

## **РОЛЬ ПРЕБИОТИКОВ В СОСТОЯНИИ КИШЕЧНОЙ МИКРОБИОТЫ ГРУДНЫХ ДЕТЕЙ**

ГОУ ВПО «Санкт-Петербургский педиатрический университет Росздрава», Санкт-Петербург;  
ГОУ ВПО «Российский государственный медицинский университет Росздрава», Москва

Гипотеза о важной роли кишечной микробиоты (КМ) в развитии и становлении всех функций желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) и активации иммунной системы появилась еще в начале 60-х годов, в период проведения экспериментальных исследований с гнотобиологическими новорожденными животными (выращенными в стерильных условиях, исключающих возможность колонизации микрофлорой). Эти исследования впервые показали, что при отсутствии нормальной КМ у животных снижаются высота ворсинок и глубина крипт в кишечнике, моторика ЖКТ и продукция пептидов, а также уменьшается число пейеровых бляшек, практичес-

ки в 10 раз уменьшается число IgA-продуцирующих В-клеток, снижается уровень специфических антител и становится более сильным ответ на воспалительные процессы в организме [1, 2]. Кроме того, у гнотобиологических мышей нарушаются процессы формирования пищевой толерантности и имеются отчетливые нарушения в структуре крипт, количестве внутриэпителиальных лимфоцитов [3, 4]. После возвращения к нормальным условиям жизни и поступлению кишечной флоры в организм восстанавливалось состояние иммунной системы.

К настоящему времени стало очевидным, что именно КМ является важнейшим стимулом для

развития кишечника и активации как врожденного, так и формирования приобретенного иммунитета. КМ участвует в процессах ангиогенеза, ключевым клеточным компонентом которого являются клетки Панета, появляющиеся в кишечнике одновременно с его микробной колонизацией и координирующие развитие микробиоценоза и ангиогенеза [5, 6]. Также КМ необходима для развития связанной с кишечником лимфоидной ткани (GALT), которая, в свою очередь, осуществляет разнообразные функции, в том числе поддержание иммунных реакций, развитие пищевой переносимости.

Исследования Bjorksten и соавт. [7] и Kalliomaki и соавт. [8] выявили различия в количестве и характере бифидофлоры (БФ) у младенцев с признаками атопии и здоровых. Заселение кишечника новорожденного ребенка бактериями является первым стимулом активации специфических и неспецифических защитных механизмов слизистой оболочки кишечника. Характер вскармливания младенца существенным образом влияет на состав КМ. В многочисленных исследованиях продемонстрировано снижение количества БФ у детей, получающих стандартные молочные смеси, по сравнению с детьми, получающими материнское молоко [9, 10]. Поэтому большой интерес могут представлять исследования роли питания в развитии КМ у грудных детей и поиск путей, улучшающих состояние КМ.

Целью данного исследования явилось изучение состава КМ у детей первых месяцев жизни, получающих грудное молоко или новые смеси с пребиотиками, а также оценка видоспецифичности бифидобактерий (ББ) у детей на разных видах вскармливания.

Были поставлены следующие задачи:

- 1) оценить индивидуальную переносимость смеси «Нестожен 1» детьми первого полугодия жизни;
- 2) изучить динамику нутритивного статуса, психомоторного развития детей при вскармливании смесью «Нестожен 1»;
- 3) исследовать бактериологические показатели кишечного микробиоценоза до и на фоне приема смеси «Нестожен 1»;
- 4) провести сравнительную оценку показателей микробиоценоза у детей, находящихся на грудном вскармливании (ГВ) и на искусственном вскармливании (ИВ) смесью «Нестожен 1»;
- 5) провести сравнительный анализ распространенности различных видов бифидобактерий у детей, вскармливаемых смесью «Нестожен 1» и женским молоком;
- 6) определить, имеют ли место видоспецифические различия ББ в кишечном микробиоценозе у детей с функциональными нарушениями пищеварения (ФНП) и без таковых, находящихся на ИВ;
- 7) сопоставить параметры видоспецифичности ББ у детей, находящихся на ИВ и на ГВ.

