

Е.М. БУЛАТОВА, д.м.н., профессор, Н.М. БОГДАНОВА,
ГОУ ВПО «Санкт-Петербургская государственная педиатрическая медицинская академия Росздрава», С.-Петербург

КИШЕЧНАЯ МИКРОФЛОРА – ОДИН ИЗ ФАКТОРОВ ФОРМИРОВАНИЯ ЗДОРОВЬЯ ЧЕЛОВЕКА

В статье приведен обзор современной зарубежной литературы, обобщающей результаты научных исследований о составе кишечной микрофлоры и ее влияния на здоровье человека.

На основании метода секвенирования генов 16S рибосомальной РНК амплифицированных бактериальных нуклеиновых кислот представлены наиболее часто встречаемые среди европейцев энтеротипы, освещены факторы, оказывающие влияние на формирование того или иного энтеротипа.

Показана возможная взаимосвязь кишечной микробиоты и ожирения.

Жизнь невозможна без бактерий.

L. Paster

Ключевые слова: кишечная микрофлора, секвенирование генов 16S рибосомальной РНК, энтеротипы, ожирение

Со времени открытия микробов постоянно возникал вопрос о роли и механизмах их воздействия на организм человека.

Впервые значение микрофлоры в жизни человека определил великий русский ученый, лауреат Нобелевской премии И.И. Мечников, который в своей монографии «Этюды о природе человека» изложил концептуальный взгляд на взаимоотношения человека и его микрофлоры [1]. За прошедший вековой период изучения микробной эндоэкологии человека накоплены огромные знания о ее влиянии практически на все органы и системы нашего организма. Учитывая то, что у млекопитающих ЖКТ служит основным резервуаром обитания микроорганизмов, огромное количество работ посвящено изучению их влияния на структуру слизистой оболочки кишечника, формирование и поддержание адекватного иммунного ответа, метаболические, ферментативные процессы, а также воздействию мукозальной микробиоты на экспрессию огромного числа генов [2].

Относительно недавно кишечную микрофлору, в частности бактерии толстой кишки, стали рассматривать как основную детерминанту здоровья и болезней людей [3]. Имеются доказательства того, что изменение взаимосвязи между составом кишечной микробиоты и организмом человека сопровождается развитием аллергических и иммунопатологических состояний, а также ряда заболеваний, таких как ожирение, сахарный диабет II типа, воспалительные заболевания кишечника, синдром раздраженной кишки, различные виды рака [4–10].

С современной точки зрения микробиоценоз кишечника представляет единую микроэкологическую систему организма, которая сформировалась в процессе филогенетического развития самого человека и его микробиоты и включает разнообразные по количественному и качественному составу ассоциации микроорганизмов и продукты их биохимической активности (метаболиты) [11].

Внедрение новейших методов молекулярно-генетического анализа микробной популяции существенно расширило наше представление о составе и функциях кишечной микроэкологии. Предложенный в 1999 г. метод секвенирования (определение нуклеотидной последовательности) генов 16S рибосомальной РНК амплифицированных бактерий, полученных из фекалий или биоптатов слизистой оболочки кишечника, позволил более точно идентифицировать представителей филогенетических групп микроорганизмов [12].

Установлено, что общая численность клеток интестинальной микрофлоры взрослых людей в среднем составляет 10^{13} – 10^{15} КОЕ/г, что в 10 раз превышает количество собственных клеток организма [13]. Эта огромная численность микроорганизмов представлена более чем 1 000 видами. В научных публикациях приводятся сведения о значительном варьировании флотипов (15 000–36 000), что примерно соответствует количеству бактериальных видов и требует дальнейшего уточнения [14].

В 2008 г. был запущен глобальный проект «Микробиом человека» (HMP), ставивший своей целью расшифровку генома бактерий, населяющих организм человека. Термин «микробиом» был впервые введен в 2001 г. для обозначения коллективных геномов микробиоты. Расшифровкой генома бактерий, населяющих ЖКТ, занимается европейский консорциум MetaHIT. Уже расшифровано более 3 млн генов, что примерно в 150 раз больше набора генов человека. Результаты проекта позволяют проводить дальнейшие исследования взаимосвязи этих генов, состояния здоровья человека, развития заболеваний и фенотипа [15, 16].

