

УДК: 616.345, 616-0,22.7

ОСОБЕННОСТИ МИКРОБИОТЫ ТОЛСТОЙ КИШКИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВИДА ВСКАРМЛИВАНИЯ У ДЕТЕЙ С ФУНКЦИОНАЛЬНЫМИ ГАСТРОИНТЕСТИНАЛЬНЫМИ РАССТРОЙСТВАМИ

Е.В. Григорова¹, Е.И. Иванова¹, У.М. Немченко¹, М.В. Савельяева¹, Л.В. Рычкова¹, Л.Ф. Шолохов¹, Л.И. Колесникова^{1,2}

¹ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», 664003, Иркутск, ул. Тимирязева, 16

²ФГБОУ ВО «Иркутский государственный университет»

Дана микроэкологическая характеристика кишечного биоценоза у детей с функциональными гастроинтестинальными расстройствами в зависимости от вида вскармливания. Объектами исследования являлись дети в возрасте 3-6 месяцев (n=241). Показано, что у детей, находящихся на грудном вскармливании, микробиота толстой кишки характеризовалась низкими показателями представителей условно-патогенной микробиоты, что, вероятно, обусловлено действием иммунной защиты, полученной от матери. У детей, находящихся на смешанном вскармливании, имеются как количественные, так и качественные изменения состава индигенной и условно-патогенной микробиоты, что впоследствии может привести к усугублению функциональных гастроинтестинальных расстройств.

Ключевые слова: функциональные гастроинтестинальные расстройства, дети первого года жизни, микробиота толстой кишки, грудное и смешанное вскармливание.

FEATURES OF SUCCESSION IN COLON MICROBIOTA IN CHILDREN WITH FUNCTIONAL GASTROINTESTINAL DISORDERS DEPENDING ON THE TYPE OF FEEDING

E.V. Grigorova¹, E.I. Ivanova¹, U.M. Nemchenko¹, M.V. Savel'kaeva¹, L.V. Rychkova¹, L.F. Sholkhov¹, L.I. Kolesnikova^{1,2}

¹Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russia

²«Irkutsk state University», Irkutsk, Russia

The microecological characteristics of intestinal biocenosis in children with functional gastrointestinal disorders depending on the type of feeding are given. The objects of the study were children aged 3-6 months (n=241). It is shown that in infants, the colon microbiota was characterized by the registration of low rates of representatives of the opportunistic microbiota, which is probably due to the action of immune protection received from the mother. In children who are on mixed feeding, there are both quantitative and qualitative changes in the composition of the indigenous and opportunistic microbiota, which can subsequently lead to an aggravation of functional gastrointestinal disorders.

Key words: functional gastrointestinal disorders, children of the first year of life, colon microbiota, breastfeeding and mixed feeding.

Введение

Как известно, период от рождения и первые 3-6 месяцев у детей является «критическим». Это связано с тем, что происходит ослабление пассивного гуморального иммунитета, обусловленного каптолизмом материнских антител. Происходит развитие первичного иммунного ответа с синтезом IgM-антител [14]. В этот период бифидо- и лактобактерии становятся основной (резидентной) флорой кишечника, чему в значительной мере способствует грудное вскармливание. У детей, находящихся на искусственном вскармливании, количество бифидо- и лактобактерий снижается, при этом происходит увеличение микробной плотности *Escherichia coli* с различным спектром свойств, *Proteus spp.*, коагулазонегативных стафилококков [8,9].

При нарушении состава микробиоты кишечника происходит образование функциональных гастроинтестинальных расстройств (ФГИР). ФГИР занимают одну из доминирующих позиций в структуре заболеваний органов пищеварения у детей раннего возраста [4,11]. Так, по данным Росстата за 2016 год, в Российской Федерации у детей первого года жизни сохраняется тенденция роста болезней органов пищеварения и составляет 255,3 тысяч случаев по стране [5].

По-прежнему недостаточно четко определено, в каких взаимоотношениях находятся различные микроорганизмы при формировании такого патологического состояния, как ФГИР. Поэтому оценка характера адаптивных и дезадаптивных перестроек микробиоты толстой кишки представляет одну из актуальных проблем патологической физиологии кишечника.