Использовали следующие методы исследования:

- 1) оценка психомоторного развития до, на фоне и

после получения смеси. Измерение массы тела, роста, окружности груди и головы 1 раз в неделю и их оценка методом центильных таблиц;

- 2) оценка переносимости продукта (оценка аппетита, функциональных изменений со стороны ЖКТ);

- 3) лабораторные методы исследования:

- a) оценка состояния микрофлоры кишечника до и после получения продукта;

- b) копрологическое исследование до и после получения продукта;

- v) типирование ББ с помощью полимеразно-цепной реакции (ПЦР) до и после получения продукта. При проведении ПЦР выделение ДНК из кала осуществляли с использованием комплекта «ДНК-сорб-В-50». Реакцию амплификации проводили на аппарате «Perkin Elmers» (США) при помощи наборов для ПЦР (СибЭнзим, Россия; Boehringer Mannheim, Германия);

- г) клинический анализ крови до и после получения продукта;

- д) общий анализ мочи до и после получения продукта.

В наблюдении принимали участие 20 детей первого полугодия жизни, находящиеся на ИВ (доношенные, имеющие не менее 6 баллов по шкале Апгар при рождении, без проявлений аллергодерматита, не получающие антибиотикотерапию, пре- и пробиотикотерапию в анамнезе, с минимальными или отсутствием жалоб со стороны ЖКТ) (1-я группа). Контрольную группу составили 20 детей аналогичного возраста, получающих грудное материнское молоко (2-я группа).

У всех детей, получающих смесь «Нестожен 1», отмечались хорошая переносимость продукта, хороший аппетит, положительный эмоциональный тонус, увеличилась длительность ночного сна. Антропометрические данные детей обеих групп не имели достоверных отличий. Отмечена положительная динамика в отношении ФНП в виде достоверного снижения частоты срыгиваний, колик, метеоризма на фоне приема смеси «Нестожен 1» (рис. 1).

Частота встречаемости и динамика симптомов ФНП у детей на фоне вскармливания смесью «Нестожен 1» представлена в табл. 1. Достоверно увеличилась частота стула у детей.

При базовом исследовании все дети имели различные степени проявления дисбактериоза кишечника. В конце исследования у 2 детей состояние микробиоценоза пришло в норму. До введения в рацион смеси «Нестожен 1» у 12 (60%) из 20 детей титр БФ оценивался как высокий ( $10^{10}$ – $10^{11}$ ), у 6 (30%) – как низкий ( $10^9$ – $10^7$ ) и у 2 (10%) – как экстремально низкий ( $10^6$ – $10^5$ ). В динамике доля детей, имеющих высокий титр БФ, возросла и составила 70% (14 человек). Нарастание титра БФ было выявлено в 7 случаях (35%). Следует отметить, что дети, у которых отсутствовала положительная динамика со стороны БФ, изначально имели высокий титр данных микроорганизмов ( $10^{10}$ – $10^{11}$ ).

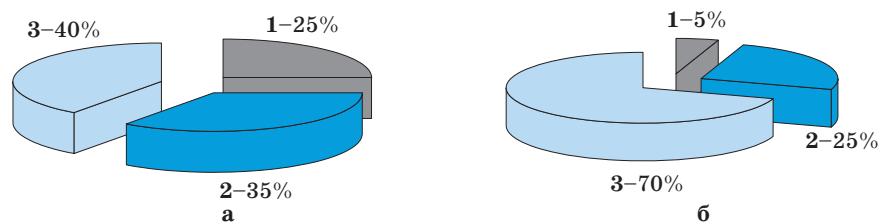


Рис. 1. Срыгивания до (а) и на фоне (б) вскармливания смесью «Нестожен 1». 1 – ежедневные срыгивания на 1 балл, 2 – редкие срыгивания на 1 балл, 3 – отсутствие срыгиваний.

