

<https://doi.org/10.22416/1382-4376-2018-28-4-36-46>



Микробиота пищевода и желудка у больных гастроэзофагеальной рефлюксной болезнью и здоровых добровольцев

Д.Е. Румянцева¹, А.С. Трухманов¹, А.В. Кудрявцева², Г.С. Краснов²,
А.В. Параскевова¹, О.А. Сторонова¹, А.Б. Пономарев¹

¹ ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» (Сеченовский университет) Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва, Российская Федерация

² ФГБУ «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта» Российской академии наук, г. Москва, Российская Федерация

Цель исследования: изучить микробиоту пищевода и желудка у больных гастроэзофагеальной рефлюксной болезнью (ГЭРБ) и здоровых добровольцев.

Материалы и методы. В исследование были включены 15 пациентов, страдающих ГЭРБ, и 6 здоровых добровольцев. Всем исследуемым был проведен забор пищевода и желудочного содержимого. Исследование микробиоты в полученных образцах было выполнено с помощью секвенирования гена 16S рибосомальной РНК (рРНК).

Результаты. Наиболее распространенными типами бактерий в пищеводе и желудке у больных ГЭРБ и здоровых добровольцев были *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fusobacterium*. При сравнении относительного содержания основных типов бактерий в пищеводной слизи и желудочном содержимом у пациентов с ГЭРБ отмечено достоверное снижение пропорции *Proteobacteria* по сравнению со здоровыми добровольцами. В пищеводе у больных ГЭРБ по сравнению со здоровыми добровольцами наблюдалось снижение относительного количества бактерий, относящихся к семействам *Acetobacteraceae*, *Bacillaceae*, *Bdellovibrionaceae*, *Clostridiales Insertae Sedis XI*, *Fusobacteriaceae*, *Moraxellaceae*, *Pasteurellaceae* и *Rhodocyclaceae*. В желудке у больных ГЭРБ выявлено более высокое содержание бактерии семейств *Leptotrichiaceae* и *Veillonellaceae*.

Выводы. Полученные результаты свидетельствуют о различиях внутрипросветной микробиоты пищевода и желудка у больных ГЭРБ и здоровых добровольцев. Необходимо дальнейшее изучение влияния тех или иных изменений бактериального состава на изменения в пищеводе и желудке.

Ключевые слова: микробиота пищевода, микробиота желудка, гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Румянцева Д.Е., Трухманов А.С., Кудрявцева А.В., Краснов Г.С., Параскевова А.В., Сторонова О.А., Пономарев А.Б. Микробиота пищевода и желудка у больных гастроэзофагеальной рефлюксной болезнью и здоровых добровольцев. Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. 2018;28(4):36–46. <https://doi.org/10.22416/1382-4376-2018-28-4-36-46>

Microbiota of the Esophagus and Stomach in Patients with Gastroesophageal Reflux Disease and Healthy Volunteers

Diana E. Rumyantseva¹, Alexander S. Trukhmanov¹, Anna V. Kudryavtseva², Georgy S. Krasnov²,
Anna V. Paraskevova¹, Olga A. Storonova¹, Andrey B. Ponomarev¹

¹ I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

² Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

This paper is aimed at investigating the microbiota of the esophagus and stomach in patients with gastroesophageal reflux disease (GERD) and healthy volunteers.

Materials and methods. The study included 15 patients suffering from GERD and 6 healthy volunteers. All subjects underwent sampling of esophageal and gastric contents. The study of the microbiota in the obtained samples was performed by sequencing the 16S gene of ribosomal RNA (rRNA).

Results. The most common types of bacteria in the esophagus and stomach in patients with GERD and healthy volunteers are found to be *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fusobacterium*. By comparing the relative contents of the main types of bacteria in the esophageal mucus and gastric contents, a significant decrease in the proportion of Proteobacteria was observed in patients with GERD as compared to healthy volunteers. The decrease in the relative number of bacteria belonging to the *Acetobacteraceae*, *Bacillaceae*, *Bdellovibrionaceae*, *Clostridiales Insertae Sedis XI*, *Fusobacteriaceae*, *Moraxellaceae*, *Pasteurellaceae* and *Rhodocyclaceae* families was observed in the esophagus in patients with GERD as compared to healthy volunteers. A higher bacterial content of the *Leptotrichiaceae* and *Veillonellaceae* families was detected in the stomach of patients with GERD.

Conclusions. The obtained results indicate differences in the intraluminal microbiota of the esophagus and stomach in patients with GERD and healthy volunteers. Further study should be carried out to study the effect of changes in bacterial composition on those in the esophagus and stomach.

Keywords: esophageal microbiota, gastric microbiota, gastroesophageal reflux disease

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

For citation: Rumyantseva D.E., Trukhmanov A.S., Kudryavtseva A.V., Krasnov G.S., Paraskevova A.V., Storonova O.A., Ponomarev A.B. Microbiota of the Esophagus and Stomach in Patients with Gastroesophageal Reflux Disease and Healthy Volunteers. Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology. 2018;28(4):36–46. <https://doi.org/10.22416/1382-4376-2018-28-4-36-46>

Введение

Гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь (ГЭРБ) относится к одним из самых широко распространенных заболеваний желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) [1]. Распространенность ГЭРБ среди взрослого населения Российской Федерации составляет 18–46 %. Актуальность ГЭРБ обусловлена не только ее распространенностью, но и значительным влиянием на качество жизни пациентов, риском развития осложнений (кровотечения из язв и эрозий, возникновения пептических стриктур и пищевода Барретта). На фоне пищевода Барретта (ПБ) наибольшее опасение вызывает развитие аденокарциномы пищевода (АКП), заболеваемость которой в последние десятилетия возросла. Все это обуславливает необходимость поиска новых патогенетических звеньев возникновения и прогрессирования ГЭРБ, а также новых подходов к терапии.

В организме человека обнаружено 10^{12} – 10^{14} микроорганизмов, что составляет 5–8 % массы его тела. Взаимодействие микробиоты и организма хозяина происходит на всем протяжении желудочно-кишечного тракта. В ряде исследований было показано, что бактерии являются причиной возникновения и персистенции хронического воспаления, развития рака желудка и толстой кишки [2].

Анализ приведенных в литературе работ продемонстрировал, что в пищеводе, так же как и в других отделах ЖКТ, встречаются микроорганизмы [3], попадающие в него в норме из ротовой полости, а при гастроэзофагеальном рефлюксе (ГЭР) из желудка. Yang L. и соавт. описали наличие двух типов микробиоты в пищеводе. 1-й тип встречается, как правило, у здоровых и представлен грамположительными бактериями, 2-й тип — с преобладанием грамотрицательных анаэробов/микроаэрофилов у больных ГЭРБ и пищеводом Барретта [4]. Считается, что микробиота пищевода способна влиять на его моторную функцию, в том числе на гастроэзофагеальный рефлюкс. Это влия-

ние реализуется за счет активации толл-подобных рецепторов (TLRs), которые взаимодействуют с липополисахаридами (ЛПС) стенки бактерий [5], что сопровождается активацией ядерного фактора κ B (NF- κ B) и продукцией провоспалительных цитокинов, вовлеченных в воспаление, врожденные иммунные реакции, адаптивные иммунные реакции, пролиферацию, дифференцировку клеток [6–9]. Таким образом, изучение микробиоты пищевода, а также способов ее коррекции является приоритетным направлением.