Группа ученых под руководством P.V. Eckburg (2005), используя молекулярно-генетический метод и анализ последовательного клонирования 16S рибосомальной РНК для идентификации мукозальной и фекальной флоры, показала, что пристеночная и просветная микрофлора включает 395 филогенетически обособленных групп микроорганизмов, из которых 244 являются абсолютно новыми. Большинство из предполагаемых новых флотипов микроорганизмов явля-

ются *Firmicutes* (род *Ruminococcus*) и *Bacteroidetes* (род *Bacteroides*), которые составляют более 90% всех представителей кишечной эндоэкологии. При этом 80% новых таксонов, выявленных при молекулярно-генетическом исследовании, относятся к некультивируемым микроорганизмам [17].

Большая международная группа ученых под руководством Agutugam M. и Raes J. (2011) из Европейской лаборатории молекулярной биологии (EMBL) сделала еще одно открытие. Они идентифицировали из огромного количества бактерий, колонизирующих ЖКТ, три доминирующих рода микроорганизмов: *Bacteroides*, *Ruminococcus*, *Prevotella*. Людей, чей кишечный биоценоз представлен микроорганизмами доминирующих родов бактерий, отнесли, соответственно, к трем энтеротипам. Каждый энтеротип имеет не только свойственный ему род бактерий, но и отличается соотношением отдельных представителей данного вида микроорганизмов. Бактерии, входящие в один из названных доминирующих родов, обладают схожими свойствами. Бактерии, принадлежащие к роду *Bacteroides*, хорошо расщепляют углеводы, в большем количестве синтезируют протеолитические ферменты и витамины (С, В₂, В₅, Н). Некоторые бактерии рода *Ruminococcus* помогают клеткам кишечника усваивать полисахара, расщепляют целлюлозу, снабжают организм фолиевой кислотой и витамином В₁, а бактерии рода *Prevotella* образуют слизь, обладают сахаролитическими свойствами, продуцируют протеазу, разрушающую IgA, производят токсичный липополисахарид [18].

Знание и учет основных свойств представителей кишечного микромира должны использоваться в профилактике заболеваний, к которым могут быть предрасположены люди с тем или иным энтеротипом. Так, дисбаланс бактерий рода *Prevotella* приводит к риску возникновения у человека язвенной болезни. Высокий уровень содержания в организме бактерий *Ruminococcus* угрожает человеку развитием инсулинорезистентности, сахарного диабета, а преобладание бактерий *Bacteroides* защищает организм от ожирения [18].

У взрослого человека состав кишечной микрофлоры индивидуален и уникален. Особенность микрофлоры каждого человека позволяет рассматривать ее как своеобразные отпечатки пальцев. При этом микрофлора здорового человека идеально адаптирована к потребностям именно организма, и поэтому ее состав достаточно стабилен и устойчив на протяжении всей жизни при максимальном колебании в концентрации отдельных микробов. По данным молекулярно-генетических исследований, состав интестинальной микрофлоры генетически связан внутри сообщества и специфичен на видовом уровне для индивидуума [19, 20]. Эта стабильность, вероятнее всего, обусловлена развитием иммунологической толерантности к контаминирующим кишечник микроорганизмам на самых ранних этапах жизни человека. Иммунологическая толерантность позволяет распознавать данные микроорганизмы как свои, в отличие от микробов, попавших в ЖКТ в старшем возрасте, когда микробиоценоз уже сформировался.

Формирование микробиома определенного энтеротипа происходит в течение всего периода раннего детства, вероятно начинаясь еще до рождения малыша. На становление энтеротипа оказывают влияние ряд факторов. Среди них можно

выделить: состояние микробиоценоза матери, ее сопутствующая соматическая и гинекологическая патология, вид родоразрешения, гестационный возраст новорожденного, оказание реанимационных пособий, время прикладывания младенца к груди матери, характер и продолжительность грудного вскармливания [3, 21]. Основными источниками микробной колонизации малыша служат вагинальная и кишечная микрофлора матери, персонал родильного дома или стационара, предметы ухода за ребенком и грудное молоко, которое с современных позиций нельзя рассматривать как стерильный субстрат [22].

■ Научными работами доказано, что грудное молоко, наряду с индигенной флорой (бифидобактерии и лактобациллы), содержит в низких титрах около 400 разновидностей непатогенных бактерий рода *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium* и др., а также значительное количество их бактериальных ДНК.

Научными работами доказано, что грудное молоко, наряду с индигенной флорой (бифидобактерии и лактобациллы), содержит в низких титрах около 400 разновидностей непатогенных бактерий рода *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium* и др., а также значительное количество их бактериальных ДНК [22–24].

