



А. Э. Дорофеев, О. А. Рассохина
Донецкий национальный медицинский
университет имени Максима Горького

Генетическая детерминированность изменений кишечного микробиома и его роль в патогенезе воспалительных заболеваний кишечника

Цель — оценить генетическую предрасположенность к изменениям кишечного микробиома и эффективность противовоспалительного действия препарата «Салофальк» при дисбиотических процессах в кишечнике у больных воспалительными заболеваниями кишечника (ВЗК).

Материалы и методы. Обследовано 98 пациентов с ВЗК, среди которых 56 (57,1 %) больных с неспецифическим язвенным колитом (НЯК) и 42 (42,9 %) пациентов с болезнью Крона (БК). Всем больным проведено эндоскопическое исследование с биопсией слизистой оболочки толстой кишки и морфологическим исследованием, а также изучение полиморфизма toll-подобных рецепторов-3, -4 и микробного пейзажа кишечника.

Результаты. Генетическая предрасположенность к нарушению колонизационной резистентности слизистой оболочки толстого кишечника, обусловленная полиморфизмом TLR-3, TLR-4, наблюдалась у большинства — 62 (63,3 %) больных ВЗК. Мутация TLR-4 (Asp299Gly) у обследованных больных наблюдалась несколько реже, чем TLR-3, и встречалась только у 23 (25,5 %) пациентов с ВЗК. Генетическая предрасположенность с сочетанной мутацией TLR-3 и TLR-4 наблюдалась только у 9 (9,2 %) больных ВЗК. У всех 98 пациентов с ВЗК были выявлены изменения количества и состава кишечной микрофлоры. После лечения у всех больных наблюдалась положительная гистологическая динамика, которая выражалась в снижении интенсивности клеточной инфильтрации слизистой оболочки толстой кишки. Гистологическая ремиссия выявлена у 49 (87,5 %) больных НЯК и у 37 (88,1 %) пациентов с БК.

Выводы. Полиморфизм toll-подобных рецепторов может способствовать устойчивым изменениям кишечной микрофлоры, формированию рефрактерных типов ВЗК. Применение препарата «Салофальк» эффективно в случае нарушения микробиоценоза кишечника у больных ВЗК. Препарат не только имеет существенное противовоспалительное действие, но и способствует нормализации процессов слизеобразования, что, возможно, приводит к нормализации облигатной и тенденции к уменьшению количества факультативной флоры. Это способствует более стабильной и длительной ремиссии ВЗК у таких больных.

Ключевые слова: воспалительные заболевания кишечника, «Салофальк», колонизационная резистентность.

Проблема воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК) имеет медико-социальную значимость, обусловленную значительным снижением качества жизни больных, высокой частотой инвалидизирующих осложнений [9, 18]. Важную роль в развитии и прогрессировании ВЗК играют такие факторы, как наследственная предрасположенность, стресс, эпизоды кишечных инфекций или дисбиоз толстого кишечника,

неправильное питание. Микрофлора толстой кишки является одним из факторов, определяющих нормальное функционирование кишечника [1, 3]. Воспалительный процесс в кишечнике, вызванный патогенной флорой, стимулирует клетки иммунной системы, вызывает дисбаланс цитокиновой регуляции и поддерживает системный воспалительный процесс. Интоксикация продуктами жизнедеятельности бактерий толстого кишечника оказывает угнетающее действие на метаболическую и секреторную активность

клеток кишечного эпителия, снижает резистентность слизистой оболочки толстого кишечника [1, 2]. Лакто- и бифидобактерии, кишечная палочка с нормальными ферментативными свойствами выполняют витаминообразующую функцию, способствуют синтезу незаменимых аминокислот, принимающих непосредственное участие в процессах регенерации слизистой оболочки кишечника [2, 18]. При изменениях микробиоценоза кишечника эти функции микрофлоры нарушаются. Изменения в балансе анаэробно-аэробной флоры приводят к нарушению энергообеспечения колоноцитов [2, 4]. При этом нарушается секреторная функция бокаловидных клеток, снижается синтез муцинов, изменяются их состав и свойства, соотношение сульфатированных и несulfатированных гликозамингликанов, что приводит к нарушению защитных свойств слизи и способствует развитию воспалительного процесса в кишечнике [1, 4].

Изменения кишечного микробиома при разных типах ВЗК отличаются. Так, при болезни Крона (БК) наблюдается нарушение микробиоценоза толстого кишечника за счет микобактерий, псевдомонад, иерсиний, патогенных штаммов эшерихий [1, 4, 9]. Для больных НЯК характерно снижение количества бифидобактерий и лактобацилл, облигатной флоры на фоне увеличения содержания факультативных бактерий [1, 2, 9, 18]. При НЯК имеет место дефицит защитного слоя муцинов, а при БК – избыточное слизеобразование в кишечнике [1, 9, 18]. Одной из причин различий в изменениях свойств кишечного барьера при НЯК и БК может быть генетическая предрасположенность к восприятию антигенной нагрузки в кишечнике.

