

© Коллектив авторов, 2008

*Е.А. Корниенко<sup>1</sup>, О.К. Нетребенко<sup>2</sup>, С.Е. Украинцев<sup>3</sup>*

## **РОЛЬ КИШЕЧНОЙ МИКРОФЛОРЫ И ПРОБИОТИКОВ В РАЗВИТИИ ИММУНИТЕТА У ГРУДНЫХ ДЕТЕЙ**

<sup>1</sup> ГОУ ВПО «Санкт-Петербургская государственная педиатрическая медицинская академия Росздрава», Санкт-Петербург; <sup>2</sup> ГОУ ВПО «Российский государственный медицинский университет Росздрава», Москва;

<sup>3</sup> ФГУН «ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора», Москва

В последние годы педиатры и эпидемиологи отмечают появление некоторых неблагоприятных тенденций в состоянии здоровья детского населения, а именно: рост аллергических, аутоиммунных заболеваний, ожирения, сахарного диабета 2-го типа, хронических неспецифических заболеваний кишечника.

Поиск причин и механизмов развития этих болезней выявил ряд факторов, которые повышают риск развития многих патологических состояний. Среди факторов риска изменения в составе кишечной микробиоты (КМБ) занимают одно из первых мест. При этом доказано, что развитию атопии, ожирения, неспецифических воспалительных за-

болеваний кишечника нередко предшествует изменение состава кишечной микрофлоры (КМФ).

Предполагают, что в основе нарушений состава КМБ лежат современные принципы стерильного ведения родов, широкая распространенность оперативного родоразрешения, значительная распространенность у матерей урогенитальных инфекций, использование антибиотикотерапии у беременных женщин, детей и матерей, снижение распространенности и продолжительности грудного вскармливания. Характер КМБ новорожденного младенца зависит от микрофлоры матери, характера родов, окружающей среды и питания.

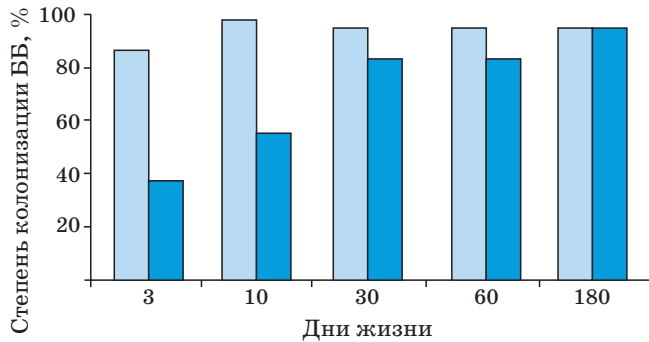


Рис. 1. Влияние характера родов на состав кишечной микрофлоры у детей.

1-й столбик — вагинальные роды, 2-й столбик — кесарево сечение.

К настоящему времени появились убедительные данные о нарушении КМБ у детей, рожденных кесаревым сечением (рис. 1). Как видно из рис. 1, нормализация состава КМБ при оперативном родоразрешении достигается только к 6-му месяцу жизни [1]. В этом же исследовании было показано, что снижение уровня бифидобактерий (ББ) в стуле у детей сопровождается повышением уровня клостридий и бактероидов. Мета-анализ данных различных исследований о влиянии оперативного родоразрешения на последующее состояние здоровья детей показал достоверно более высокий уровень заболеваемости у младенцев, рожденных с помощью кесарева сечения (рис. 2).

Зачастую в раннем постнатальном периоде используется антибиотикотерапия, иногда без достаточных оснований. В работе S. Nutten и соавт. [2] было показано, что использование антибиотиков широкого спектра действия в течение 7 дней сопровождается грубыми изменениями КМБ: резким снижением числа ББ и лактобацилл (ЛБ), вплоть до полного их исчезновения, замещением здоровой микрофлоры антибиотикорезистентными штаммами, повышением активности тучных клеток и увеличением риска развития атопии. Нарушение состава КМБ снижает возможности защитного барьера кишечника, в частности за счет снижения

