

Пробиотики в терапии постинфекционного синдрома раздраженного кишечника

В.И. Симаненков¹, А.Н. Суворов², С.М. Захаренко³, А.Н. Бочкарева², З.Р. Сундукова¹

¹СПбМАПО, ²НИИ экспериментальной медицины РАМН, ³Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

Около 25–30% больных после острой кишечной инфекции имеют симптомы одного из наиболее распространенных функциональных расстройств желудочно-кишечного тракта – синдрома раздраженного кишечника (СРК). В генезе постинфекционного СРК существенную роль играют дисбиотические расстройства, сочетающиеся с субклиническим воспалением, нейроиммунными нарушениями и сенсорно-моторной дисфункцией. В результате «сцепления» местных – внутрисистемных нарушений – с центральными дисрегуляторными расстройствами формируются гиперсенситивность и гиперреактивность толстой кишки. Единой точки зрения в отношении стратегии и тактики применения пробиотиков при этом заболевании не существует. В работе обсуждаются вопросы безопасности применения пробиотиков на основе энтерококков (Линекс, Словения; Ламинолакт, Россия) и перспективы применения оригинальной методики аутопробиотической терапии при СРК.

Ключевые слова: постинфекционный синдром раздраженного кишечника, пробиотики, Линекс, Ламинолакт, энтерококки

Одним из наиболее распространенных функциональных расстройств желудочно-кишечного тракта является синдром раздраженного кишечника (СРК). В зарубежной литературе приводятся данные, в соответствии с которыми около 10–15% взрослого населения имеют симптомы СРК [1]. Результаты проведенного нами исследования свидетельствуют, что распространенность СРК в г. Санкт-Петербурге достигает 8,5% среди взрослого населения, при этом женщины страдают приблизительно в 2 раза чаще мужчин [2]. Социальная значимость СРК подчеркивается тем фактом, что средний возраст пациентов составляет 24–41 год. Среди лиц пожилого возраста (65–93 года) распространенность СРК составляет 10,9% по сравнению с 17% у лиц 30–64 лет [3].

Несмотря на огромное число работ, посвященных СРК, механизмы его развития и течения остаются во многом дискуссионными. Наиболее популярной остается биопсихосоциальная модель, предложенная D. Drossman еще в 1998 году и описанная в Римских критериях II и III [4].

В соответствии с современными представлениями, сформулированными в Римских критериях III, СРК является биопсихосоциальным расстройством, в основе развития которого лежат 2 основных патологических механизма – психосоциальное воздействие и сенсорно-моторная дисфункция кишечника. Эти механизмы были нами ранее детально рассмотрены в «Руководстве по психосоматической медицине», опубликованном в 2008 г. [5].

Третьим, принципиально важным, фактором являются стойкие нейроиммунные повреждения, которые развиваются после инфекционных заболеваний кишечника и рассматриваются как возможная причина формирования сенсорно-моторной дисфункции. В данной работе нам хотелось бы более детально рассмотреть особенности развития, течения и терапии СРК, развивающегося после перенесенных острых кишечных инфекций (ОКИ). Чаще всего его называют постинфекционным СРК (PI-IBS, ПИ-СРК).

История изучения ПИ-СРК насчитывает уже около 60 лет. Впервые детальное описание данного варианта СРК дал G.T. Stewart в 1950 году. В этой работе было отмечено, что у 24–32% больных, перенесших ОКИ, в течение 3 месяцев развивается СРК-подобный синдром. В настоящее время доказано, что острые бактериальные гастроэнтероколиты являются серьезным фактором риска развития СРК. По данным разных авторов, у 7–33% пациентов после перенесенной кишечной инфекции в период от 3–4 мес до 6 лет развивается клиническая

картина, подобная СРК, с преобладанием диарей [6–9]. При этом лишь около 10% пациентов с СРК связывают заболевание с перенесенной инфекцией, а около 50% из них выздоравливают в течение ближайших 6 лет [10].

Столь большой разброс данных может быть связан с методическими сложностями, возникающими при попытках эпидемиологической оценки ретроспективных данных. В связи с этим, особый интерес представляют проспективные наблюдения за пациентами, перенесшими ОКИ. Эти исследования показали, что у 24–32% пациентов через 3 месяца после инфекции формируется СРК-подобный синдром [6, 7]. В работах шведских авторов указывается, что вероятность развития ПИ-СРК после острого инфекционного гастроэнтерита составляет 12%. По данным испанских авторов, заболеваемость СРК после бактериального гастроэнтерита (ГЭ) составила 98,2 на 10 000 человек в год, а в контрольной группе – 45,3 на 10 000 человек в год. Скорректированный относительный риск СРК после бактериального ГЭ составил 2,2 (95% доверительный интервал 1,5–2,9) по отношению к контрольной группе [9].

Можно констатировать, что отнесение расстройства к категории ПИ-СРК в клинической практике остается достаточно субъективным. В отечественной литературе можно встретить следующие критерии ПИ-СРК [11]:

- 1) соответствие диагноза Римским критериям;
- 2) упоминание в анамнезе о перенесенных кишечных инфекциях, предшествующих заболеванию;
- 3) обнаружение маркеров ОКИ в биологических средах больного;
- 4) нарушение состава микрофлоры в бактериологических посевах кала;
- 5) избыточный бактериальный рост в тонкой кишке;
- 6) изменение мукозной микрофлоры слизистой оболочки тонкой кишки;
- 7) снижение напряженности иммунитета;
- 8) положительный эффект от терапии кишечными антисептиками и пробиотиками.