К факторам, способствующим нормальному функционированию микробиома кишечника, относится система toll-подобных рецепторов (TLRs 1–13), отвечающих за распознавание компонентов клеточной стенки бактерий, активацию каскада провоспалительных цитокинов и интерлейкинов, формирование колонизационной резистентности и бактериальную транслокацию [5, 6, 15]. TLR в большом количестве представлены на поверхности кишечного эпителия, они также обнаружены на моноцитах, макрофагах, в системном циркуляции и периферических органах и тканях, что свидетельствует о важной роли toll-подобных рецепторов в регуляции как местного, так и системного иммунного ответа [5, 15]. Toll-подобные рецепторы активируются бактериальными или вирусными клеточными компонентами. Рецепторы распознают микробные структуры, так называемый патоген-ассо-

циированный микробный паттерн, и являются ключевым звеном в регуляции противомикробной защиты кишечника. Связывание рецепторов с бактериальным или вирусным антигеном приводит к активации факторов ядерной транскрипции (NF-κB, JAK2), изменению экспрессии провоспалительных цитокинов и индукции воспалительного ответа [5, 6, 15, 17].

Повышенная экспрессия TLRs способствует активации цитокинов и интерлейкинов, избыточной продукции ФНО-α, ИЛ-1β, ИЛ-6, ИЛ-8 [13, 17]. Точечная мутация в экзоне гена TLR-4 (хромосома 9q32-33) приводит к замене аспарагиновой кислоты на глициновую, потере отрицательного заряда в позиции 299 (Asp299Gly), что нарушает распознавание липополисахаридов бактерий как *in vitro*, так и *in vivo* и способствует развитию грамнегативного сепсиса у животных, снижению ответа на бактериальный эндотоксин у человека в эксперименте [5, 10]. TLR-4 экспрессируется не только в кишечнике, но и на кардиомиоцитах, в головном мозге, на лейкоцитах периферической крови, влияя на системный иммунный ответ [5, 9]. Изменение его экспрессии может быть обусловлено как внешними факторами, так и генетической предрасположенностью, что может повлиять на характер иммунного ответа у пациентов с ВЗК [10, 11, 14]. В то же время TLR-3 экспрессируется только на дендритных клетках [6, 8, 11, 14] и поэтому может быть первичным звеном, контактирующим с антигеном, распознающим и презентующим компонентом иммунной системы кишечника. В эксперименте клетки TLR-3-дефицитных мышей характеризовались сниженной продукцией ФНО-α, ИЛ-6, ИЛ-12, и нормальным ответом на бактериальные полисахариды [7, 12, 13]. Возможно, различные нарушения экспрессии TLRs в кишечнике вследствие генетической предрасположенности способствуют формированию разных типов ответа на вирусные и бактериальные антигены, изменения качественного и количественного состава кишечной микрофлоры, индуцируя различную выраженность воспалительных изменений в толстом кишечнике, степень тяжести и активности ВЗК.

Общность патогенеза НЯК и БК, обусловленная воспалительным процессом в кишечнике, обуславливает необходимость включения в терапевтический комплекс таких больных противовоспалительных препаратов 5-аминосалициловой кислоты (5-ASA) [2, 6, 9]. Эффективность базисной терапии ВЗК оценивают по уменьшению или устранению имеющихся воспалительных, цитокиновых, иммунных и морфологических нарушений [15].

Одним из представителей данной группы препаратов является «Салофальк» (месалазин), который подавляет активность нейтрофильной липоксигеназы и образование из арахидоновой кислоты активных провоспалительных медиаторов (лейкотриенов и простагландинов), ингибирует секрецию иммуноглобулинов лимфоцитами, а также миграцию, фагоцитоз и дегрануляцию нейтрофильных гранулоцитов. Кроме того, «Салофальк» оказывает антиоксидантное действие, что также имеет важное значение для эффективности репаративных процессов в слизистой оболочке толстого кишечника. Прогноз стабильности ремиссии может зависеть преимущественно от нормализации слизистого барьера толстой кишки. Состояние слизистого барьера толстого кишечника определяется функциональными изменениями слизистой оболочки толстой кишки, свойствами толстокишечной слизи и количественным и качественным составом кишечной микрофлоры [1, 4, 18]. Изучение влияния базисной терапии ВЗК на слизистый барьер и микробиом кишечника позволит не только оценить эффективность лечения и полноту ремиссии, но и спрогнозировать дальнейшее течение заболевания.

Цель работы — оценить изменения качественного и количественного состава кишечного микробиома у больных ВЗК; проанализировать генетическую предрасположенность к нарушению колонизационной резистентности, а также оценить противовоспалительный эффект «Салофалька» при дисбиотических процессах в толстом кишечнике у пациентов с ВЗК.

Материалы и методы

Обследовано 98 пациентов с ВЗК (56 (57,1 %) — с НЯК и 42 (42,9 %) — с БК). Средний возраст больных составлял $(36,2 \pm 4,2)$ года.

Всем больным проведена ДНК-диагностика в отделе молекулярно-генетических исследований ЦНИЛ Донецкого национального медицинского университета имени Максима Горького, предусматривающая анализ мутаций toll-подобного рецептора 3 — TLR-3 (мутация Phe412Leu) и toll-подобного рецептора 4 — TLR-4 (мутация Asp299Gly). ДНК выделена из лейкоцитов цельной крови с помощью реагента «ДНК-экспресс-кровь». В работе использованы диагностические тест-системы «SNP-экспресс», разработанные НПФ «Литех». Анализ полиморфных ДНК-локусов осуществляли методом полимеразной цепной реакции синтеза (ПЦР) ДНК с последующей электрофоретической детекцией. Реакцию проводили при следующих условиях: пер-

вичная денатурация при 93 °C в течение 1 мин, после которой следовали 35 циклов, состоящих из денатурации при 93 °C в течение 10 с, отжига праймеров при 64 °C в течение 10 с, элонгации при 72 °C в течение 20 с. ПЦР проводили на амплификаторе Gene Amp PCR System 2400 (Applied Biosystems). Анализ амплифицированных фрагментов осуществляли путем электрофореза в 3 % агарозном геле, окрашенном в бромистом этидии. Визуализацию результатов проводили в ультрафиолетовом трансиллюминаторе «TFX-20.M» (Vilber Lourmat, Франция).

