

АНАЛИЗ ВИДОВОГО РАЗНООБРАЗИЯ СООБЩЕСТВ СИМБИОТИЧЕСКИХ МИКРООРГАНИЗМОВ МИКРОБИОТЫ ТОЛСТОЙ КИШКИ ЧЕЛОВЕКА

Белова И.В.¹, Точилина А.Г.¹, Соловьева И.В.¹, Пожидаева А.С.², Жирнов В.А.¹, Иванова Т.П.¹

¹ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия (603950, Нижний Новгород, ул. Малая Ямская, д.71), e-mail: lab-lb@yandex.ru;

²Нижегородский государственный технический университет им. Р.Е. Алексеева, Нижний Новгород, Россия (603950, ГСП-41, Нижний Новгород, ул. Минина, д. 24), e-mail: pozhidaeva.a.s@gmail.com

Проанализирована база данных результатов бактериологического исследования качественного и количественного состава микробиоценоза толстой кишки 3268 «больных» и «здоровых» людей разного возраста. Получены новые знания о формировании микробиоты человека, доказано, что в онтогенезе в равных соотношениях с первого часа жизни участвуют аэробные и анаэробные микроорганизмы, процесс нарастания анаэробной компоненты идет параллельно с ростом оппортунистических микроорганизмов, минуя «стадию трансформации». Установлено, что 93,8 % детей рождаются с бактериальной флорой, оппортунисты уже присутствуют в составе микробиоты в 8,1% случаев в значимых количествах (≥ 105 КОЕ/г). Показано, что с наибольшей частотой (92%) оппортунистические микроорганизмы в значимых количествах выделялись в группе «здоровых» детей в возрасте от месяца до года. Установлено, что суммарная численность сообществ симбиотических микроорганизмов, выделяемых из толстой кишки здоровых людей на два порядка выше, чем у больных ($p < 0,05$) за исключением возрастной группы 60 лет и старше. Доказано, что все экологические законы и закономерности, свойственные другим природным биотопам и популяциям, справедливы и в отношении микробиоты человека.

Ключевые слова: микроорганизмы, микрофлора кишечника людей, толстая кишка, возрастные группы

THE SPECIES DIVERSITY HUMAN COLON SYMBIOTIC MICROBIOTA MICROORGANISMS ANALYSIS

Belova I.V.¹, Tochilina A.G.¹, Soloveva I.V.¹, Pozhidaeva A.S.², Zhirnov V.A.¹, Ivanova T.P.¹

¹Federal Budget Institution of Science «Nizhny Novgorod Scientific and Research Institute of Epidemiology and Microbiology named after academician I.N. Blochina» Of Federal Service on Surveillance for Consumer Rights Protection and Human Welfare, Nizhny Novgorod, Russia (603950, Nizhny Novgorod, street Malaya Yamskaya, 71), e-mail: lab-lb@yandex.ru;

²Nizhny Novgorod State Technical University n.a. R.E. Alekseev, Nizhny Novgorod, Russia (603950, Nizhny Novgorod, street Minina, 24), e-mail: pozhidaeva.a.s@gmail.com

The research results database of microflora of the large intestine of 3268 “sick” and “healthy” people of all ages has been analyzed. New knowledge about the formation of human microbiota is obtained. It is proved that aerobic and anaerobic microorganismst take part in ontogeny in equal proportions from the first hours of life . The process of growth of anaerobic component runs parallel with the growth of opportunistic microorganisms, except the "stage of transformation." It was established that 93.8% of children are born with a bacterial flora, opportunists are present in the the microbiota in 8.1% of cases in significant quantities (≥ 105 CFU / g). It is shown that most commonly (92%) opportunistic microorganisms in significant quantities have allocated in the group of "healthy" children aged from one month to a year, the total number of colon symbiotic microorganisms is twice higher in the “healthy” group, than in the “sick” one ($p < 0,05$) except for the age group of 60 years and older. It is proved that all environmental laws of natural habitats and populations are also valid for human microbiota.