Немногочисленные зарубежные исследования, посвященные изучению пристеночной микробиоты пищевода, были сконцентрированы на анализе биоптатов слизистой оболочки пищевода. Целью нашего исследования было сравнить внутрипросветную (полостную) микробиоту пищевода и желудка у больных ГЭРБ и здоровых добровольцев. Для решения поставленных задач нами впервые был спроектирован и изготовлен специальный зонд для забора пищеводной и желудочной слизи и получен Патент РФ на полезную модель № 179203 с приоритетом от 08.12.2016.

Материалы и методы исследования

В исследование были включены 15 пациентов, страдающих ГЭРБ, и 6 здоровых добровольцев, у которых не было клинической симптоматики ГЭРБ и по данным эзофагогастроуденоскопии (ЭГДС) не выявлялись признаки рефлюкс-эзофагита.

Клиническая часть исследования выполнена на базе клиники пропедевтики внутренних болезней, гастроэнтерологии и гепатологии им. В.Х. Василенко ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет). Секвенирование 16S рибосомальной РНК (рРНК) проведено в ФГБУ «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта» РАН (заведующая лабораторией постгеномных исследований к.м.н. Кудрявцева А.В.).

Критериями включения в исследование были: респонденты в возрасте от 18 до 69 лет, подписавшие информированное согласие, отсутствие приема ингибиторов протонной помпы, пробиотиков и антибактериальных препаратов в течение последнего месяца.

Для решения поставленных задач нами был спроектирован и изготовлен зонд для забора пищеводного и желудочного содержимого с двумя надувными баллонами. Зонд представляет собой силиконовую трубку длиной 90 см с шестью каналами внутри, два из которых служат для раздувания баллонов, один — для аспирации слюны и по два для вливания растворов и аспирации содержимого из пищевода и желудка. Зонд вводился через рот до желудка, при этом нижний баллон располагался над НПС, а верхний выше него на 8 см. Раздувание баллонов обеспечивало изоляцию дистального сегмента пищевода от попадания слюны и содержимого желудка, тем самым позволяя получить именно пищеводное содержимое для дальнейшего анализа.

Исследование структуры микробиоценоза в образцах пищеводного и желудочного содержимого было выполнено с помощью секвенирования гена 16S рибо-сомальной РНК (рРНК) [10].

Всем респондентам была выполнена ЭГДС для оценки состояния слизистой оболочки и верификации формы ГЭРБ, манометрия пищевода высокого разрешения на приборе Solar GI (специализированное программное обеспечение Medical Measurements Systems (MMS), The Netherlands) с применением 22-канального водно-перфузионного катетера. Исследование проводилось пациентам в положении лежа на спине в соответствии со стандартным протоколом исследования. Определялось расстояние до нижнего пищеводного сфинктера (НПС) с целью правильного расположения баллонов зонда для забора пищеводного и желудочного содержимого.

Выделение ДНК и подготовка библиотек к секвенированию

Замороженные образцы помещали в контейнер со льдом для разморозки в течение 30 минут. Шпателем отбирали навеску образца массой 10 мкг и помещали в пробирки для гомогенизации, содержащие керамические шарики (MagNA Lyser Green Beads). К навеске образца добавляли 500 мкл лизирующего буфера MagNA Pure Bacteria Lysis Buffer (Roche, Германия) и 20 мкл протеиназы К (QIAGEN, Германия). Пробирки с образцами инкубировали в течение 10 минут при 65 °С, затем еще 10 минут при 95 °С. Далее образцы гомогенизировали с помощью автоматического гомогенизатора MagNA Lyser (Roche) согласно инструкции производителя, после чего центрифугировали при 14 000 об./мин в течение 10 минут. Полученный супернатант (400 мкл) использовался для дальнейшего выделения нуклеиновых кислот. Тотальную ДНК выделяли с использо-

ванием реагентов MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I (Roche) согласно инструкции производителя в системе для автоматического выделения нуклеиновых кислот MagNA Pure LC. Выделенную ДНК хранили при -20 °С. Для качественной и количественной оценки ДНК использовали NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, США). Подготовка 16S метагеномных библиотек осуществлялась в соответствии с протоколом 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation (Illumina, США), рекомендованному Illumina для секвенатора MiSeq. Первый раунд амплификации переменных участков V3-V4 гена 16S рРНК осуществляли с использованием прямого:

5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGA GACAGCCTACGGGNGGCWGCAG-3'

и обратного праймеров:

5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAG AGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC-3'.

Программа амплификации (амплификатор Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler, США): 1) 95 °С — 3 мин; 2) 30 циклов: 95 °С — 30 с; 55 °С — 30 с; 72 °С — 30 с; 3) 72 °С — 5 мин; 4) 4 °С.

Очистку ПЦР-продуктов осуществляли с использованием шариков Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, США) в соответствии с протоколом производителя. Второй раунд амплификации для двойного индексирования образцов осуществляли с использованием комбинации специфических праймеров. Программа амплификации (амплификатор Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler, США): 1) 95 °С — 3 мин; 2) 8 циклов: 95 °С — 30 с; 55 °С — 30 с; 72 °С — 30 с; 3) 72 °С — 5 мин; 4) 4 °С.

Очистку ПЦР-продуктов осуществляли с использованием шариков Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter) в соответствии с протоколом производителя. Концентрацию полученных библиотек 16S определяли с помощью флуориметра Qubit 2.0 (Invitrogen, США) с использованием набора QuantiT dsDNA High-Sensitivity Assay Kit. Очищенные ампликоны смешивали эквимольно в соответствии с полученными концентрациями. Качество приготовленного пула библиотек проводили на приборе Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, США) с использованием набора Agilent DNA 1000 Kit. Секвенирование проводили на приборе MiSeq (Illumina) в режиме парно-концевых прочтений (2·300 нукл.) с использованием набора MiSeq Reagent Kit v2.