Как видно из этой цитаты, прямое отношение к части диагноза «постинфекционный» имеет лишь второй критерий, однако и он не обладает достаточной четкостью. С учетом длительности анамнеза ни один из критериев 3–7 не может быть напрямую соотнесен с имеющимся у больного СРК.

По мнению большинства исследователей, существуют predisposing факторы к развитию ПИ-СРК у лиц, перенесших ОКИ. Исследователи из Каролинского института факто-

рами риска постинфекционных функциональных кишечных нарушений считают женский пол – относительный риск 2,65 (95% доверительный интервал 1,28–5,50) и лечение инфекционной диарее антибиотиками – относительный риск 2,37 (95% доверительный интервал 1,07–5,25) [9]. К независимым факторам риска относят и наличие до ОКИ органического заболевания пищеварительной системы, а также длительный прием антибиотиков. В работе J. Lehter и G. Lichtenstein (2007) к факторам риска ПИ–СРК относятся длительное течение заболевания, характер возбудителя, отсутствие рвоты, молодой возраст пациентов [12].

Иные данные получены при анализе исходов острого вирусного ГЭ, которые приведены в статье канадских авторов – J. Marshal и соавт. (2007). Установлено, что наиболее значимым фактором риска развития ПИ–СРК является рвота (относительный риск 10,5) [13]. По мнению исследователей, рвота в изучавшейся когорте может представлять собой суррогатный показатель патогенной нагрузки и тяжести заболевания. Обращается внимание на то, что СРК-подобное состояние чаще развивается после инфекционных заболеваний, протекающих с симптомами колита, у женщин с психоневротическими расстройствами и у лиц, подвергшихся стрессогенным воздействиям в период ОКИ [3, 14].

Одним из наиболее дискуссионных вопросов является связь между этиологией ОКИ и вероятностью развития ПИ–СРК. К настоящему времени получены убедительные доказательства того, что микрофлора фекалий больных СРК существенно отличается от микрофлоры здоровых лиц. Это подтверждается и результатами выполненной на высоком методическом уровне работы A. Kallinen и соавт. (2007). Финскими авторами у больных с СРК обнаружены существенные различия в содержании некоторых родов бактерий в разных библиотеках клонов, что подтверждено методом количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) флотипов родов *Coprococcus*, *Collinsella* и *Coprobacillus* [15]. Наличие при СРК изменений «микробного пейзажа» кишечника делает понятными попытки связать развитие ПИ–СРК с определенным инфекционным агентом. В нашей стране в серии работ, выполненных под руководством профессора А.И.Парфенова, с помощью реакции ко-агглютинации было установлено, что у 53,1% больных с ПИ–СРК определяются антигены шигелл Флекснера. В этой группе больных имелись признаки ослабления ответа иммунной системы (лейкопения, лимфопения, относительное снижение IgG). Было также показано, что некоторые ОКИ, в частности кампилобактериоз, могут протекать под маской обострения СРК. При иммунологическом и инструментальном исследовании у этих больных зафиксированы последствия кампилобактерного энтероколита с макро- и микроскопическими воспалительными изменениями слизистой оболочки тонкой или толстой кишки [16].

В отличие от приведенных выше данных, авторы ряда исследований не нашли очевидных доказательств того, какой-либо патогенный микроорганизм достоверно чаще приводит к развитию функциональных кишечных нарушений. Указывается, что после ГЭ, вызванного *Campylobacter spp.*, риск СРК был несколько выше, чем после ГЭ, вызванного *Salmonella spp.*, однако разница не была статистически значимой. С точки зрения этих исследователей, для оценки вероятности развития функционального кишечного нарушения знание конкретного патогенного микроорганизма не является важным [17].

Представляется, что неоднозначность представленных результатов может быть связана с 3 факторами. Во-первых, с методической точки зрения, данные, получаемые при стандартных посевах кала, лишь в малой степени отражают качественный и количественный составы микробиоты кишечника. Во-вторых, оценка роли того или иного патогенного микроорганизма по-

сле курсов активной терапии ОКИ антибиотиками существенно затрудняется. Антибактериальные препараты подавляют не только рост патогенных микроорганизмов, но и нормальную микрофлору кишечника. В результате размножаются сапрофитные микробы с высокой устойчивостью к лекарственным препаратам, которые проявляют свои патогенные свойства. Это чаще всего стафилококки, протей, дрожжевые грибы, энтерококки, синегнойная палочка, клебсиеллы [18, 19].

В-третьих, не случайно в большинстве работ, посвященных ПИ–СРК, в качестве факторов риска рассматриваются внесистемные признаки. Это отражает сложность патогенеза СРК, практически облигатную включенность церебральноэнтеральных компонентов патогенеза. В этой связи можно предполагать, что для развития ПИ–СРК существенное значение имеют «неспецифические» последствия ОКИ.

