

УДК 616.72-002.77-08:616.34-008.87

МИКРОБИОЦЕНОЗ КИШЕЧНИКА И ЕГО ОСОБЕННОСТИ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ ПРОБИОТИКОВ У БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ

Гульнева М.Ю., Носков С.М., Потапова Е.М., Малафеева Э.В.

Ярославский государственный медицинский университет, Ярославль, e-mail: ch-ma@mail.ru

Проведено изучение микрофлоры толстого кишечника у 70 больных ревматоидным артритом (РА). У больных РА изменение микробиоценоза толстого кишечника проявлялось снижением частоты выделения лактобактерий и повышением частоты обнаружения энтерококков, клостридий, кишечных палочек с измененными ферментативными свойствами, стафилококков, условно-патогенных энтеробактерий и микроорганизмов, обладающих гемолитической активностью. Изменение количественного состава микрофлоры кишечника характеризовалось снижением уровня бифидобактерий. Больным, у которых наблюдалось выраженное нарушение количественного и качественного состава микрофлоры, в комплексном лечении рекомендовано применение пробиотика «бифидумбактерина». У больных РА при применении пробиотика наблюдалось существенное повышение количества лактобактерий, снижение титров лактозонегативных эшерихий и существенное снижение количества условно-патогенных энтеробактерий. Прослеживалась тенденция к нормализации микробиоценоза толстого кишечника больных РА.

Ключевые слова: нормальная микрофлора организма, ревматические заболевания, пробиотики.

GUT MICROBIOTA AND ITS FEATURES IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS AT APPLICATION OF PROBIOTICS

Gulneva M.Yu., Noskov S.M., Potapova E.M., Malafeeva E.V.

Yaroslavl State Medical University, Yaroslavl, e-mail: ch-ma@mail.ru

Studying of microflora of a large intestine at 70 patients with rheumatoid arthritis (RA) is carried out. The change of the microbiocenosis of a large intestine in the RA patients manifested reduction in the incidence of detection of lactobacilli and increase of frequency of detection of enterococci, Clostridium, Escherichia coli with altered enzymatic properties, staphylococci, opportunistic enterobacteria and microorganisms with hemolytic activity. Changes in the quantitative composition of intestinal microflora characterized by the decrease in the level of bifidobacteria. The use of probiotic "bifidumbacterin" was recommended in complex treatment to patients who experienced a pronounced violation of the quantitative and qualitative composition of microflora. There was a significant increase in the number of lactobacilli, reduced lactose-negative Escherichia titles and a significant reduction in the number of opportunistic enterobacteria in the application of probiotics in RA patients. There is a tendency to normalization microbiocenosis colon RA patients. The tendency to normalization of a microbiocenosis of large intestines in RA patients was traced.

Keywords: normal microflora, rheumatic diseases, probiotics.

Все чаще признается, что нарушения нормальной микрофлоры может привести к иммунной дисфункции и аутоиммунным реакциям [4]. Комменсалы кишечника участвуют в поддержании иммунного гомеостаза и функции организма, однако они могут иметь решающее значение в изменении иммунной системы, что приводит к таким заболеваниям как ревматоидный артрит (РА) [9, 11, 12]. Нарушение микрофлоры организма является всегда вторичным состоянием и замыкает патогенетический порочный круг, разорвать который необходимо как для успешного лечения основного заболевания [1]. С этой целью используются различные биологические препараты [2]. Большинство данных свидетельствуют о том, что пробиотики являются безопасными и во многих случаях полезными средствами [3]. При ревматических заболеваниях для

коррекции изменений характера микрофлоры организма больных рекомендуется применение пробиотиков [14, 15]. Применение пробиотиков в комплексном лечении РА может улучшить воспалительный статус больных, облегчить симптомы заболевания и помочь увеличить повседневную деятельность пациентов [7, 8, 10]. Однако, при применении пробиотиков у больных РА не всегда наблюдается статистически значимые изменения клинических проявлений болезни и лабораторных тестов [5]. В связи с этим практическое и теоретическое значение приобретает вопрос изучения особенностей микробного биоценоза кишечника больных РА при применении пробиотиков.

Целью настоящего исследования было изучение микробного биоценоза толстого кишечника и его особенностей при применении пробиотиков у больных РА.