Keywords: microorganisms, human intestine microflora, thick intestine, age groups

Одним из актуальных направлений экологических исследований в настоящее время является изучение видовой структуры биотических сообществ и закономерностей ее организации. Следует отметить, что описание видовой структуры сообществ организмов

успешно проведено для наземных и водных экосистем, однако в отношении симбиотических сообществ микробиоценозов различных биотопов организма человека до настоящего времени этот вопрос остается актуальным. Это связано с важной ролью, которую играет микробиота в жизнедеятельности макроорганизма, а также с повсеместно наблюдаемыми изменениями экологии микроорганизмов, повлекшими нарастание удельного веса заболеваний, вызываемых микробами-оппортунистами [10]. В связи с этим большой интерес представляет изучение видового разнообразия и структуры симбиотических сообществ микроорганизмов микробиоты человека, среди которых наибольшим видовым богатством характеризуется микробное сообщество толстой кишки, прямо или косвенно влияющее практически на все функции макроорганизма [7].

Новые доступные высокотехнологичные методы исследований, появившиеся в настоящее время, позволяют более подробно изучать видовую структуру сообществ симбиотических микроорганизмов. Современные информационные технологии дают возможность структурировать обширные базы данных, оценивать как множество единичных показателей, так и их совокупность в многомерном пространстве показателей, проводить статистический и экологический анализ. Следует отметить, что описание видовой структуры сообществ организмов успешно проведено для наземных и водных экосистем: зоо- и фитопланктона, зообентоса, растений, сообществ мелких млекопитающих [5]. Аналогичные исследования проведены в отношении симбиотических сообществ микробиоценозов миндалин человека [3], а в отношении микробиоты желудочно-кишечного тракта подобных исследований не проводилось.

В связи с этим актуальным вопросом является изучение закономерностей, управляющих динамикой численности популяций микроорганизмов в составе микробиоты, ее пространственной и видовой структурой, изучение разнообразных типов межпопуляционных отношений, обеспечивающее образование сообществ как систем с относительно стабильным видовым составом. Понимание и теоретическое осмысление экологических закономерностей функционирования симбиотической микрофлоры является необходимой предпосылкой для развития и совершенствования способов влияния на ее формирование и нормализацию с помощью различных форм пробиотиков из представителей резидентной микрофлоры. Широкое распространение дисбиотических нарушений ставит на повестку дня важность разработки методов комплексной коррекции микробиоты, направленных не только на восстановление эволюционно обусловленных микробных популяций, но и обеспечивающих воздействие на макроорганизм в целом.

Цель исследования: на основании изучения экологических закономерностей формирования сообществ симбиотических микроорганизмов толстой кишки «здоровых» и

«больных» людей разных возрастных групп, проживающих на территории промышленного мегаполиса, определить спектр родов микроорганизмов, приоритетных для использования в качестве штаммов-продуцентов пробиотиков.

Материалы и методы исследования: изучен качественный и количественный состав микрофлоры просвета толстой кишки 3268 «здоровых» и «больных» людей разных возрастных групп, всего проведено 5837 анализов, выделено 32 784 культуры, из них идентифицировано до вида 23 497 штаммов микроорганизмов, как представителей облигатной микрофлоры, так и условно-патогенных (УПМ) и патогенных микроорганизмов различных родов.

Изучение микрофлоры толстой кишки проводилось по методу, разработанному Р.В. Эпштейн-Литвак и Ф.Л. Вильшанской и модифицированному в Нижегородском НИИЭМ [6].

Проверка данных на нормальность распределения проводилась с применением статистических критериев Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Уилка. Для статистической обработки полученных результатов использовались непараметрические критерии Mann - Whitney и Kruskal-Wallis [1]. Многомерный кластерный анализ данных проведен методом Варда, результаты кластеризации проанализированы с помощью метода К-средних, критический уровень значимости p принимался за 0,05. В случае множественных сравнений производилась корректировка критического уровня значимости с помощью поправки Бонферрони [1].