Говоря о механизмах развития ПИ–СРК, подчеркнем, что, как и при других вариантах СРК, ключевыми звеньями патогенеза признаются измененная реактивность и чувствительность кишки. По мнению И.Н. Ручкиной и соавт. (2000), в патогенезе ПИ–СРК имеют значение высокое бактериальное обсеменение тонкой кишки, выявленное с помощью дыхательного водородного теста; дисбактериоз толстой кишки и повреждение энтеринервной системы антигенами ОКИ на фоне снижения иммунной защиты организма [20]. О нарушениях качественного и количественного состава кишечной флоры пишут целый ряд авторов. Предполагается, что это сопровождается хроническим субклиническим воспалением, изменением проницаемости кишечной стенки, моторики, а также висцеральной гипералгезией. Профессор D. Drossman в уже упоминавшейся выше работе отмечает, что в слизистой больных СРК обычно увеличивается число воспалительных клеток и повышается уровень провоспалительных цитокинов. Инициация инфекции и воспаление сначала приводят к активации макрофагов, следствием чего являются сенсорно-моторные нарушения. В результате увеличивается выработка местных медиаторов и длительность экспрессии антигенов в просвете кишечника. Инфекция и вызванное ею воспаление поддерживают дисфункцию кишечника посредством иммунного ответа Т-хелперов типа 2. Интерлейкины (ИЛ)-4 и -13 инициируют гиперконтрактильность гладкой мускулатуры. Индукция циклооксигеназы 2 (ЦОГ-2) также повышает сократительную активность кишечника. Таким образом, в части случаев воспаление в слизистой может детерминировать висцеральную гиперчувствительность. Сцепленность иммунновоспалительных и нейроэндокринных нарушений при ПИ–СРК была продемонстрирована в опубликованной в 2007 г. работе J.K. Lehter и G.R. Lichtenstein [12]. При лапароскопической еюнальной биопсии они выявили инфильтрацию лимфоцитами интрамуральных нервных сплетений. У ряда больных отмечалась нейрональная дегенерация. Повышение числа нейроэндокринных клеток в слизистой толстой кишки сочеталось с усилением секреции серотонина, увеличением кишечной секреции, что может провоцировать диарею. В обзорной работе И.В.Маева и С.В.Черемушкина (2006) отмечается, что развитие ПИ–СРК сопровождается изменениями сенсорно-моторной функции аноректальной зоны и клеточной насыщенностью ректального биоптата [21]. Биопсия и иммуногистохимические исследования у таких пациентов демонстрируют повышенную экспрессию некоторых цитокинов, включая уровень провоспалительного цитокина ИЛ-1β в сравнении с пациентами, которые перенесли ОКИ без развития в дальнейшем клинических признаков ПИ–СРК; а также чаще обнаруживается увеличение количества клеток хронического воспаления и CD3+ лимфоцитов в собственной пластинке слизистой оболочки толстой кишки [8, 22–24].

В ряде случаев ОКИ приводит к усилению интолерантности к лактозе, которая провоцирует диарейные эпизоды у пациентов с ПИ–СРК. Кроме того, при анализе возможных причин развития СРК-подобной симптоматики нельзя упускать из виду пищевую аллергию. V. Jones (1982) считает, что в патогенезе СРК решающую роль играют пищевая непереносимость в сочетании с измененной микробной флорой кишечника. Он обнаружил, что у больных с СРК и пищевой непереносимостью резко увеличивается количество аэробных бактерий [25].

Суммируя приведенные данные, можно предположить следующую цепь событий, приводящую к развитию и течению ПИ–СРК. У лиц с факторами риска (и, возможно, генетической предрасположенностью) ОКИ и связанная с ней антибиотикотерапия приводят к изменению количественного и качественного состава микрофлоры кишечника. Одновременно могут усиливаться латентные ферментопатии и возникать пищевая аллергия. Указанные факторы приводят к локальным иммунным нарушениям и развитию субклинического воспаления, следствием чего является нарушение энтеральной нейроэндокринной регуляции, развитие гиперсенситивности и гиперреактивности кишки. В дальнейшем происходит формирование патологической функциональной системы, включающей цереброэнтеральные взаимосвязи. Таким образом, течение ПИ–СРК определяется не только местными, но и центральными механизмами.

Представленная модель ПИ–СРК признает существенную роль дисбиотических расстройств. В связи с этим целесообразно обсудить возможности их коррекции. Единые взгляды на терапию ПИ–СРК как в отечественной, так и в зарубежной литературе отсутствуют. Ряд исследователей не видят каких-либо специфических отличий в терапии этого варианта СРК. Тактика лечения в основном определяется ведущим клиническим симптомокомплексом. Тем не менее, анализируя отечественные и зарубежные публикации последних 3 лет, можно согласиться с мнением английских исследователей о том, что у больных с ПИ–СРК модификация кишечной микрофлоры может иметь терапевтические перспективы [26]. С такой точкой зрения согласны и эксперты, участвовавшие в создании Римских критериев III (Drossman D. et al., 2006). Следует положительно оценить стремление к повышению доказательности полученных результатов. Показательна в этом плане работа немецких авторов [27, 28]. В ходе двойного, слепого, рандомизированного исследования ими была показана эффективность пробиотической терапии при СРК. Наиболее выражено пробиотическая терапия влияла на абдоминальную боль, при этом результаты лечения были лучше у мужчин.