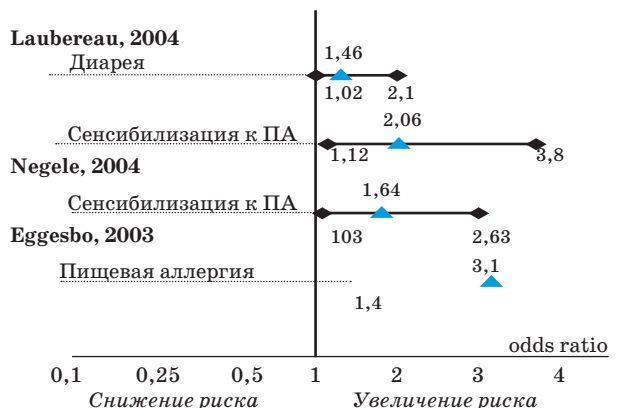


Рис. 2. Кесарево сечение и риск развития заболеваний в первые 2 года жизни.

антимикробной функции клеток Панета [3]. Последние исследования в этой области показали, что у генетически чувствительных субъектов нарушения состава КМБ приводят к снижению продукции дефенсина клетками Панета, что, возможно, является ключевым патогенетическим фактором некоторых форм болезни Крона [4, 5]. Кроме того, нарушение состава КМБ влечет за собой снижение экспрессии генов, ответственных за синтез белков, участвующих в процессах транскрипции, передачи сигналов, клеточной пролиферации, дифференциации и др. [6]. В настоящее время есть достоверные свидетельства того, что нарушения состава КМБ в младенчестве вследствие антибиотикотерапии являются важным фактором, предрасполагающим к развитию хронических воспалительных заболеваний кишечника в дальнейшем.

Дополнительным фактором неблагоприятного влияния на состав КМБ является искусственное вскармливание.

### Роль грудного молока в развитии здоровой кишечной микрофлоры

Бифидогенный эффект грудного молока (ГМ) является сложным и комплексным, включая в себя различные механизмы.

Низкое содержание белка в ГМ и высокая степень его усвоения способствуют тому, что бактерии-протеолитики в нижних отделах тонкой и верхних отделах толстой кишки не получают достаточного количества белка для своего развития и не доминируют над ББ. Относительно высокое содержание в составе белков ГМ  $\alpha$ -лактальбумина способствует росту ББ благодаря его бифидогенному действию.

ГМ отличается от коровьего значительно более низким содержанием фосфора (160 мг/л в ГМ против 900–980 мг/л в коровьем). Низкий уровень фосфора обеспечивает низкую буферную емкость в просвете кишечника, что способствует формированию более низких показателей pH. Создание слабнокислой среды в просвете толстой кишки благоприятно для роста ББ и одновременно сдерживает рост условно-патогенной флоры.

По мнению большинства исследователей, большую роль в обеспечении бифидогенного эффекта ГМ играют олигосахариды (ОС).

ОС ГМ представляют собой сложные молекулы, в состав которых входят галактоза, глюкоза, фукоза, сиаловая кислота, N-ацетилглюкозамин. Они могут быть представлены в свободной форме или в связанном с белком (гликопротеины) или липидами (гликолипиды) состоянии. К настоящему времени установлено, что количество вариантов строения ОС в ГМ может превышать 900 [7], а выделено и охарактеризовано к настоящему времени лишь около 200 из них.

Некоторые ОС ГМ способны связывать в просвете кишки патогенные бактерии, вирусы и ток-

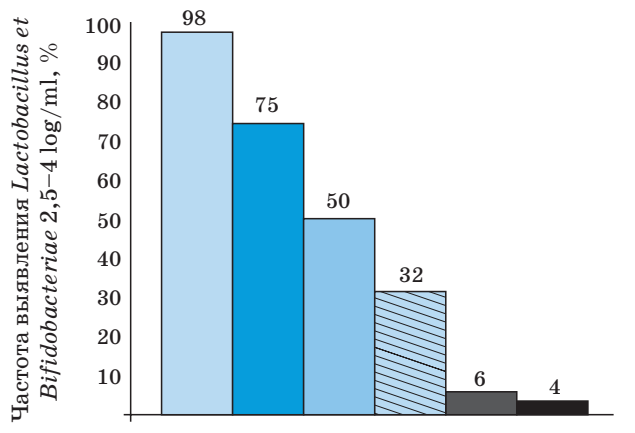


Рис. 3. Женское молоко — естественный источник лакто- и бифидобактерий.

