptococcus* достоверно превышает таковое в группе сравнения.

Информации о представителях семейства *Veillonellaceae* в литературе немного. Altomare и соавт. [10] выявили статистически значимое увеличение содержания *Veillonella dispar* в пристеночной микробиоте у пациентов с ВЗК независимо от локализации и активности заболевания. В нашем исследовании содержание представителей семейства *Veillonellaceae* (*Dialister* + *Alisonella* + *Megasphaera* + *Veillonella*) в слизистой оболочке толстой кишки также было достоверно повышено при язвенном колите.

Многие авторы говорят о важной роли типа *Proteobacteria* и увеличении его содержания 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 и соавт. даже рассматривают *Enterobacteriaceae* в образцах стула как биомаркер ВЗК [10]. Однако во все эти исследования включали пациентов как с язвенным колитом, так и болезнью Крона. Вероятно, поэтому в нашем исследовании, в котором принимали участие только пациенты с язвенным колитом, были получены иные результаты. Тип *Proteobacteria* в составе пристеночной биоты занимал лишь третье место после *Firmicutes* и *Bacteroidetes*. Содержание представителей семейства *Enterobacteriaceae* и рода *Desulfovibrio* было достоверно снижено при язвенном колите, в то время как количество *E. coli* и *Sutterella wadsworthensis* достоверно не отличалось от контроля.

Таким образом, полученные нами результаты не противоречат опубликованному ранее общемировому данным и позволяют дополнить и уточнить имеющуюся информацию, так как наше исследование было выполнено на выборке пациентов с язвенным колитом.

Заключение

В данной работе проведена комплексная оценка микробного состава как полостной, так и пристеночной биоты с помощью ПЦР в режиме реального времени при различных протяженности поражения толстой кишки, течения, эндоскопической активности и схемах лечения язвенного колита в российской популяции. Новая информация об изменениях микробиоты толстой кишки необходима для лучшего понимания патогенеза язвенного колита и в будущем может стать основой для разработки оптимальных схем обследования и консервативного лечения пациентов.

Конфликт интересов: нет.

1. Халиф И.Л., Шельгин Ю.А. (ред.). Атлас. Воспалительные заболевания кишечника: диагностика и лечение. СПб: Гиппократ; 2017, 116 с. [Atlas. Inflammatory Bowel Disease: Diagnosis and Treatment. Khalif IL, Shelygina JA (ed). SPb: 2017. 116 s. (In Russ.)].
2. Лоранская И.Д., Халиф И.Л., Болдырева М.Н. и др. Характеристика микробиома при воспалительных заболеваниях кишечника. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология 2018;153(5):104–11 [Loranskaya ID, Khalif IL, Boldyreva MN, et al. Characteristic of microbiome in inflammatory bowel disease. Experimental and Clinical Gastroenterology 2018;153(5):104–11 (In Russ.)].
3. Clemente JC, Ursell LK, Parfrey LW, et al. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. Cell 2012;148:1258–70.
4. Ивашкин В.Т., Шельгин Ю.А., Халиф И.Л. и др. Клинические рекомендации российской гастроэнтерологической ассоциации и ассоциации колопроктологов России по диагностике и лечению язвенного колита. Колопроктология 2017;1:6–30 [Ivashkin VT, Shelygin JA, Halif IL, et al. Clinical guide of Russian association of gastroenterology and Russian association of coloproctology on diagnostics and treatment of ulcerative colitis. Koloproktologia 2017;1:6–30 (In Russ.)].
5. National Center for Biotechnological Information, NCBI [Internet]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>.
6. Купаева В.А., Лоранская И.Д., Болдырева М.Н. и др. Особенности микробиоты кишечника при язвенном колите. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология 2020;179(7). [Kupaeva VA, Loranskaya ID, Boldyreva MN, et al. Features of intestinal microbiota in ulcerative colitis. Experimental and Clinical Gastroenterology 2020;179(7). (In Russ.)].
7. Frank DN, Amand AL, Feldman RA, et al. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. Proc Natl Acad Sci USA 2007;104(34):13780–85.
8. Kabeerdoss J, Sankaran V, Pugazhendhi S, et al. *Clostridium leptum* group bacteria abundance and diversity in the fecal microbiota of patients with inflammatory bowel disease: a case-control study in India. BMC Gastroenterol 2013;13:20.