В отечественной литературе рассматриваются следующие позитивные эффекты пробиотической терапии при ПИ–СРК [29]:

- предотвращение адгезии чужеродных микробов (колониационная резистентность);
- продукция антимикробных субстанций (лизоцима, проглутамата, пероксида);
- конкуренция за пищевые субстраты;
- продукция цитопротективных веществ (аргинин, глютамин);
- ацидификация толстокишечного содержимого;
- стимуляция иммунного ответа на патогены (синтез SIgA, IgG, повышение синтеза макрофагами и Т-клетками цитокинов, усиление фагоцитоза; ХОМИНГ-эффект);
- ферментопродуцирующие эффекты – гидролиз клетчатки, белков, жиров, крахмала, деконъюгация желчных кислот;
- синтез витаминов, аминокислот, холестерина, мочевиной кислоты, органических кислот;
- укрепление цитоскелета (экспрессия тропомиозина (ТМ)-5, синтез актина и окклюдина);

- снижение проницаемости (фосфорилирование белка межклеточных соединений);
- повышение синтеза муцина (стимуляция гена MUC-3);
- стимуляция синтеза и активации рецептора эпителиального фактора роста (EGF);
- увеличение синтеза полиаминов.

Дополнительно рассматривается влияние пробиотиков на систему циклооксигеназ. Установлено, что применение пробиотиков в пероральной форме у больных с ПИ–СРК уменьшает уровень ЦОГ-2 и приводит к обратному развитию дисфункции кишечника.

Если в принципиальном плане с целесообразностью применения пробиотиков при ПИ–СРК согласно большинство исследователей, то в плане выбора конкретных микроорганизмов для такой терапии – единство мнений отсутствует. С нашей точки зрения, больному будут нужны штаммы, способные вмешиваться в ситуацию как при отсутствии медикаментозной терапии, так и вместе с ней (особенно в сочетании с применением антибиотиков). Нужны штаммы, обладающие малой провоспалительной активностью и способные модулировать систему местного иммунитета таким образом, чтобы происходило купирование воспалительных реакций на слизистой. Терапия пробиотиками, вероятно, может/должна проводиться в несколько этапов или быть комплексной для решения нескольких задач одновременно.

Наиболее важной задачей может быть смещение равновесия в микробиоценозе кишечника в сторону микрофлоры, обладающей «противовоспалительной» активностью. Представляется, что изолированное применение лактобацилл и бифидобактерий не позволит решить проблемы, связанные с ПИ–СРК. Использование симбиотических комбинаций лактобацилл и бифидобактерий является одним из перспективных направлений применения пробиотиков. Так, по имеющимся данным, одновременное применение *L. acidophilus* LA-5 и *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* BB-12 способствует увеличению адгезии BB12 более чем в 2 раза [30, 31]. Наряду с повышением продукции ИЛ-10 повышается продукция фактора некроза опухоли α (ФНО- α), γ -интерферона (ИФН- γ) и ИЛ-12, а иммуномодулирующее действие комбинации этих штаммов оказывается более «мягким», чем при применении монопрепаратов, возрастают уровень SIgA и фагоцитарная активность лейкоцитов [32–34]. Усиление пробиотических свойств бифидобактерий и лактобацилл может быть достигнуто путем введения в симбиотическую комбинацию еще одного типичного представителя нормофлоры желудочно-кишечного тракта человека – энтерококка.

Недавно проведенные Е.И.Ермоленко и соавт. (2009) исследования по коррекции дисбиозов с применением энтерококков, входящих в состав пробиотика Ламиналакт, показали, что данный штамм энтерококков приводит к преимущественной экспрессии ИЛ-10 эпителием кишечника. При этом у экспериментальных животных с антибиотик-ассоциированным дисбиозом наблюдалось переключение синтеза интерлейкинов с гиперпродукции ИЛ-8 на преимущественный синтез ИЛ-10 [35]. Другим возможным вариантом является применение бактерий, способных блокировать воспалительные механизмы [32].

Еще одной существенной задачей пробиотической терапии при ПИ–СРК является восстановление «естественной» метаболической структуры в кишечнике. Для достижения этой цели наиболее оправданным является применение симбиотиков, включающих 3 основных компонента с доказанной пробиотической активностью и относящихся к естественным обитателям кишечника человека: бифидобактерии, лактобациллы и энтерококки.

Таблица 1. Динамика клинического состояния пациентов с СРК на фоне аутопробиотической терапии (в баллах)

Клинические проявления	До приема препарата			После приема препарата		
	M ± m	min	max	M ± m	min	max
Боль в животе	1,75 ± 0,20	0,0	3,0	0,50 ± 0,18	0,0	3,0
Чувство тяжести в эпигастральной области	1,90 ± 1,16	1,0	3,0	0,40 ± 1,16	0,0	3,0
Метеоризм	2,40 ± 0,13	1,0	3,0	0,70 ± 0,19	0,0	3,0
Аппетит	1,00 ± 0,19	1,0	1,0	1,65 ± 0,10	1,0	2,0
Характер стула	2,45 ± 0,36	1,0	6,0	3,55 ± 0,13	2,0	4,0

Различия всех показателей до и после лечения достоверны (p < 0,05)

Новым направлением, развиваемым нами, является применение аутопробиотиков в терапии кишечных расстройств. Исходной предпосылкой для проведения нами этой серии исследований являлось следующее соображение. Если для целей лечения СРК оправдано применение микробиологических средств, способных, с одной стороны, ликвидировать воспаление, а с другой стороны – восстановить свойственную конкретному индивидууму микрофлору, то вполне целесообразно проведение исследований, направленных на использование в терапевтических целях препаратов-пробиотиков с иммуномодулирующими характеристиками и пробиотиков, полученных из собственной микрофлоры пациента, или аутопробиотиков.