Для количественного описания видового разнообразия сообществ симбиотических микроорганизмов толстой кишки человека проведены расчеты с использованием общепринятых в экологии индексов: видового разнообразия Шеннона, доминирования Симпсона, видового богатства Маргалефа и выравненности Пиелу [8, 9]. Индекс Шеннона, для которого разработаны соответствующие алгоритмы, также был применен для подтверждения сделанных обобщений и получения статистически корректных оценок различий (t -критерий Стьюдента) в видовом разнообразии микрофлоры толстой кишки разновозрастных групп здоровых и больных людей [8].

Возрастная периодизация, основанная как на физиологических параметрах, так и на состоянии микробиоты ЖКТ, предложена авторами.

Группы «здоровых» людей были сформированы по критериям здоровья, определенным для каждой возрастной группы в отдельности [4].

В группы «больных» детей в возрасте 0 - 23 часа и 24 часа – 6 суток были включены доношенные дети без врожденных уродств и выраженной патологии, отнесенные к подгруппе риска по развитию гнойно-воспалительных заболеваний по клиническим показателям состояния здоровья новорожденного по шкале Апгар (менее 8 баллов) и

факторам пренатального риска у матери. К «больным» в остальных возрастных группах были отнесены лица, в анамнезе которых на момент обследования отмечались хронические заболевания в стадии обострения или клинические проявления острой формы, на фоне применения антибактериальных и/или других лекарственных средств, так и при первичном обращении до назначения этиотропной терапии, а также все не вошедшие в группу «здоровые».

Методом экспертных оценок из числа клинически значимых родов и видов микроорганизмов, определяющих качественный и количественный состав микрофлоры, были определены 29 признаков, наиболее полно отражающих состояние микробиоценоза ЖКТ человека, включающих 70 родов, 376 видов.

В соответствии с выбранными признаками результаты бактериологических анализов (количества микроорганизмов в 1г. субстрата) были занесены во вновь разработанную СУБД «Автоматизированная система микробиологического мониторинга микробиоценозов желудочно-кишечного тракта (ЖКТ)» (свидетельство о гос. регистрации программ для ЭВМ № 2011614233 от 30.05.2011).

Результаты исследования и их обсуждение

Важным и определяющим звеном в процессе формирования микробиоценоза является первичная колонизация бактериями новорожденного в раннем неонатальном периоде, так как в дальнейшем состояние здоровья индивидуума, и резистентность к целому ряду заболеваний во многом зависит от характера кишечной микрофлоры и ее активности. В связи с этим представляет особый интерес оценка видового разнообразия и видового богатства сообществ микроорганизмов толстой кишки в онтогенезе.

Ранее считалось, что формирование микробиоценоза начинается в процессе родов и обусловлено видовым составом микрофлоры родовых путей матери. Однако в конце 80-х годов прошлого века доказано, что внутриутробно развивающийся плод не является стерильным, а получает от матери какое-то количество индигенных микроорганизмов *in utero*. Далее до семидневного возраста микрофлора претерпевает три стадии становления: первая – «условно-асептическая» начинается с момента рождения; вторая – «нарастающей колонизации» наступает через 10-20 часов после родов. В этот период колонизация осуществляется гетерогенными микроорганизмами, в первую очередь аэробными и факультативно аэробными бактериями, такими как *E.coli*, *Staphylococcus spp.*, *Klebsiella spp.*, *Enterococcus pp.* и др. Третья стадия - «трансформации микрофлоры» - наступает с 5-7 дня после родов, в результате которой происходит вытеснение бифидофлорой других микроорганизмов.

В настоящем исследовании после обобщения данных, полученных по каждой возрастной группе, был смоделирован процесс изменения микрофлоры «здоровых» людей в течение жизни от рождения до старости, имеющий некоторые отличия от вышеописанного.

Установлено, что в период формирования микрофлоры во вторую стадию «нарастающей колонизации» у «здоровых» младенцев параллельно идет активный рост как анаэробных микроорганизмов (лактобацилл, лактококков и бифидобактерий), так и аэробных (кишечной палочки, энтерококка и группы УПМ) в количествах $10^5 - 10^7$ КОЕ/г (рис. 1). Незначительное преобладание бифидофлоры отмечается начиная с третьих суток жизни, стадия трансформации микрофлоры отсутствует.