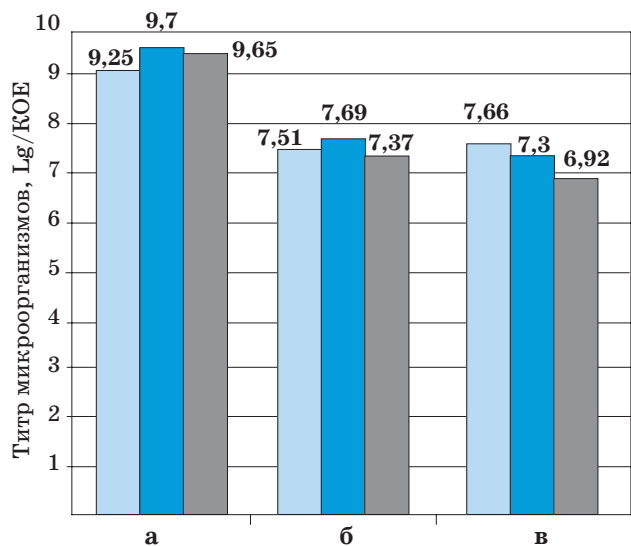


Рис. 2. Динамика бактериологических показателей на фоне вскармливания смесью «Нестожен 1». а – ББ, б – лактобактерии, в – *E. coli* с нормальными свойствами; здесь и на рис. 3: 1-й столбик – до приема смеси «Нестожен 1», 2-й столбик – на фоне приема смеси «Нестожен 1», 3-й столбик – исключительно ГВ.

На фоне вскармливания смесью «Нестожен 1» показатели среднего уровня облигатной микрофлоры были близкими к аналогичным показателям детей на ГВ (рис. 2).

На фоне использования смеси «Нестожен 1» нами выявлены изменения в качественном и количественном составе условно-патогенных микроорганизмов (УПМ). Это проявлялось в виде снижения титра лактозонегативных *E. coli* в 66,6% случаев (у 6 из 9 детей), *Klebsiella* – в 44,4% (у 4 из 9

детей), *St. aureus* – в 64,3% (у 9 из 14 детей), *Candida* – в 46% (у 6 из 13 детей). Частота высевов УПМ в ассоциациях снизилась на 15% и составила 5% (до приема смеси – 20%).

Однако были обнаружены некоторые отличия по частоте распространения УПМ у детей при различных видах вскармливания. У детей на ГВ реже выделялась *Candida*, не выявлено ассоциаций микроорганизмов. Следует отметить, что на фоне приема смеси «Нестожен 1» частота выявления *Candida* сократилась на 20% и показатели среднего титра *Candida* уменьшились с  $10^{4,51}$  до  $10^{4,19}$ . Динамика частоты выявления УПМ на фоне вскармливания смесью «Нестожен 1» представлена на рис. 3.

В зависимости от наличия или отсутствия ФНП из числа обследованных детей сформированы 2 группы: 1-я группа с ФНП (20 детей) и 2-я группа детей, не имеющих ФНП (17 детей).

Под ФНП понимали следующее: срыгивания (с частотой не более 5 раз в сутки и разовым объемом не более 5 мл); непостоянные и нетяжелые кишечные колики; умеренный метеоризм; склонность к запорам (частота стула 1 раз в сутки).

Исследования видоспецифичности ББ в этих группах показали достоверные отличия по частоте встречаемости двух младенческих видов – *B. longum*, *B. bifidum*, количество которых было достоверно меньше у детей с ФНП (рис. 4).

Также отмечалось снижение частоты выделения младенческих видов ББ в сочетании с сокращением их разнообразия в группе детей, имеющих ФНП (рис. 5, 6).

Нарушения кишечного микробиоценоза и ФНП являются широко распространенной пробле-

Таблица 1

**Частота встречаемости и динамика симптомов ФНП у детей на фоне вскармливания смесью «Нестожен 1»**

Симптомы	До введения продукта	Динамика за период наблюдения		
		положительная	отрицательная	без динамики
Срыгивания (1–2 балла)	12	8*	0	4
Метеоризм	4	2	0	2
Кишечные колики	3	3	0	0
Запор и склонность к запору	3	3	0	0
Общее количество выявленных ФНП	22	16*	0	6

\*  $p < 0,01$  при сравнении показателей до введения продукта.