Наиболее удобной микробной моделью для использования в качестве аутопробиотиков нам представлялось применение препаратов на основе энтерококков. Причина выбора энтерококков диктуется следующими соображениями. Индивидуальные штаммы энтерококков прекрасно развиваются на искусственных питательных средах, их легко культивировать, они сбраживают лактозу, что позволяет делать молочнокислые продукты, а их иммуномодулирующие свойства доказаны экспериментально на примере энтерококковых штаммов – пробиотиков [36, 37].

Судя по данным литературы, большинство штаммов энтерококков, определяемых в желудочно-кишечном тракте человека, относятся к 2 видам: *Enterococcus faecium* и *Enterococcus faecalis*. С этими же видами энтерококков могут быть ассоциированы и разнообразные по характеру проявления и локализации инфекционные процессы. При этом, если *E. faecalis* чаще связывают с патологией человека, то *E. faecium* наиболее часто содержит гены устойчивости к ванкомицину, который рассматривается в качестве важнейшего антибиотика резерва при лечении энтерококковых инфекций [38]. Оба вида энте-

рококков отличаются и по частоте обнаружения генов факторов патогенности – в штаммах *E. faecalis* данные гены обнаруживаются существенно чаще [39]. В то же время, гены цитолитического комплекса практически никогда не удается обнаружить в других видах энтерококков [40, 41].

Учитывая установленный факт ассоциации ряда штаммов энтерококков с патологией, нам представлялось наиболее безопасным при выборе штамма аутопробиотика обращать внимание на его видовую принадлежность (в исследовании были отобраны только штаммы *E. faecium*). Также представлялось необходимым проведение обязательного генетического тестирования аутоштаммов на предмет генов патогенности и осуществление предварительных исследований по применению аутопробиотиков с энтерококками на добровольцах. Штаммы аутопробиотиков предварительно анализировались микробиологически на селективных питательных средах с целью получения чистых культур с последующей видовой генетической идентификацией.

Генетический анализ штаммов энтерококков осуществлялся с использованием метода ПЦР на предмет принадлежности к виду *E. faecium* и определения генов патогенности, таких, как гены адгезинов *esp*, *asa1*, *efaA*, желатиназы (*gelE*), сериновой протеиназы (*sprE*) и феромона (*fsrB*). В исследование отбирались только штаммы *E. faecium*, свободные от данных генов патогенности. После отбора аутоштаммов на основе чистой культуры аутоэнтерококков осуществлялось изготовление молочнокислого продукта с содержанием кокковых форм 1×10^8 КОЕ/мл, который принимался пациентом дважды в сутки по 100 мл на прием в течение 10 дней. Бактериологическое исследование проводилось перед исследованием и на следующий день после прекращения монотерапии. В течение исследования пациенты вели дневник, в котором отмечались жалобы, самочувствие, частота и характер стула по Бристольской

Таблица 2. Динамика основных показателей кишечной микро-флоры у пациентов с СРК (данные представлены в виде десятичных log КОЕ/г)

Микроорганизмы	До приема препарата			После приема препарата		
	M ± m	min	max	M ± m	min	max
Бифидобактерии	8,10 ± 0,28	4,0	9,0	8,95 ± 0,05	8,0	9,0
Лактобациллы	8,45 ± 0,19	8,0	9,0	8,71 ± 0,18	7,0	9,0
Энтерококки	5,25 ± 0,09	5,0	6,0	5,45 ± 0,24	4,0	7,0
<i>E. coli</i>	6,15 ± 0,18	5,0	8,0	6,50 ± 0,13	6,0	8,0
Другие УПЭБ	2,57 ± 0,30	2,0	4,0	2,0 ± 0,0	2,0	2,0
Протей	2,43 ± 0,43	2,0	5,0	2,0 ± 0,0	2,0	2,0
Клебсиелла	2,43 ± 0,43	2,0	5,0	2,0 ± 0,0	2,0	2,0
Кандида	0,90 ± 0,31	0,0	3,0	0,60 ± 0,35	0,0	6,0

Таблица 3. ДНК-праймеры, использованные в работе, и ПЦР-продукты, полученные для секвенирования 16S RNA штаммов «Линекс» и L3

Название праймера	Локализация на последовательности 16S	ДНК последовательность	Праймеры, дающие ПЦР-продукт для секвенирования
1F	1-24	GAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGA	4R, 1R
3F	501-534	CTTACCAGAAAAGGGACGGCTAACT	1R, 3R
4F	942-965	CGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTG	1R, 3R
4R	456-473	TTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGT	1F
3R	1040-1017	CTGACGACAACCATGCACCACCTG	1F, 3F, 4F
1R	1528-1504	CGCACCTTCCGATACGGGCTACCT	1F, 3F, 4F
1R-1	1476-1453	ACGGCTACCTTGTTACGACTTCAC	1F, 3F, 4F

шкале. Ежедневно осуществлялся врачебный осмотр больных. Статистическая обработка проводилась с помощью программы Statistica, версия 6.0.

Предварительные исследования были проведены на 7 здоровых добровольцах с обязательной процедурой подписания информированного согласия. Динамическое наблюдение не выявило существенных сдвигов в состоянии здоровья, нарушений в биохимическом составе крови или составе кишечной микрофлоры. Отмечена лишь тенденция к умеренному снижению уровней холестерина крови, железа и билирубинемии на фоне хорошего общего самочувствия. Полученные результаты позволили перейти к изучению влияния аутопробиотической терапии на течение СРК. К настоящему времени аутопробиотическая терапия проведена у 37 пациентов, также подписавших информированное согласие на проведение лечения. Проведенный статистический анализ выявил существенное улучшение общего самочувствия больных и ряда клинико-микробиологических показателей (табл. 1, 2).