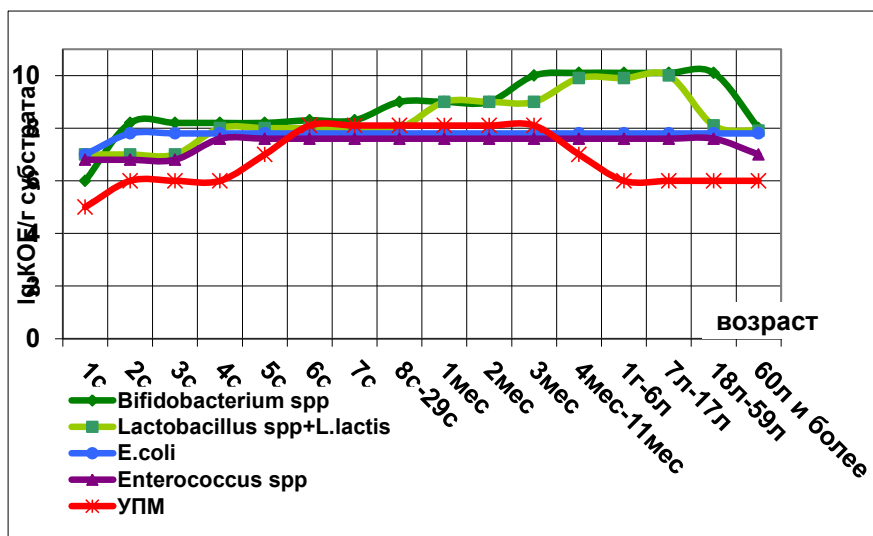


Рис 1. Фазы формирования микробиоценозов группы «здоровых» людей (количество микроорганизмов приведено в усредненных значениях)

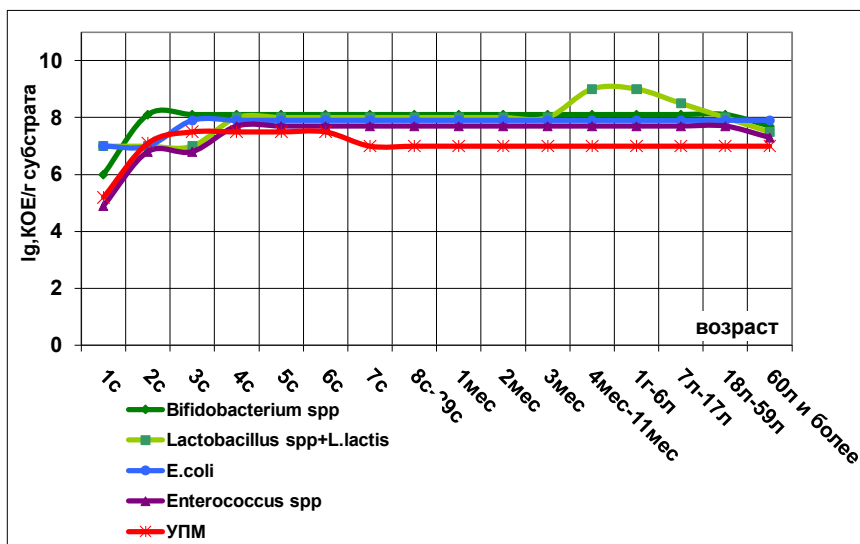


Рис. 2. Фазы формирования микробиоценозов группы «больных» людей (количество микроорганизмов приведено в усредненных значениях)

К шестым суткам, то есть к моменту выписки из родильного дома, количество представителей аэробной и анаэробной части флоры устанавливается на уровне 10^8 КОЕ/г, далее происходит нарастание лакто- и бифидофлоры, и к 2 месяцам жизни ребенка она достигает значений 10^9 - 10^{10} КОЕ/г. На таком уровне количество анаэробов сохраняется и в более старшие возрастные периоды. Снижение количества лакто- и бифидобактерий начинается ближе к 60 годам. Количество нормальной *E.coli* со вторых суток не изменяется и остается на уровне 10^8 КОЕ/г на протяжении практически всей жизни человека. Падение количества УПМ начинается с трехмесячного возраста, к шести годам снижается до уровня 10^6 КОЕ/г и далее не изменяется.