9. Imhann F, Vich Vila A, Bonder MJ, et al. Interplay of host genetics and gut microbiota underlying the onset and clinical presentation of inflammatory bowel disease. Gut 2018;67(1):108–19.
10. Altomare A, Putignani L, Del Chierico F, et al. Gut mucosal-associated microbiota better discloses inflammatory bowel disease differential patterns than fecal microbiota. Dig Liver Dis 2019;51(5):648–656.
11. Lo Presti A, Zorzi F, Del Chierico F, et al. Fecal and mucosa microbiota profiling in irritable bowel syndrome and inflammatory bowel disease. Front Microbiol 2019;10:1655.

Intestinal and fecal microbiome in patients with ulcerative colitis

V.A. Kupaeva^{1,2}, I.D. Loranskaya¹, M.N. Boldyreva⁴

¹Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, ²State Scientific Centre of Coloproctology, Moscow, ³NRC Institute of Immunology FMBA of Russia, Moscow, ⁴LLC “DNA Technology”, Moscow

Aim. To study mucosal and fecal microbiota in patients with ulcerative colitis (UC) in the Russian population.

Material and methods. Seventy patients with UC (43 females and 27 males, mean age of 40±14.4 years) were enrolled in this study. The average duration of the disease was 7.3±6.9 years. Extensive colitis was diagnosed in 55 (78.6%) patients and left-sided colitis in 15 (21.4%) patients. Three (4.3%) patients presented with acute UC, 29 (41.4%) patients with relapsing course of the disease and 38 (54.3%) patients with remitting course. The endoscopic activity of UC was evaluated by Schroeder classification. Eighteen patients (25.7%) had inactive disease, whereas 31 (44.3%), 18 (25.7%) and 3 (4.3%) patients showed mild, moderate and severe activity, respectively. Microbiota composition was determined in mucosal biopsies and fecal samples by real-time polymerase chain reaction (PCR) in all patients with UC and 50 non-IBD (inflammatory bowel disease) patients.

Results. Three phylum of bacteria, that is, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, and *Proteobacteria*, predominated in the mucosal and fecal microbiota in UC patients. Mucosal and fecal microbiota composition differed slightly. In the microbiota of UC patients, compared with non-IBD patients' group, *Bacteroides* significantly predominated and can be considered as biomarkers in biopsy and fecal samples. In left-sided UC, no significant difference was found between inflamed and not inflamed tissue samples ($p>0.05$). No statistical difference in mucosal microbiome was observed between patients with remitting or relapsing course of the disease ($p>0.05$). In patients with a higher endoscopic activity of UC, there was an increase in *Bacteroides* spp. count and decrease in *Erysipelotrichaceae* count ($p<0.05$).

Conclusion. Our findings suggest that the representatives of *Bacteroides* spp., both in biopsies and in fecal samples, can be considered as a biomarker of ulcerative colitis.

Keywords. Ulcerative colitis, microbiota, microbiome, real-time polymerase chain reaction.

Conflict of interest: none declared.

Correspondence to: V. Kupaeva, 2/1 Barrikadnaya ul., Moscow, 123995, Russian Federation. victoriakupavea@gmail.com.

To cite: Kupaeva VA, Loranskaya ID, Boldyreva MN In testinal and fecal microbiome in patients with ulcerative colitis. Kliniches kaya farmakologiya i terapiya = Clin Pharmacol Ther 2020;29(3):49–54 (In Russ.). DOI 10.32756/0869-3-49-54.