

## ДИАГНОСТИКА НАРУШЕНИЙ МИКРОБИОМА ПРИ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА

Логинов В.А.

ФГБУ «Учебно-научный медицинский центр» Управления делами Президента РФ,  
Москва

УДК: 616.33/34-008.87-07

В последнее время отмечается устойчивый рост интереса к изучению микробиома человеческого организма. Все больше внимания уделяется принципам взаимодействия микробиоты и организма-хозяина, благодаря научным изысканиям в этой области, заметно расширились представления о функциональном и эволюционном значении этих связей.

По словам Бретта Финлея, микробиолога из университета Британской Колумбии в Ванкувере, человека можно назвать «суперорганизмом», в котором собственно человеческих клеток не более 10%. Все остальное – это бактерии, обитающие на поверхности кожи, в кишечнике, определяется как микробиом. Микробиом – это масса, точнее, сообщество симбионтов и антагонистов, комьюнити микроорганизмов, населяющих внутренности и поверхность человеческого тела.

Исследования последних лет показали большое значение качественного и количественного состава кишечной части микробиома, симбионтной микрофлоры для нормального функционирования человека в различные возрастные периоды, роль сформировавшихся взаимоотношений между макроорганизмом и микробным сообществом пищеварительного тракта, а также его изменений (первичных или вторичных) при патологии [1, 2].

В норме в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ) человека определяют более 500 видов микроорганизмов. Количественный и видовой состав проксимальных и дистальных отделов кишечника значительно различается. В верхних отделах тонкой кишки количество микроорганизмов составляет примерно 10<sup>2</sup> колониеобразующих единиц/мл (КОЕ/мл), популяция представлена преимущественно грамположительными аэробными видами, в дистальных отделах количество микробных тел увеличивается на несколько порядков, преобладают грамотрицательные анаэробные бактерии. У здоровых людей нормальная микрофлора кишечника поддерживается следующими физиологическими механизмами: уровнем желудочного pH, желчью, секретом поджелудочной железы, пропульсивной активностью моторики кишечника, а также структурной целостностью стенок ЖКТ. Нарушение любого из этих защитных механизмов,

### ДИАГНОСТИКА НАРУШЕНИЙ МИКРОБИОМА ПРИ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА

Loginov V.A.

обусловленного развитием заболевания ЖКТ или других органов, может вызывать изменение состава микробиоты, типичного для конкретного отдела кишечной трубки. Наибольшие трудности вызывает изучение измененного микробного состава тонкой кишки, в клинической практике получившее название синдрома избыточного бактериального роста в тонкой кишке (СИБР) [1, 3].

СИБР можно определить как полиэтиологичный синдром, характеризующийся увеличением количества нормальной микробной флоры и/или появлением патологической микрофлоры в тонкой кишке, что приводит к развитию нарушений функций пищеварительного конвейера [4].

Существуют прямые и непрямые методы оценки микробного состава отделов кишечника: бактериологические, гистохимические, морфологические, молекулярно-генетические, комбинированные методы исследования биоматериала, нагрузочные пробы и др. Однако эти методы, находящиеся в арсенале крупных лечебных или исследовательских учреждений, не могут быть полностью использованы в клинической практике.

«Золотым стандартом» диагностики СИБР является посев аспирата тонкокишечного содержимого на питательную среду [5]. Колонии микроорганизмов, выросшие на питательных средах, подвергаются родовой и видовой идентификации для определения их таксономической принадлежности и чувствительности к антибиотикам. Для этого оценивают возможности роста бактерий в аэробных и анаэробных условиях, их отношения к окраске по Граму, характеру роста на селективных питательных средах и угнетения под действием антибактериальных препаратов и др.