Материалы и методы исследования

Проведено изучение микрофлоры кишечника у 70 больных РА и 40 лиц группы сравнения. Диагноз РА устанавливали согласно критериям Американской ревматологической ассоциации (ARA, 1987). Критериями включения лиц в группу сравнения были возрастное соответствие группе больных РА (от 45 до 60,5 лет), отсутствие клинических и микробиологических проявлений дисбиоза, определенных приказом Минздрава России № 231 (ОСТ 91500.11.0004-2003). Средний возраст больных РА был $59,89 \pm 12,06$ лет. Продолжительность заболевания составила в среднем $12,14 \pm 11,22$ лет.

Преобладали пациенты со II рентгенологической стадией (64,6%) поражения суставов. Активность РА выражали в баллах индекса DAS28: низкая степень активности ($2,6 < DAS28 < 3,2$) наблюдалась у 23,7% больных, умеренная ($DAS28 = 3,2-5,1$) I – у 56,2%, высокая ($DAS28 > 5,1$) III – у 20% больных. Все пациенты принимали метотрексат (7,5-12,5 мг/нед.), 72,8% больных глюкокортикостероиды перорально (преднизолон по 5-15 мг/сут.) или внутривенно (триамцинон от 2 до 6 инъекций в год). В качестве симптоматических средств назначались НПВП (диклофенак от 50 до 100 мг/сут. Для оценки качественного и количественного состава микрофлоры толстого кишечника использовали бактериологический метод в соответствии с методическими указаниями «Бактериологическая диагностика дисбактериоза кишечника» (2004). Обнаружение в биологических пробах ДНК бактериоидов (*Bacteroides* spp.) проводилось методом ПЦР с применением набора реагентов для ампли-

фикации научно-производственной фирмы «Литех» (г. Москва). Определяли видовой состав, количество отдельных представителей микрофлоры кишечника в КОЕ/г испражнений. Статистический анализ данных выполнен на IBM PC совместимом компьютере с помощью программы STATISTICA (Data analysis software system, StatSoft) версия 7.0. Результаты исследований представлены в виде средней \pm стандартное отклонение ($M \pm SD$). Сравнение непрерывных величин с нормальным распределением проводилось с помощью t-критерия Стьюдента. Дискретные величины сравнивались с использованием критерия χ^2 . Различия между группами считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Данные о качественном составе микрофлоры толстого кишечника у больных РА представлены в таблице 1.

Характеризуя качественный состав кишечной микрофлоры больных РА, можно отметить, что у пациентов наблюдалось снижение частоты выделения лактобактерий до 74,28% при обнаружении данных микроорганизмов в кале лиц группы сравнения в 100% случаев. Повышалась частота выделения энтерококков до 75,71%, в то время как у лиц группы сравнения они высеивались только в 10% случаев.

Таблица 1

Качественный состав микрофлоры кишечника у больных ревматоидным артритом

Микроорганизмы	Группы обследованных			
	Больные РА (n=70)		Группа сравнения (n=40)	
	Количество выделенных культур			
	абс.	%	абс.	%
Бифидобактерии	70	100	40	100
Лактобактерии	52*	74,28	40	100
Бактероиды	70	100	34	85
Энтерококки	53*	75,71	4	10
Клостридии	39*	55,71	8	20
Кишечные палочки типичные	70	100	40	100
Кишечные палочки (<Iac ⁺)	41*	58,57	9	22,50
Кишечные палочки (Iac ⁻)	18	25,71	4	10
Условно-патогенные энтеробактерии	38*	54,28	0	0
Стафилококки	42*	60	18	45
<i>S. aureus</i>	30*	42,86	0	0
Дрожжеподобные грибы рода <i>Candida</i>	18	25,71	4	10
Микроорганизмы гемолитические	39*	55,71	0	0

Примечание: * – достоверность различия ($p < 0,05$) в частоте выделения микроорганизмов (данные χ^2).

При РА происходили существенные изменения в частоте обнаружения кишечных палочек с измененными ферментативными свойствами. До 58,57% возрастал уровень кишечных палочек со сниженными ферментативными свойствами и до 25,71% частота выделения лактозонегативных эшерихий. У лиц группы сравнения данные микроорганизмы были обнаружены соответственно в 22,50% и 10% случаев. Повышалась частота обнаружения стафилококков до 60% при их уровне у здоровых лиц равном 45%. Для микробиоценоза кишечника больных РА характерно наличие в испражнениях условно-патогенных энтеробактерий в 54,28% случаев и микроорганизмов, обладающих гемолитической активностью (55,71%). У лиц группы сравнения условно-патогенные кишечные бактерии и микроорганизмы с гемолитической активностью не были обнаружены. Условно-патогенные бактерии семейства Enterobacteriaceae у больных РА были представлены видами *Proteus vulgaris* (38,89%), *Klebsiella enterocolitica* (33,33%) культур, *Enterobacter cloacae* (16,67%) и *Morganella morganii* (11,113%).