Прочтения были отфильтрованы по качеству и обрезаны с 3'-конца при помощи trimmomatic [11]. Далее парно-концевые прочтения были объединены в единую последовательность ампликона при помощи MeFiT [12]. Мы не проводили кластеризацию ридов и поиск OTU. Вместо этого была проведена прямая таксономическая аннотация полученных последовательностей ампликонов при помощи RDP classifier [13] и баз данных RDP. Дальнейшая обработка данных проводилась

в среде R с использованием пакетов *vegan*, *fossil*, *GUniFrac*. Размер выборки не основывался на статистических соображениях. Все численные данные были проанализированы с использованием *t*-теста Стьюдента и критерия Вилкоксона. Различия между группами считались статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты исследования

Микробиота пищевода у пациентов с ГЭРБ и здоровых добровольцев

Мы сравнили типы и семейства бактерий в образцах пищеводной слизи у 15 пациентов с ГЭРБ и 6 здоровых добровольцев.

Наиболее распространенными типами в пищеводе у больных и здоровых были *Bacteroidetes* (34,2 и 25,8 % соответственно), *Firmicutes* (27,3 и 25,5 %), *Actinobacteria* (15,4 и 15,4 %), *Proteobacteria* (3,5 и 11,7 %), *Fusobacterium* (8,2 и 8,8 %) (рис. 1А).

Анализ полостной микробиоты у здоровых показал, что наиболее распространенными микроорганизмами являются грамположительные бактерии, относящиеся к семействам *Streptococcaceae* (в среднем 9,8 %), *Coriobacteriaceae* (10,5 %), *Lachnospiraceae* (4,2 %), *Actinomycetaceae* (3,7 %) и грамотрицательные – *Prevotellaceae* (22,2 %), *Fusobacteriaceae* (7,4 %), *Porphyromonadaceae* (4,5 %), *Pasteurellaceae* (3,9 %), *Neisseriaceae* (2,5 %), *Veillonellaceae* (3,0 %), *Campylobacteraceae* (2,8 %) (рис. 1В).

У пациентов с ГЭРБ среди грамположительных бактерий выявлены в основном *Streptococcaceae* (11,0 %), *Coriobacteriaceae* (7,2 %), *Lachnospiraceae* (5,4 %), *Actinomycetaceae* (5,1 %), *Erysipelotrichaceae* (2,1 %), среди грамотрицательных – *Prevotellaceae* (36,8 %), *Fusobacteriaceae* (4,2 %), *Veillonellaceae* (4,2 %), *Leptotrichiaceae* (3,7 %), *Porphyromonadaceae* (2,6 %), *Campylobacteraceae* (2,1 %).

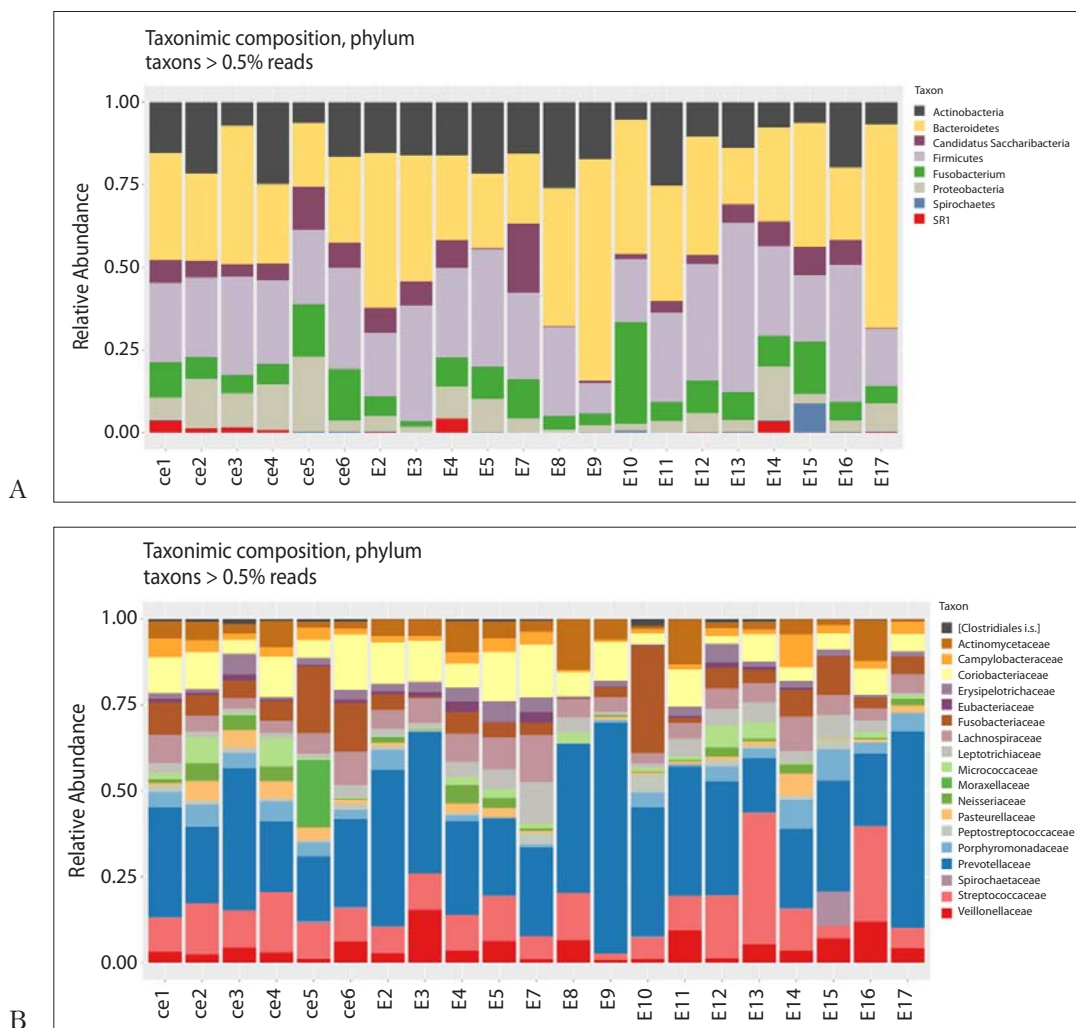


Рис. 1. Основные типы (А) и семейства (В) бактерий в образцах пищеводной слизи у больных ГЭРБ (Е) и здоровых (се)

Fig. 1. Main bacterial types (A) and families (B) in the samples of esophageal mucus from patients with GERD (E) and healthy volunteers (ce)