Данный метод имеет ряд общепринятых издержек: длительность получения результатов, использование дорогостоящих питательных сред, зависимость от соблюдения сроков транспортировки и качества сред, преимущественное определение внутрипросветной флоры, и наряду с ней транзитной (пассажной), неоднородность выделения микроорганизмов из разных отделов кишки, затруднение в культивировании анаэробных микроорганизмов и определении их видовой и штаммовой принадлежности, невозможности воспроизведения

нативных условий среды обитания микроорганизмов, низкая воспроизводимость результатов и др. Однако избыточный бактериальный рост может наблюдаться и в дистальных участках тонкой кишки, недостижимых для взятия материала [6, 7], при верхней эндоскопии. В этих случаях возможно использовать интестиноскопию, однако исследование отличается высокой сложностью исполнения, а также возможностью возникновения осложнений. Не всегда однократное эндоскопическое исследование оказывается успешным, ввиду того что возможна избыточная бактериальная контаминация лишь части тонкой кишки, которая вполне может быть труднодоступна для аспирации [8, 9]. Из-за «громоздкости» интестиноскопии с аспирацией содержимого тонкой кишки ее проводят только в крупных диагностических или научно-исследовательских центрах. Но все вышперечисленное не дает полного представления о населяющей гликокаликс автохтонной микрофлоре. Довольно часто забывают о низкой чувствительности данного метода и возможности получения ложноположительных и ложноотрицательных результатов. Кроме этого возможности бактериологического метода ограничивают небольшим количеством определяемых видов микроорганизмов – не более 30.

К непрямым методам диагностики СИБР относятся тесты, основанные на изучении метаболитов микрофлоры. Это  $^{14}\text{C}$ - или  $^{13}\text{C}$ -гликохолатный,  $^{14}\text{C}$ -D- или  $^{13}\text{C}$ -D-ксилозные дыхательные тесты.

При работе предпочтение отдается стабильному изотопу  $^{13}\text{C}$ , так как радионуклид  $^{14}\text{C}$  предполагает значительное усложнение технических условий для проведения исследования. Несомненным достоинством метода является полное отсутствие противопоказаний. Это обстоятельство особенно важно при обследовании детей любого возраста, беременных, больных в тяжелом состоянии.

Метод неинвазивен, возможно применение в амбулаторных условиях. Стоит отметить и то, что проводить исследование собранных проб можно через несколько дней после получения, что исключает необходимость наличия прибора в каждом учреждении, следовательно, возможна централизация. Условиями, резко ограничивающими использование изотопно-меченых методов изучения метаболитов кишечной микробиоты – это строгие требования к размещению и оборудованию изотопных лабораторий, необходимость пищевых субстратов (лактозы, глюкозы, лактозы и др.) меченых короткоживущими изотопами. Наиболее часто применяемыми измерительными приборами при проведении дыхательных тестов с использованием стабильных изотопов в настоящее время являются масс-спектрометры, инфракрасные спектрометры и лазерные анализаторы. Хотя масс-спектрометры обладают высокими аналитическими характеристиками, их высокая цена ограничивает широкое внедрение дыхательных тестов в клиническую практику. Для диагностики СИБР может быть использо-

ван  $^{13}\text{C}$ -ксилозный дыхательный тест, в основе которого лежит увеличение скорости окисления углерода, входящего в состав ксилозы, в присутствии грамтрицательных аэробных бактерий. У пациентов с избыточной инфицированностью кишечника скорость метаболизма углерода возрастает приблизительно в 2 раза [10, 11]. Наибольшая скорость метаболизма достигается через 2,5 час. у здоровых людей. Для пациентов с патологией тонкой кишки отмечены сдвиги пика скорости метаболизма, типична картина существенного (до 2 раз) увеличения скорости метаболизма.

Относительно новым изотопным дыхательным тестом в исследовании кишечника является  $^{13}\text{C}$ -уреидно-лактозный дыхательный тест. Уреид лактозы  $^{13}\text{C}$  используют в качестве средства определения времени транзита через кишечник. При таком использовании объективные результаты могут быть получены при условии, если бактерии в слепой кишке сначала подпитывать небольшими дозами помеченного уреида лактозы, а затем с введением помеченного уреида лактозы изучается метаболизм данного субстрата. Двухэтапная технология использования немеченого и меченого уреида значительно удлиняет и удорожает исследование.