У больных РА выявлялось существенное изменение количественного состава микрофлоры кишечника (таблица 2).

Уровень бифидобактерий снижался до $\lg 6,40 \pm 0,86$ КОЕ/г, бактероидов до $\lg 8,80 \pm 0,65$ КОЕ/г, при их содержании в испражнениях лиц группы сравнения соответственно $\lg 9,11 \pm 0,93$ КОЕ/г и $\lg 9,45 \pm 0,82$ КОЕ/г. Следует подчеркнуть, что в кишечнике больных РА существенно изменялось представительство кишечных палочек. Число типичных лактозопозитивных кишечных палочек снижалось до $\lg 5,24 \pm 1,72$ КОЕ/г, а количество эшерихий со сниженными ферментативными свойствами увеличивалось до $\lg 7,56 \pm 2,16$ КОЕ/г. В кишечнике больных РА определялись УПЭБ в титре $\lg 5,58 \pm 0,54$ КОЕ/г и микроорганизмы, обладающие гемолитической активностью, в пределах $\lg 3,89 \pm 0,86$ КОЕ/г, в то время как у лиц группы сравнения они не обнаруживались. Характерным для РА являлось повышение в кишечнике больных уровня стафилококков до $\lg 5,40 \pm 0,48$ КОЕ/г при количестве стафилококков у здоровых лиц $\lg 2,88 \pm 0,93$ КОЕ/г и возрастание титров *S. aureus* до $\lg 3,17 \pm 0,98$ КОЕ/г ($p < 0,001$).

Основываясь на том, что у больных РА наблюдались микробиологические нарушения микрофлоры толстого кишечника, была отобрана группа пациентов с выраженным изменением количественного и качествен-

Таблица 2

Количественный состав микрофлоры кишечника у больных ревматоидным артритом

Микроорганизмы	Группы обследованных		
	Больные РА (n=70)	Группа сравнения (n=40)	
	Количество микроорганизмов \lg КОЕ / г		
	M \pm SD	M \pm SD	p
Бифидобактерии	6,40 \pm 0,86	9,11 \pm 0,93	<0,001
Лактобактерии	7,76 \pm 0,46	7,15 \pm 1,09	>0,05
Бактероиды	8,80 \pm 0,65	9,45 \pm 0,82	>0,05
Энтерококки	5,45 \pm 0,36	3,20 \pm 0,84	<0,05
Клостридии	6,00 \pm 1,20	5,37 \pm 1,01	>0,05
Кишечные палочки типичные	5,24 \pm 1,72	7,37 \pm 1,01	>0,05
Кишечные палочки (<Iac ⁺)	7,56 \pm 2,16	3,89 \pm 0,60	<0,001
Кишечные палочки (Iac ⁻)	4,87 \pm 1,45	3,00 \pm 0,71	>0,05
Условнопатогенные энтеробактерии	5,58 \pm 0,54	0	<0,001
Стафилококки	5,40 \pm 0,48	2,88 \pm 0,93	<0,01
<i>S. aureus</i>	3,17 \pm 0,98	0	<0,001
Дрожжеподобные грибы рода <i>Candida</i>	4,00 \pm 2,00	2,60 \pm 0,55	>0,05
Микроорганизмы гемолитические	3,89 \pm 0,86	0	<0,001

ного состава микрофлоры, которым в соответствии с приказом Минздрава России № 231 «Об утверждении отраслевого стандарта. Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника» (ОСТ 91500.11.0004-2003) рекомендован двадцатидневный курс, включающий применение бифиформа (Biform) и лактусана. Изучение количественных и качественных характеристик микрофлоры толстого кишечника проводилось до начала лечения и через 14 дней после окончания приема препаратов. Бифиформ – пробиотик, одна капсула которого содержит *Bifidobacterium longum* – не менее 10^7 бактериальных клеток; *Enterococcus faecium* – не менее 10^7 бактериальных клеток. Препарат назначали в дозе 2 капсулы в день. Лактусан в форме сиропа назначался пациентам по 20 мл/сутки с разделением дозировки на два приема.

Данные, характеризующие качественный состав микрофлоры толстого кишечника у больных РА представлены в таблице 3. Характеризуя качественный состав кишеч-

ной микрофлоры больных РА, можно отметить, что у пациентов не наблюдалось существенного изменения частоты выделения резидентных и транзитных представителей микрофлоры толстого кишечника в условиях применения про- и пребиотиков ($p > 0,05$).