При благоприятном стечении обстоятельств у младенцев на грудном вскармливании доминирующей флорой становятся лактобациллы и бифидобактерии, хотя возможно появление и других бактерий вида *Bacteroides* [25]. Особенно необходимо отметить, что у детей на грудном вскармливании, спектр бифидобактерий представлен младенческими видами: *B. longum subsp. infantis*, *B. animalis subsp. lactis*, *B. breve*. Именно младенческие виды бифидобактерий грудного молока обеспечивают формирование иммунологической толерантности, снижение активности воспалительного процесса, укрепление защитного барьера кишечника.

В целом микрофлора здорового ребенка, получающего грудь матери, не столь многообразна, как у взрослого, но она более чувствительна к воздействию неблагоприятных факторов окружающей среды и подвержена выраженной изменчивости. Чрезвычайно важно влияние факторов окружающей среды на интестинальную колонизацию детей, рожденных путем операции кесарева сечения. У этих младенцев, как показано в ряде исследований, отсрочено становление стабильной бифидофлоры, низкая идентичность бактерий рода *Bacteroides*, высокий уровень *Enterococcus faecalis*, *E. coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphyl. epidermidis* и *Staphyl. haemolyticus* [26, 27]. В результате такой микробной контаминации нарушаются процессы иммунологической адаптации, снижается защитный барьер кишечника и развивается воспаление.

По мере перехода ребенка на общий стол его кишечный микромир усложняется и становится более разнообразным, приближаясь по составу и характеру обменных процессов к

таковым в кишечной флоре взрослого человека. Одновременно повышается стабильность микробиоты. Но даже в стабильной флоре могут происходить временные трансформации, оказывающие влияние на ее функции.

Отмечено, что только долговременное изменение рациона питания преобразует состав кишечного микробиома [28]. В исследовании, проведенном De Filippo C. et al. (2010), представлен сравнительный анализ фекальной микрофлоры европейских детей, получающих традиционную западную диету, и детей такого же возраста, проживающих в сельской местности центральной части Западной Африки (государство Буркина-Фасо), диета которых преимущественно состоит из продуктов с высоким содержанием пищевых волокон. Использование метода секвенирования генов 16S рибосомальной РНК и биохимического анализа позволило выявить существенные различия в составе интестинальной микрофлоры и уровне короткоцепочечных жирных кислот между двумя группами детей. Доминирующими видами фекальной флоры детей Буркина-Фасо были бактерии класса *Bacteroidetes*, а европейских – бактерии класса *Firmicutes*. Кроме того, уровень короткоцепочечных жирных кислот достоверно был выше у детей Буркина-Фасо по сравнению с европейскими детьми [29].

В свою очередь, изменение состава интестинальной микрофлоры влияет на обменные и метаболические процессы, протекающие в организме. В исследовании бактериальных последовательностей гена 16S rRNA дистального отдела толстой кишки тощих мышшей и мышшей с генетически детерминированным ожирением, находящихся на одинаковом полисахаридном рационе, показано, что у мышшей с ожирением на 50% снижено количество бактерий класса *Bacteroidetes* с пропорциональным увеличением бактерий класса *Firmicutes* [30]. Кроме бактериальной флоры, в представленных образцах у мышшей с ожирением определялись одноклеточные микроорганизмы класса *Archaea* (вид *Methanobrevibacter smithii*), выделяющие метан. Эти микроорганизмы не имеют ядра и каких-либо мембранных органелл. Однако отмечено, что они повышают процесс ферментации полисахаридов, утилизируя молекулярный водород и другие продукты бактериального метаболизма [17].

Также в фекалиях мышшей с ожирением общее содержание калорий оказалось ниже, чем у их сородичей – тощих мышшей. Это говорит о том, что отдельные представители кишечной микрофлоры мышшей с избыточным весом более эффективно извлекают калории из потребляемой пищи, что может являться не только следствием, но и одной из причин ожирения.

Для подтверждения высказанного предположения был проведен эксперимент. Первую группу мышшей-гнотобионтов с нормальным весом колонизировали кишечной флорой мышшей с ожирением, вторую – флорой от худых мышшей. Через две недели у мышшей первой группы наблюдалась отчетливая тенденция динамики более быстрой прибавки веса и накопления жировой ткани, чем у их собратьев второй группы. При одинаковом объеме потребляемого корма различие в поступлении калорий составило 2% калоража [31]. Хорошо известно, что длительное постоянное поступление в организм даже небольшого количества дополнительной энергии может привести к увеличению веса.