Для оценки изменений кишечного микробиома изучали количественный и качественный состав облигатной и факультативной кишечной флоры. Определяли количество бифидобактерий и лактобацилл, кишечной палочки; изучали состав факультативной флоры и количество стафило-, стрепто- и энтерококков, клебсиелл, протей, энтеробактера, цитобактера, грибов рода *Candida*, а также их ферментативные свойства.

Всем больным ВЗК проведено эндоскопическое исследование с биопсией слизистой оболочки толстой кишки и морфологическим исследованием биоптата во время обострения и после наступления ремиссии заболевания для оценки эффективности терапии. Фиксацию биоптата слизистой оболочки толстой кишки выполняли в 4,0 % растворе нейтрального формалина в течение 24 ч с последующей заливкой в парафин. Гистологические срезы толщиной 4–5 мкм, полученные с помощью микротомы для парафиновых срезов, окрашивали гематоксилином и эозином, что позволяло оценить состояние исследуемой ткани. По препарату оценивали выраженность воспаления в слизистой оболочке толстой кишки, интенсивность и клеточный состав инфильтрата, количество и зрелость бокаловидных клеток [3, 5]. Для характеристики слизи образования проводили PAS-реакцию, с помощью которой выявляли гликопротеиды, гликолипиды и гликоген, определяли количество PAS-положительных веществ в слизи и число активных лейкоцитов, содержащих гликоген в клеточном инфильтрате.

Часть срезов окрашивали альциановым синим при значениях pH 1,0 и 2,5. При pH 1,0 сульфатные группы углеводов приобретают достаточный заряд для связывания положительно заряженных молекул красителя. При pH 2,5 окрашивались как сульфатные, так и карбоксильные группы, которые входят в состав сиаловых, глюкуроновой и индуроновой кислот. С помощью этой методики определяли сульфатированные и несulfатированные гликозамингликаны, протеогликианы, гликопротеины и гликоген [1, 5].

Все обследованные больные в качестве базисной терапии получали «Салофальк» в дозе 3,0 г в сутки в течение 30 дней.

Клинические, эндоскопические, морфологические и микробиологические изменения оценивали до начала терапии и после ее окончания.

Результаты и обсуждение

У обследованных пациентов клиническая картина ВЗК была типичной. Нарушения стула проявлялись преимущественно синдромом диареи с частотой стула от 5 до 20 раз в сутки. Выявлена примесь крови в стуле от прожилок до «кровоавого стула», наличие слизи. Типичными для большинства больных были тенезмы, ночные дефекации, вздутие кишечника, сопровождающиеся болевым и астеноневротическим синдромами. Более половины больных имели среднетяжелое течение ВЗК, а 40,0 % — легкое.

Для оценки выраженности активности НЯК использовали индекс Рахмилевича, для оценки БК — Crohn's Disease Activity Index (CDAI) [9, 16, 18].

В исследование включали пациентов с активностью 220—450 баллов по индексу CDAI и 6—11 баллов по индексу Рахмилевича. Индекс клинической активности у больных НЯК составил в среднем ($10,57 \pm 0,98$) балла, а у пациентов с БК — ($362,80 \pm 12,91$) балла.

При эндоскопическом исследовании у всех больных НЯК до терапии выявлена гиперемия слизистой оболочки толстой кишки с изменением сосудистого рисунка, отечность слизистой толстой кишки с «зернистостью» — грануляциями мембранной поверхности слизистой оболочки, рассеивающими отраженный свет. Эрозии или язвы, повышенная ранимость слизистой оболочки толстой кишки, примеси слизи, фибрина, гноя обнаружены практически у всех больных, при этом степень выраженности упомянутых изменений коррелировала со степенью тяжести НЯК. Для объективизации динамической оценки эндоскопических изменений слизистой оболочки толстой кишки у больных ВЗК определен эндоскопический индекс, который включал наличие грануляций мембранной поверхности слизистой оболочки, рассеивающих отраженный свет, изменения сосудистого рисунка, ранимость и контактную кровоточивость, поражение слизистой оболочки в виде эрозий, язв, стриктур [13]. В среднем у больных НЯК этот показатель составил ($2,20 \pm 0,71$) балла, у больных БК — ($1,94 \pm 0,89$) балла ($p \geq 0,05$).