Количественный состав микрофлоры кишечника при применении пробиотика у больных РА представлен в таблице 4. При использовании пробиотика наблюдалось существенное изменение количества лактобактерий и условно-патогенных энтеробактерий. Титр лактобактерий повышался от $\lg 5,70 \pm 1,49$ КОЕ/г до $\lg 6,20 \pm 1,03$ КОЕ/г ($p < 0,05$). Количественные характеристики УПЭБ характеризовались существенным снижением их числа в ходе терапии от $\lg 4,71 \pm 1,49$ КОЕ/г до $\lg 3,28 \pm 0,75$ КОЕ/г ($p < 0,05$). После применения пробиотика наблюдалась нормализация уровня лактозонегативных кишечных палочек, их титр определялся в пределах $\lg 4,60 \pm 1,14$ КОЕ/г, у здоровых лиц этот показатель равен $\lg 3,00 \pm 0,71$ КОЕ/г.

Таблица 3

Качественный состав микрофлоры кишечника у больных ревматоидным артритом при применении пробиотика

Микроорганизмы	Частота выделения микроорганизмов					
	У больных РА при применении пробиотика				Группа сравнения n=40	
	До лечения (n=10)		После лечения (n=10)			
	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Бифидобактерии	10	100	10	100	40	100
Лактобактерии	10	100	10	100	40	100
Бактероиды	10	100	10	100	34	85
Энтерококки	7**	70	7**	70	4	10
Клостридии	2	20	2	20	8	20
Кишечные палочки типичные	10	100	10	100	40	100
Кишечные палочки (Iac^+)	5**	50	5**	50	9	22,50
Кишечные палочки (Iac^-)	5	50	5	50	4	10
Условно-патогенные энтеробактерии	7**	70	7**	70	0	0
Стафилококки	9**	90	8**	80	18	45
<i>S. aureus</i>	2**	20	1	10	0	0
Дрожжеподобные грибы рода <i>Candida</i>	1	10	1	10	4	10
Микроорганизмы гемолитические	5**	50	4**	40	0	0

Примечание: * – достоверность различий (данные χ^2) в частоте выделения микроорганизмов у больных до и после лечения; ** – достоверность различий с лицами группы сравнения ($p < 0,05$).

Количественный состав микрофлоры кишечника
у больных ревматоидным артритом при применении пробиотика

Микроорганизмы	Число микроорганизмов Ig КОЕ / г		
	У больных РА при применении пробиотика		Группа сравнения n=40
	До лечения (n=10)	После лечения (n=10)	
	М ± SD	М ± SD	М ± SD
Бифидобактерии	6,88 ± 1,27**	6,89 ± 0,78**	9,11 ± 0,93
Лактобактерии	5,70 ± 1,49	6,20 ± 1,03*	7,15 ± 1,09
Бактероиды	6,70 ± 1,49**	6,80 ± 1,62**	9,45 ± 0,82
Энтерококки	5,57 ± 2,43	5,00 ± 1,41	3,20 ± 0,84
Клостридии	6,00 ± 1,41	6,00 ± 0,71	5,37 ± 1,01
Кишечные палочки типичные	6,30 ± 1,49	6,70 ± 0,60	7,37 ± 1,01
Кишечные палочки (<Iac ⁺)	6,80 ± 1,79**	6,20 ± 1,30**	3,89 ± 0,60
Кишечные палочки (Iac ⁻)	5,40 ± 0,89**	4,60 ± 1,14 *	3,00 ± 0,71
Условно-патогенные энтеробактерии	4,71 ± 1,49**	3,28 ± 0,75* **	0
Стафилококки	5,37 ± 1,41**	5,37 ± 0,91**	2,88 ± 0,93
<i>S. aureus</i>	2,00 ± 0**	3,00 ± 0**	0
Дрожжеподобные грибы рода <i>Candida</i>	4,00 ± 0**	4,00 ± 0**	2,60 ± 0,55
Микроорганизмы гемолитические	4,00 ± 1,41**	3,25 ± 0,96**	0

Примечание: * – достоверность различий до и после лечения; ** – достоверность различий с лицами группы сравнения (p<0,05).