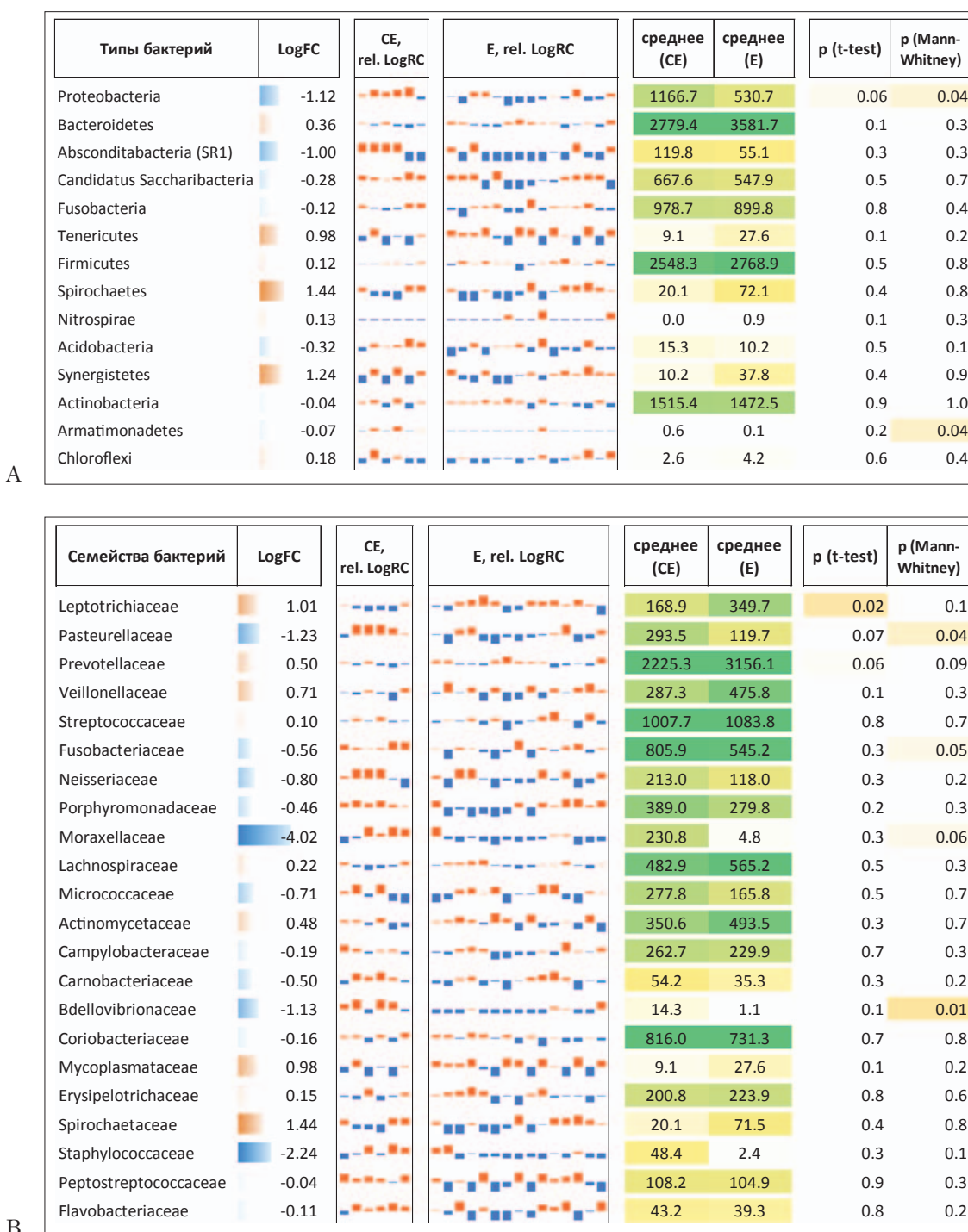


Рис. 2. Сравнительный анализ типов (А) и семейств (В) бактерий в образцах пищеводной слизи у больных ГЭРБ (Е) и здоровых (СЕ). *LogFC* – двоичный логарифм отношения средней доли бактерий, относящихся к данному семейству/типу, у больных ГЭРБ к здоровым добровольцам. *rel. LogFC* – двоичный логарифм отношения содержания доли бактерий, относящихся к данному семейству/типу, у данного индивидуума к усредненному значению этой доли по всем участникам исследования (здоровые + больные); шкала -2...+2, т.е. от 4-кратного снижения до 4-кратного повышения; синим обозначены значения ниже среднего, красным – выше среднего

Fig. 2. Comparative analysis of bacterial types (A) and families (B) in the samples of esophageal mucus from patients with GERD (E) and healthy volunteers (CE). *LogFC* – binary logarithm of the ratio of mean bacterial fraction of a given family/type from patients with GERD to healthy volunteers. *rel. LogFC* – binary logarithm of the ratio of bacterial fraction of a given family/type from the given individual to the mean fraction among all research participants (healthy + diseased); scale is from -2 to +2, i.e. from 4 time decrease to 4 time increase; values below the mean are blue, above mean – red

При сравнении относительного содержания основных типов бактерий у пациентов с ГЭРБ отмечено достоверное снижение пропорции *Proteobacteria* по сравнению со здоровыми добровольцами (в среднем 3,5 против 11,7 %, $p = 0,047$) (рис. 2А).

Сравнительный анализ бактериальных семейств у здоровых и больных выявил большее число различий между группами (рис. 2В). В пищевом тракте у больных ГЭРБ по сравнению со здоровыми добровольцами наблюдалось снижение относительного количества бактерий, относящихся к семействам *Acetobacteraceae* (тип *Proteobacteria*), *Bacillaceae* (тип *Firmicutes*), *Bdellovibrionaceae* (тип *Proteobacteria*), *Clostridiales Insertae Sedis XI* (тип *Firmicutes*), *Fusobacteriaceae* (тип *Fusobacteria*), *Moraxellaceae* (тип *Proteobacteria*), *Pasteurellaceae* (тип *Proteobacteria*) и *Rhodocyclaceae* (тип *Proteobacteria*) ($p < 0,05$).

Анализ особенностей микробиоты желудка у больных ГЭРБ и здоровых добровольцев

Исследование микробиоты в образцах желудочного содержимого было выполнено всем респондентам, включенным в исследование.

Основными типами бактерий в желудке у здоровых лиц и больных ГЭРБ являлись *Firmicutes* (27 и 26 % соответственно), *Bacteroidetes* (24 и 28 %), *Actinobacteria* (9 и 14 %), *Fusobacteria* (7 и 6 %), *Proteobacteria* (19,1 и 8,1 %) (рис. 3А).