У всех больных НЯК выявлено снижение числа бокаловидных клеток, коррелировавшее с тя-

жестью НЯК, вплоть до полного отсутствия бокаловидных клеток у пациентов со среднетяжелым и тяжелым течением НЯК. Зафиксированы истончение, дистрофия поверхностного эпителия с перестройкой крипт. Кроме того, у всех больных обнаружены дефекты поверхностного эпителия от микроэрозий до глубоких язв, заполненных некротическими массами. На этом фоне у всех больных НЯК выявлена усиленная воспалительная клеточная инфильтрация слизистой оболочки толстой кишки, интенсивность которой варьировала от умеренной до выраженной. В воспалительном клеточном инфильтрате у больных НЯК чаще всего преобладали нейтрофильные лейкоциты, плазмоциты и макрофаги, характерным было наличие активных сегментоядерных лейкоцитов, содержащих гликоген. Более чем у половины больных НЯК выявлены внутриэпителиальные лимфоциты, что свидетельствовало об активности воспалительного процесса. Помимо изменений в клеточном составе слизистой оболочки толстой кишки у больных НЯК выявлены нарушения слизееобразования. У всех больных установлено уменьшение количества внутри- и внеклеточной слизи и изменение ее свойств. При проведении PAS-реакции и окрашивании альциановым синим при pH 2,5 и pH 1,0 интенсивность окрашивания у всех больных НЯК была ниже нормы ($p < 0,01$), что свидетельствует об изменениях в составе толстокишечной слизи, уменьшении содержания в ней гликозамингликанов и гликопротеинов.

У пациентов с БК отмечена выраженная лимфоцитарная инфильтрация слизистой и подслизистой оболочек толстой кишки, локальная гиперплазия лимфоидных фолликулов. Наличие эпителиально-клеточных гранул выявлено у 39,0 % больных БК. Снижение продукции муцинов, уменьшение количества бокаловидных клеток не наблюдали у пациентов с БК, что было типичным дифференциально-диагностическим признаком БК. PAS-реакция была умеренной у большинства больных. При окраске альциановым синим при pH 1,0 у 29 (69,0 %) пациентов отметили интенсивную выраженность окрашивания, при pH 2,5 у 27 (64,3 %) больных ($p < 0,01$) — умеренное и интенсивное окрашивание.

На фоне воспалительных изменений слизистой оболочки толстой кишки у больных ВЗК выявлено нарушение микробного пейзажа в сочетании с генетической модификацией паттерн-распознающих рецепторов. Состояние рецепторного аппарата колоноцитов во многом предопределяет возможность колонизации микрофлоры толстой кишки, ее жизнедеятельность и

состав. При этом полиморфизм специфических рецепторов наблюдается не только в эпителиальных клетках, но и в строме, что может приводить к феномену повышенной проницаемости кишечника при воспалительных изменениях слизистой оболочки, индуцировать или усугублять иммунный дисбаланс при ВЗК.

Генетическая предрасположенность к нарушению колонизационной резистентности слизистой оболочки толстого кишечника, обусловленная полиморфизмом TLR-3 и TLR-4, установлена у большинства (62 (63,3%)) больных ВЗК. Мутация TLR-3 (Phe412Leu) встречалась чаще, чем TLR-4, ее обнаружили у 38 (38,8%) больных ВЗК ($p < 0,01$). Большинство мутаций toll-подобных рецепторов были гетерозиготными. Полные мутации TLR-3 (Leu/Leu) выявлены только у 6 (6,1%) пациентов с ВЗК. Частота встречаемости точечной мутации TLR-3 была разной в зависимости от типа ВЗК. Гетерозиготные мутации (Phe/Leu) преобладали у больных НЯК — 26 (46,4%). Неполные мутации встречались с меньшей частотой при БК — 13 (31,0%) пациентов ($p < 0,05$). Гомозиготные мутации TLR-3 (Leu/Leu) также преобладали среди пациентов с НЯК по сравнению с больными БК (соответственно 4 (7,1%) и 2 (4,8%) случая), однако отличие не было достоверным. Таким образом, полиморфизм TLR-3 чаще наблюдался у больных НЯК. Изменения в кишечнике, обусловленные полиморфизмом TLR-3, могут свидетельствовать о преобладании избыточного ответа на бактериальные полисахариды как облигатной, так и факультативной микрофлоры кишечника. Они могут запустить каскад провоспалительных цитокинов (ФНО- α , ИЛ-6, ИЛ-12), играющих ключевую роль в формировании ВЗК.

Мутация TLR-4 (Asp299Gly) встречалась реже, чем TLR-3, — у 23 (25,5%) пациентов с ВЗК. У всех больных выявлены только гетерозиготные мутации TLR-4 (Asp/Gly). Полиморфизм TLR-4 преобладал у больных БК в отличие от больных НЯК (соответственно 15 (35,7%) и 8 (14,3%) случаев; $p < 0,01$). Таким образом, для больных БК более характерно снижение или отсутствие способности адекватного распознавания бактериальных липополисахаридов вследствие мутации TLR-4, что приводит к снижению защитного ответа на эндотоксин представителей грамотрицательной флоры, избыточной колонизации кишечника патогенной микрофлорой, индукции и хронизации воспалительного процесса в кишечнике. Возможно, этим объясняется то, что изменение состава микробиоценоза толстого кишечника за счет патогенной микрофлоры и

кишечные инфекции предшествуют развитию, а также провоцируют обострения у пациентов с БК чаще, чем у больных НЯК.

Генетическую предрасположенность с сочетанной мутацией TLR-3 и TLR-4 наблюдали только у 9 (9,2%) больных ВЗК. При этом сочетанные мутации встречались с одинаковой частотой у больных как НЯК, так и БК, что, возможно, свидетельствует о наличии схожих патогенетических механизмов развития данных заболеваний. Сочетание полиморфизма TLR-3 и TLR-4 у больных НЯК и БК может приводить к более выраженным и стойким нарушениям микробиоценоза толстого кишечника (что может объяснить случаи рефрактерного течения заболевания) и потребовать более длительного курса стандартной терапии.

