

ИЗУЧЕНИЕ ПРОЦЕССОВ ФОРМИРОВАНИЯ НОРМАЛЬНОЙ МИКРОФЛОРЫ КИШЕЧНИКА НОВОРОЖДЕННЫХ ДЕТЕЙ В ПЕРИОД ИХ ВНУТРИУТРОБНОГО РАЗВИТИЯ

STUDY OF THE PROCESSES OF FORMATION OF THE NORMAL INTESTINAL MICROFLORA OF NEWBORNS DURING THEIR INTRAUTERINE DEVELOPMENT

**O. Azovskova
E. Fedosov
E. Pankrashov
T. Gustovarova**

Summary. The article presents data on the results of studying the features of the formation of normal microflora during the intrauterine development of the fetus. In children of "zero" age, born in time by caesarean section, representatives of obligate microflora — bifidumbacteria, lactobacilli, E. coli, E. faecalis—were found in the contents of the intestine. The obtained data suggest that the microflora, as a kind of "multicellular organ", is laid down and develops in parallel with the development of the macroorganism as a whole, thereby forming the corresponding "organ" in the biotopes. Further research is needed to study the processes of normal microflora formation, including the issues of biofilm ontogenesis, as well as the factors that influence its formation and the influence of developing microflora on the development of the fetus as a whole.

Keywords: obligate normal microflora, microbiota, microbiome, intrauterine bacterial translocation.

Азовскова Ольга Васильевна

К.м.н., доцент, ФГБОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет»
oazovskova@gmail.com

Федосов Евгений Алексеевич

Д.м.н., профессор, ФГБОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет»
fedosoffevgenij@yandex.ru

Панкрашов Эдгар Вадимович

Аспирант, врач акушер-гинеколог, ФГБОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет»

Ed.pankrashov@gmail.com

Густоварова Татьяна Алексеевна

Д.м.н., профессор, ФГБОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет»
tanya.prof@yandex.ru

Аннотация. В статье приводятся данные о результатах изучения особенностей формирования нормальной микрофлоры в период внутриутробного развития плода. У детей «нулевого» возраста, родившихся в срок методом кесарева сечения в содержимом кишечника, были обнаружены представители облигатной микрофлоры — бифидумбактерии, лактобактерии, E. coli, E. faecalis. Полученные данные позволяют предполагать, что микрофлора, как своего рода «многоклеточный орган», закладывается и развивается параллельно с развитием макроорганизма в целом, формируя тем самым в биотопах соответствующий «орган». Необходимы дальнейшие исследования по изучению процессов формирования нормальной микрофлоры, включая вопросы онтогенеза биопленки, а также факторов, влияющих на ее формирование и влияние развивающейся микрофлоры на развитие плода в целом.

Ключевые слова: облигатная нормальная микрофлора, microbiota, микробиом, внутриутробная бактериальная транслокация.

Интерес к проблеме формирования нормальной микрофлоры организма человека остается приоритетным в различных областях биологии и медицины в целом. До недавнего времени считалось, что формирование микробиоценоза начинается в момент рождения и обусловлено видовым составом микрофлоры родовых путей матери. Однако с конца 80-х годов прошлого века в зарубежной литературе стали появляться работы, демонстрирующие контакт микрофлоры матери с плодом in utero. Открытие отечественными учеными феномена «бактериальной трансло-

кации» еще в большей степени подвергло сомнению убеждение о стерильности желудочно-кишечного тракта плода. В работе И.А. Бочкова была установлена идентичность кишечных штаммов новорожденного и материнской микрофлоры. Эти факты свидетельствуют в пользу того, что внутриутробно развивающийся плод не является стерильным, а получает от матери какое-то количество индигенных микроорганизмов [4]. Возвращаясь к проблеме формирования микрофлоры организма человека и учитывая вышесказанное, было бы некорректным рассматривать этот вопрос

лишь в постнатальном периоде развития новорожденного. Результаты молекулярно-генетических исследований свидетельствуют о том, что процесс формирования кишечной микробиоты начинается внутриутробно и ребенок получает микрофлору матери в течение всей беременности, родов и грудного вскармливания. [11,12, 16].

