

Применение метода хромато-масс-спектрометрии для оценки состояния микрофлоры кишечника

Аннотация

Применение газового хромато-масс-спектрометра для исследования и оценки состава кишечной микрофлоры у людей при хроническом гастродуодените в сравнении с традиционными методами диагностики и микробиологическими анализами позволяет существенно расширить спектр определяемой микробиоты, а также возможные ее изменения на разных фазах заболевания, что позволяет успешно проводить коррекцию микрофлоры и открывает перспективы в целенаправленном лечении с последующей оценкой его эффективности. С помощью газового хромато-масс-спектрометра проанализированы состав и количество микроорганизмов кишечной стенки у 340 пациентов в возрасте от 12 до 18 лет в острой фазе, в период ремиссии и по окончании лечения.

Актуальность

Своевременное диагностирование и профессиональная коррекция дисбиоза при ХГД (хронический гастродуоденит) имеют очень важное терапевтическое и профилактическое значение. В то же время не менее важной является оценка динамического состояния кишечной микробиоты у людей с хроническим гастродуоденитом в различных фазах течения заболевания, в период ремиссии и в результате проведенной терапии [1].

На сегодняшний день особый интерес представляет возможность использования для диагностики метода газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС). Исследования микрофлоры желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) с применением хромато-масс-спектрометра позволяют выявить неблагоприятные микробиологические нарушения в организме, являющиеся пусковым механизмом подавляющего большинства патологических процессов [2].

Результаты, полученные с помощью нового метода диагностики, являются более информативными и позволяют не только оценить состояние внутрипросветной флоры, но и идентифицировать основную часть бактерий и других микроорганизмов, входящих в состав микробной биопленки [2].

При использовании метода газовой хромато-масс-спектрометрии для оценки состояния кишечной микробиоты в качестве маркеров используются видоспецифичные жирные кислоты (ЖК) – генетически детерминированные структурные компоненты клеточной стенки [3]. Высокая чувствительность, быстрое получение результатов (в течение 2,5 ч), значительно расширенный спектр определения микроорганизмов (более 10^4 клеток/мл) пристеночной микрофлоры (бактерий, грибов, вирусов) являются серьезными достоинствами новой медицинской технологии [4].

Целью нашего исследования была оценка возможностей

применения хромато-масс-спектрометра для диагностики заболеваний желудочно-кишечного тракта, в частности хронического гастродуоденита.

Материалы и методы исследования

Было обследовано 340 детей в возрасте от 12 до 18 лет с ХГД в фазе обострения и 90 детей через 6 мес. после эрадикации *H. pylori*. В группу сравнения вошли 22 ребенка, сопоставимые по возрасту и гендерному составу с детьми основной группы.

Исследования включали в себя сбор анамнеза, объективное обследование. Применялись также инструментальные методы исследования: ультразвуковое исследование органов брюшной полости и забрюшинного пространства на аппарате «Sonolina SL-1» фирмы «Siemens», а также фиброгастродуоденоскопия (ФГДС) по традиционным методикам. Диагностика хеликобактерной (НР) инфекции осуществлялась в соответствии со «Стандартами (протоколами) диагностики и лечения болезней органов пищеварения Министрства здравоохранения РФ, 1998 г.». Отрицательный результат после эрадикационной терапии базировался на основании негативных результатов Хелик-теста, Хелпил-теста и идентификации в СОЖ.

У 30 детей с ХГД были оценены количество и состав микроорганизмов кишечной стенки методом ГХ-МС в фазе обострения, в период ремиссии и после курса приема пробиотического препарата. В качестве пробиотического препарата применяли комплексный пробиотик «Бифиформ», содержащий *Bifidobacterium longum* не менее 10^7 и *Enterococcus faecium* не менее 10^7 . Значимыми считались отклонения, превышающие нормативные показатели в два и более раз [5].