Существенно более точной методикой является полимеразная цепная реакция (ПЦР), совмещенная с электрофорезом в геле, который предусматривает термальную или химическую сепарацию цепи ДНК с последующим электрофорезом. Этот метод позволяет надежно дифференцировать изменение в популяции микроорганизмов, но, тем не менее, он медленный, так как идентификация видов микроорганизмов требует выполнения полного цикла. Количественная ПЦР позволяет определять малые количества бактерий, причем с оценкой их видовой, родовой принадлежности, при использовании специфических праймеров. Наиболее точный метод – это секвенирование 16s-единиц рибосомальной ДНК бактериальных тел, который дает возможность дать развернутую характеристику индивидуальных видов микроорганизмов. Но этот метод, как и ПЦР с электрофорезом в геле, очень трудоемкий и дорогой, и применяется только в отдельных центрах с научной целью.

Определить состав флоры, составляющей кишечный микробиом, и ее активность позволяет получившее широкое распространение исследование короткоцепочечных жирных кислот (КЖК) в различных биологических субстратах. КЖК, являясь продуктами жизнедеятельности аэробных и анаэробных популяций микроорганизмов [12, 13], могут быть использованы для исследования состояния микробного состава различных биотопов макроорганизма, а также для оценки эффективности лечения, в том числе и для индивидуального подбора терапии [14, 15].

Короткоцепочечные жирные кислоты влияют на адгезию и размножение патогенной и условно-патогенной флоры, участвуют в регуляции ионного обмена, микроциркуляции, секретируют слизи, активируют местный

иммунитет, восполняют энергетические потребности эпителия, влияют на пролиферацию и дифференцировку энтеро- и колоноцитов и, являясь метаболитами сахаролитической и протеолитической аэробной и анаэробной микрофлоры, могут служить отображением различных процессов, происходящих в кишечнике. Для диагностики могут быть использованы различные биологические субстраты (дуоденальное содержимое или кал).

Метод исследования КЖК с использованием газожидкостного хроматографического анализа (ГЖХ-анализа) обладает высокой чувствительностью и специфичностью в отношении верификации родовой принадлежности микроорганизмов, простотой воспроизведения, возможностью быстрого получения данных. Определение абсолютного содержания индивидуальных кислот в смеси осуществляется как путем расчета площадей хроматографических пиков методом «треугольника», так и методом компьютерной обработки хроматограмм.

Определяют относительное содержание (т.е. отношение концентрации данной кислоты к общей суммарной концентрации кислот) уксусной, пропионовой, масляной кислот, значения окислительно-восстановительного потенциала среды, выраженного значениями анаэробного индекса (АИ), относительного суммарного содержания изокилот и ряд других параметров. По результатам исследования делают вывод о состоянии биотопа тонкой или толстой кишки. Повышение или снижение абсолютного содержания кислот свидетельствует о повышении или снижении численности и активности микроорганизмов различных отделов кишечной трубки. Качественный состав микрофлоры оценивается по профилю, т.е. по относительному содержанию кислот. Увеличение относительного содержания пропионовой и масляной кислот в качественном составе короткоцепочечных жирных кислот, отклонении значений анаэробного индекса в область резко отрицательных значений ( $< -0,600$  и менее) свидетельствует о повышении активности анаэробных популяций микроорганизмов. Данный метод технически прост, неинвазивен при исследовании микробиоценоза толстой кишки (субстрат – каловые массы), но требует забора тонкокишечного содержимого (при эндоскопическом исследовании), специального оснащения (газового хроматографа), для детального квалифицированного анализа полученных данных и заключения по исследованию требуется компьютерная обработка.

Предложена технология газовой хроматографии (фекалий) для диагностики нарушений микробиоценоза толстой кишки по изменению количества ароматических веществ: индола, скатола, фенола и крезола. Но несмотря на высокую информативность описанных хроматографических методов исследования, они не получили широкого распространения из-за их ограниченной доступности.

Альтернативными методами диагностики СИБР являются дыхательные тесты, основанные на клиренсе водорода ( $H_2$ ) в выдыхаемом воздухе. Это простые по выполнению, неинвазивные и достаточно информативные

методы, предложены около 25 лет назад для диагностики заболеваний пищеварительного тракта, в первую очередь для определения малабсорбции углеводов и избыточного бактериального роста в тонкой кишке. В настоящее время во всем мире данный диагностический метод быстро внедряется в клиническую практику.

В 2008 г. был предложен Римский консенсус по водородным тестам, в котором изложены рекомендации международных экспертов для клинической практики с перечнем показаний и методик проведения  $H_2$ -дыхательных тестов при заболеваниях ЖКТ [16].