Отмечается тенденция к снижению количества условно-патогенных энтеробактерий с $2,57 \pm 0,3$ до $2,0 \pm 0,0$ lg КОЕ/г ($p = 0,098$). Достоверно увеличилось количество бифидобактерий с $8,10 \pm 0,28$ до $8,95 \pm 0,05$ lg КОЕ/г ($p = 0,005$); лактобацилл – с $8,45 \pm 0,19$ до $8,71 \pm 0,18$ lg КОЕ/г ($p = 0,019$). Достоверного увеличения количества энтерококков после применения аутопробиотической терапии не выявлено. Первые результаты использования аутопробиотиков при СРК свидетельствуют, что в ходе терапии меняется весь «микробный пейзаж». Хочется подчеркнуть, что в данный период нашим коллективом осуществляется серия исследований, посвященных аутопробиотической терапии. Результаты этих работ будут представлены в последующих статьях.

Новые возможности, открываемые использованием в клинической практике аутопробиотиков, конечно, не отменяют перспективы применения проверенных стандартизованных пробиотических препаратов. Нам представляется, что если аутопробиотики нацелены на длительную колонизацию слизистой и восстановление «микробного пейзажа» кишки с мягким воздействием на систему иммунитета, то роль стандартизованных пробиотических препаратов заключается в более быстром и мощном, но ограниченном по времени воздействии, нацеленном на элиминацию патогенов и опосредованное восстановление микробиоты, присущей конкретному организму. В этом ряду пробиотиков выделяются штаммы энтерококков, используемые в составе препарата Линекс (Словения) и отечественного пищевого лечебно-профилактического продукта «Ламинолакт» (Россия). Оба штамма энтерококка – «Линекс» и L3 – обладают широким спектром ценных для пробиотика свойств, таких, как широкий спектр антагонизма к грамотрицательным и грамположительным патогенам, способность восстанавливать нормальный состав микрофлоры и мягкое иммуномодулиру-

ющее действие. В обоих штаммах не обнаружены гены патогенности, присущие клиническим штаммам энтерококков [42, 43]. В недавних работах С.Г. Ботиной с соавторами было показано, что некоторые штаммы молочнокислых энтерококков обладают уникальными особенностями организации их генома, причем данные характеристики возможно выявить на основании изучения ДНК-последовательности структуры 16S субъединицы РНК [44]. Авторами было предложено выделить данные штаммы энтерококков в отдельный вид *E. lactis*.

Используя предложенный авторами подход с незначительными модификациями, нами было осуществлено аналогичное исследование штаммов энтерококков «Линекс» и L3. Для проведения ДНК-анализа продукты ПЦР, полученные в результате амплификации различных фрагментов, кодирующих 16S RNA, в зависимости от выбранных праймеров (табл. 3) разделялись методом электрофореза в агарозном геле, после чего фрагменты ДНК вырезались из агарозного геля и направлялись на секвенирование. Секвенирование фрагментов проводилось в 2 направлениях для получения уверенного прочтения последовательности. После получения ДНК-последовательностей отдельных фрагментов результаты секвенирования сопоставлялись с использованием набора компьютерных программ с целью получения последовательности, соответствующей 16S RNA, которую анализировали с помощью базы данных нуклеотидных последовательностей BLAST.

Анализ 16S RNA штамма «Линекс» выявил интересную закономерность – оказалось, что штамм характеризуется ДНК-последовательностью, практически идентичной штаммам *Enterococcus lactis*, депонированным в базу данных GenBank. Другой группой родственных энтерококков оказались штаммы, выделенные из рубца коровы. В обоих случаях отличия составили 1 нуклеотид из 1490 нуклеотидов в последовательности. Столь незначительной разницей можно пренебречь. Исследование штамма L3 выявило отличия лишь в 3 нуклеотидных парах, что также несущественно. Кластерный анализ обоих штаммов с использованием программы BLAST показал, что оба штамма наиболее родственны энтерококкам вида *E. lactis*, а также энтерококкам, выделенным из рубца коровы (*Rumen bacterium*) (рис. 1). Обнаруженный факт является косвенным подтверждением того, что энтерококки пищевых продуктов и пробиотиков происходят из штаммов, которые первоначально селекционировались из молочнокислых продуктов, причем, вполне вероятно, что их первоисточниками являлись организмы животных, не связанных с патологией человека.