У всех больных ВЗК выявлены изменения в количестве и составе кишечной микрофлоры (табл. 1). Как у больных НЯК, так и БК патогенные микроорганизмы не определялись, а облигатная флора (бифидобактерии, лактобациллы и кишечная палочка) высевались почти у всех пациентов, однако их количество было небольшим. У пациентов с БК частота высеваемости *E. coli* была ниже, чем у здоровых лиц, — 71,4%. Ее общее количество и количество кишечной палочки со слабовыраженными ферментативными свойствами было небольшим за счет увеличения удельного веса гемолизующей *E. coli* (до 50%). У больных НЯК отмечено только снижение количества кишечной палочки. У пациентов с БК выявлено уменьшение количества энтерококков при 100% высеваемости.

Уменьшение количества облигатной флоры приводит к нарушению колонизационной резистентности и росту факультативных бактерий. Энтеробактер у больных НЯК высевался достоверно чаще, чем у здоровых лиц ($p < 0,01$), при этом его количество достоверно превышало показатель здоровых лиц. Частота встречаемости стафилококков у больных НЯК была выше, чем у здоровых лиц, однако их количество достоверно не отличалось, при этом чаще высевались *S. epidermidis* и *S. aureus*. У пациентов с БК частота встречаемости стафилококков была значительно ниже, чем у здоровых лиц ($p < 0,03$) и пациентов с НЯК ($p < 0,01$). Клебсиеллы высевались достоверно чаще у больных НЯК ($p < 0,01$), при этом их количество превышало норму в 2,7 раза. У больных БК высеваемость клебсиелл была достоверно ниже, однако их количество превышало норму и достоверно не отличалось от показателей больных НЯК. Частота высеваемости протей у больных НЯК была выше в 2 раза, а у больных

Таблиця 1. Состав микрофлоры кишечника у больных ВЗК и здоровых лиц до лечения

Микроорганизм	Здоровые лица		Больные с НЯК		Больные с БК	
	Частота, %	Количество, lg КОЕ/г	Частота, %	Количество, lg КОЕ/г	Частота, %	Количество, lg КОЕ/г
<i>Escherichia coli</i>	100,0	7,82 ± 0,24	100,0	6,75 ± 0,61*	78,6**	3,84 ± 0,50
<i>Bifidobacterium</i>	100,0	8,72 ± 0,25	100,0	7,29 ± 0,71*	100,0	8,41 ± 0,69
<i>Lactobacillus</i>	100,0	6,60 ± 0,14	94,6	5,77 ± 0,51*	92,9	5,79 ± 0,57
<i>Enterococcus</i>	100,0	6,37 ± 0,33	66,1*	7,33 ± 0,63	100,0	5,30 ± 0,51
<i>Enterobacter</i>	26,6	1,11 ± 0,32	41,1*	2,81 ± 0,21*	40,4*	3,97 ± 0,28
<i>Staphylococcus</i>	40,0	4,05 ± 0,35	51,7*	4,41 ± 0,43	14,2**	2,21 ± 0,18
<i>Klebsiella</i>	23,3	0,99 ± 0,27	41,1*	3,46 ± 0,32*	16,7**	3,05 ± 0,61*
<i>Proteus</i>	16,6	0,4 ± 0,1	39,2*	2,52 ± 0,25*	42,8*	2,43 ± 0,27
<i>Citobacter</i>	53,3	1,79 ± 0,32	53,6*	3,12 ± 0,22*	–	–
<i>Candida</i>	10,0	3,36 ± 0,41	35,7	3,50 ± 0,35	26,2	4,28 ± 0,45

Примечание. * Различия относительно здоровых лиц статистически значимы ($p < 0,05$).

** Различия относительно больных НЯК статистически значимы ($p < 0,05$).

БК — в 3 раза, чем у здоровых лиц. Чаще высевался *P. mirabilis*. У пациентов с БК чаще высевался *P. vulgaris*. Цитобактер не определялся у пациентов с БК и был выявлен только у больных НЯК, его количество достоверно превышало нормальные показатели ($p < 0,05$). Грибы рода *Candida* у больных НЯК высевались чаще, чем у больных БК, их количество при БК несколько превышало нормальные показатели. Таким образом, на фоне снижения количества облигатных бактерий у больных НЯК повышается количество и удельный вес факультативной флоры, что приводит к нарушению колонизационной резистентности. Повышается частота высеваемости клебсиелл, кластридий, энтеробактера и протея.

Наличие полиморфизма TLR-3 и TLR-4 у обследованных больных ВЗК приводило к более выраженным изменениям качественного и количественного состава микрофлоры кишечника по сравнению с больными, не имеющими генетической предрасположенности. Так, у пациентов с полиморфизмом TLR-3 чаще высевались *E. coli* и *Enterobacter*, а у больных с полиморфизмом TLR-4 преобладала высеваемость *Klebsiella*, *Proteus* и *Enterococcus*.