Таблица 2

**Частота выявления штаммов ББ у детей первого полугодия жизни, находящихся исключительно на ГВ и вскармливании смесью «Нестожен 1»**

Виды выделенных бифидобактерий	Исключительно ГВ (n=17)	ИВ смесью «Нестожен 1» (n=13)
<i>B. bifidum</i>	13 (76,4%)	11 (84,6%)
<i>B. longum</i>	8 (47,1%)	9 (69,2%)
<i>B. infantis</i>	9 (52,9%)	8 (61,5%)
<i>B. adolescentis</i>	7 (41,7%)	8 (61,5%)
<i>B. dentium</i>	7 (41,7%)	5 (38,5%)

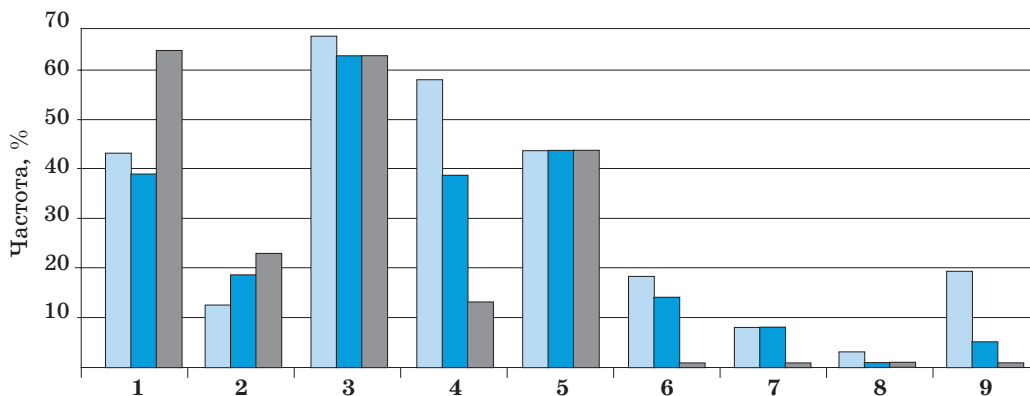


Рис. 3. Динамика частоты выявления УПМ на фоне вскармливания смесью «Нестожен 1». 1 – лактонегативные *E. coli*, 2 – гемолизирующие *E. coli*, 3 – *St. aureus*, 4 – *Candida*, 5 – *Klebsiella*, 6 – *Enterobacter*, 7 – *Proteus*, 8 – *Citrobacter*, 9 – ассоциации УПМ.

мой для детей первого года жизни. ФНП представляют собой комбинацию различных симптомов, наблюдаемых у детей первого года жизни, которые не связаны с биохимическими или структурными нарушениями со стороны ЖКТ. Наличие симптомов ФНП не сопровождается нарушением роста и развития детей и наблюдается, по данным разных авторов, у 80–90% детей первых 6 месяцев жизни. Этиология ФНП связана с недостаточной зрелостью ЖКТ, нарушением моторики и координации, возможно, нарушением колонизации кишечника. Известно, что симптомы ФНП характерны для детей грудного возраста и постепенно исчезают без всяких последствий. В то же время нарушения микробной колонизации кишечника являются фактором, предрасполагающим к развитию аллергических состояний, ожирению, нарушениям нормального развития иммунной системы. Есть немногочисленные данные о влиянии состава КМ на развитие ФНП у младенцев.

В наших наблюдениях у 50% детей отмечались те или иные симптомы ФНП: частые или редкие срыгивания, метеоризм, колики, запоры. В группе детей, получавших смесь «Нестожен 1», наблюдалось достоверное снижение частоты симптомов ФНП. Благоприятное действие продукта связано с преобладанием сывороточных белков, снижением общего уровня белка и включением в состав продукта пребиотиков (ГОС и ФОС) с доказанным благоприятным действием на пищеварение младенцев [11, 12].