В желудке у здоровых добровольцев выявлялись как грамположительные, так и грамотрицательные бактерии (рис. 3В). Среди грамположительных в наибольшем количестве были представлены бактерии семейств *Streptococcaceae* (9,70 %), *Coriobacteriaceae* (3,17 %), *Staphylococcaceae* (3,17 %), *Lachnospiraceae* (3,17 %), *Actinomycetaceae* (1,70 %), *Micrococccaceae* (1,10 %). Количе-

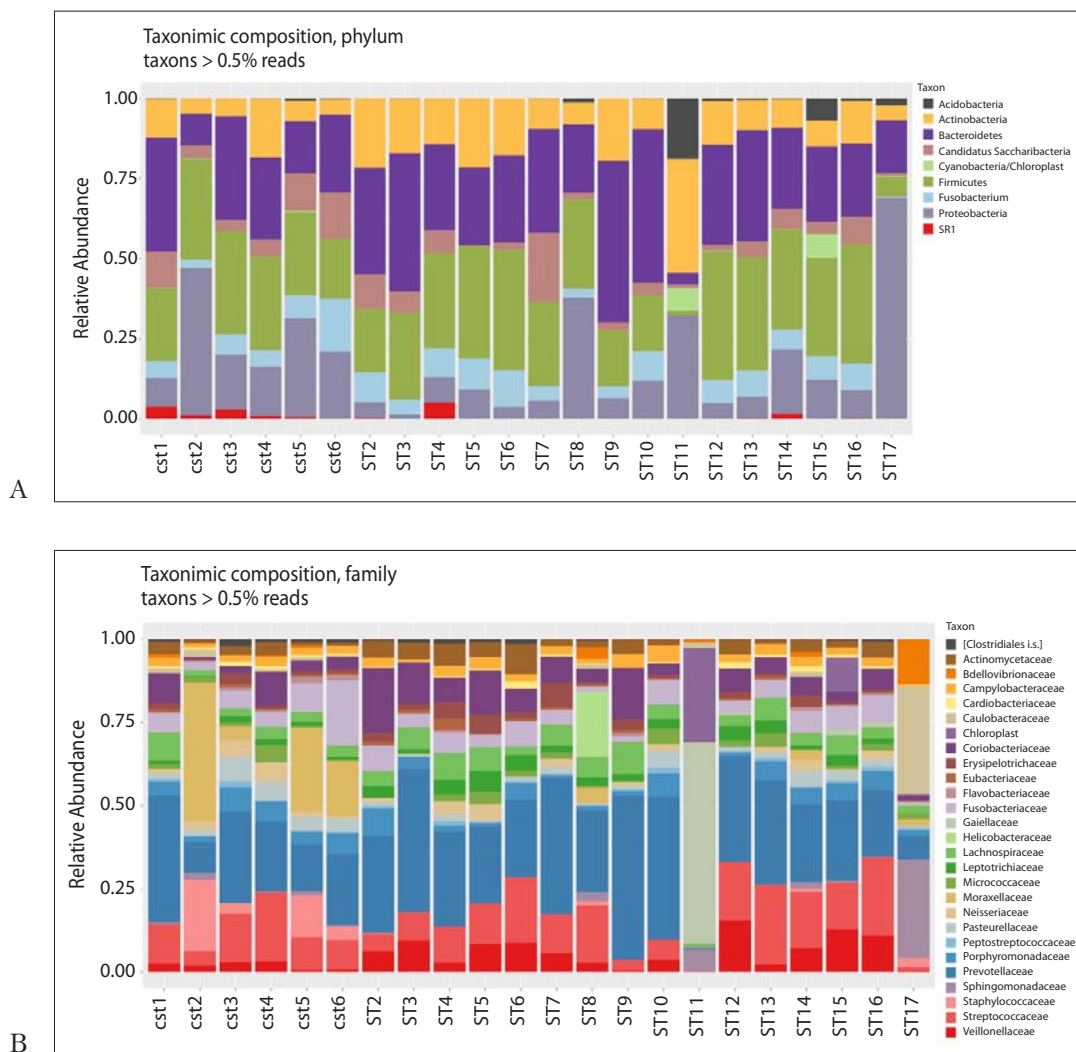


Рис. 3. Основные типы (А) и семейства (В) бактерий в образцах желудочного содержимого у больных ГЭРБ (ST) и здоровых (cst)

Fig. 3. Main bacterial types (A) and families (B) in the samples of gastric mucus from patients with GERD (ST) and healthy volunteers (cst)