■ *B. longum*, ■ *B. lactis*, ■ *B. bifidum*, ■ *B. catenulatum*, ■ *B. breve*, ■ *B. adolescentis*.

сины, а также препятствовать их адгезии к слизистой оболочке кишечника [8]. Таким образом, ОС ГМ выполняют важнейшую функцию защиты организма ребенка.

ОС ГМ часто используют в качестве модели при производстве детских молочных смесей (ДМС), в которые добавляют искусственно синтезированные галактоОС (ГОС) и фруктановые ОС (ФОС). Очевидно, что искусственно синтезированные ОС не могут повторить многообразие и индивидуальность строения материнских ГОС, то есть не идентичны ОС ГМ ни в качественном аспекте, ни в плане функциональности. Они обладают бифидогенным действием, но не могут соответствовать индивидуальной структуре гликолизированных рецепторов слизистой оболочки кишечника и выполнять их функции [9].

ГМ традиционно относят к стерильным продуктам, рассматривая это как один из факторов, обеспечивающих безопасность младенца, вскармливаемого грудью. Стерильность ГМ ассоциируется с отсутствием в нем патогенной микрофлоры, способной вызвать заболевание матери или ребенка. Однако на сегодняшний день появились данные о том, что ребенок, находящийся на грудном вскармливании, получает в сутки с ГМ порядка  $10^4$ – $10^6$  комменсальных бактерий, многие из которых обладают способностью ингибировать рост патогенной флоры, в частности *S. aureus* [10].

В 2003 г. группа испанских исследователей опубликовала работу, в которой сообщалось о выделении из ГМ здоровых женщин кисломолочных бактерий [11, 12]. В пользу эндогенного происхождения бактерий, выделенных из ГМ, свидетельствовал тот факт, что эти штаммы по своим генотипическим характеристикам отличались от штаммов, высеянных у этих же женщин с кожи молочной железы. В то же время установлена тождественность штаммов ЛБ, высеянных из ГМ и с

поверхности ареолы, со штаммами ЛБ, выделенных из кала младенца, вскармливаемого данной женщиной (рис. 3). Авторы предполагают, что кисломолочные бактерии, содержащиеся в ГМ, создают своего рода биопленку в протоках молочной железы и на поверхности ареолы. Формирование этой биопленки, содержащей кисломолочные бактерии, может начинаться за несколько недель до родов, когда начинаются выработка и выделение небольших количеств молозива.

В продолжение этой работы авторы изучали пробиотическую активность штаммов кисломолочных бактерий, выделенных ими из ГМ [13]. В результате исследования было продемонстрировано, что ЛБ, выделенные из ГМ, способны сохранять свою жизнеспособность при прохождении через агрессивные среды желудка и 12-перстной кишки. Показана их способность продуцировать молочную кислоту, создавая таким образом кислую среду в кишечнике, препятствующую росту патогенной флоры, а также способность к продукции перекиси водорода, обладающей способностью ингибировать рост многих патогенов, в частности *S. aureus*.

Немаловажным является и тот факт, что ни один из штаммов ЛБ, выделенных из ГМ, не обладал способностью разрушать пристеночный слой слизи или продуцировать нежелательные биогенные амины (кадаверин, путресцин, гистамин, тирамин) [12].

Новые оригинальные исследования в этом направлении помогают более полно понять механизмы переноса бактерий от матери к плоду и новорожденному ребенку. В работе Р. Perez и соавт. [14] проведено исследование содержания бактерий в ГМ матерей, наличие бактериальных ДНК в клетках молока и моноцитах периферической крови. В качестве контроля изучались аналогичные показатели здоровых не беременных женщин. Результаты исследования показали наличие бактерий в молоке женщин, а также наличие бактериальных ДНК в клетках периферической крови матерей. Эти данные позволяют подтвердить, что бактериальная транслокация является уникальным физиологическим механизмом, наиболее выраженным у беременных и кормящих женщин. ГМ содержит относительно небольшое количество бактерий, но, кроме того, значительное количество бактериальных ДНК, которые программируют иммунную систему новорожденных таким образом, что ответ иммунокомпетентных клеток на бактериальные антигены отличается от ответа на комменсальную флору [15].