Количественные и качественные изменения микрофлоры при ВЗК, обусловленные генетической предрасположенностью, модификацией toll-подобных рецепторов, могут носить стойкий характер и способствовать развитию ВЗК, рефрактерных к лечению. Данные изменения могут быть обусловлены нарушениями содержания

биоогенных аминов, продуцируемых микрофлорой кишечника, что усиливает кишечную моторику, секрецию слизи, провоцирует болевую импульсацию. При дисбиозе кишечника нарушается инактивирование ферментными системами микрофлоры биологически активных веществ, гистамина и серотонина. Гиперпродукция серотонина и гистамина бактериями толстого кишечника приводит к образованию избыточного количества токсических веществ, усилению пропульсивной активности кишечника, что усугубляет симптомы ВЗК. Снижение продукции гистидазы поврежденной слизистой оболочкой кишечника также приводит к увеличению концентрации гистамина в крови, развитию сенсибилизации к условно патогенной флоре. Дисбиоз кишечника способствует развитию и поддержанию моторно-эвакуаторной дисфункции, являющейся предрасполагающим фактором для возникновения кишечного дисбиоза. При усугублении дисбиотических процессов в слизистой оболочке возрастает количество воспалительных клеток, инфильтрирующих эпителиальный пласт (эозинофилов, лимфоцитов, плазмоцитов, нейтрофилов, фибробластов стромы), уменьшается количество лаброцитов, продуцирующих гистамин, что приводит к дальнейшей инфильтрации соединительной ткани клеточными элементами, способствует прогрессированию ВЗК.

На фоне 30-дневного лечения положительная клиническая динамика с улучшением самочувствия и уменьшением клинической симптомати-

ки отмечена у всех больных НЯК и БК. Клиническая ремиссия выявлена у 47 (83,9 %) больных НЯК и 35 (83,3 %) пациентов с БК. На (18,9 ± 3,7) сутки у больных НЯК зафиксировано исчезновение болевого синдрома, тенезмов, ночной дефекации. Нормализация частоты стула, исчезновение примеси крови и слизи в кале, вздутия и урчания кишечника отмечены только на фоне достижения полной клинической ремиссии. На 30-е сутки лечения клиническая ремиссия достигнута у 53 (94,6 %) больных НЯК и 39 (92,9 %) пациентов БК. При проведении контрольного эндоскопического исследования толстого кишечника выявлено, что эндоскопическая полная ремиссия достигнута у 48 (85,7 %) больных НЯК и 37 (88,1 %) пациентов с БК. В целом по группе больных НЯК после терапии индекс клинической активности составил (2,89 ± 0,31) балла, эндоскопический индекс — (0,93 ± 0,27) балла, а у больных БК — (2,78 ± 0,33) и (0,89 ± 0,31) балла соответственно, что свидетельствует о достаточно высокой эффективности проводимой терапии в обеих группах.

После лечения у всех больных выявлена положительная гистологическая динамика, о чем свидетельствовало снижение интенсивности клеточной инфильтрации слизистой оболочки толстой кишки. Гистологическая ремиссия выявлена у 49 (87,5 %) больных НЯК и 37 (88,1 %) пациентов с БК. После лечения сегментоядерные лейкоциты, обнаруженные в клеточном инфильтрате слизистой оболочки толстой кишки, не содержали гликоген, что означало отсутствие местной воспалительной активности. У больных НЯК количество бокаловидных клеток увеличилось, они содержали более зрелую слизь. У 10 (23,8 %) больных БК выявлено нормальное количество бокаловидных клеток, содержащих зрелую слизь. Почти у всех больных ВЗК наблюдали восстановление интенсивности окрашивания при проведении PAS-реакции и методики с альциановым синим, особенно при pH 2,5. Это свидетельствует о нормализации процессов гликообразования и нормальном соотношении сульфатированных и несulfатированных гликозамингликанов в кишечной слизи. Улучшение гликообразования на фоне применения «Салофалька» у больных ВЗК способствовало более стабильной и длительной ремиссии.

На фоне положительной клинической динамики у больных как НЯК, так и БК, отмечена общая тенденция к нормализации микробного пейзажа толстой кишки (табл. 2). Несмотря на патогенетические отличия НЯК и БК, разный характер микробиологических нарушений в ки-

шечнике, на фоне применения базисной противовоспалительной терапии наблюдали восстановление микробного биоценоза толстого кишечника, что свидетельствует о важной роли дисбиоза кишечника в индукции и прогрессировании ВЗК, а также о регулирующем влиянии «Салофалька» на состояние микробиоценоза кишечника при воспалительных процессах в слизистой оболочке толстой кишки. В результате проведенного лечения отмечено повышение общего количества кишечной палочки и уменьшение количества кишечной палочки со сниженными ферментативными свойствами и гемолизирующих штаммов *E. coli*. Число бифидобактерий и лактобацилл у больных НЯК и БК на фоне терапии достоверно не изменилось. В тоже время у больных ВЗК отмечена тенденция к уменьшению количества факультативной флоры. При использовании «Салофалька» выявлено достоверное снижение количества энтеробактера, протей и цитобактера ($p < 0,05$).

Применение «Салофалька» является эффективным у больных НЯК и БК. Препарат не только оказывает выраженный противовоспалительный эффект, но и способствует нормализации процессов гликообразования, стимулирует продукцию слизи, способствует ее созреванию, что, возможно, объясняет нормализацию количества и ферментативных свойств кишечной палочки и тенденцию к уменьшению количества факультативной флоры. Использование данного препарата позволяет достичь более стабильной и длительной ремиссии ВЗК.

