

---

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

---

© Ю.Ю.ФИЛИПОВА, А.Л.БУРМИСТРОВА, 2017

Ю.Ю.Филиппова, А.Л.Бурмистрова

### КОГНИТИВНАЯ ОСЬ СТАРОСТИ: ВОСПАЛЕНИЕ — МИКРОБИОТА ТОНКОГО КИШЕЧНИКА

Челябинский государственный университет

**Цель.** Выявить взаимосвязь когнитивной дисфункции у людей пожилого возраста с системным воспалительным профилем и структурой микробиоты тонкого кишечника. **Материалы и методы.** В исследование были включены 42 человека пожилого возраста. По результатам оценки психического статуса все обследованные были разделены на 2 группы: 20 человек с умеренными когнитивными расстройствами — группа «активное долголетие» и 22 человека, с выраженной когнитивной недостаточностью — группа «милосердие». У всех лиц пожилого возраста определяли системный воспалительный статус и структуру и количественный состав микробиоты тонкого кишечника с помощью метода газовой хроматографии масс-спектрометрии микробных маркеров. **Результаты.** Определена взаимосвязь между системным уровнем цитокинов и структурой микробиоты тонкого кишечника у людей пожилого возраста с разным когнитивным статусом. Впервые обнаружены значимые корреляции между концентрацией провоспалительного цитокина интерлейкина-6 в плазме крови, количеством микроорганизмов *Propionibacterium jensenii*, *Moraxella* spp., *Bacillus cereus* и *Fusobacterium* spp. в тонком кишечнике и степенью выраженности когнитивной несостоятельности у лиц пожилого возраста. **Заключение.** Полученные показатели могут быть использованы в качестве предиктивных биомаркеров когнитивной дисфункции у пожилых людей.

Журн. микробиол., 2017, № 5, С. 3—9

Ключевые слова: цитокины, микробиота тонкого кишечника, пожилые люди, когнитивная несостоятельность

*Yu. Yu. Filippova, A. L. Burmistrova*

### COGNITIVE AXIS OF AGING: INFLAMMATION — MICROBIOTA OF SMALL INTESTINE

Chelyabinsk State University, Russia

**Aim.** Detect connection between cognitive dysfunction in senior people with systemic infection profile and small intestine microbiota structure. **Materials and methods.** 42 senior individuals were included into the study. All the examined have been divided into 2 groups based on the results of psychic status: 20 individuals with moderate cognitive disorders — «active longevity» group and 22 individuals with pronounced cognitive deficiency — «mercy» group. Systemic inflammation status and structure and quantitative composition of microbiota of small intestine was determined in all the senior individuals using gas chromatography mass-spectrometry of microbial markers. **Results.** Interconnection between systemic level of cytokines and microbiota structure of small intestine in senior people with various cognitive status was determined. Significant correlations between levels of pro-inflammatory cytokine IL-6 in blood plasma and quantity of *Propionibacterium jensenii*, *Moraxella* spp., *Bacillus cereus* and *Fusobacterium* spp. in small intestine and the degree of cognitive failure were detected for the first time. **Conclusion.** The parameters obtained could be used as predictive biomarkers of cognitive dysfunction in senior people.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 5, P. 3—9

## ВВЕДЕНИЕ

Старение — это естественный мультифакторный феномен, характеризующийся накоплением дегенеративных процессов, которые, в свою очередь, поддерживаются многочисленными изменениями или повреждениями молекулярных механизмов клеточных функций [13]. Одним из наиболее известных эффектов старения является нарушение регуляции функций иммунной системы в результате дефектов в инициации и завершении иммунных реакций — иммунное старение. Иммунное старение сопровождается низкоградированным хроническим провоспалительным состоянием во многих тканях, характеризующимся повышенной продукцией провоспалительных цитокинов, таких как IL-6 и TNF- $\alpha$ , острофазовых белков, активных форм кислорода и аутоантител. Это провоспалительное состояние является весьма существенным фактором риска развития патофизиологических процессов и смертности среди пожилых людей, так как большинство, если не все, возраст-ассоциированные заболевания, включая нейродегенеративные (болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, рассеянный склероз и деменция), имеют воспалительный патогенез [Franceschi C. et al., 2014]. В настоящее время «провоспалительный профиль старости» все чаще связывают с изменением композиции кишечной микробиоты при старении [Kim K.A. et al., 2016]. Выдвинута концепция и растет количество доказательств, что микробиота кишечника, иммунная, эндокринная, автономная нервная и кишечная нервная системы, образуя взаимозависимые сетевые системы, формируют ось «микробиота-кишечник-мозг» [4]. Несмотря на значительное количество работ, посвященных изучению функциональных изменений оси «микробиота-кишечник-мозг» в течение жизни, а именно при решении таких вопросов, как здоровье/болезнь/старение организма, развитие когнитивных нарушений и возраст-ассоциированных заболеваний, большинство исследований сосредоточено на изучении фекальной микробиоты толстого кишечника. В то же время, в последние 10 лет представлен ряд доказательств о фундаментальной роли тонкого кишечника (ТК) и его эндогенной микробиоты в физиологии человека: 1) в метаболическом статусе — в ТК происходят основные события переваривания и абсорбции питательных веществ, которые обеспечивают приблизительно 90% общей энергии, получаемой из пищи; 2) в иммунном гомеостазе — большая масса лимфоидной ткани (кишечно-ассоциированная лимфоидная ткань и Пейеровы бляшки), представленной в подвздошной кишке, гарантирует кофункционирование микробиоты и иммунной системы хозяина в мутуалистическом режиме [5].