На сегодняшний день термины «нормальная микрофлора» ассоциированы с понятиями «микробиоценоз», «микробиота» и даже появилось такое понятие как «микробиом». Представление о микробиоценозах различных биотопов макроорганизма расширилось, благодаря появлению возможности генотипического подхода к идентификации многочисленного микробного сообщества и ранее неизученных видов бактерий. Появлению метагеномики — науки, изучающей последовательность фрагментов ДНК смешанных микробных популяций как культивируемых, так и некультивируемых микроорганизмов, обязано понятие — «микробиом». Благодаря многим генетическим исследованиям последних лет стало признанным, что многие предполагаемые стерильные органы — нестерильны (например: легкие, плацента) [9,10,15]. В последние годы появилось понятие «фетальный микробиом». И оно вполне оправдано появлением большого количества литературных данных, основанных на генетических исследованиях мекония новорожденных. [15, 16,19,20]. Однако остается неясным, представляет ли эта ДНК жизнеспособные бактерии и как она связана с материнской микробиотой в разных участках тела. Полученные генетические данные о фетальном микробиоме диктуют необходимость проведения культуральных исследований содержимого кишечника, начиная с «нулевого» возраста новорожденного с целью получения информации в виде идентифицированных чистых культур микробов. Изучение данного вопроса поможет расширить понятия о процессе формирования кишечной микробиоты младенца, о факторах, влияющих на этот процесс, поможет оптимизировать подходы к лечению определенных заболеваний, скоординирует работу врачей разных специальностей в области изучения микробиома и его влияния на здоровье человека.

Цель работы

Изучение качественного и количественного состава микрофлоры кишечника новорожденных «нулевого» возраста, родившихся в родильных домах г. Смоленска.

Материалы и методы

Все обследуемые 13 новорожденных детей родились в срок, с помощью кесарева сечения Исследуемый

материал — содержимое кишечника новорожденного забирали в стерильных условиях сразу после изъятия плода из утробы матери, до прикладывания новорожденного к груди.

Исследуемый материал от обследуемых групп погружали в транспортную среду Стюарта с соблюдением правил асептики и доставляли в микробиологическую лабораторию в течении 1 часа после забора.

Микробиологические исследования для выявления, идентификации вида микроорганизма проводили согласно стандартным методикам, принятых и проводимых в условиях лицензированной лаборатории. Исследуемый материал вносили в питательные среды — бифидум среда и сердечно-мозговой бульон в разведении 1:10 и культивировали в условиях СО-2 инкубатора и строгих анаэробных условиях. Через 1, 3, 5, 7 суток производили высев на питательные среды — сердечно-мозговой агар, селективный кровяной агар для кокков, кровяной агар для анаэробов, агар Эндо, лактоагар, энтерококкагар, агар Сабуро. Идентификацию выросшей культуры проводили с использованием масс-спектрометра (MALDI-TOFF).

Результаты исследования

Всего исследовано 13 новорожденных, родившихся в ходе кесарева сечения. В 7 случаях из 13 в содержимом кишечника новорожденного были обнаружены следующие бактерии: штаммы *Bifidumbacterium*: 10^1 (в 3 случаях) и 10^2 — (в 3-х случаях), 10^3 — (в 1 случае). В 4-х случаях бифидумбактерии были представлены двумя видами. У 3-х новорожденных наряду с бифидумбактериями были обнаружены *E. coli* (10^1 , 10^3), штаммы лактобактерий (10^1 , 10^2). В 2 случаях в кишечнике новорожденного были выявлены *L. jensenii* (10^1) и *Cl. Perfringens* (10^1) в монокультуре, при этом такие же виды бактерий были обнаружены в плаценте матерей. У 2-х новорожденных наряду с вышеперечисленными бактериями в содержимом кишечника присутствовали *E. faecalis* (10^3) и *S.epidermidis* (10^2). Стоит отметить, что рост выявленных бактерий был замедленный и был отмечен лишь на вторые (стафилококк, энтерококк, *E. coli*) и на 4 сутки (бифидумбактерии и лактобактерии) культивирования. В случае, когда бифидумбактерии были обнаружены в монокультуре — визуальный рост бактерий в питательной среде появился лишь на 5 сутки. Необходимо обратить внимание на случаи посева исследуемого материала, не давших визуального роста бактерий. При микроскопии мазков, приготовленных из данных питательных сред накопления, были обнаружены необычные морфотипы культур, что заставляет предположить наличие субклеточных организаций.

Обсуждение

Введение термина «микробиом», обозначающего весь генетический материал содержащийся, например, в микробиоте кишечника человека, послужило основанием рассматривать совокупность всех микроорганизмов в качестве «надорганизма». Вопрос симбиотического взаимодействия «надорганизма» и общим функционированием организма остается открытым и на сегодняшний день, а в связи с ускорением результатов исследования в этой области, углубилось и расширилось понимание этого вопроса. Теория «стерильного» эмбриона перестает быть общепризнанной, а внутриутробная микробная «инвазия», по современным данным, выглядит как составляющая часть периодов формирования плода. — в последние годы появились сообщения об обнаружении бактерий в образцах плаценты и оболочек в отсутствие гистологической инфекции [13, 20, 21, 22, 23].