Таким образом, ГМ является источником комменсальных бактерий и фактором, способствующим росту ББ в кишечнике у младенца. Отсутствие грудного вскармливания может нарушить колонизацию кишечника ББ и создает риск развития целого ряда заболеваний.

### Механизмы влияния КМФ на становление иммунного ответа у новорожденного

Здоровая КМФ играет определяющую роль в процессах становления и созревания иммунного ответа у младенцев. Прежде всего комменсальные бактерии становятся первым антигеном, попадающим в кишечник ребенка, и реакция врожденной иммунной системы при встрече с бактериями определяет направленность иммунного ответа. Попадание в организм патогенных бактерий сопровождается активацией ядерного фактора, выбросом провоспалительных цитокинов. В работе L. O'Mahony [15] в клинических условиях было продемонстрировано отличие иммунного ответа лимфоцитов периферической крови на контакт с комменсальной и патогенной флорой: комменсальная флора не увеличивала продукцию провоспалительных цитокинов, в то время как патогенная флора индуцировала активную продукцию TNF $\alpha$ , IL12 и процессы воспаления. При неблагоприятной ситуации этот процесс может носить затяжной характер и повторяться в дальнейшем. Поступление в организм младенца комменсальных бактерий (в период прохождения по родовым путям матери, с ГМ) не приводит к активации ядерного фактора и продукции воспалительных цитокинов. Наблюдается появление Т-регуляторных клеток, секретирующих IL10, TGF $\beta$ , обладающих толерогенными свойствами, смягчающих активность иммунного ответа. По мнению Rooks и соавт. [16], это связано с тем, что в процессе многотысячелетней эволюции человека его организм стал воспринимать ЛБ и ББ в качестве «старых друзей», поэтому поступление этих бактерий не активирует синтез провоспалительных цитокинов. В то же время отсутствие «старых друзей» нарушает процессы иммунорегуляции, выработку толерантности в организме младенца. Задача комменсальных бактерий заключается в инициации, обучении, тренировке иммунной системы младенца, и их отсутствие становится фактором риска развития аутоиммунных и аллергических заболеваний ребенка.

Другим механизмом влияния комменсальных бактерий на защиту младенца является повышение выработки sIgA в кишечнике. Большая часть sIgA, а также другие иммуноглобулины, продуцируются плазматическими клетками кишечника. Защитные свойства sIgA, как первой линии защиты, обусловлены его способностью предотвращать адгезию и пенетрацию патогенов [17]. Вторая линия защиты связана со способностью sIgA проникать в эпителиальные клетки слизистой оболочки кишечника и воздействовать на репликационный цикл вирусов, находящихся внутриклеточно. SIgA в отличие от остальных иммуноглобулинов выполняет функцию специфического иммунологического барьера, связывая антигены на поверхности эпителия и препятствуя их проникновению

внутри организма, тем самым снижая активность иммунного ответа, уменьшая вероятность как воспалительного, так и аллергического процесса [18].

Важным механизмом защиты желудочно-кишечного тракта является поддержание целостности барьера слизистой оболочки кишечника для предотвращения пенетрации его патогенами. В настоящее время появилось много новой информации о роли комменсальной микробиоты в процессах сохранения целостности кишечного барьера. Экспериментальное изучение состояния эпителиального барьера кишечника у гнотобионтов и животных, выращенных в нормальных условиях, показало более высокую проницаемость кишечника у гнотобионтов. Более того, восстановление, репарация слизистой оболочки кишечника невозможны без участия КМБ [3].