Кроме того, у генетически предрасположенных к ожирению мышшей обнаружены особенности генотипа микробиоты, в частности, выявлены гены, кодирующие ферменты, расщепляющие непереваримые полисахариды, т. е. гены, регулирующие расход и запасание энергии [31, 32].

Первое исследование по определению метана в выдыхаемом воздухе среди пациентов с избыточной массой тела (индекс массы тела (ИМТ) больше 30 кг/м²) было проведено в медицинском центре Лос-Анджелеса (Калифорния).

■ Большое значение в профилактике ожирения играет не только ведущая роль бактерий класса *Bacteroidetes*, но и правильное формирование кишечного микробиоценоза на ранних этапах роста малыша, а именно доминирование среди видового состава бифидобактерий его младенческих видов.

Исследование выявило, что у больных с метаноположительными тестами ИМТ был статистически значимо выше, чем у пациентов с метан-отрицательными тестами (45,2 ± 2,3 и 38,5 ± 0,8 кг/м², p = 0,001). На основании проведенной научно-исследовательской работы были сделаны выводы, что источником метана служат микроорганизмы – метанопродукторы и наличие метана в выдыхаемом воздухе может быть неблагоприятным признаком развития тяжелого ожирения у людей с избыточным весом [33].

Как было сказано выше, на формирование микробиоценоза младенца оказывает влияние микрофлора его матери. Оказалось, что немаловажную роль в становлении кишечной композиции младенца в первые 6 месяцев его жизни играет ИМТ матери перед беременностью и ее весовые прибавки во время беременности. В работе, выполненной Collado M.C. (2010), выявлена прямая корреляционная связь между ИМТ, весовыми прибавками во время беременности, а также количеством бактероидов, клостридий и стафилококков и обратная корреляционная зависимость между ИМТ, весовыми прибавками во время беременности и уровнем бифидобактерий у ее ребенка. Также было отмечено, что малыши, демонстрирующие высокий уровень клостридий и стафилококков и низкий уровень бифидобактерий в кишечном микробиоценозе, имеют высокий темп весовых прибавок [34].

Взаимосвязь диеты, массы тела и кишечной микрофлоры прослежена в работе Ley R.E. (2006). При базовом исследовании интестинальная флора людей с ожирением была представлена бактериями класса *Firmicutes*. На фоне диетической программы, предусматривавшей снижение содержания в рационе или жиров, или углеводов, происходило не только снижение массы тела, но и уменьшение бактерий класса *Firmicutes* с активацией роста представителей класса *Bacteroidetes* в фекалиях этих пациентов. Отмечено, что степень изменения кишечной микробиоты коррелировала с потерей массы тела, а не с уровнем получаемого суточного калоража [35].

Большое значение в профилактике ожирения играет не только ведущая роль бактерий класса *Bacteroidetes*, но и правильное формирование кишечного микробиоценоза на ранних этапах роста малыша, а именно доминирование среди видового состава бифидобактерий его младенческих видов. В лонгитудинальном исследовании, проведенном Kalliomäki M. (2008) с помощью современных молекулярно-генетических методов (FISH) и поточной цитометрии, показана связь между снижением младенческих видов бифидобактерий у детей на первом году жизни и развитием ожирения у них в возрасте 7 лет. Под наблюдением находилось две группы детей. В первую группу вошли респонденты с избыточной массой тела и тучные ($n = 25$), во вторую – дети с нормальной массой тела ($n = 24$). Дети были сопоставимы по гестационному возрасту, оценке по шкале Апгар, массе тела при рождении, виду родоразрешения, длительности грудного вскармливания, использованию антибактериальной терапии в течение раннего детства и атопии. Отбор производился из общей когорты финских детей, которым в возрасте 6 и 12 месяцев проводилась оценка кишечного микробиоценоза с определением видового состава бифидобактерий. Оказалось, что у детей первой группы в возрасте 6 и 12 месяцев уровень младенческих видов бифидобактерий был достоверно ниже, чем у детей второй группы. Также у детей, развивших ожирение в семилетнем возрасте, уровень *S. aureus* на первом году жизни был значительно выше по сравнению с детьми, которые к школьному возрасту имели нормальные показатели массы тела [36].

Каким образом изменения в составе кишечной эндоекологии могут способствовать развитию ожирения?