Как обсуждается в последние годы, кишечная микробиота способна влиять практически на все функции организма, в том числе, выступать в качестве модулятора пластичности мозга, его когнитивных функций и в целом поведения персоны в ходе старения [9]. Вопрос о том, влияет ли хроническое воспаление на изменение структуры микробиоты или изменения композиции кишечной микробиоты при старении и развитии возраст-ассоциированных заболеваний приводят к «провоспалительному профилю старости», остается открытым. В данной работе мы оценили взаимосвязь между системным воспалительным профилем и структурой микробиоты тонкого кишечника у пожилых людей с разным ментальным статусом.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 42 человека пожилого возраста, проживающих в Челябинском геронтологическом центре. Средний возраст обследованных составил  $79 \pm 5$  лет. Всем пожилым людям врачами-клиницистами центра был проведен мониторинг когнитивных нарушений с использованием шкалы «Mini Mental State Examination» и классификации стадий дисциркуляторной энцефалопатии Н.Н. Яхно и др. (2003). По результатам оценки психического статуса все обследованные были разделены на две группы: 20 человек с умеренными когнитивными расстройствами — группа «активное долголетие» (А/Д) и 22 человека с выраженной когнитивной недостаточностью, проявляющейся, в основном, сосудистой деменцией — группа «милосердие» (М). Пожилые люди обеих групп имели одинаковые возраст-ассоциированные заболевания: кардиоваскулярные, бронхолегочные, заболевания желудочно-кишечного тракта и опорно-двигательного аппарата. При этом из исследованных были исключены индивидуумы с ожирением, онкологическими заболеваниями, болезнью Паркинсона и Альцгеймера, врожденными нарушениями центральной нервной системы.

Группу сравнения составили случайным образом отобранные 19 штатных доноров крови Челябинской областной станции переливания крови — группа «доноры» (Д). Средний возраст —  $39 \pm 4$  года. Исследование было одобрено этическим комитетом Челябинского государственного университета (протокол № 1 от 16.05.2016.). Все индивидуумы, которые согласились принять участие в исследовании, подписали форму информированного согласия перед процедурой взятия крови.

Концентрацию цитокинов IL-1 $\beta$ , IL-18, IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$  оценивали в плазме крови методом твердофазного иммуноферментного анализа наборами реагентов ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск).

Для изучения структуры и количественного состава микробиоты тонкого кишечника определяли специфические химические маркеры микроорганизмов (жирные кислоты, альдегиды, спирты и стерины) непосредственно в периферической крови с помощью метода газовой хроматографии масс-спектрометрии микробных маркеров (ГХ-МСММ), который позволяет выявить более 50 родов/видов микроорганизмов [10]. Метод детектирования микроорганизмов по маркерным жирным кислотам сходен с генетическим анализом, поскольку состав жирных кислот детерминирован в ДНК. Это обстоятельство определяет возможность родового или видового анализа инфекций и дисбиозов на преобладающем фоне биологической жидкости непосредственно в клиническом материале [8]. Приготовление образцов и подсчет результатов проводили, как описано в [10]. Сорок микролитров крови высушивали при добавлении равного по объему количества метанола и подвергали кислую метанолизу в 1М HCl в метаноле в течение 1 часа при 80°C. На этой стадии происходило освобождение жирных кислот и альдегидов из сложных липидов микроорганизмов и других клеток и жидкостей в виде метиловых эфиров и диметилацеталей. Эти компоненты двукратно экстрагировали 200 мкл гексана, высушивали и обрабатывали в течение 15 мин при 80°C 20 мкл N,O-бис (триметилсилил)-трифторацетамидом для получения триметилсилильных эфиров окси-кислот и стиролов. Полученную смесь эфиров вводили в инжектор газового хроматографа Маэстро ГХ 7820 (ООО «Интерлаб», Россия) с масс-селективным детектором Agilent Technologies 5975 (США). Образец был хроматографически разделен на капиллярной колонке HP-5ms Hewlett-Packard. Условия хроматографического разделения: начальная температура