В норме определяется очень малое количество ионов водорода в выдыхаемом воздухе, т.к. эукариотные клетки организма человека не способны образовывать водород. При диагностике СИБР в качестве донатора водорода применяется дисахарид лактулоза. Лактулоза в обычных условиях подвергается бактериальному ферментативному процессу анаэробными бактериями в толстой кишке, при этом выделяемый водород всасывается в кровеносное русло, а затем выделяется через легкие, что и фиксирует прямопоказывающий прибор-регистратор. Из кровотока  $H_2$  практически полностью удаляется за один пассаж через легкие, таким образом, уровень экскреции водорода эквивалентен его абсорбции в кишечнике. Около 14–20%  $H_2$ , высвобождаемого в кишечнике, экскретируется через легкие. Таким образом, концентрация водорода в выдыхаемом воздухе может быть мерой его кишечной продукции [17]. Измерение концентрации водорода в выдыхаемом воздухе позволяет оценить количество и уровень метаболической активности анаэробных бактерий в желудочно-кишечном тракте. Время, за которое концентрация водорода повышается при проведении дыхательного теста, указывает на отдел кишечника, в котором происходят процессы брожения.

При наличии бактерий в тонкой кишке принятая лактулоза начинает подвергаться ферментативному процессу уже в тонкой кишке, где в норме не должны присутствовать бактерии, ферментирующие лактулозу до моносахаридов. При этом увеличение концентрации водорода в выдыхаемом воздухе может отмечаться уже через 20–30 минут после приема лактулозы.

Исследование проводится утром натощак. Вначале получают исходный образец выдыхаемого воздуха, для этого пациент делает глубокий вдох и максимальный выдох в аппарат-анализатор. Затем больной принимает внутрь 30 мл лактулозы. В течение 3-х часов каждые 20 мин. собирают образцы выдыхаемого воздуха и анализируют содержание водорода на аппарате-анализаторе. В норме количество водорода в выдыхаемом воздухе возрастает умеренно, причем пик концентрации водорода наступает через два и более часов от начала исследования. При избыточном бактериальном росте в тонкой кишке пик концентрации водорода достигается обычно в пределах первого часа.

Водородно-метановый дыхательный тест с лактулозой – это улучшенный вариант водородного дыхательно-

го теста с лактулозой, который проводится по аналогичной методике. Параллельно с водород-продуцирующей флорой метод позволяет оценить наличие избыточного роста бактериальной флоры, продуцирующей метан, что может иметь решающее значение для выбора средств лечения синдрома избыточного бактериального роста в тонкой кишке.

Одной из диагностических проблем, возникающих при проведении дыхательных тестов, является наличие двух пиков содержания водорода в выдыхаемом воздухе: ранний тонкокишечный пик при СИБР и поздний – толстокишечный. При этом время появления водородных пиков зависит от индивидуальных особенностей двигательной активности кишки. Согласно данным большинства авторов базальный уровень водорода составляет 20 промилле и более. Если через 120 мин. после употребления глюкозы уровень водорода в выдыхаемом воздухе увеличивается на 12% и более относительно исходного, то пробу оценивают как положительную, в этом случае диагностируется наличие избыточного бактериального роста в тонкой кишке [18].

Технологические и методологические аспекты водородных тестов окончательно пока не стандартизированы, поэтому изучение эффективности существующих, разработка и усовершенствование тестов во всем мире продолжается [19].

В настоящее время в метод дыхательного водородного теста с лактулозой используется для скрининговой диагностики СИБР. Метод дешев, прост в выполнении, представляет большую ценность для скрининговых исследований, особенно в амбулаторных условиях, однако большинство практикующих врачей не знакомы с диагностическими возможностями, ограничениями и недостатками технологии. Это, несомненно, сдерживает внедрение метода в клиническую практику [20].