Появление ДНК бактерий в формирующейся плаценте вероятно предсказуемо и целесообразно, хотя бы потому что фетоплацентарная система является соучастником закладки и развития иммунной системы. Многие вопросы внутриутробной колонизации определенными видами бактерий пока еще не выяснены и остаются необъяснимыми. Ответ на вопрос «являются ли жизнеспособными ДНК бактерий, выявленные в ходе геномного исследования?» требует проведения культуральных исследований биологического материала, полученного неинвазивными способами. В нашей работе были получены первые результаты, свидетельствующие о том, что ДНК бактерий, обнаруженные в плаценте и содержимом кишечника

новорожденного, являются жизнеспособными. В первую очередь такими бактериями являются представители видов *Actinobacteria* (роды *Bifidobacterium*), род *Clostridium* (*Cl. Perfringens*), *Firmicutes* (роды *Lactobacillus*), *Proteobacteria* (*E. coli*, *Enterobacter* spp., *E. faecalis*, *S. epidermidis*). Это подтверждают литературные данные по геномным исследованиям [4,12,15].

Однако, по данным зарубежных исследователей ДНК жизнеспособных бактерий были обнаружены только у плодов ранних сроков беременности (до 24 недели беременности), объяснив это тем, что на более поздних этапах беременности созревание иммунной системы противодействует сохранению микроорганизмов в плаценте. В нашем исследовании материал был предоставлен от доношенных детей и в 53% случаев обнаружены жизнеспособные бактерии. Привлекает внимание, что жизнеспособные бактерии имели удлиненные фазы цикла размножения (медленный, скудный рост в питательной среде) — репликативные, но со сниженной активностью. Предположительно, заселение «ранней», «врожденной» микрофлоры с данными свойствами — это необходимость для создания своеобразного «союза» между иммунной системой матери и плода на период его созревания и установления взаимосвязей между формирующимися тканями (в конкретном случае — кишечнике) и микробиотой. Понимание данного вопроса требует дальнейшего изучения проблемы, поскольку многие патологические процессы, развивающиеся в организме, могут быть тесно связаны с формирующейся микробиотой различных биотопов организма (атопические болезни, болезнь Крона, рак).

ЛИТЕРАТУРА

1. Беляева И.А., Бомбардинова Е.П., Турти Т.В., и др. Кишечная микробиота у недоношенных детей: современное состояние проблемы (обзор литературы) // Педиатрическая фармакология. — 2015. — Т. 12. — № 3 — С. 296–303.
2. Беляева И.А., Бомбардинова Е.П., Митиш М.Д., Потехина Т.В., Харитоновна Н.А. Онтогенез и дизонтогенез микробиоты кишечника у детей раннего возраста: триггерный механизм нарушений детского здоровья // Вопросы современной педиатрии — 2017 — № 16 — № 1 с. 29–38
3. Бондаренко В.М. Механизмы транслокации бактериальной аутофлоры в развитии эндогенной инфекции // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН (электронный журнал) — 2013 — № 3 — с. 1–20
4. Бочков И.А., Юрко Л.П., Юдицкая Н.М. Состояние микрофлоры толстой кишки у детей раннего возраста (по материалам амбулаторных исследований) // Инфекционные болезни. — 2004 — Т. 2 — № 3 — с. 83–85
5. Булатова В.М. Богданов Н.М., Лобанов Е.А. Габруская Т.В. Кишечная микробиота: современные представления // Педиатрия — 2009 — Т. 87 — № 3 — с. 104–109
6. Григорьев П.Я., Коровина В.И., Жуховицкий В.Г. и др. Изменение родового состава кишечной микрофлоры и степени обсемененности кишечника: бактериологическая характеристика, клиническое значение, вопросы терапии // Практикующий врач. 1999–16 — № 3 — с. 14–19.
7. Самсыгина Г.А., Савельева Г.М., Конопляников А.Г. и др. Характеристика иммунного ответа плода в перинатальном периоде жизни в норме и патологии. Матер. Конгресса "Современные технологии в педиатрии и детской хирургии". М., 2002.
8. Мазанкова Л.Н., Рыбальченко О.В., Николаева И.В. Микродисбиоз и эндогенные инфекции: руководство для врачей. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2018:336.
9. Николаева И.В., Царегородцев А.Д., Шайхиева Г.С. Формирование кишечной микробиоты ребенка и факторы, влияющие на этот — процесс. // Российский вестник перинатологии и педиатрии — 2018–63–№ 3 с. 13–18.