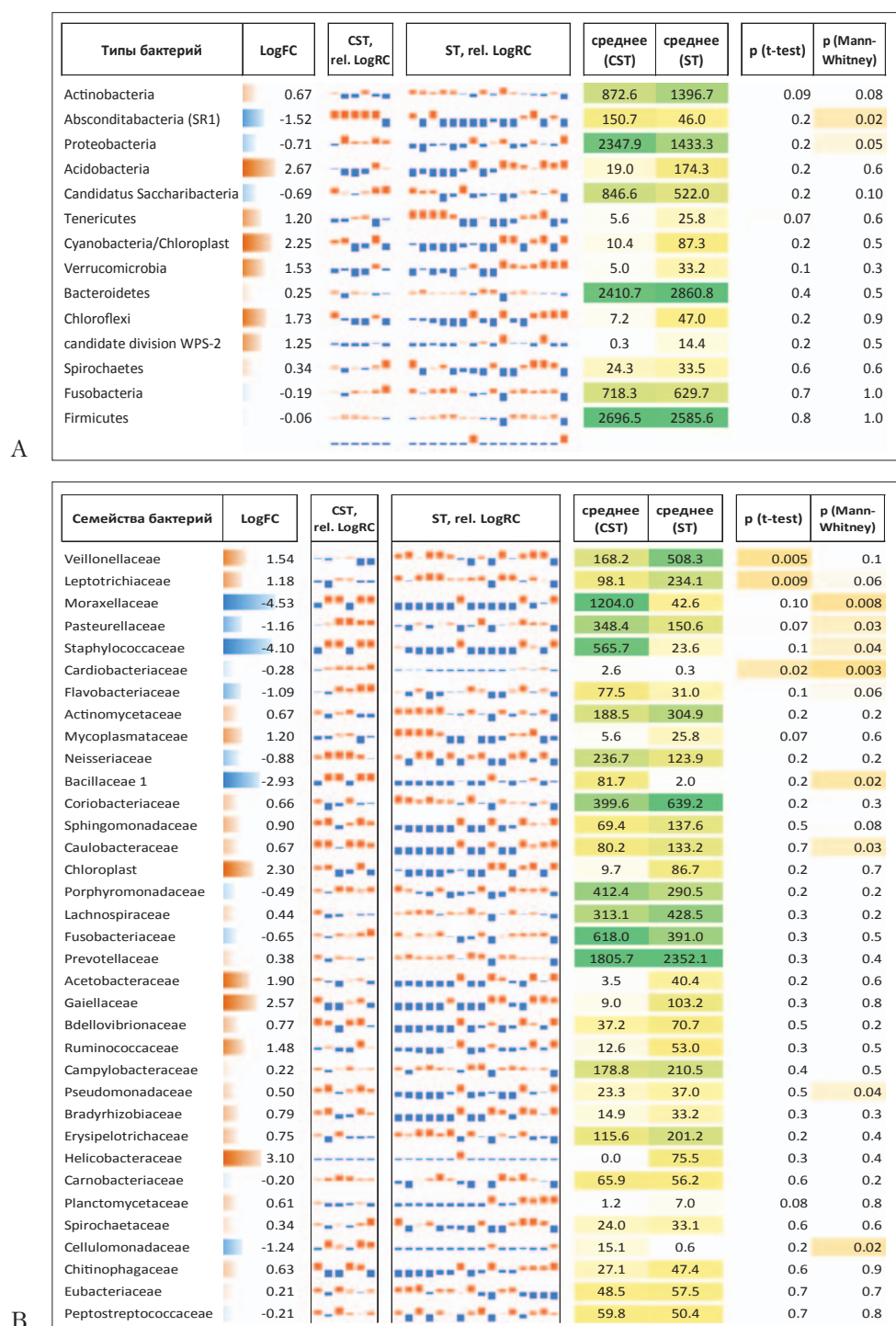


Рис. 4. Сравнительный анализ типов (А) и семейств (В) бактерий в образцах желудочного содержимого у больных ГЭРБ (ST) и здоровых (CST). *LogFC* — двоичный логарифм отношения средней доли бактерий, относящихся к данному семейству/типу, у больных ГЭРБ к здоровым добровольцам. *rel. LogFC* — двоичный логарифм отношения содержания доли бактерий, относящихся к данному семейству/типу, у данного индивидуума к усредненному значению этой доли по всем участникам исследования (здоровые + больные); шкала -2...+2, т.е. от 4-кратного снижения до 4-кратного повышения; синим обозначены значения ниже среднего, красным — выше среднего

Fig. 4. Comparative analysis of bacterial types (A) and families (B) in the samples of gastric mucus from patients with GERD (ST) and healthy volunteers (CST). *LogFC* — binary logarithm of the ratio of mean bacterial fraction of a given family/type from patients with GERD to healthy volunteers. *rel. LogFC* — binary logarithm of the ratio of bacterial fraction of a given family/type from the given individual to the mean fraction among all research participants (healthy + diseased); scale is from -2 to +2, i.e. from 4 time decrease to 4 time increase; values below the mean are blue, above mean — red

ственно грамотрицательных бактерий было больше, и к ним относились семейства *Prevotellaceae* (19,4 %), *Moraxellaceae* (8,7 %), *Fusobacteriaceae* (4,8 %), *Porphyromonadaceae* (4,6 %), *Pasteurellaceae* (3,4 %), *Neisseriaceae* (2,1 %), *Veillonellaceae* (1,9 %), *Campylobacteraceae* (1,8 %). В желудке также встречались и другие бактерии, но их относительное количество было менее 1 %.

Анализ микробиоты желудка у больных ГЭРБ показал преобладание грамотрицательных бактерий, относящихся к семействам *Prevotellaceae* (26,4 %), *Veillonellaceae* (5,4 %), *Fusobacteriaceae* (4,6 %), *Porphyromonadaceae* (2,7 %), *Leptotrichiaceae* (2,7 %), *Campylobacteraceae* (2,4 %), *Pasteurellaceae* (1,6 %), *Neisseriaceae* (1,2 %) и грамположительных, включающих *Streptococcaceae* (10,4 %), *Coriobacteriaceae* (6,1 %), *Lachnospiraceae* (4,6 %), *Actinomycetaceae* (3,9 %), *Erysipelotrichaceae* (2,0 %), *Micrococcaceae* (1,4 %).

Сравнительный анализ основных типов бактерий в желудке продемонстрировал, что у пациентов с ГЭРБ отмечено двукратное снижение относительного количества бактерий, относящихся к типу *Proteobacteria*, по сравнению со здоровыми добровольцами ($p < 0,05$) (рис. 4А).

В желудке у исследуемых основной группы достоверно реже ($p < 0,05$) по сравнению со здоровыми добровольцами встречались бактерии семейств *Bacillaceae* (тип *Firmicutes*), *Cardiobacteriaceae* (тип *Proteobacteria*), *Caulobacteraceae* (тип *Proteobacteria*), *Moraxellaceae* (тип *Proteobacteria*), *Pasteurellaceae* (тип *Proteobacteria*), *Promicromonosporaceae* (тип *Actinobacteria*), *Pseudomonadaceae* (тип *Proteobacteria*), *Staphylococcaceae* (тип *Firmicutes*) (рис. 4В). В то же время бактерии семейства *Leptotrichiaceae* (тип *Fusobacteria*) и *Veillonellaceae* (тип *Firmicutes*) у пациентов с ГЭРБ встречались достоверно чаще ($p < 0,05$).

Обсуждение результатов исследования

В этом исследовании мы изучили просветную микробиоту пищевода и желудка у пациентов, страдающих ГЭРБ, и здоровых добровольцев. Полученные результаты свидетельствуют, с одной стороны, в целом об идентичном **качественном** составе бактериальных популяций (семейств и типов) как в пищеводе, так и в желудке у больных по сравнению со здоровыми, с другой — о достоверных **количественных** различиях в этих показателях между группами.

В недавних работах зарубежных авторов с применением полимеразной цепной реакции (ПЦР) 16S рРНК клонированием и секвенированием клонов были идентифицированы микроорганизмы, которые ранее не удавалось обнаружить с помощью культурального метода. Например, в исследовании, проведенном в Японии N. Liu и соавт. [11], изучена микробиота дистальной части пище-

вода у пациентов с нормальной эндоскопической картиной пищевода, больных с ГЭРБ и пищеводом Барретта (см. таблицу). В работе в качестве материала для исследования были использованы биоптаты слизистой оболочки пищевода, то есть была изучена пристеночная микробиота. *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* были наиболее распространенными типами бактерий в пищеводе как у здоровых, так и у больных. Однако *Fusobacteria* чаще встречалась у больных ГЭРБ в отличие от здоровых.

В пищеводе следует выделять полостную и пристеночную микробиоту, которые могут отличаться. Работ, посвященных этому, в настоящее время еще не выполнено. Сопоставление полученных нами данных с ранее выполненными работами демонстрирует идентичный качественный, но отличный количественный состав микробиоты пищевода у больных и здоровых. Во-первых, это отличие обусловлено различием в популяции респондентов, включенных в исследование. Во-вторых, в одном случае оценивалась пристеночная микробиота (в биоптатах слизистой оболочки пищевода), в другом — полостная (образцы пищеводной слизи). Также велико влияние различных методик анализа таксономического состава [15]. Сопоставление полученных нами результатов с представленными в литературе приведено в таблице.

Еще в одной работе, выполненной I. Amir и соавт., было показано, что *Proteobacteria* и *Firmicutes* являются наиболее распространенными типами бактерий в пищеводе у здоровых, пациентов с ГЭРБ [18], но их исследование также оценивало пристеночную микробиоту.

Таким образом, полостная микробиота пищевода представлена как грамположительными (*Firmicutes*, *Actinobacteria*), так и грамотрицательными бактериями (*Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Fusobacterium*). Различия бактериального состава у здоровых добровольцев и пациентов с ГЭРБ на уровне типов проявляются в содержании *Proteobacteria*, которые снижается у вторых. При этом наиболее значительно группы отличаются по количественному составу бактериальных семейств *Aceetobacteraceae*, *Bdellovibrionaceae*, *Moraxellaceae*, *Pasteurellaceae*, *Rhodocyclaceae*.