Важным свойством ФОС и ГОС является их способность стимулировать рост БФ и лактобацилл [13]. В последние годы появился ряд рандомизированных плацебо-контролируемых исследований, позволяющих подтвердить бифидогенное действие пребиотиков. Так, в работе O. Brunser и соавт. [14] показано, что включение в рацион де-

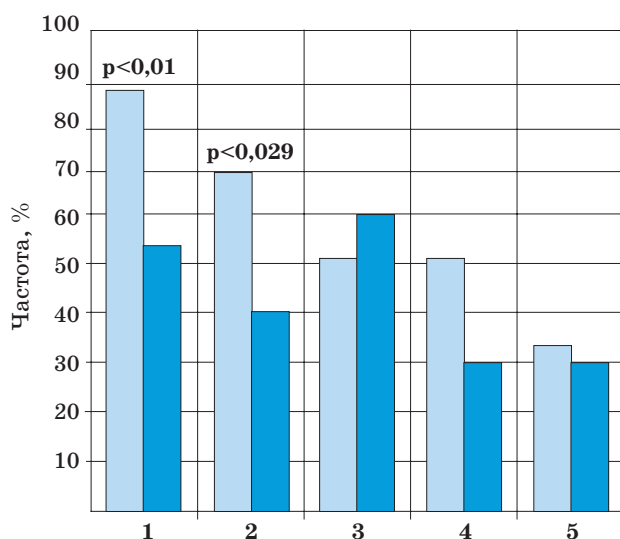


Рис. 4. Видоспецифичность ББ у детей первого полугодия жизни в зависимости от функционального состояния пищеварения.

1 – *B. bifidum*, 2 – *B. longum*, 3 – *B. infantis*, 4 – *B. adolescentis*, 5 – *B. dentium*; здесь и на рис. 5 и 6: 1-й столбик – дети без ФНП, 2-й столбик – дети с ФНП.

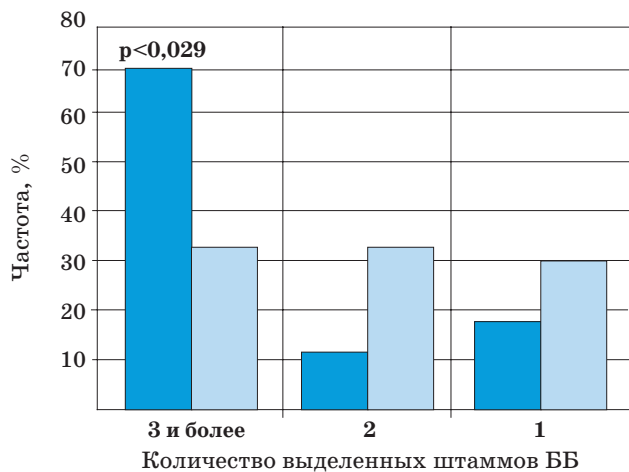


Рис. 5. Число видов ББ у детей первого полугодия жизни в зависимости от функционального состояния пищеварения.

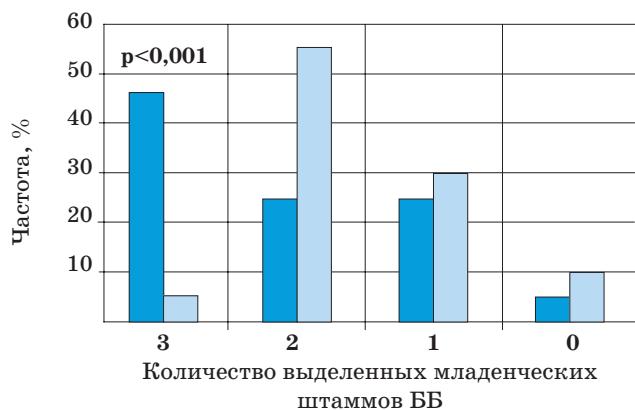


Рис. 6. Количество видов младенческих форм ББ у детей первого полугодия жизни в зависимости от функционального состояния пищеварения.

тей, перенесших антибиотикотерапию, молочной смеси с пребиотиками (Нестожен 1) позволило достоверно увеличить уровень БФ в стуле после его снижения вследствие антибиотикотерапии.

Интересные данные получились при изучении специфичности видов ББ у детей на ГВ и вскармливании смесью «Нестожен 1» (табл. 2).

Как видно из табл. 2, у детей обеих групп отмечено преобладание младенческих видов ББ: *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. longum*, хотя имеют место и другие виды ББ. Достоверных различий между группами не выявлено.