10. Николаева И.В., Анохин В.А., Купчихина Л.А. Формирование кишечной микрофлоры у детей, рожденных естественным и оперативным путем. //Казанский медицинский журнал — 2009- Т. 6 — № 90 — с. 852–856.
11. Точилина А.Г., Белова И.В., Соловьева И.В., Жирнов В.А., Иванова Т.П., Мартюхина О.К., Чикина Н.А. Формирование микрофлоры кишечника ребенка в онтогенезе и профилактика развития дисбиозов с помощью авторских пробиотиков группы «Ib-комплекс» // Современные проблемы науки и образования. — 2016. — № 5.с.
12. Aagaard K., Ma J., Antony K.M., Ganu R., Petrosino J., Versalovic J. The placenta harbors a unique microbiome. //Sci Transl Med. — 2014-№ 6 — p. 237–65.
13. Bezirtzoglou E., Tsiotsias A., Welling G.W. Microbiota profile in feces of breast- and formula-fed newborns by using fluorescence in situ hybridization (FISH). // Anaerobe. — 2011 — Т. 17 — № 6 — p.478–482.
14. Eckburg P.B., Bik E.M., Bernstein C.N., Purdom E., Dethlefsen L., Sargent M. et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. //Science — 2005–308 (5728) — p. 1635–1638.
15. Fujimura K.E., Sitarik A.R., Havstad S., et al. Neonatal gut microbiota associates with childhood multisensitized atopy and T cell differentiation. //Nat Med.— 2016–22 — № 10 — p. 1187–1191.
16. Fortner K.B., Grotegut C.A., Ransom C.E., et al. Bacteria localization and chorion thinning among preterm premature rupture of membranes // Issue PLoS One — 2014 — Volume 9 — № 1 — p.1–10
17. Penders J., Vink C., Driessen C., et al. Quantification of Bifidobacterium spp., Escherichia coli and Clostridium difficile in faecal samples of breast-fed and formula-fed infants by real-time PCR. //FEMS Microbiol Lett. — 2005 — № 243(1) p.141–147.
18. Noelle Younge, Jessica R. McCann, Julie Ballard, Catherine Plunkett, Suhail Akhtar, Félix Araújo-Pérez, Amy Murtha, Debra Brandon, and Patrick C. Seed Fetal exposure to the maternal microbiota in humans and mice // JCI Insight. — 2019–4 — № 19 — p.
19. Gensollen T., Iyer S.S., Kasper D.L., Blumberg R.S. How colonization by microbiota in early life shapes the immune system. //Science.— 2016–352 — (6285) — p.539–544.
20. Martín V., et al. Sharing of bacterial strains between breast milk and infant feces. //J. Hum Lact.— 2012 — V 28 — № 1 -. p36–44
21. Munyaka P.M., Khafipour E., Ghia J. External Influence of Early Childhood Establishment of Gut Microbiota and Subsequent Health Implications. Front Pediatr — 2014 — № 2 — p.109–117.
22. Qin J., Li R., Raes J., Arumugam M., Burgdorf K.S., Manichanh C. et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. MetaHIT Consortium. Nature 2010–464 — (7285) — p. 59–65.
23. Stout M.J., Conlon B., Landeau M., et al. Identification of intracellular bacteria in the basal plate of the human placenta in term and preterm gestations. Am J Obstet Gynecol. 2013–208(3):221–227.
24. Cleofina B. Bosco*, Eugenia G. Díaz Placentophagy: a controversial trend //International Journal of Research in Medical Sciences — 2018 — V 6 — № 6 — p.1841–1846
25. Anna Kornete, Natalija Vedmedovska, Solvita Blazuka Correlation between placental pathology and neonatal morbidity: a case-control study // International Journal Of Reproduction, Contraception, Obstetrics And Gynecology — 2017 — V 6 — № 7 — p. 599–605

© Азовскова Ольга Васильевна (oazovskova@gmail.com), Федосов Евгений Алексеевич (fedosoffevgenij@yandex.ru),
 Панкрашов Эдгар Вадимович (Ed.pankrashov@gmail.com), Густоварова Татьяна Алексеевна (tanya.prof@yandex.ru).
 Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»