В целом, это и определило *цель работы*, заключающуюся в установлении особенностей микробиоты толстой кишки у детей с функциональными гастроинтестинальными расстройствами в зависимости от вида вскармливания.

Материалы и методы

Объектами исследования являлись дети в возрасте 3-6 месяцев ($n=241$), проходившие обследование в гастроэнтерологическом отделении клиники ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека».

В работе с исследуемыми лицами соблюдались этические принципы, предъявляемые Хельсинской Декларацией Всемирной Медицинской Ассоциацией (World Medical Association Declaration of Helsinki 1964, в редакции Бразилия, октябрь 2013) и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266. Исследование одобрено комитетом по биомедицинской этике ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» протокол № 8 от 28.05.2013 г. (Иркутск, Тимирязева, 16).

Критерии включения: в исследование включали детей с установленным врачом-гастроэнтерологом диагнозом – функциональные гастроинтестинальные расстройства (ФГИР) (согласно МКБ-10, Рабочего протокола диагностики и лечения функциональных заболеваний органов пищеварения у детей, 2010, Римским критериям III (2006 г.), IV (2016 г.)).

Критерии исключения: из исследования исключали детей, имеющих органические заболевания ЖКТ; перенесших инфекции различной локализации; принимавших антибактериальные, пробиотические препараты и лечебные бактериофаги в предшествующие три месяца до обследования; детей, находящихся на искусственном вскармливании; детей, рожденных путем кесарева сечения.

Из числа обследованных 130 детей (53,9%) находились на грудном вскармливании (группа сравнения 1) и 111 детей (46,1%) – на смешанном (группа сравнения 2).

Лабораторные исследования копрологических проб, полученных у обследованных детей с ФГИР, проводили в лаборатории микробиома и микрoэкологии ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека». Для оценки состава микрофлоры кишечника использованы критерии соотношения количества микроорганизмов [10].

При сравнении бактериальной флоры толстой кишки от мальчиков и девочек статистически значимых различий не было выявлено ($p>0,05$), что позволило объединить их в одну группу ($n=241$).

Идентификацию выделенных культур семейства Enterobacteriaceae проводили с использованием общепринятых схем идентификации как классическим методом, так и с использованием коммерческих тест-систем для биохимической идентификации энтеробактерий: СИБ, НИИЭМ, г. Новгород; ENTEROtest 16 и ENTEROtest 24, PLIVA-Lachema, Чехия; сред Гисса, Россия. Инкубация посевов на плотных средах для выделения лакто- и бифидобактерий осуществлялась в микроанаэрозоате с использованием газогенерирующих пакетов «Анаэрогаз». Идентификацию дрожжеподобных грибов осуществляли с использованием хромогенного агара HiCrome Candida Agar (HiCrome Candida Differential Agar) (HiMedia Laboratories, Индия). Для идентификации неферментирующих бактерий использовали стандартную схему (Методики клинических лабораторных исследований: под ред. В.В. Меньшикова, 2009).

По полученным данным, все дети имели различную степень дисбиоза толстой кишки (1 степень – 83 человека (34,4%), 2 степень – 45 человек (18,7%), 3 степень – 113 человек (46,9%)). В связи с этим набор контрольной группы представляется нецелесообразным, поскольку все дети, включенные в исследование, имели ФГИР.

Статистическая обработка полученных результатов осуществлялась при помощи пакетов лицензионных прикладных программ «MS Office Excel 2007 for Windows 7», «Statistica» v.6.1., 2008. Рассчитаны основные показатели непараметрического метода – точного критерия Фишера с определением значения $\phi^*_{эмп}$. При этом считали, что если полученное эмпирическое значение ϕ^* находится в зоне незначимости ($p>0,05$), то гипотеза H_1 отвергается; если полученное эмпирическое значение ϕ^* находится в зоне значимости ($p\leq 0,05$), то гипотеза H_0 отвергается. Данный критерий использовали для проверки гипотез: H_0 – доля лиц, у которых проявляется исследуемый эффект (признак), в выборке 1 не больше, чем в выборке 2; H_1 – доля лиц, у которых проявляется исследуемый эффект (признак), в выборке 1 больше, чем в выборке 2. При увеличении расхождения между углами ϕ_1 и ϕ_2 и увеличения численности выборок значение критерия возрастает. Чем больше величина ϕ^* , тем более вероятно, что различия достоверны.