Изучение специфичности видов ББ у детей показало достоверное снижение количества *B. longum* и *B. bifidum* у детей с ФНП по сравнению с группой абсолютно здоровых детей. Помимо этого, выявлена меньшая разнообразность младенческих штаммов ББ, благоприятные свойства которых хорошо известны. Так, в клинических исследованиях было показано, что включение *B. longum* в рацион улучшает расщепление лактозы и снижает симптоматику лактазной недостаточности [15]. Экспериментальные исследования показали, что *B. longum* способствует развитию пищевой толерантности у детей благодаря выбросу регулирующих цитокинов (ИЛ10, TGF $\beta$ ) и снижению выброса провоспалительных цитокинов [16].

Разнообразие КМ является важным фактором в стабильности интестинальной экосистемы. Доказано, что недостаточность микробного разнообразия в кишечнике недоношенных младенцев предрасполагает к нарушению колонизации, увеличивает риск развития воспалительных процессов и появления штаммов, устойчивых к антибиотикам [17].

Проведенное нами исследование позволило подтвердить благоприятное действие смеси «Нестожен 1» с пребиотиками на кишечный микробиоценоз, что позволяет рекомендовать этот продукт как здоровым детям, так и при наличии ФНП. Нами было также установлено различие видов ББ в кишечнике у детей с ФНП и здоровых. Эти данные позволяют более полно оценить роль видового состава КМ в развитии ФНП у детей.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Berg RD, Savage DC. Immune responses of specific pathogen-free and gnotobiotic mice to antigens in indigenous and non-indigenous microorganism. *Infect Immun*, 1975; 11: 320–329.
2. Cebra J. Influences of microbiota on intestinal immune system development. *A.J.C.N.* 1999; 69: 1046–1051.
3. Hooper LV, Gordon JL. Commensal host-bacterial relationship in the gut. *Science*, 2001; 292: 1115–1118.
4. Murch SH. Oral tolerance and gut maturation. In: *Allergic disease and environment*. Eds. E. Isolauri, W. Alan Walker. NNW Series, 2003; 53: 133–152.
5. Ouwehand A, Isolauri E, Salminen S. The role of intestinal flora for the development of the immune system in early childhood. *Eur. J. Nutr.*, 2002 (Suppl); 1: 32–37.
6. Stappenbeck TS, Hooper LV, Gordon JI. Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. *PNAS*, 2002; 99: 15451–15455.
7. Bjorksten B, Sepp E, Julge K, et al. Allergy development and intestinal microflora during the first year of life. *J Allergy Clin Immunol*, 2001; 108: 516–520.
8. Kalliomaki M, Kirjanainen N, Eerola E, et al. Distinct patterns of neonatal gut microflora in infants in whom atopy was and was not developing. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2001; 107: 129–134.
9. Adlerberth I. Establishment of a normal intestinal

microflora in the newborn infant. In: *Probiotics, other nutritional factors and intestinal microflora*. Eds. L. Hanson, R. Yolken. NNW series, 1999; 42: 69–78.

10. Bettleheim KA, Lenox-King SM. The acquisition of *Escherichia coli* by newborn infants. *Infection*, 1976; 4: 174–179.

11. Billeaud C, Guillet J, Sandler B. Gastric emptying in infants with or without gastroesophageal reflux according to the type of milk. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 1990; 44: 577–583.

12. Zunin P. Clinical trial of Nan low phosphate: pH level and bacterial count. *Clinical trial reports*. Nestec, 1991: 17–19.

13. Schneeman BO. Fiber, inulin and oligofructose: similarities and differences. *J. Nutr.*, 1999; 129: 1424–1427.

14. Brunser O, Gotteland M, Cruchet S, et al. Effect of a milk formula with prebiotics on the intestinal microbiota of infants after an antibiotic treatment. *Ped. Res*, 2006; 59 (3): 451–456.

15. Jiang T, Mustapha A, Savaiano D. Improvement of lactose digestion in humans by ingestion of unfermented milk containing *B. longum*. *J. Dairy Sci.*, 1996; 79: 750–757.

16. Mercenier A, Foligne B, Dennini V, et al. Selection of candidate probiotic strains protecting against murine acute colitis. *ESPGHAN*, 2006; Abstracts 48.

17. Neu J, Douglas-Escobar M, Lopez M. Microbes and developing gastrointestinal tract. *Nutrition in clinical practice*, 2007; 22: 174–182.