Заключение

У больных РА изменение микробиоценоза толстого кишечника проявлялось снижением частоты выделения лактобактерий и повышением частоты обнаружения энтерококков, клостридий, кишечных палочек с измененными ферментативными свойствами, стафилококков, УПЭБ и микроорганизмов, обладающих гемолитической активностью. Изменение количественного состава микрофлоры кишечника характеризовалось снижением уровня бифидобактерий. Установленное снижение количества бифидобактерий у больных РА, наблюдалось и в исследованиях Vaahrovuo [13]. Отмечалась тенденция к увеличению титров лактобактерий, что согласуется с результатами Liu X et al [6] и может указывать на потенциальную связь между лактобактериями и прогрессированием РА. Нарушение микрофлоры организма больных РА определило целесообразность изучения возможности коррекции микробного статуса. У больных РА при применении пробиотика наблюдалось существенное повышение количества лактобактерий, снижение титров лактозонегативных эшерихий и существенное снижение количества условно-патогенных энтеробактерий.

Полученные данные показывают необходимость изучения кишечной микрофлоры больных РА для решения вопросов рациональной терапии, так как применение пробиотических препаратов может способствовать позитивному изменению микрофлоры кишечника больных. Потенциал применения пробиотиков при РА достоин рассмотрения, учитывая необходимость в новых терапевтических подходах, и растущее признание важности микробных взаимодействий организма человека [15].

Список литературы

1. Сабельникова Е.А. Клинические аспекты дизбактериоза кишечника // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2011. – № 3 – С. 111-116.
2. Calder P.C., Albers R., Antoine J.M. et al. Zhao J Inflammatory disease processes and interactions with nutrition // Br J Nutr. – 2009. – Vol. 1, № 101. – P. 1-45.
3. Didari T., Solki S., Mozaffari S. et al. A systematic review of the safety of probiotics // Expert Opin Drug Saf. – 2014. – № 3. [Epub ahead of print].
4. Fung I., Garrett J.P., Shahane A., Kwan M. Do bugs control our fate? The influence of the microbiome on autoimmunity // Curr Allergy Asthma Rep. – 2012. – Vol. 6, № 12. – P. 511-519.

5. Hatakka K., Martio J., Korpela M. et al. Effects of probiotic therapy on the activity and activation of mild rheumatoid arthritis - a pilot study // *Scand J Rheumatol.* – 2003. – Vol. 4, № 32. – P. 211-215.
6. Liu X., Zou Q., Zeng B., Fang Y. et al. Fecal microbiota transplantation for *Clostridium difficile* infection: benefits and barriers // *Curr Opin Gastroenterol.* – 2014 – Vol. 1, № 30 – P. 47-53.
7. Mandel D.R., Eichas K., Holmes J. *Bacillus coagulans*: a viable adjunct therapy for relieving symptoms of rheumatoid arthritis according to a randomized, controlled trial. *BMC Complement Altern Med.* – 2010. – Vol. 1, № 12. – P. 10-11.
8. Pineda Mde L., Thompson S.F., Summers K., de Leon F., Pope J., Reid G. A randomized, double-blinded, placebo-controlled pilot study of probiotics in active rheumatoid arthritis // *Med Sci Monit.* – 2011. – Vol. 6, № 17. – P. 347-354.
9. Round J.L., O'Connell R.M., Mazmanian S.K. Coordination of tolerogenic immune responses by the commensal microbiota // *J Autoimmun.* – 2010. – Vol. 3, № 34. – P. 220-225.
10. Scofield R.H. Rheumatic diseases and the microbiome // *Int J Rheum Dis.* – 2014. – Vol. 5, № 17. – P. 489-492.
11. Taneja V. Arthritis susceptibility and the gut microbiome // *FEBS Lett.* – 2014. – Vol. 22, № 17. – P. 4244-4249.
12. Tlaskalová-Hogenová H., Štěpánková R., Hudcovic T. et al. Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases // *Immunol. Lett.* – 2004. – Vol. 2-3, № 93. – P. 97-108.
13. Vahtovuo J., Munukka E., Korkeamäki M., Luukkainen R., Toivanen P. Fecal microbiota in early rheumatoid arthritis // *J Rheumatol.* – 2008. – № 35. – P. 1500-1505.
14. Vieira A.T., Teixeira M.M., Martins F.S. The role of probiotics and prebiotics in inducing gut immunity // *Front Immunol.* – 2013. – Vol. 4, № 12. – P. 445.
15. Yeoh N., Burton J.P., Suppiah P., Reid G., Stebbings S. The role of the micro-biome in rheumatic diseases // *Curr Rheumatol Rep.* – 2013. – Vol. 3, № 15. – P. 314.