Результаты и обсуждение

Сравнительный анализ состава микрофлоры у детей двух групп показал статистически значимые различия по содержанию основных компонентов индигенной флоры: бифидобактерий и кишечной палочки.

У 89,2% детей, находящихся на смешанном вскармливании, выявлялся дефицит бифидобактерий, почти в 2 раза чаще встречался дефицит полноценной *E. coli* (НКП), *E. coli* со слабой ферментативной активностью (КП с СФА), по сравнению с группой детей, находящихся на грудном вскармливании ($p \leq 0,05$). Статистически значимых различий между группами сравнения не выявлено по следующим показателям индигенной микробиоты толстой кишки – лактобактерий, *E. coli* с гемолитической активностью (КП с ГА) и энтерококков (табл. 1).

Таблица 1.
Характеристика показателей индигенной микробиоты толстой кишки у детей с ФГИР, а также *E. coli* с различным спектром свойств (абс/%)

Дети с ФГИР	<i>Bifidobacterium</i> spp. (менее 10^{10} КОЕ/г фекалий)	<i>Lactobacterium</i> spp. (более 10^7 КОЕ/г фекалий)	КП с ГА (более 10^2 КОЕ/г фекалий)	НКП (менее 10^7 КОЕ/г фекалий)	КП с СФА (более 10^2 КОЕ/г фекалий)	<i>Enterococcus</i> spp. (более 10^7 КОЕ/г фекалий)
Группа 1 (дети, находящиеся на грудном вскармливании, n=130)	95/73,1	119/91,5	20/15,4	40/30,8	36/27,7	11/8,5
Группа 2 (дети, находящиеся на смешанном вскармливании, n=111)	99/89,2* $\Phi^*_{\text{эмп}} = 3,258$ $p \leq 0,05$	103/92,8	21/18,9	58/52,3* $\Phi^*_{\text{эмп}} = 3,405$ $p \leq 0,05$	50/45,0* $\Phi^*_{\text{эмп}} = 2,801$ $p \leq 0,05$	14/12,6

Примечания: Абсолютное число положительных результатов / частота встречаемости (%); * – различия статистически значимы при $p \leq 0,05$ у детей 3–6 месяцев, находящихся на грудном вскармливании по сравнению с периодом 3–6 месяцев у детей, находящихся на смешанном вскармливании (точный критерий Фишера).

При сравнении частоты встречаемости диагностически значимых представителей УПМ в двух группах так же выявлены статистически значимые различия ($p \leq 0,05$). В группе детей на смешанном вскармливании в 2 раза чаще, по сравнению с первой группой, регистрировали *Klebsiella* spp., *S. aureus*, *Clostridium* spp.; в три раза чаще – *Citrobacter* spp.; в пять раз чаще выявляли *Proteus* spp. (табл. 2).

Таблица 2.
Частота выявления УПМ у детей с ФГИР

Дети с ФГИР	<i>Klebsiella</i> spp. (более 10^4 КОЕ/г фекалий)	<i>S. aureus</i> (более 10^2 КОЕ/г фекалий)	<i>Clostridium</i> spp. (более 10^3 КОЕ/г фекалий)	<i>Candida</i> spp. (более 10^3 КОЕ/г фекалий)	<i>Citrobacter</i> spp. (более 10^4 КОЕ/г фекалий)	<i>Proteus</i> spp. (более 10^4 КОЕ/г фекалий)
Группа 1 (дети, находящиеся на грудном вскармливании, n=130)	51/39,2	50/38,5	20/15,4	17/13,1	3/2,3	2/1,5
Группа 2 (дети, находящиеся на смешанном вскармливании, n=111)	101/90,9* $\Phi^*_{\text{эмп}} = 9,123$ $p \leq 0,05$	63/56,7* $\Phi^*_{\text{эмп}} = 2,848$ $p \leq 0,05$	35/31,5* $\Phi^*_{\text{эмп}} = 2,979$ $p \leq 0,05$	10/9,0	10/9,0 $\Phi^*_{\text{эмп}} = 2,36$ $p \leq 0,05$	11/9,9 $\Phi^*_{\text{эмп}} = 3,049$ $p \leq 0,05$

Примечания: Абсолютное число положительных результатов / частота встречаемости (%); * – различия статистически значимы при $p \leq 0,05$ у детей 3–6 месяцев, находящихся на грудном вскармливании по сравнению с периодом 3–6 месяцев у детей, находящихся на смешанном вскармливании (точный критерий Фишера).