Процесс формирования микрофлоры в группе «больных» детей в первые сутки не отличается от такового у «здоровых» (рис. 2). Количество бифидобактерий и *E.coli* до 10^8 КОЕ/г увеличивается на вторые сутки, лактобацилл и лактококков на третьи. Установившееся к третьим-четвертым суткам пребывания в родильном доме равновесие аэробной и анаэробной части флоры на уровне 10^8 КОЕ/г сохраняется до трех месяцев, и только на четвертый месяц число лактобацилл и лактококков увеличивается до 10^9 КОЕ/г. Далее количественное соотношение микроорганизмов остается неизменным до шестилетнего возраста. Начиная с шести лет количество лактобацилл и лактококков постепенно снижается и в возрастной группе 60 лет и более составляет 10^7 КОЕ/г.

Анализ трендов частоты выделения микроорганизмов у «здоровых» людей позволяет выделить три типа распределения по возрастным группам (рис.3). К первому типу (распределение с насыщением) относятся зависимости для *Lactobacillus spp*, *Bifidobacterium*

spp и *E. coli*, характеризующиеся нарастанием в первые часы и сутки с последующим насыщением, выходящим на стационарный уровень от 1 года жизни и до 60 лет и более. Второй тип – трехфазная зависимость частоты, характерна для *Lactococcus spp.* Эта зависимость имеет максимальное значение частоты выделения в первые сутки жизни с последующим снижением и выходом на стационарный уровень у детей с семидневного возраста. Вторичное снижение частоты выделения наблюдается уже у взрослых. Третий тип – колоколообразная функция отклика характерна для УПМ: от первых часов до 1 года жизни частота выделения возрастает с выходом на максимум в возрастной период 1 - 11 месяцев, далее происходит резкое снижение частоты выделения в возрасте от 1 года до 17 лет, затем переходящее в стационарную фазу. Данный тип распределения частоты выделения микроорганизмов подчиняется одному из фундаментальных законов теоретической экологии – закону толерантности Шелфорда [9].

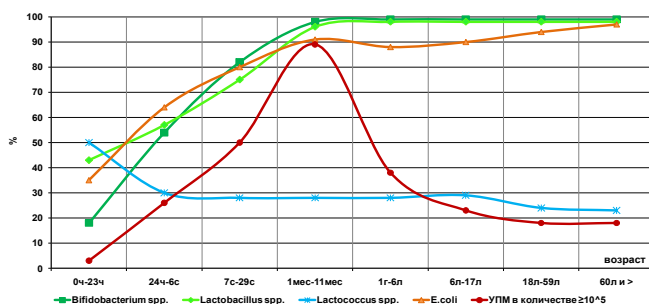


Рис.3. Тенденция (тренд) распределения частоты выделения облигатной микрофлоры и УПМ из кишечника «здоровых» людей различных возрастных групп

Характер распределения трендов частоты выделения микроорганизмов по возрастным группам в микрофлоре «больных» людей имеет отличия от «здоровых» (рис.4). Так, несмотря на сохранение тенденции для *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.* и *E. coli* к распределению с насыщением, они реже встречаются у «больных». Однако наиболее резкие изменения частоты выделения у «больных» касаются УПМ: типичная колоколообразная кривая заметно уплощается, демонстрируя резко сниженную и упрощенную возрастную динамику. И только трехфазная зависимость, характерная для *Lactococcus spp.*, сохраняется и в группе «больных».