Математико-статистическая обработка данных была проведена с использованием программ StatSoft Statistica 6.0. и Microsoft Exel 7.0 для Windows-XP. Полученные данные были проанализированы с помощью описательной статистики с оп-

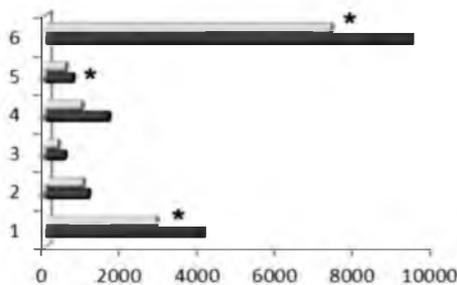


Рис. 1. Изменения со стороны отдельных представителей микробиоты в фазе ремиссии до и после применения пробиотика по данным масс-спектрометрии, где по оси Y представлены возбудители: 1 – Streptococcus; 2 – Clostridium hystolyticum; 3 – Peptostreptococcus anaerobius; 4 – Clostridium propionicum; 5 – Actinomycetes; 6 – Clostridium ramosum; нижний ряд – данные пациентов в фазе ремиссии до назначения пробиотика; верхний ряд – результаты пациентов через 1 мес. после терапии пробиотиком (* Различия между данными до и после проводимой терапии статистически значимы, $p < 0,01$.)

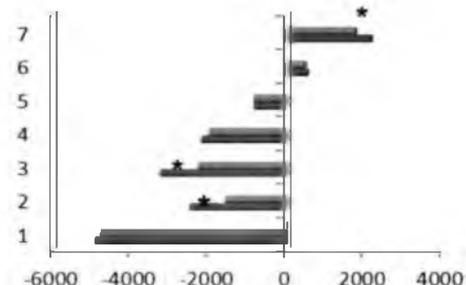


Рис. 2. Изменения со стороны отдельных представителей микробиоты в фазе ремиссии до и после применения пробиотика по данным масс-спектрометрии, где по оси Y представлены возбудители: 1 – Lactobacillus; 2 – Eubacterium moniliforme, E.nodatatum, E.sabureum; 3 – Bifidobacterium; 4 – Propionibacterium; 5 – микр. грибы, кампестерол; 6 – Nocardia asteroides; 7 – Actinomycetes 10Me14; нижний ряд – данные пациентов в фазе ремиссии до назначения пробиотика; верхний ряд – результаты пациентов через 1 мес. после терапии пробиотиком (* Различия между данными до и после проводимой терапии статистически значимы, $p < 0,01$.)

ределением средней арифметической M и среднего квадратичного отклонения s . Нормальность распределения оценивалась с применением критерия Шапиро-Уилка. Оценка статистической значимости различий проводилась с использованием t -критерия Стьюдента для зависимых выборок; для сравнения качественных данных в двух группах рассчитывали доверительный интервал (ДИ) для отношения шансов (ОШ). Для выявления корреляционной зависимости вычисляли коэффициент корреляции рангов Спирмена r . Полученные результаты оценивались как статистически значимые при уровне вероятности $p < 0,05$.

Результаты исследования и обсуждение

В фазе обострения нарушения микробиоты были выражены уменьшением количества бифидо-, лактобактерии, кишечной палочки и повышением численности представителей условно-патогенной флоры (УПФ). При исследовании метаболитов пристеночной микрофлоры у детей с ХГД методом ГХ-МС было обнаружено наличие дисбиотических нарушений в фазе обострения с некоторой тенденцией к нормализации показателей в фазе ремиссии. Однако у детей с ХГД через 6 мес. после применения пребиотика лактулозы сохранялись нарушения со значимым повышением численности представителей семейства клостридий (*Clostridium histolyticum*, *Clostridium propionicum*, *Clostridium ramosum*) и снижением содержания лактобактерий.

На фоне терапии пробиотиком (Бифиформ), проводимой в течение 1 мес., была получена следующая динамика со стороны просветной и пристеночной микробиоты (табл. 1, рис. 1, 2).

Таблица 1

Результаты микробиологического исследования кала на дисбактериоз у детей с хроническим гастродуоденитом до и после лечения

Микроорганизмы, Ig мт/г фекалий	Группа сравнения $n = 22, M (s)$	Дети с ХГД до и после лечения пробиотиком (Бифиформ) $n = 30, M (s)$	
		до	после
Бифидобактерии	$8,29 \pm 1,4$	$5,67 \pm 1,3$	$8,5^* \pm 1,25$
Лактобактерии	$8,02 \pm 1,3$	$6,16 \pm 1,2$	$8,3^* \pm 1,54$
Кишечная палочка	$24 \pm 4,3$	$27,5 \pm 5,1$	$27,6 \pm 2,8$
УПФ	$0,43 \pm 0,04$	$1,16 \pm 0,12$	0
Энтерококки	$0,25 \pm 0,015$	$0,38 \pm 0,035$	0
Дрожжеподобные грибы	$0,11 \pm 0,012$	$0,87 \pm 0,096$	0
Стрептококки	$1,25 \pm 0,15$	$3,25 \pm 0,35$	$0,75 \pm 0,086^*$

* Различия между данными до и после проводимой терапии статистически значимы, $p < 0,01$.