вскармливания по сравнению с периодом 3–6 месяцев у детей, находящихся на смешанном вскармливании (точный критерий Фишера).

Микроорганизмы-ассоцианты (сочетание двух видов УПМ) у детей с ФГИР чаще регистрировались в группе 2 – *S. aureus* и *Clostridium* spp., *Klebsiella* spp. и *S. aureus*, *Klebsiella* spp. и *Clostridium* spp. (табл.3).

Таблица 3.

Частота выявления ассоциаций УПМ толстой кишки у детей с ФГИ (%)

Дети с ФГИР	Условно-патогенные микроорганизмы-ассоцианты	Частота встречаемости, %
Группа 1	<i>S. aureus</i> + <i>Clostridium</i> spp.	10/7,7
	<i>Klebsiella</i> spp. + <i>S. aureus</i>	50/38,5
	<i>Klebsiella</i> spp. + <i>Clostridium</i> spp.	20/15,4
Группа 2	<i>S. aureus</i> + <i>Clostridium</i> spp.	21/18,9* $\varphi^*_{\text{эмп}}=2,615, p\leq 0,05$
	<i>Klebsiella</i> spp. + <i>S. aureus</i>	63/56,7* $\varphi^*_{\text{эмп}}=2,848, p\leq 0,05$
	<i>Klebsiella</i> spp. + <i>Clostridium</i> spp.	35/31,5* $\varphi^*_{\text{эмп}}=2,979, p\leq 0,05$

Примечания: Абсолютное число положительных результатов / частота встречаемости (%); * – различия статистически значимы при $p\leq 0,05$ у детей 3–6 месяцев, находящихся на грудном вскармливании по сравнению с периодом 3–6 месяцев у детей, находящихся на смешанном вскармливании (точный критерий Фишера).

Микробиота кишечника в нестабильном, еще развивающемся организме ребенка играет ключевую роль в его последующем становлении и функционировании. Установлено, что обсемененность толстой кишки у детей раннего возраста проходит несколько стадий: «условно» асептическая (в интранатальном периоде), стадия «нарастающей колонизации» (через 10–20 ч после рождения), «трансформации микробиоты» (начиная с 3-5 дня жизни) [1]. Ряд факторов могут нарушить этапность становления, видовой состав микрофлоры и способствовать развитию инфекционного процесса различной степени выраженности, а также неадекватного иммунного ответа. Одним из благоприятных факторов, влияющих на формирование микрофлоры, является грудное вскармливание. Известно, что видовой состав микробиоты детей, находящихся на искусственном вскармливании, имеет значительные различия. У первых преобладают бифидо и лактобактерии, в то время как у вторых — флора гетерогенна и представлена в значительной мере аэробами и условно-патогенными анаэробами [2].

По нашим данным, у детей на смешанном вскармливании наблюдался не только дефицит основных компонентов индигенной флоры – бифидобактерий (у 89,2%) и НКП (у 52,3%), но и повышенное содержание, по сравнению с детьми, находящимися на грудном вскармливании, *E.coli* с измененными свойствами и УПМ.