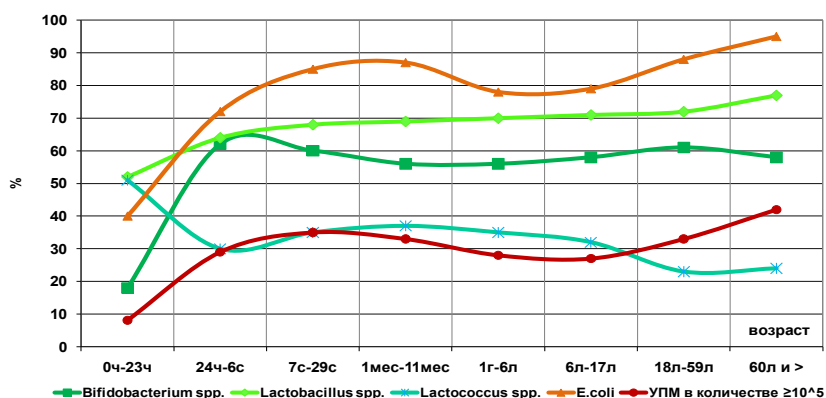


Рис.4. Тенденция (тренд) распределения частоты выделения облигатной микрофлоры и УПМ из кишечника «больных» людей различных возрастных групп

Проанализировав данные о частоте встречаемости отдельных представителей микробиоценоза просвета толстой кишки в микрофлоре «здоровых» людей различных возрастных групп, следует отметить, что в 93,8% дети рождаются с бактериальной флорой ЖКТ, причем в первые 24 часа жизни преобладающей флорой являются микроаэрофильные микроорганизмы родов *Lactobacillus* и *Lactococcus*, а также факультативно-анаэробные бактерии родов *Staphylococcus* и *Escherichia*.

В отличие от «здоровых» у «больных» детей в возрасте от 1 месяца до 1 года наблюдается резкое снижение частоты выделения представителей анаэробной части флоры (лактобацилл и бифидобактерий). Следует отметить тот факт, что в группе «больных» детей УПМ в значимых количествах выделялись реже, чем в группе «здоровых», особенно это заметно в возрастных группах 7 - 29 суток и 1- 11 мес. (37% и 50%, 29.5 и 91.6% соответственно). В более старших возрастных группах частота обнаружения УПМ достоверно выше у «больных», чем у «здоровых», а частота выделения анаэробов снижена. Проведенные исследования показали, что суммарная численность сообществ симбиотических микроорганизмов у «здоровых» людей на один - два порядка выше, чем у больных ($p < 0,05$). Полученные результаты можно объяснить с точки зрения процесса формирования местной толерантности к резидентной микрофлоре и существующей теорией эндогенного инфицирования. Возникновение патологического процесса можно объяснить не количеством выделяемых УПМ, а их измененными свойствами и подавлением лакто- и бифидобактерий [2].

В ходе статистического анализа в каждой возрастной группе пациентов были выявлены виды микроорганизмов - *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*, а также *E. coli*,

Enterococcus spp., S.epidremidis, S.aureus, Klebsiella spp., Citrobacter spp., Proteus spp., Enterobacter spp., численности которых статистически значимо различались у «здоровых» и «больных» людей. Достоверность попарных различий в численности симбиотических микроорганизмов толстой кишки у здоровых и больных по 7 возрастным группам подтверждена методом Манна-Уитни. Эти микроорганизмы были определены как «информационно значимые признаки» - признаки пригодные для использования в процедурах скрининга и диагностики дисбиотических состояний.

Экологический анализ видовой структуры микробиоценозов толстой кишки показал, что во всех возрастных группах, как у «здоровых», так и «больных» людей при увеличении видового разнообразия сообществ симбиотических микроорганизмов, оцениваемого по индексу Шеннона, закономерно снижается доминирование (индекс Симпсона) и возрастает выравненность (индекс Пиелу), что полностью согласуется с основными положениями теоретической экологии.

Результаты синэкологического анализа микробиоты «здоровых» и «больных» людей послужили теоретическими предпосылками для обоснования пробиотикотерапии и разработки новых пробиотиков.

Выводы

В процессе формирования микрофлоры кишечника человека участвуют как аэробные, так и анаэробные микроорганизмы, причем в равных соотношениях с первого часа жизни, процесс нарастания анаэробной компоненты (представители родов Lactobacillus, Lactococcus и Bifidobacterium) идет параллельно с ростом условно-патогенных микроорганизмов, E.coli и бактерий рода Enterococcus, минуя стадию «трансформации», что подтверждено результатами синэкологического анализа базы данных видового состава симбиотических микроорганизмов толстой кишки, проведенного с использованием разработанной программы для ЭВМ «Автоматизированная система микробиологического мониторинга микробиоценозов желудочно-кишечного тракта (ЖКТ)» (свидетельство о гос. регистрации программ для ЭВМ № 2011614233 от 30.05.2011).