Несмотря на то что различий по другим типам не было, сравнительный анализ показал, что бактериальные семейства *Leptotrichiaceae* чаще встречаются у респондентов основной группы, а *Bacillaceae*, *Clostridiales Insertae Sedis XI*, относящиеся к типу *Firmicutes*, и *Fusobacteriaceae* (тип *Fusobacteria*) — контрольной.

С учетом того, что основным патогенетическим фактором развития ГЭРБ является патологический рефлюкс в пищевод желудочного содержимого, было целесообразно параллельно оценить микробиоту желудка в основной и контрольной группах.

Таблица 1. Микробиота пищевода у здоровых добровольцев, больных с ГЭРБ и пищеводом Барретта по данным различных авторов [16]

Table 1. Esophageal microbiota of healthy volunteers, patients with GERD and Barrett's esophagus according to different authors [16]

	Z. Pei и соавт. (2004) [17] Z. Pei et al. (2004) [17]	N. Liu и соавт. (2013) [14] N. Liu et al. (2013) [14]	Румянцева Д.Е. и соавт. (2018) D.E. Romyantseva et al. (2018)
Материал для анализа Sample material	Биоптаты слизистой пищевода Biopates of esophageal mucus	Биоптаты слизистой пищевода Biopates of esophageal mucus	Пищеводная слизь Esophageal mucus
Нормальная эндоскопическая картина пищевода Normal endoscopic view of esophagus		<i>Proteobacteria</i> (49 %) <i>Firmicutes</i> (40 %) <i>Bacteroidetes</i> (8 %) <i>Actinobacteria</i> (3 %)	<i>Bacteroidetes</i> (25,8 %) <i>Firmicutes</i> (25,5 %), <i>Actinobacteria</i> (15,4 %) <i>Proteobacteria</i> (11,7 %) <i>Fusobacterium</i> (8,2 %)
ГЭРБ GERD	<i>Firmicutes</i> (69,9 %) <i>Bacteroides</i> (20,2 %) <i>Actinobacteria</i> (4,3 %) <i>Proteobacteria</i> (2,2 %) <i>Fusobacteria</i> (2,2 %)	<i>Proteobacteria</i> (43 %) <i>Firmicutes</i> (33 %) <i>Bacteroidetes</i> (10 %) <i>Fusobacteria</i> (10 %) <i>Actinobacteria</i> (2 %) TM7 (2 %)	<i>Bacteroidetes</i> (34,2 %) <i>Firmicutes</i> (27,3 %) <i>Actinobacteria</i> (15,4 %) <i>Proteobacteria</i> (3,5 %) <i>Fusobacterium</i> (8,8 %)

I. Amig и соавт. продемонстрировали, что преобладающими типами бактерий в биоптатах желудка были *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* и *Fusobacteria*. Результаты, полученные нами при исследовании полостной микробиоты, показывают схожие данные в отношении качественных показателей. *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria*, *Proteobacteria* являлись основными представителями полостной микробиоты желудка. Так же как и в пищеводе, в желудке у больных ГЭРБ выявлено двукратное уменьшение содержания *Proteobacteria* по сравнению с здоровыми лицами (8,1 и 19,1 %).

В работе Elisabeth M. Vik и соавт., которое изучали микробиоту желудка, также было продемонстрировано, что наиболее распространенными являются бактерии типов *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* и *Fusobacteria* [19].

Исследования полостной микробиоты желудка, проведенные нами, и пристеночной, выполненное I. Amig и соавт., выявили, что у здоровых респондентов в большем количестве встречаются семейства *Pasteurellaceae* и *Porphyromonadaceae*.

Бактерии семейств *Staphylococcaceae*, которые в основном представляют собой оральную микробиоту, встречались в большем количестве в желудке у здоровых добровольцев. Возможно, что объяснение этому кроется в различиях внутрижелудочной pH у здоровых и больных ГЭРБ. Однако влияние pH на микробиоту пищевода и желудка не было описано ранее и является интересным и перспективным направлением.

Выводы

Результаты нашего исследования свидетельствуют о различиях микробиоты как желудка, так и пищевода у больных ГЭРБ и здоровых добровольцев. Дальнейшее изучение микробиоты пищевода и желудка позволит раскрыть новые звенья патогенеза заболевания, а также разработать новые подходы к терапии. В настоящее время убедительных данных о влиянии тех или иных изменений бактериального состава на изменения в пищеводе и желудке мало, и необходимы дальнейшие исследования в этом направлении.