В последние годы в медицинской литературе широко обсуждается возможность благоприятного модулирования КМБ младенца на искусственном вскармливании с помощью ДМС, обогащенных пробиотиками. В настоящее время установлена способность пробиотических бактерий модулировать иммунную систему младенца за счет нескольких механизмов [19]:

1) поддержание целостности эпителиального барьера кишечника:

- увеличение слоя муцина для предотвращения проникновения патогена;
- снижение возможности повышения проницаемости барьера для патогенов;
- увеличение защиты клеток эпителия выбросом стресс-регулирующих белков;

2) регулирование функций антиген-презентирующих клеток путем снижения их чрезмерной активации;

3) обеспечение готовности иммунной системы к адекватному ответу здорового организма и подавление провоспалительной направленности иммунного ответа в процессе болезни;

4) формирование иммунологической толерантности.

В то же время подчеркивается, что пробиотики ДМС должны удовлетворять трем основным критериям: 1) стабильность в продукте и при прохождении через агрессивные среды желудка и кишечника; 2) эффективность, доказанная в клинических испытаниях; 3) абсолютная безопасность для младенца, получающего ДМС с рождения.

### Пробиотики в составе ДМС

В научно-исследовательском центре компании Нестле существует коллекция штаммов ББ и ЛБ, многие из которых с успехом используются в питании здоровых и больных детей (*B. longum* и *L. rhamnosus* — в составе смесей НАН 2 и НАН ГА2, *B. lactis* — в составе смеси НАН кисломолочный 1, 2 и в составе продуктов прикорма). Стабильность

пробиотиков в этих продуктах доказана многочисленными исследованиями их сохранности в продуктах при длительном хранении, устойчивостью к соляной кислоте, желудочному и кишечному сокам. Экспериментальные исследования показали, что инкубирование этих пробиотиков с лимфоцитами периферической крови приводит к снижению выброса провоспалительных цитокинов (TNF $\alpha$ , IL2 и др.) и повышению уровня регулирующих цитокинов — TGF $\beta$ , IL10 [20]. В случаях экспериментального колита у лабораторных животных использование пробиотиков приводило к стиханию процессов воспаления.

Интересно отметить, что TGF $\beta$  и IL10 обнаруживаются в достаточном количестве в ГМ, что позволяет говорить о толерогенных свойствах ГМ. Экспериментальные исследования также демонстрируют увеличение количества Пейеровых бляшек, уровня IgA в копрофильтратах, что свидетельствует об активации иммунной системы экспериментальных животных.

Клинические исследования влияния пробиотиков на КМБ грудного ребенка показали прежде всего возможность предупредить глубокие нарушения состава КМФ. В работе Mohan и соавт. [21] в питание недоношенных детей, получавших антибиотики, были введены *B. lactis*. Через 3 недели от начала пробиотикотерпии отмечен достоверно более высокий по сравнению с контрольной группой уровень ББ в стуле у детей, снижение количества условно-патогенной флоры, повышение уровня IgA в копрофильтратах и снижение уровня калпротектина, как показателя воспаления кишечной стенки (рис. 4). Кроме того, в другом клиническом исследовании [22] было продемонстрировано улучшение целостности кишечного барьера (показателя кишечной проницаемости) у недоношенных детей, получавших *B. lactis* (рис. 5). Эти данные показали эффективность использования пробиотиков в питании детей с рождения, что особенно важно для детей, получавших антибиотикотерапию в раннем постнатальном периоде.

Следует напомнить, что доминирование ББ в КМБ доношенных детей является важным факто-

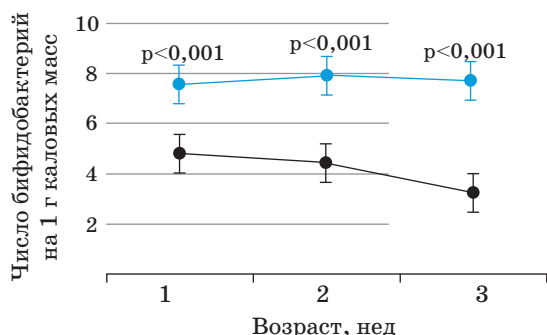


Рис. 4. Применение *B. lactis* у недоношенных. ● — контрольная группа, ● — *B. lactis*.