На фоне проведенного лечения отмечалась тенденция к уменьшению дефицита основных представителей нормофлоры, при этом наиболее отчетливая положительная динамика была получена со стороны содержания зубактерий и бифидобактерий (рис. 2), тогда как прироста содержания лактобактерий, по данным ГХ-МС, практически не произошло. Кроме того, показано значимое уменьшение представителей УПФ с отчетливой тенденцией к нормализации гомеостатических параметров кишечного микробиоценоза. Сохранение изменений после месячного курса терапии, несмотря на полученную положительную динамику, свидетельствует о необходимости применения более продолжительных курсов лечения со смесью пробиотического препарата.

Проведенные обследования детей с ХГД как традиционно используемыми методами, так и с помощью метода ГХ-МС показали, что и в фазе обострения, и в фазе ремиссии в 100 % случаев выявлялись изменения состояния микрофлоры, однако благодаря данным ГХ-МС были выявлены некультивируемые обычными методами микроорганизмы. Показано, что изменения характеризовались уменьшением количества облигат-

ной флоры (бифидобактерий, лактобактерий, пропионобактерий) и повышением численности представителей семейства клостридий, стрептококков, грибов рода *Candida*.

Наше исследование подтверждает мнение, что восстановление измененной на фоне патологического процесса (ХГД) микробиоты происходит длительно. После традиционного месячного курса лечения пробиотиком, несмотря на положительные сдвиги по данным ГХ-МС, полного восстановления микробного профиля не происходит. При этом наибольший эффект от пробиотика (содержащего *Bifidobacterium longum* и *Enterococcus faecium*) был отмечен со стороны бифидофлоры и энтеробактерий, тогда как содержание лактобактерий практически не изменилось.

Выводы

Использование метода газовой хромато-масс-спектрологии дает уникальную возможность проводить динамическую оценку состояния кишечной микрофлоры для людей с хроническим гастродуоденитом, значительно расширить спектр определяемых микроорганизмов, не выявляемых традиционными методами, что позволяет применять метод ГХ-МС для успешного решения задач диагностики и направленной коррекции с последующей оценкой ее эффективности для пациентов с заболеваниями желудочно-кишечного тракта.

Список литературы:

1. 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.
2. Осипов Г.А. Хромато-масс-спектрометрический анализ микроорганизмов и их сообществ в клинических пробах при инфекциях и дисбиозах. Химический анализ в медицинской диагностике. – М.: Наука, 2010. С. 293-368.
3. Методика масс-спектрометрии микробных маркеров как способ оценки пристеночной кишечной микробиоты при заболеваниях органов пищеварения. Учебно-методическое пособие / Под ред. Г.А. Осипова, В.П. Новиковой. – СПб, 2013. 96 с.
4. Осипов Г.А., Федосова Н.Ф., Лядов К.В. Количественный *in situ* микробиологический анализ по липидным маркерам в биологических жидкостях с использованием метода газовой хроматографии-масс-спектрометрии // Здоровоохранение и медицинские технологии. 2007. № 5. С. 20-23.
5. Beloborodova N. V., Osipov G. A. Small molecules origination from microbes (SMOM) and their role in microbes-host relationship // Microb. Ecol. Heal. Dis. SCUP. 2010. Vol. 12. PP. 12-21.

Маргарита Михайловна Гурова,
д-р мед. наук, профессор,

Татьяна Алексеевна Романова,
д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой,
кафедра педиатрии с курсом детских хирургических болезней,
ФГАОУ ВПО «Белгородский национальный
исследовательский университет»,
г. Белгород,

Валерия Павловна Новикова,
д-р мед. наук, профессор,

кафедра детских болезней,
ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова»
Минздрава России,
г. С.-Петербург,

Инга Анатольевна Авилова,
д-р биол. наук, профессор,

кафедра технологии продуктов питания,
Юго-Западный государственный университет,
г. Курск,

e-mail: itely@mail.ru