Вероятно, штаммы энтерококковых пробиотиков первоначально принадлежали бактериям в составе молочнокислых продуктов питания, а позднее были использованы как эффективные пробиотики для лечения дисбиозов. Полученные результаты, учитывая установленное ранее отсутствие факторов патогенности данного штамма энтерококков, позволяют утверждать,

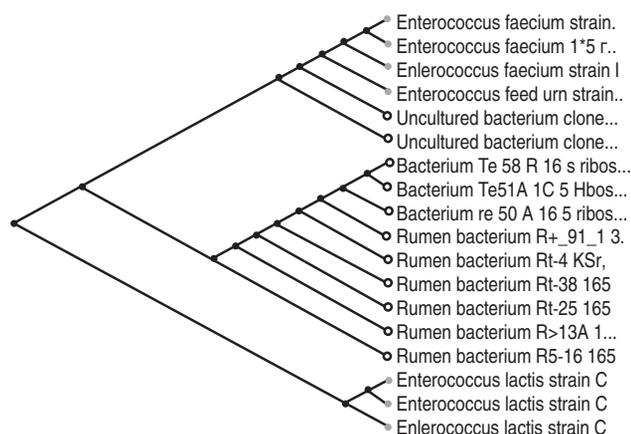


Рис 1. Кластерный анализ последовательностей ДНК, кодирующей участок 16S РНК энтерококков штаммов «Линекс» и Л3.

что штаммы энтерококков из препарата Линекс и Л3 генетически удалены от штаммов *Enterococcus faecium*, способных вызывать инфекционные заболевания человека.

Завершая данную статью, хочется подчеркнуть, что авторы не стремились рассмотреть все вопросы ПИ–СРК. Основной акцент был сделан на клинико-микробиологических аспектах этого расстройства. Суммируя представленные данные, можно констатировать, что в генезе ПИ–СРК существенную роль играют количественные и качественные изменения микрофлоры кишечника. Указанные изменения тесно сцеплены с субклиническим воспалением и изменениями в нейроэндокринных регуляторных системах кишки. В терапии ПИ–СРК существенное место должны занять пробиотические препараты. При этом могут использоваться как детально апробированные средства, содержащие энтерококк, так и аутопробиотики.

ЛИТЕРАТУРА

1. Маев И.В., Черемушкин С.В. Синдром раздраженного кишечника. Римские критерии III. Consilium Medicum. Гастроэнтерология 2007; 1: 29–34.
2. Симаненков В.И., Лутаенко Е.А. Лечение СРК с позиций доказательной медицины. СПб., 2008; 108.
3. Drossman D.A., Camilleri M., Mayer E.A., et al. AGA technical review on irritable bowel syndrome. Gastroenterology 2002; 123: 2108–31.
4. Drossman D.A. The Functional Gastrointestinal Disorders and the Rome III. Process. Gastroenterology 2006; 130(5): 1377–90.
5. Симаненков В.И. Психосоматические расстройства в практике терапевта. СПб., 2008; 335.
6. McKendrick M.W., Read N.W. Irritable bowel syndrome post salmonella infection. J Infect. 1994; 29(1): 1–3.
7. Neal K.R., Hebden J., Spiller R. Prevalence of gastrointestinal symptoms six months after bacterial gastroenteritis and risk factors for development of the irritable bowel syndrome: postal survey of patients. BMJ 1997; 314(7083): 779–82.
8. Spiller R.C., Jenkins D., Thornley J.P., et al. Increased rectal mucosal enteroendocrine cells, T lymphocytes, and increased gut permeability following acute *Campylobacter* enteritis and in post-dysenteric irritable bowel syndrome. Gut. 2000; 47(6): 804–11.
9. Törnblom H., Holmwall P., Svenungsson B., et al. Gastrointestinal symptoms after infectious diarrhea: a five-year follow-up in a Swedish cohort of adults. Clin Gastroenterol Hepatol. 2007; 5(4): 461–4.
10. Neal K.R., Barker L., Spiller R.C. Prognosis in post-infective irritable bowel syndrome: a six year follow up study. Gut. 2002; 51(3): 410–3.
11. Ручкина И.Н., Парфенов А.И., Осипов Г.А. Постинфекционный синдром раздраженного кишечника – новое направление в этиологии и патогенезе функциональных заболеваний. Consilium Medicum 2006; (Экстрывыпуск): 8–12.
12. Lehrer J.K., Lichtenstein G.R. Irritable Bowel Syndrome. eMedicine. 2007; 8.
13. Marshall J.K., Thabane M., Borgiaonkar M.R., et al. Postinfectious irritable bowel syndrome after a food-borne outbreak of acute gastroenteritis attributed to a viral pathogen. Clin Gastroenterol Hepatol. 2007; 5(4): 457–60.
14. Spiller R., Campbell E. Post-infectious irritable bowel syndrome. Curr Opin Gastroenterol. 2006; 22: 13–7.
15. Kassinen A., Krogius-Kurikka L., Mäkitavokko H. et al. The fecal microbiota of irritable bowel syndrome patients differs significantly from that of healthy subjects. Gastroenterology 2007; 133(1): 24–33.
16. Парфенов А.И., Ручкина И.Н. Синдром раздраженного кишечника. Медицинский вестник 2006; 16: 359.
17. Ruigómez A., García Rodríguez L.A., Panés J. Risk of irritable bowel syndrome after an episode of bacterial gastroenteritis in general practice: influence of comorbidities. Clin Gastroenterol Hepatol. 2007; 5(4): 465–9.
18. Григорьев П.Я., Яковенко Э.П. Синдром раздраженного кишечника, ассоциированный с дисбактериозом. Consilium medicum. Гастроэнтерология 2003; 2(7): 305–7.
19. Swidsinski A., Ladhoff A., Pernthaler A., et al. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. Gastroenterology 2002; 122(1): 44–54.
20. Ручкина И.Н., Белая О.Ф., Парфенов А.И. и соавт. Роль *Campylobacter jejuni* в патогенезе синдрома раздраженного кишечника. Рос. гастроэнтерол. журнал 2000; 2: 118–9.
21. Маев И.В., Черемушкин С.В. Психосоциальные факторы в развитии синдрома раздраженного кишечника: возможности терапии. Consilium medicum. Гастроэнтерология 2006; 7: 34–42.
22. Collins S.M. A case for an immunological basis for irritable bowel syndrome. Gastroenterology 2002; 122: 2078–80.
23. Gwee K.A., Collins S.M., Read N.W., et al. Increased rectal mucosal expression of interleukin 1beta in recently acquired post-infection irritable bowel syndrome. Gut. 2003; 52: 523–6.
24. Gwee K.A., Leong Y.L., Graham C., et al. The role of psychological and biological factors in postinfective gut dysfunction. Gut. 1999; 44(3): 400–6.
25. Jones V.A., McLaughlan P., Shorhouse M., et al. Food intolerance: a major factor in the pathogenesis of irritable bowel syndrome. Lancet 1982; 2(8308): 1115–7.
26. Parkes G.C., Brostoff J., Whelan K., et al. Gastrointestinal microbiota in irritable bowel syndrome: their role in its pathogenesis and treatment. Am J Gastroenterol. 2008; 103(6): 1557–67.