Оппортунистические микроорганизмы в значимых количествах ($> 10^5$ КОЕ/г) с наибольшей частотой – в 92% случаев - выделяются в группе «здоровых» детей в возрасте от одного месяца до года. Далее частота выделения УПМ постепенно снижается до 18% (возрастная группа 60 лет и старше). Суммарная численность сообществ симбиотических микроорганизмов, выделяемых из толстой кишки здоровых людей во всех возрастных группах на один - два порядка выше, чем у больных ($p < 0,05$) за исключением группы 60 лет и старше.

Полученные результаты свидетельствуют, что все экологические законы и зависимости, свойственные другим природным биотопам и популяциям, справедливы и в отношении микробиоты человека. Кроме того, все выявленные закономерности, характерные для части микробного сообщества микрофлоры толстой кишки, представленной фиксированным набором 29 показателей, учитывающих количества различных видов микроорганизмов в одном грамме субстрата, сохраняются и развиваются также и для популяции в целом.

Выявлено, что количество бактерий родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*, а также *E. coli*, *Enterococcus* spp, *S.epidremidis*, *S. aureus*, *Klebsiella* spp., *Citrobacter* spp., *Proteus* spp., *Enterobacte* r spp. относится к «информационно-значимым показателям», то есть их численность статистически значимо различается у «здоровых» и «больных» людей одного возраста и между возрастными группами, что позволяет верифицировать классификационные решения по разделению пациентов на категории «здоровые» и «больные» с учетом возраста в многомерном пространстве показателей.

Результаты синэкологического анализа микробиоты «здоровых» и «больных» людей являются обоснованием для разработки и применения пробиотиков, содержащих бактерии родов *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* и *Lactococcus*.

Список литературы

1. Банержи А. Медицинская статистика понятным языком: вводный курс / пер. с англ. под ред. В.П. Леонова. – М.: Практическая медицина, 2007. – 287с.
2. Бондаренко В.М. Роль условно-патогенных бактерий кишечника в полиорганной патологии человека. – Тверь: ООО «Издательство «Триада», 2007. – 64с.
3. Бухарин О.В., Усвяцова Б.Я., Хуснутдинова Л.М. Межбактериальные взаимодействия // ЖМЭИ. – 2003. – №4. – С.3- 8.
4. Вельтищев Ю.Е., Ветров В.П. Объективные показатели нормального развития и стстояния здоровья ребенка (нормативы детского возраста). – М.: Наука, 2002. – 96 с.
5. Гелашвили Д.Б., Дмитриев А.И., Иудин Д.И. и др. Мультифрактальный анализ видовой структуры сообществ мелких млекопитающих Нижегородского Поволжья // Экология. – 2008. – № 6. – С. 456–461.
6. Диагностика и биокоррекция нарушений антиинфекционного гомеостаза в системе «Мать-дитя»: книга практического врача [под ред. Е.И.Ефимова, К.Я.Соколовой]. Н. Новгород: НижГМА, 2004. – с. 153-172.

7. Дисбиоз кишечника. Руководство по диагностике и лечению. 2-е изд., испр. и доп. [под ред. Е.И. Ткаченко, А.Н. Суворова]. СПб. – ИнформМед, 2009. – 276 с.
8. Мэггаран Э. Экологическое разнообразие и его измерение. – М.: Мир, 1992. – 184с.
9. Одум Ю. Основы экологии. – М.: Мир, 1975. – 741 с.
10. Шендеров Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание. Том III: Пробиотики и функциональное питание. – М.: ГРАНТЬ, 2001. – 288с.

Рецензенты:

Смирнов В.Ф., д.б.н., профессор кафедры Физиологии и биохимии человека и животных ФГАОУ ВО «Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского», г. Нижний Новгород.

Заславская М.И., д.б.н., профессор кафедры микробиологии и иммунологии ГБОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения России, г. Нижний Новгород.