Литература / References

- Ивашкин В.Т., Маев И.В., Трухманов А.С., Баранская Е.К., Дронова О.Б., Зайратьянц О.В., Сайфутдинов Р.Г., Шептулин А.А., Лапина Т.Л., Пирогов С.С., Кучерявый Ю.А., Сторонова О.А., Андреев Д.Н. Клинические рекомендации Российской гастроэнтерологической ассоциации по диагностике и лечению гастроэзофагеальной рефлюксной болезни. Рос журн гастроэнтерол гепатол колопроктол. 2017;27(4):75–95. DOI: 10.22416/1382-4376-2017-27-4-75-95 [Ivashkin V.T., Maev I.V., Trukhmanov A.S., Baranskaya Ye.K., Dronova O.B., Zayratyants O.V., Sayfutdinov R.G., Sheptulin A.A., Lapina T.L., Pirogov S.S., Kucheryavyy Yu.A., Storonova O.A., Andreyev D.N. Diagnostics and treatment of gastroesophageal reflux disease: clinical guidelines of the Russian gastroenterological Association. Rus J. Gastroenterol. Hepatol. Coloproctol. 2017;27(4):75–95. DOI: 10.22416/1382-4376-2017-27-4-75-95 (In Rus.)].
- Rowland I.R. The role of the gastrointestinal microbiota in colorectal cancer. *Curr Pharm Des.* 2009;15:1524–7.
- Osiyas G., Bromer M., Thomas R.M. Esophageal bacteria and Barrett's esophagus: a preliminary report. *Dig Dis Sci.* 2004;49:228–36.
- Pei Z., Bini E.J., Yang L., Zhou M., Francois F., Blaser M.J. Bacterial biota in the human distal esophagus. *PNAS.* 2004;101:4250–5.
- Macfarlane S., Furrie E., Macfarlane G.T., Dillon J.F. Microbial colonisation of the upper gastrointestinal tract in patients with Barrett's esophagus. *Clin Infect Dis.* 2007;45:29–38.
- Yang L., Lu X., Nossa C.W., Francois F., Peek R.M., Pei Z. Inflammation and intestinal metaplasia of the distal esophagus are associated with alterations in the microbiome. *Gastroenterology.* 2009;137:588–97.
- Yang L., Francois F., Pei Z. Molecular pathways: pathogenesis and clinical implications of microbiome alteration in esophagitis and Barrett esophagus. *Clinical Cancer Research.* 2012;18:2138–44.
- Frosali S., Pagliari D., Gambassi G., Landolfi R., Pandolfi F., Cianci R. How the Intricate Interaction among Toll-Like Receptors, Microbiota, and Intestinal Immunity Can Influence Gastrointestinal Pathology. *J Immunol Res.* 2015;2015:489821.
- Евсютина Ю.В., Ивашкин В.Т. Роль микробиома в развитии болезней пищевода. Рос журн гастроэнтерол гепатол колопроктол. 2016;26(3):11–6 [Yevsyutina Yu.V., Ivashkin V.T. Microbiome in development of esophageal diseases. Rus J. Gastroenterol. Hepatol. Coloproctol. 2016;26(3):11–6 (In Rus.)].
- Кардымон О.Л., Кудрявцева А.В. Молекулярно-генетические методы для исследования микробиома кишечника. Рос журн гастроэнтерол гепатол колопроктол. 2016;26(4):4–13 [Kardymon O.L., Kudryavtseva A.V. Molecular genetic methods for intestinal microbiome investigation. Rus J. Gastroenterol. Hepatol. Coloproctol. 2016;26(4):4–13 (In Rus.)].
- Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics.* 2014;30(15):2114–20. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu170.
- Parikh H.I., Koparde V.N., Bradley S.P., Buck G.A., Sheth N.U. MeFiT: merging and filtering tool for illumina paired-end reads for 16S rRNA amplicon sequencing. *BMC Bioinformatics.* 2016;17(1):491.
- Wang Q., Garrity G.M., Tiedje J.M., Cole J.R. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73(16):5261–7. DOI: 10.1128/AEM.00062-07.
- Liu N., Ando T., Ishiguro K., Maeda O., Watanabe O., Funasaka K., Nakamura M., Miyahara R., Ohmiya N., Goto H. Characterization of bacterial biota in the distal esophagus of Japanese patients with reflux esophagitis and Barrett's esophagus. *BMC Infect Dis.* 2013;13:130. DOI: 10.1186/1471-2334-13-130.
- Wu G.D., Lewis J.D., Hoffmann C., Chen Y.Y., Knight R., Bittinger K., Hwang J., Chen J., Berkowsky R., Nessel L., Li H., Bushman F.D. Sampling and pyrosequencing methods for characterizing bacterial communities in the human gut using 16S sequence tags. *BMC Microbiol.* 2010;10:206. DOI: 10.1186/1471-2180-10-206.
- Румянцова Д.Е., Трухманов А.С., Кудрявцева А.В., Ивашкин В.Т. Влияние кислотосупрессии на микробиоту желудочно-кишечного тракта. Рос журн гастроэнтерол гепатол колопроктол. 2018;28(1):78–88. DOI: 10.22416/1382-4376-2018-28-1-78-88 [Rumyantseva D.Ye., Trukhmanov A.S., Kudryavtseva A.V., Ivashkin V.T. Effect of antisecretory treatment on gastrointestinal microbiota. Rus J. Gastroenterol. Hepatol. Coloproctol. 2018;28(1):78–88 DOI: 10.22416/1382-4376-2018-28-1-78-88 (In Rus.)].
- Pei Z., Bini E.J., Yang L., Zhou M., Francois F., Blaser M.J. Bacterial biota in the human distal esophagus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004;101:4250–5.
- Amir I., Konikoff F.M., Oppenheim M., Gophna U., Half E.E. Gastric microbiota is altered in oesophagitis and Barrett's oesophagus and further modified by proton pump inhibitors. *Environmental Microbiology.* 2014;16(9):2905–14.
- Bik E.M., Eckburg P.B., Gill S.R., Nelson K.E., Purdom E.A., Francois F., et al. Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006;103:732–7. DOI: 10.1073/pnas.0506655103.

Сведения об авторах

Румянцова Диана Евгеньевна* — врач отделения гастроэнтерологии клиники пропедевтики внутренних болезней им. В.Х. Василенко, ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» (Сеченовский университет) Министерства здравоохранения Российской Федерации.
Контактная информация: diana-ryazanceva@yandex.ru; 119991, г. Москва, ул. Погодинская, д. 1, стр. 1.

Трухманов Александр Сергеевич — доктор медицинских наук, профессор кафедры пропедевтики внутренних болезней лечебного факультета, ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» (Сеченовский университет) Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Information about the authors

Diana E. Rumyantseva* — Physician of the Gastroenterology Department, Vasilenko Clinic of Internal Disease Propedeutics, Gastroenterology and Hepatology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Ministry of Healthcare of the Russian Federation.
Contact information: diana-ryazanceva@yandex.ru.

Alexander S. Trukhmanov — Dr. Sci. (Med), Professor of the Department of Propaedeutics of Internal Diseases, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Ministry of Healthcare of the Russian Federation.

Кудрявцева Анна Викторовна — кандидат биологических наук, заведующая лабораторией постгеномных исследований, ФГБУ «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта» Российской академии наук, научный сотрудник патологоанатомического отделения, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Краснов Георгий Сергеевич — старший научный сотрудник, ФГБУ «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта» Российской академии наук.

Параскевова Анна Владимировна — врач отделения функциональной диагностики Клиники пропедевтики внутренних болезней, гастроэнтерологии и гепатологии им. В.Х. Василенко УКБ № 2, ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» (Сеченовский университет) Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Сторонова Ольга Андреевна — кандидат медицинских наук, врач отделения функциональной диагностики Клиники пропедевтики внутренних болезней, гастроэнтерологии и гепатологии им. В.Х. Василенко УКБ № 2, ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» (Сеченовский университет) Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Пономарев Андрей Борисович — кандидат медицинских наук, доцент кафедры патологической анатомии, ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» (Сеченовский университет) Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Anna V. Kudryavtseva — Cand. Sci. (Biology), Head of the Laboratory of Post-Genomic Studies, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Research Associate of Pathological Anatomy Department, National Medical Research Radiological Centre.

Georgy S. Krasnov — Senior Researcher, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences.

Anna V. Paraskevova — Physician of the Department of Functional Diagnostics, Vasilenko Clinic of Internal Disease Propedeutics, Gastroenterology and Hepatology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Ministry of Healthcare of the Russian Federation.

Olga A. Storonova — Cand. Sci. (Med.), Physician of the Department of Functional Diagnostics, Vasilenko Clinic of Internal Disease Propedeutics, Gastroenterology and Hepatology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Ministry of Healthcare of the Russian Federation.

Andrey B. Ponomarev — Cand. Sci. (Med.), Associate Professor of Pathological Anatomy Department, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Ministry of Healthcare of the Russian Federation.

Поступила: 16.05.2018

Received: 16.05.2018

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author