Таблица 2. Состав кишечной флоры у больных НЯК и БК после лечения, Ig КОЕ/г

Микроорганизм	Больные с НЯК	Больные с БК
<i>Escherichia coli</i>	7,35 ± 0,55	7,02 ± 0,70*
<i>Bifidobacterium</i>	7,89 ± 0,71	8,68 ± 0,74
<i>Lactobacillus</i>	6,20 ± 0,56	5,89 ± 0,59
<i>Enterococcus</i>	7,03 ± 0,69	6,45 ± 0,73
<i>Enterobacter</i>	1,85 ± 0,21*	2,02 ± 0,23*
<i>Staphylococcus</i>	4,11 ± 0,43	3,32 ± 0,44*
<i>Klebsiella</i>	1,16 ± 0,31*	1,28 ± 0,32*
<i>Proteus</i>	1,45 ± 0,15*	1,99 ± 0,21*
<i>Citobacter</i>	1,20 ± 0,18*	1,87 ± 0,17*
<i>Candida</i>	2,25 ± 0,32*	2,94 ± 0,28*

Примечание. * Различия относительно показателей до лечения статистически значимы ($p < 0,05$).

Выводы

До лечения изменения микробного состава кишечной флоры наблюдали у всех обследованных больных, что свидетельствует о значимой роли кишечного дисбиоза в развитии и прогрессировании ВЗК. Кроме того, у пациентов с ВЗК имелась генетическая предрасположенность к нарушению микробиоценоза кишечника, связанная с изменением экспрессии toll-подобных рецепторов (TLR-3 и TLR-4). Сочетание полиморфизма TLR-3 с изменениями микрофлоры кишечника свидетельствует о преобладании избыточного иммунного ответа на антигены облигатных и факультативных бактерий у больных НЯК. Преобладание полиморфизма TLR-4 в сочетании с наличием условно-патогенной микрофлоры в кишечнике у пациентов с БК может отражать снижение реактивности к кишечным патогенам. Из-

менения качественного и количественного состава микрофлоры при НЯК и БК, обусловленные генетической предрасположенностью, могут носить стойкий характер, способствовать развитию рефрактерных к лечению типов ВЗК.

На фоне применения базисной терапии ВЗК и «Салофалька» отмечена тенденция к нормализации микробного пейзажа толстой кишки, увеличению количества кишечной палочки и нормализации ее ферментативных свойств, уменьшению количества энтеробактера, протей, цитобактера. Возможно, это связано с улучшением метаболизма колоноцитов, нормализацией процессов слизиобразования в мукозном слое, являющимся не только протективным барьером, но и питательным субстратом для облигатных бактерий, отвечающих за феномен колонизационной резистентности в толстой кишке.

Список литературы

1. Анохина Г.А., Скопиченко С.В. Современные аспекты микробиологического дисбаланса, профилактика и лечение // Журн. практ. лікаря. — 2001. — № 3. — С. 28—33.
2. Барановский А.Ю., Кондрашина Э.Л. Дисбактериоз и дисбиоз кишечника. — СПб: Питер, 2000. — 224 с.
3. Григорьев А.В. Желудочно-кишечный тракт как среда обитания бактерий. Раздел 1. Морфология желудочно-кишечного бактериального биотопа. — М.; К., 2004. — 95 с.
4. Дорофеев А.Э., Звягинцева Т.Д., Харченко Н.В. Заболевания кишечника. — Горловка: ПП «Видавництво Ліхтар», 2010. — 532.
5. Крючко Т.О. и др. Генетичний поліморфізм Toll-подібного рецептора 4 у дітей з atopічною бронхіальною астмою // Клин. иммунол., алергол., інфектол. — 2011. — № 5. — С. 52—54.
6. Толстопятова М.А., Буслаева Г.А., Козлов И.Г. Роль рецепторов врожденного иммунитета в развитии инфекционной патологии у новорожденных детей // Педиатрия. — 2009. — Т. 87, № 1. — С. 115—120.
7. Akira S., Takeda K. Toll-like receptors in innate immunity // Immunology. — 2005. — Vol. 17 (1). — P. 1—14.
8. Brikos C., O'Neill L.A. Signaling of toll-like receptors // Handb Exp. Pharmacol. — 2008. — Vol. 183. — P. 21—50.
9. D'Haens G.R. The London Position Statement of the World Congress of Gastroenterology on Biological Therapy for IBD With the European Crohn's and Colitis Organization: When to Start, When to Stop, Which Drug to Choose, and How to Predict Response? // Am. J. Gastroenterol. — 2011. — Vol. 106. — P. 199—212.
10. Ferwerda B., McCall B., Verheijen K., Kullberg B.J. Functional consequences of toll-like receptor 4 polymorphisms // Mol. Med. — 2008. — Vol. 14, N 5—6. — P. 346—352.
11. Garcia Rodriguez C. Toll-like receptor 4 dependent pathways as sensors of endogenous «danger» signals. New evidences and potential therapeutic targets // Immunologia. — 2007. — Vol. 26, N 4. — P. 210—215.
12. Harju K., Glumoff V., Hallman M. Ontogeny of TLR-2, TLR-4 in mice // J. Pediatr. Res. — 2001. — Vol. 49. — P. 81—83.
13. Marsik C., Jilma B., Joukhadar C. et al. The toll-like receptor 4 Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms influence the late inflammatory response in human endotoxemia // Clinical Chemistry. — 2005. — Vol. 51, N 11. — P. 2178—2180.
14. Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity // Nature Rev. Immunol. — 2001. — N 1. — P. 136—144.
15. Moser M., Murphy K.M. Dendritic cell regulation of TH1/TH2 development // Nat. Immunol. — 2000. — Vol. 1. — P. 199—205.
16. Rachmilewitz D. Inflammatory bowel diseases. — Dordrecht; Boston; London: Kluwer Acad. Publishers, 1994. — 297 p.
17. Schwartz D. The Genetics of innate immunity // Chest. — 2002. — Vol. 121. — P. 62—68.
18. Travis S.P.L., Stange E.F., Lemman M. et al. European evidence based consensus on the diagnostic and management of Crohn's disease: current management // Gut. — 2006. — Vol. 55 (suppl. 1). — P. 16—35.