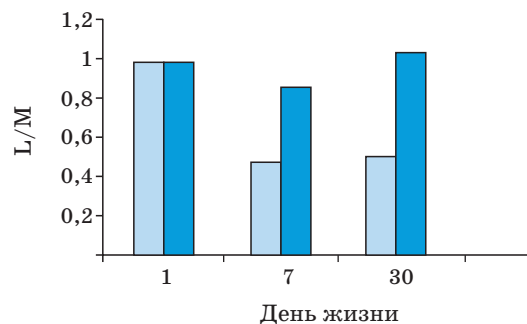


Рис. 5. Влияние *B. lactis* на проницаемость кишечной стенки у недоношенных детей.

■ *B. lactis*, ■ контроль.

ром предупреждения развития атопии. В работе J. Penders и соавт. [23], проводилось наблюдение за здоровыми доношенными детьми на протяжении 2 лет. При этом в возрасте 1 месяца был проведен анализ КМБ, а в возрасте 2 лет проводили забор крови для определения IgE. Результаты исследования показали, что высокий уровень *E. coli* являлся достоверным прогностическим фактором развития экземы, а младенцы, колонизированные *C. difficile*, имели более высокий риск развития экземы, аллергической сенсibilизации и аллергического ринита. В исследованиях Kalliomaki и соавт. [24] было показано, что использование пробиотиков (*L. rhamnosus*) у детей с рождения на протяжении первых 6 месяцев жизни на 50% снижает частоту развития атопии у этих детей.

Полученные теоретические и клинические данные позволяют говорить об эффективности и необходимости использования пробиотиков в питании детей, лишенных материнского молока с рождения [25]. Безопасность пробиотиков оценивается для каждого конкретного штамма и вида пробиотиков.

В настоящее время получены данные о безопасности использования в детском питании ряда пробиотиков, к которым относятся *B. lactis*, *B. longum*, *L. rhamnosus* и некоторые другие. Однако единственным пробиотиком, получившем в FDA (США) статус GRAS (безусловно безопасный) и разрешенным в питании детей с рождения, является *B. lactis*.

Утверждение о безопасности *B. lactis* базируется на всестороннем исследовании ее свойств. К настоящему времени выделен и хорошо изучен геном *B. lactis*, в котором отсутствуют неблагоприятные метаболические характеристики и потенциал вирулентности.

*B. lactis* (Bb12) не оказывает никакого негативного влияния на пристеночный слой слизи, сохраняя высокую способность к адгезии. Имеются многочисленные и хорошо документированные исследования, подтверждающие благоприятное влияние *B. lactis* на состояние кишечного барьера и иммунитет. Накоплена серьезная база

научных данных, подтверждающих благоприятные свойства и безопасность *B. lactis* при использовании в питании младенцев, включая недоношенных детей.

В последние 15 лет ДМС с *B. lactis* широко используется в питании грудных детей более чем в 30 странах, и не обнаружено ни одного побочного эффекта при ее использовании. Сотни тысяч тонн продуктов, содержащих *B. lactis*, потребляется ежегодно в мире, при этом не задокументировано ни одного случая бактериемии или инфекции, связанных с применением молочных продуктов или

ДМС, обогащенных *B. lactis*. Не зарегистрировано никаких побочных эффектов в ходе более чем 60 клинических испытаний продуктов, содержащих *B. lactis*, включая исследование доношенных и недоношенных новорожденных, а также детей, рожденных от ВИЧ-инфицированных матерей.