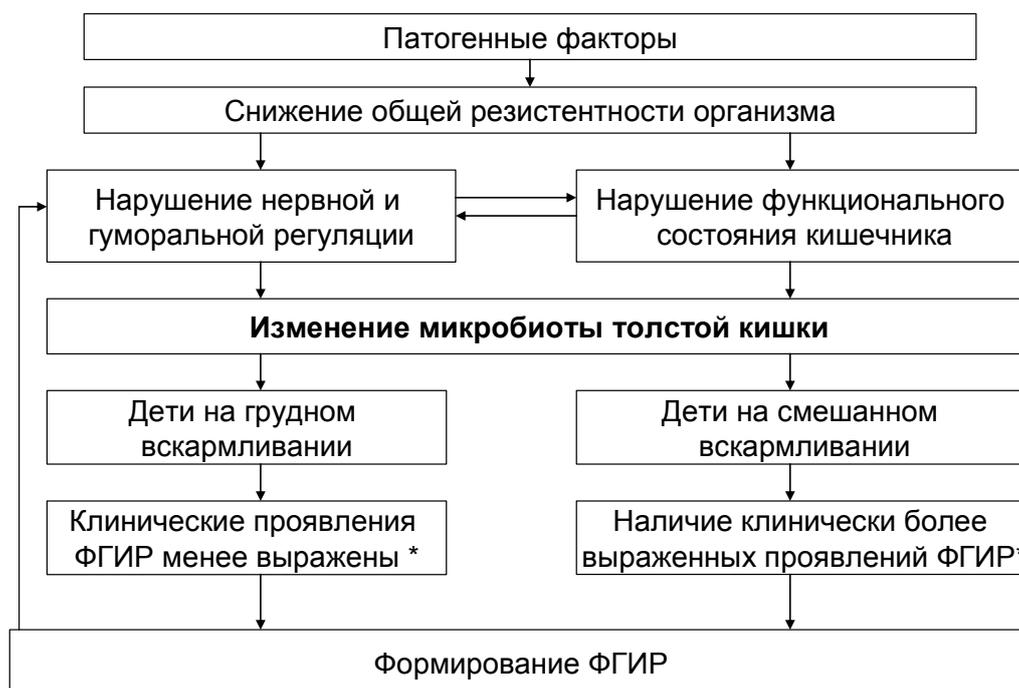
Причины ФГИР обусловлены нарушением нервной и гуморальной регуляции деятельности пищеварительного тракта [15,17]. При ФГИР возможно изменение моторной функции, переваривания и всасывания пищевых веществ, активности иммунной системы макроорганизма [7,12]. УПМ, обладающие потенциалом вирулентности, такие как *Klebsiella*, *S. aureus*, *Clostridium* spp., находятся в тесной связи с эпителиоцитами толстой кишки и являются решающими факторами в модуляции физиологических, метаболических и иммунных процессов толстой кишки [16].

В группе детей на смешанном вскармливании наблюдалось не только повышение концентрации УПМ, но и увеличение частоты встречаемости отдельных представителей (*Klebsiella* spp у 90,9%, *S. aureus* у 56,7%, *Clostridium* spp у 31,5% обследованных) и их ассоциаций. При таких дисбиотических нарушениях происходит изменение функциональной активности кишечной микрофлоры, что, в конечном итоге, приводит к нарушениям липидного и углеводного обменов, и, замыкая патологический круг, усугубляет проявления ФГИР [3,6,13].

Заключение

На основании вышеизложенного нами была разработана концептуальная схема изменения микробиоты толстой кишки у детей с ФГИР в зависимости от вида вскармливания. Под воздействием патогенных факторов происходит снижение резистентности макроорганизма, впоследствии приводя к изменению микробиоты толстой кишки у детей первого года жизни с ФГИР. Данные сдвиги характеризуются не только нарушением нервной и гуморальной регуляции, но и нарушением моторики, всасывания пищевых веществ и приводят к образованию патологической микробиоты у детей с ФГИР независимо от вида вскармливания. По нашему мнению, в патогенезе ФГИР у детей, находящихся на смешанном вскармливании ключевую роль играют изменения, заключающиеся в увеличении в 2 раза

представителей УПМ и их ассоциантов, что сопровождается более выраженными клиническими проявлениями ФГИР, образуя порочный круг указанных расстройств (рис. 1).