27. *Enck P., Zimmermann K., Menke G., et al.* A mixture of *Escherichia coli* (DSM 17252) and *Enterococcus faecalis* (DSM 16440) for treatment of the irritable bowel syndrome – a randomized controlled trial with primary care physicians. *Neurogastroenterol Motil.* 2008; 20(10): 1103–9.
28. *Enck P., Zimmermann K., Menke G., et al.* Randomized controlled treatment trial of irritable bowel syndrome with a probiotic *E.-coli* preparation (DSM17252) compared to placebo. *Z Gastroenterol.* 2009; 47(2): 209–14.
29. *Осипенко М.Ф., Бибулатова Е.А., Холин С.И.* Пробиотики в лечении постинфекционного синдрома раздраженного кишечника. *Consilium Medicum. Гастроэнтерология* 2008; 1: 47–50.
30. *Ouwehand A.C., Isolauri E., Kirjavainen P.V., et al.* The mucus binding of *Bifidobacterium lactis* Bb12 is enhanced in the presence of *Lactobacillus GG* and *Lact. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Lett Appl Microbiol.* 2000; 30(1): 10–3.
31. *Ouwehand A.C., Salminen S., Tölkö S., et al.* Resected human colonic tissue: new model for characterizing adhesion of lactic acid bacteria. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002; 9(1): 184–6.
32. *Kekkonen R.* Immunomodulatory Effects of Probiotic Bacteria In Healthy Adults. Academic Dissertation. Helsinki, Finland. 2008; 119.
33. *Link-Amster H., Rochat F., Saudan K.Y., et al.* Modulation of a specific humoral immune response and changes in intestinal flora mediated through fermented milk intake. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 1994; 10: 55–64.
34. *Hatcher G., Lambrecht R.* Augmentatin of macrophage phagocytic activity by cell-free extracts of selected lactic acid-producing bacteria. *J of Dairy Science* 1993; 76: 2485–92.
35. *Бельтоков П.П., Абдурасулова И.Н., Тарасова Е.А. и соавт.* Исследование влияния пробиотических эшерихий и энтерококков на иммунную систему здоровых крыс. *Ученые записки Санкт-Петербургского государственного медицинского университета имени академика И.П.Павлова.* 2009; 3: 17–22.
36. *Hlivak P., Janova E., Odrazka J., et al.* Long-term (56 week) oral administration of probiotic *E.faecium* M-74 decreases the expression of sICAM-1 and monocyte CD49 in humans. *Bratisl Lek Listy.* 2005; 106(4-5): 175–81.
37. *Benyacoub J., Czarnecki-Maulden G.L., Cavadini C., et al.* Supplementation of food with *Enterococcus faecium* (SF68) stimulates immune functions in young dogs. *J Nutr.* 2003; 133: 1158–62.
38. *Boyce J.M., Mermel L., Zevos M.J., et al.* Controlling vancomycin – resistant enterococci. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* 1995; 16: 634–7.
39. *Eaton T.J., Gasson M.J.* Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001; 67: 1628–35.
40. *Coburn P.S., Gilmore M.S.* The *Enterococcus faecalis* cytotoxin: a novel toxin active against eukaryotic and prokaryotic cells. *Cell Microbiol.* 2003; 5(10): 661–9.
41. *Coque T.M., Patterson J.E., Steckelberg J.M., et al.* Incidence of hemolysin, gelatinase and aggregation substance among enterococci isolated from patients with endocarditis and other infections and from feces of hospitalized and community-based persons. *J Infect. Dis.* 1995; 171(5): 1223–9.
42. *Бондаренко В.М., Суворов А.Н.* Симбиотические энтерококки и проблемы энтерококковой оппортунистической инфекции. М., 2007; 30.
43. *Вершинин А.Е., Колодziejewa В.В., Ермоленко Е.И. и соавт.* Генетическая идентификация как метод определения патогенных и симбиотических штаммов энтерококков. *Журн. микробиол. эпидемиол. иммунобиол.* 2008; 5: 83–7.
44. *Botina S.G., Sukhodolets V.V.* Speciation in bacteria: comparison of the 16S rRNA gene for closely related *Enterococcus* species. *Genetika.* 2006; 42(3): 325–30.