#### Литература

- Jebba V., Nicoletti M., Schippa S. Gut microbiota and the immune system: an intimate partnership in health and disease // *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* – 2012. – Vol. 25(4). – P. 823–833.
- Маевская Е.А., Черемушкин С.В., Кривобородова Н.А., Кучерявый Ю.А. Синдром избыточного бактериального роста в тонкой кишке: от последних научных данных к рутинной практике // *Клинич. перспективы гастроэнтерол., гепатол.* – 2013. – №5. – С. 29–40.
- Белюсова Е.А. Синдром избыточного бактериального роста тонкой кишки в свете общей концепции о дисбактериозе кишечника. Взгляд на проблему. // *Фарматека.* – 2009 – № 2. – С. 8–16.
- Маевская Е.А., Черемушкин С.В., Кривобородова Н.А., Кучерявый Ю.А. Синдром избыточного бактериального роста в тонкой кишке: от последних научных данных к рутинной практике // *Клинич. перспективы гастроэнтерол., гепатол.* – 2013. – №5. – С. 29–40.
- Singh V.V., Toskes P.P. Small Bowel Bacterial Overgrowth: Presentation, Diagnosis, and Treatment // *Curr Treat Options Gastroenterol.* 2004. Vol. 7(1). P. 19–28.
- Singh V.V., Toskes P.P. Small Bowel Bacterial Overgrowth: Presentation, Diagnosis, and Treatment // *Curr. Treat. Options Gastroenterol.* – 2004. – Vol.7(1). – P. 19–28.
- Gasbarrini A., Lauritano E.C., Gabrielli M. et al. Small intestinal bacterial overgrowth: diagnosis and treatment // *Dig. Dis.* – 2007. – № 25. – P. 237–240.
- Кучерявый Ю.А., Оганесян Т.С. Синдром избыточного бактериального роста // *Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол., колопроктол.* – 2010. – №5. – С. 63–68.
- Malik B.A., Xie Y.Y., Wine E, Huynh H.Q. Diagnosis and pharmacological management of small intestinal bacterial overgrowth in children with intestinal failure // *Can. J. Gastroenterol.* – 2011. – Vol. 25(1). – P. 41–45.
- Keller J., Layer P. Intestinal function tests // *Schweiz. Rundsch. Med. Prax.* – 2005. – Vol. 94. – № 37. – P. 1433–1438.
- Dellert S.F., Nowicki M.J., Farrell M.K. et al. The 13C-xylose breath test for the diagnosis of small bowel bacterial overgrowth in children // *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* – 1997. – Vol. 25. – № 2. – P. 153–158.
- Готтшалк Г. Метаболизм бактерий // перевод с английского, М.: Мир, 1982. – С. 230.
- Шендеров Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание – М.: 1998, в 3 томах.
- Ардатская М.Д. Клиническое значение короткоцепочечных жирных кислот при патологии желудочно-кишечного тракта: дис.... д-ра мед. наук. – М., 2003. – С. 299
- Минушкин О.Н., Ардатская М.Д., Бабин В.Н., Домарадский И.В., Дубинин А.В. Дисбактериоз кишечника. // *Росс. мед. журн.* – №3. – 1999. – С. 40–45.
- Gasbarrini A., Corazza G.R., Gasbarrini G., Montalto M. 1–st Rome H2–Breath Testing Consensus Conference Working Group. Methodology and indications of H2–breath testing in gastrointestinal diseases: the Rome Consensus Conference // *Aliment. Pharmacol. Ther.* – 2009, Mar 30. – Vol. 29. – Suppl. 1. – P. 1–49.
- Levitt M.D., Donaldson R.M. Use of respiratory hydrogen (H2) excretion to detect carbohydrate malabsorption // *J. Lab. Clin. Med.* – 1970. – Vol.75. – P. 937–945.
- Bures J., Cyraný J., Kohoutová D. et al. Small intestinal bacterial overgrowth syndrome // *Wld. J. Gastroenterol.* – 2010. – Vol. 28. – P. 2978–2990.
- Передерий В.Г., Ткач С.М., Сизенко А.К., Швец О.В. Клиническое применение водородных дыхательных тестов в гастроэнтерологии // *Сучасна гастроентерологія.* – 2010. – № 4 (54). – С. 26–33.
- Плотникова Е.Ю., Борщ М.В., Краснова М.В., Баранова Е.Н. Некоторые аспекты диагностики и лечения избыточной бактериальной контаминации тонкой кишки в клинической практике // *Лечащий Врач.* – 2013. – № 2. – С. 52–56.

#### КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

e-mail: maleus.manus@gmail.com