Экспериментальные и клинические исследования последних лет установили, что ожирение – это хроническое воспалительное заболевание [37, 38]. Возникающие в процессе воспаления нарушения липидного обмена усугубляются еще и тем, что жировая ткань является иммунологически активным органом, также как и GALT-система кишечника, т. е. иммунная система служит связующим звеном между интестинальной микрофлорой и жировой тканью. Причем основными представителями кишечной микрофлоры являются аэробные грамотрицательные микроорганизмы, которые способствуют развитию эндо-

токсемии и запускают каскад воспалительной реакции через распознавание эпителиальными рецепторами (TLRs), а именно TLR-4, активация которых индуцирует нуклеарный фактор транскрипции (NF-κB) и синтез большого количества провоспалительных цитокинов, таких как IL-1, IL-6, IL-17, TNF-α, IFN-γ, лежащих в основе развития не только системного воспалительного процесса, но и метаболического синдрома.

Исследование культуры клеток, полученной у лиц с ожирением, показывает усиление секреции провоспалительных цитокинов как изолированными адипоцитами, так и макрофагами [39].

Взаимосвязь иммунных и метаболических процессов отражена в исследовании Feuerer M. (2009), в котором отмечен высокий уровень Th-2 и провоспалительных цитокинов у мышей с ожирением, в то время как у тощих мышей основной популяцией Т-хелперов были Т-reg клетки, которые обеспечивают продукцию регуляторных цитокинов (TGF-β и IL-10). Данные цитокины, преимущественно IL-10, ингибируют нуклеарный фактор транскрипции, тем самым способствуя формированию иммунологической толерантности [40].

Один из основных провоспалительных цитокинов – фактор некроза опухоли (TNF-α), роль которого при ожирении хорошо изучена. Доказано, что TNF-α стимулирует в адипоцитах секрецию лептина, угнетает экспрессию адипонектина, а также приводит к инсулинорезистентности жировых клеток и усилению липолиза [41]. При усилении липолиза повышается уровень свободных жирных кислот и лептина, которые воздействуют на воспалительные киназы JNK (с-Jun N-terminale Kinase) и IKKβ и тем самым активируют нуклеарный фактор транскрипции [42, 43]. Подавление секреции адипонектина также индуцирует нуклеарный фактор транскрипции – обязательного участника воспалительной реакции [44, 45]. В результате порочный круг замыкается.

В случае нарушения кишечной эндоекологии необходима осторожная и взвешенная ее коррекция, одним из наиболее доступных способов которой является оптимизация рациона, а также его обогащение продуктами функционального питания, содержащими про- и пребиотические компоненты.



ЛИТЕРАТУРА

1. Мечников И.И. Этюды о природе человека. М.: изд-во Академии наук СССР, 1961.
2. Shui W., Gilmore S.A., Sheu L., Liu J., Keasling J.D., Bertozzi C.R. Quantitative Proteomic Profiling of Host-Pathogen Interactions: The Macrophage Response to Mycobacterium tuberculosis Lipids. *J Proteome Res* 2009; 8(1): 282–289.
3. Guarino A., Wudy A., Basile F., Ruberto E., Buccigrossi V. Composition and roles of intestinal microbiota in children. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2012 Apr; 25 Suppl 1: 63–6.
4. Andresen V., Camilleri M. Irritable bowel syndrome: recent and novel therapeutic approaches *Drugs.* – 2006; 66(8): 1073–88.
5. Kassinen A., Krogius-Kurikka L., Mäkituokko H., Rinttilä T., Paulin L., Corander J., Malinen E., Apajalahti J., Palva A. The fecal microbiota of irritable bowel syndrome patients differs significantly from that of healthy subjects // *Gastroenterology* – 2007; 133(1): 24–33.
6. Sartor R.B. Microbial influences in inflammatory bowel diseases // *Gastroenterology.* – 2008; 134 (2): 577–94.
7. Maslowski K.M., Mackay C.R. Diet, gut microbiota and immune responses. *Nat Immunol.* 2011; 12: 5–9.
8. Rachmilewitz D., Katakura K., Karmeli F., Hayashi T., Reinus C., Rudensky B., Akira S., Takeda K., Lee J., Takabayashi K., Raz E. Toll-like receptor 9 signaling mediates the anti-inflammatory effects of probiotics in murine experimental colitis // *Gastroenterology.* – 2004; 126 (2): 520–8.
9. Reinhardt C., Reigstad C.S., Bäckhed F. Intestinal microbiota during infancy and its implications for obesity // *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* – 2009; 48(3): 249–56.
10. Grunland M., Guimonde M., Laitinen K. Maternal breast-milk and intestinal bifidobacteria guide the compositional development of the Bifidobacterium microbiota in infants at risk of allergic disease // *Clin. and Experimental Allergy* – 2007; 111: 1–9.

Полный список литературы вы можете запросить в редакции.