А. Е. Дорофеев, О. О. Рассохіна

Донецький національний медичний університет імені Максима Горького

Генетична детермінованість змін кишкового мікробіома та його роль у патогенезі запальних захворювань кишечника

Мета — оцінити генетичну схильність до змін кишкового мікробіома та ефективність протизапальної дії препарату «Салофальк» при дисбіотичних процесах у кишечнику у хворих на запальні захворювання кишечника (ЗЗК).

Матеріали та методи. Обстежено 98 пацієнтів із ЗЗК, серед яких 56 (57,1%) хворих на неспецифічний виразковий коліт (НВК) і 42 (42,9%) пацієнтів із хворобою Крона (ХК). Усім хворим проведено ендоскопічне дослідження з біопсією слизової оболонки товстої кишки та морфологічним дослідженням, а також вивчення поліморфізму тол-подібних рецепторів-3, -4 та мікробного пейзажу кишечника.

Результати. Генетична схильність до порушення колонізаційної резистентності слизової оболонки товстого кишечника, зумовлена поліморфізмом TLR-3, TLR-4, спостерігалася в більшості — 62 (63,3%) хворих на ЗЗК. Мутація TLR-4 (Asp299Gly) в обстежених пацієнтів спостерігалася дещо рідше, ніж TLR-3, і зустрічалася тільки у 23 (25,5%) хворих на ЗЗК. Генетична схильність із поєднаною мутацією TLR-3 і TLR-4 була лише в 9 (9,2%) хворих на ЗЗК. У всіх 98 пацієнтів із ЗЗК були виявлені зміни кількості і складу кишкової мікрофлори. Після лікування у всіх хворих спостерігалася позитивна гістологічна динаміка, яка виражалася у зниженні інтенсивності клітинної інфільтрації слизової оболонки товстої кишки. Гістологічна ремісія виявлена у 49 (87,5%) хворих на НВК і у 37 (88,1%) пацієнтів із ХК.

Висновки. Поліморфізм тол-подібних рецепторів може сприяти стійким змінам кишкової мікрофлори, формуванню рефрактерних типів ЗЗК. Застосування препарату «Салофальк» ефективно в разі порушення мікробіоценозу кишечника у хворих на ЗЗК. Препарат не лише справляє суттєвий протизапальний вплив, а й сприяє нормалізації процесів слизоутворення, що, можливо, зумовлює нормалізацію облигатної та тенденцію до зменшення кількості факультативної флори. Це сприяє більш стабільній і тривалій ремісії ЗЗК у таких хворих.

Ключові слова: запальні захворювання кишечника, «Салофальк», резистентність колонізації.

A. E. Dorofeyev, O. O. Rassokhina

Donetsk National Medical University of Maxim Gorky

Genetic determinism of the intestinal microbiome changes and its role in pathogenesis of inflammatory bowel diseases

Objective — to assess the genetic predisposition to the changes of gut microbiome and efficacy of *Salofalk* on dysbiotic processes in the intestine at inflammatory bowel diseases (IBD).

Method and materials: The investigation involved 98 patients with IBD from them 56 (57.1%) patients with ulcerative colitis and 42 (42.9%) with Crohn's disease. All patients were undergone colonoscopy with the large bowel mucosa biopsy and morphological investigation, as well as polymorphism investigation of the of toll-like receptors 3 and 4 and microbiological examination of colon flora.

Results. The genetic predisposition to the disturbances of colonization resistance of the colon mucosa, stipulated by the polymorphism of TLR-3 and TLR-4, was observed in the majority of the IBD patients (62, or 63.3%). The mutation TLR-4 (Asp299Gly) in the investigated patients was marked a bit rarely, than TLR-3, and was exposed only in 23 (25.5%) of IBD patients. The genetic predisposition with combined mutation TLR-3 and TLR-4 was only in 9 (9.2%) IBD patients. In all 98 IBD patients, the changes in the quantity and composition of gut microflora have been exposed. After the treatment, all patients demonstrated positive histological dynamics, which manifested in the reduction of cellular infiltration intensity in the colon mucosa. Histological remission was revealed in 49 (87.5%) of patients with ulcerative colitis and in 37 (88.1%) patients with Crohn's disease.

Conclusions. Polymorphism investigation of the of toll-like receptors can promote the steady changes in the gut microflora, formation of the refractory IBD types. The use of *Salofalk* preparation is effective in the case of the intestinal microbiota in IBD patients. This agent has not only significant anti-inflammatory effects, but also promoted the normalization of the production of mucus, that possibly stipulates the normalization of the obligatory flora and trend towards reduction of the quantity of optional flora. This promotes the greater stability and duration of the IBD remission in such patients.

Key words: inflammatory bowel diseases, *Salofalk*, resistance of colonization. □

Контактна інформація

Дорофеев Андрей Едуардович, д. мед. н., проф. кафедри внутрішньої медицини №2 ДНМУ
83003, м. Донецьк, просп. Ілліча, 16
Тел. (62) 345-78-47

Стаття надійшла до редакції 21 листопада 2013 р.