Таким образом, использование пробиотиков в ДМС с рождения в случае отсутствия возможности грудного вскармливания поможет формированию здоровой иммунной системы младенца и снижению риска развития хронических воспалительных заболеваний.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Grolund MM, Lehtonen OP, Erkk E et al. Fecal microflora in healthy infants born by different methods of delivery: permanent changes in intestinal flora after Cesarean delivery. JPGN, 1999; 28: 19–25.
2. Nutten S, Schumann A, Donnicola D et al. Antibiotic administration early in life impairs specific humoral responses to an oral antigen and increases intestinal mast cell numbers and mediators concentrations. Clin and Vaccine Immunol, 2007; 2: 190–197.
3. Ismail AS, Hooper LV. Epithelial cells and their neighbors. IV. Bacterial contributions to intestinal epithelial barrier integrity. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2005; 289: 779–784.
4. Bevinc CL. Paneth cells, defensins, and IBD. Proceedings of the Second International symposium on pediatric IBD. JPGN, 2008; 46 (S1): 14–15.
5. Wehkamp J, Salzman N, Porter E et al. Reduced Paneth cells defensins in ileal Crohn's disease. PNAS, 2005; 102: 18129–12134.
6. Schumann A, Nutten S, Donnicola D et al. Neonatal antibiotic treatment alters gastrointestinal tract developmental gene expression and intestinal barrier transcription. Physiol Genomics, 2005; 23: 235–245.
7. Stahl B, Thurl S, Zeng J et al. Oligosaccharides from human milk as revealed by a matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. Anal Biochem, 1994; 223: 218–226.
8. Ruiz-Palacios GM, Cervantes LE, Ramos P et al. Campylobacter jejuni binds intestinal H(O) antigen (Fuc I, 2Gal BI, 4GlcNAc), and fructooligosaccharides of human milk inhibit its binding and infection. J Biol Chem, 2003, 278: 14112–14120.
9. Morrow AL, Ruiz-Palacios GM, Jiang Xi, Newburg DS. Human-milk glyeans that inhibit pathogen binding protect breast-feeding infants against infectious diarrhea. J Nutr, 2005; 135: 1304–1307.
10. Heikkilä MP, Saris PEJ. Inhibition of Staphylococcus aureus by commensal bacteria of human milk. J Applied Microbiol, 2003, 95: 471–478.
11. Martin R, Langa S, Reviriego C et al. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. J Pediatrics, 2003; 143 (6): 754–758.
12. Martin R, Olivares M, Martin M. Probiotic potential of 3 Lactobacilli strains isolated from breast milk. J Hum Lact, 2005; 21 (1): 8–17.
13. Saavedra J. Use of probiotics in pediatrics: rationale, mechanisms of action, and practical application. Nutr Clin Pract, 2007; 22: 351–365.
14. Perez PE, Dore J, Ledere M et al. Bacterial imprinting of the neonatal immune system: lessons from maternal cells? Pediatrics, 2007; 6:e724–e732.
15. O'Mahony L, O'Callaghan L, McCarthy J et al. Differential cytokine response from dendritic cells to commensal and pathogenic bacteria in different lymphoid compartments in human. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2006; 290: G839–G845.
16. Rook GA, Bruner LR. Microbes, immunoregulation, and the gut. Gut, 2005; 54: 317–320.
17. Lamm ME. Interaction of antigens and antibodies at mucosal surfaces. Ann Rev Microbiol, 1997; 51: 311–340.
18. Lamm ME. Current concepts in mucosal immunity. How epithelial transport of IgA antibodies relates to host defense. Am J Physiol, 1998; 274: G614–G617.
19. Lin YP, Versalovic J. Immunoregulation by probiotics. Agro Food Industry hi-tech, 2006; 17(6): 34–37.
20. Mercenier A, Foligne B, Dennini V et al. Selection of candidate probiotic strains protecting against murine acute colitis. ESPGHAN abstracts, 2006: C64.
21. Mohan R, Koebnick C, Schildt J. Effects of Bifidobacterium lactis Bbl2 supplementation on intestinal microbiota of preterm infants: a double-blind, placebo-controlled, randomized study. J Clin Microbiol, 2006; 44 (11): 4025–4031.
22. Stratiki Z, Costalos C, Sevastiadou C et al. The effect of bifidobacter supplemented bovine milk on intestinal permeability of preterm infants. Early Hum Dev, 2007; 83: 575–579.
23. Penders J, Thijs C, van den Brandt PA, et al. Gut microbiota composition and development of atopic manifestations in infancy: the KOALA birth cohort study. Gut, 2007; 56: 661–667.
24. Kalliomaki M, Salminen S, Arvilommi H et al. Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomized placebo-controlled study. Lancet, 2001; 357: 1076–1079.
25. Gueimonde M, Kallimaki M, Isolauri E et al. Probiotic intervention in neonates — will permanent colonization ensue? JPGN, 2006; 42: 604–606.