* - по данным литературы

Рис. 1. Концептуальная схема изменений микробиоты толстой кишки у детей с ФГИР в зависимости от вида вскармливания

Литература

1. Беляева И.А. Функциональные нарушения желудочно-кишечного тракта у грудных детей, родившихся недоношенными // Актуальные проблемы педиатрии. – 2006. – № 5 (1). – С. 56.
2. Булатова Е.И., Нетребенко О.К., Волкова И.С., Лобанова-Дейн Е.А. Становление и динамика кишечной микробиоты в младенчестве: факторы влияния и риски // Педиатрия. – 2011. – № 90 (5). – С. 112-118.
3. Бухарова Е.В., Попкова С.М., Ракова Е.Б., и др. Детекция некоторых генетических маркеров факторов патогенности в аутоштаммах *Klebsiella* spp. у детей первого года жизни // Бюллетень Востоочно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. – 2014. – № 2(96). – С. 58-62.
4. Григорова Е.В., Немченко У.М., Иванова Е.И., и др. Особенности микробиоценоза толстого кишечника у детей первого года жизни с функциональными нарушениями желудочно-кишечного тракта на фоне высокой популяционной плотности бактерий рода *Klebsiella* // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2017. – № 66. – С: 83-88.
5. Здравоохранение в России. 2017: Статистический сборник / Агеева Л.И., Александрова Г.А., Зайченко Н.М. и др. – Москва: Росстат, 2017. – 170 с.
6. Иванова Е.И., Попкова С.М., Шабанова Н.М., и др. Адгезивные свойства микроорганизмов, колонизирующих различные биотопы организма человека // Известия Иркутского государственного университета. Серия «Биология. Экология». – 2011. – Т. 4, № 4. – С. 25-29.
7. Ильенко Л.И., Холодова И.Н., Сырьева Т.Н., Рубцова А.А. К вопросу о лечении функциональных нарушений желудочно-кишечного тракта у детей грудного возраста и первых лет жизни // Педиатрия. – 2010. – Т. 89, № 5. – С. 118-122.
8. Немченко У.М., Ракова Е.Б., Савелькаева М.В., и др. Комплексная оценка состояния кишечного и носоглоточного микробиоценозов у воспитанников дома ребенка // Клиническая лабораторная диагностика. – 2016. – № 61 (8). –С. 508-512.
9. Николаева И.В., Анохин В.А., Халиуллина С.В. Референтные значения состава кишечной микрофлоры у детей раннего возраста // Практическая медицина. – 2012. – № 7(62) . – С. 114-117.

10. Федеральные клинические рекомендации "Определение дисбиотических изменений желудочно-кишечного тракта по маркерам содержимого кишечника / Алешкин В.А., Сельков, Е.П., Затева-лов А.М., и др. – Новгород: Издательство "Ремедиум Приволжье", 2016. – 35 с.
11. Функциональные расстройства органов пищеварения у детей (в свете Римских критериев IV): методическое пособие для врачей / Бельмер С.В., Хавкин А.И., Печкуров Д.В. – Москва: Ремдер, 2016. – 140 с.
12. Холодова И.В., Ильенко Л.И., Рубцова А.А. Тактика лечения функциональных нарушений желудочно-кишечного тракта у детей раннего возраста // Медицинский совет. – 2015. – № 1. – С. 46-48.
13. Ivanova E.I., Rychkova L.V., Nemchenko U.M., et al. The structure of the intestinal microbiota of the intestine and the frequency of detection of pathogenicity genes (stx1, stx 2, bfp) in *E. coli* with normal enzymatic activity isolated from children during the first year of life // Molecular Genetics, Microbiology and Virology. – 2017. – Т. 32, № 1. – С. 42-48.
14. Iyengar S.R., Walker W.A. Immune factors in breast milk and the development of atopic disease // JPGN. – 2012. – V 55, № 6. – P: 641-647.
15. Leung A.K., Lemau J.F. Infantile colic: a review // J. R. Soc. Health. – 2004. – V. 124, № 4. – P. 162.
16. Lopetuso L.R., Scaldaferrri F., Petito V., Gasbarrini A. Commensal Clostridia: leading players in the maintenance of gut homeostasis // Gut Pathogens. – 2013. – № 5. – P. 23.
17. Paul S.P., Johnson J., Speed H.R. Clinical update: coeliac disease in children // Community Pract. – 2013. – V. 86, №1. – P. 35-37.

Сведения об авторах:

Ответственный автор Григорова Екатерина Владимировна – к.б.н., научный сотрудник лаборатории микрoэкологии и микробиома, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», тел. (3952) 33-34-41; e-mail: buxarowa.ekaterina@yandex.ru.