130°C, выдержка при начальной температуре 0,5 мин, нагрев температуры со скоростью 70/мин до 320°C, выдержка при конечной температуре 6 мин. Режим селективных ионов. Газ-носитель гелий, поток 1,2 мл/мин в режиме без деления потока. В результате проведенных исследований получали хроматограммы жирных кислот и других продуктов жизнедеятельности микробных сообществ тонкого кишечника, которые были соотнесены с соответствующим типом и количеством микроорганизмов с помощью программы, разработанной Осиповым Г.А. [10]. В качестве внутреннего стандарта использовали дейтерометиловый эфир тридекановой кислоты. Чувствительность метода составляет  $10^4$  КОЕ/мл.

В ходе статистической обработки данных использовали порядковые статистики и критерии: для оценки центральной тенденции — расчет медиан и 25 — 75 квартилей, для оценки значимости межгрупповых различий — критерий Краскела — Уоллиса с апостериорными парными сравнениями по Ковверу — Инману. Различия считали статистически значимыми при  $p \leq 0,001$ . В качестве разведывательной техники был применен многомерный эксплораторный анализ методом нелинейных главных компонент для количественных показателей по алгоритму CATPCA. Все расчеты выполнены в пакетах SPSS for Windows (v. 15.0., SPSS Inc.).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Для определения системного воспалительного профиля был измерен уровень цитокинов IL-1 $\beta$ , IL-18, IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$  в плазме крови доноров и пожилых людей с наличием/отсутствием когнитивной недостаточности. Результаты показали, что у пожилых людей, вне зависимости от когнитивного статуса, был значимо повышен системный уровень IL-6 и TNF- $\alpha$  по сравнению с аналогичными показателями здоровых доноров. При сравнении лиц пожилого возраста с наличием/отсутствием когнитивной дисфункции обнаружено, что у людей с выраженной когнитивной несостоятельностью (группа М) наблюдается статистически значимое повышение концентрации IL-6 в плазме крови, по сравнению с индивидуумами группы без когнитивных расстройств (группа А/Д). В уровнях остальных цитокинов статистически значимых различий не обнаружено.

Изучение структуры и количественного состава микробиоты тонкого кишечника на основе определения специфических липидных маркеров микроорганизмов в периферической крови показало, что у пожилых людей наблюдается дефицит общего числа изученных микроорганизмов в тонком кишечнике, достигая статистической значимости для группы людей с когнитивной недостаточностью ( $2,3 \times 10^9$  КОЕ/мл:  $2,4 \times 10^9$  КОЕ/мл:  $2,8 \times 10^9$  КОЕ/мл для групп М: А/Д: Д соответственно). Данный дефицит был обусловлен значимым снижением количества микроорганизмов типа Actinobacteria, а также тенденцией к снижению числа бактерий типа Firmicutes. Количество микроорганизмов типа Fusobacteria, наоборот, было статистически значимо повышено у людей группы «милосердие», по сравнению с аналогичным показателем группы «доноров». В тонком кишечнике пожилых людей группы «активное долголетие» также был повышен уровень бактерий типов Bacteroidetes и Proteobacteria по сравнению с результатами здоровых индивидуумов. При сравнении показателей у людей пожилого возраста с разным когнитивным статусом значимые различия наблюдались только в количестве представителей типа Fusobacteria, которое было понижено в группе пожилых людей с выраженной когнитивной дисфункцией.

Для оценки взаимосвязи и интегрального вклада цитокинов плазмы крови и структуры сообщества бактерий тонкого кишечника в различия между группами молодых лиц и пожилых людей с разным когнитивным статусом был использован нелинейный анализ главных компонент по алгоритму САТРСА с наложением на показатели данных о разделении групп в зависимости от возраста (молодые/пожилые) и степени когнитивных расстройств (с наличием/отсутствием когнитивной недостаточности). В результате анализа главных компонент были выделены три паттерна взаимосвязанных показателей (ГК1, ГК2, ГК3), объясняющие в сумме 37,2% общей изменчивости показателей.

В первый паттерн (ГК1), объясняющий 15,9% общей дисперсии, с высокой силой связи ( $>0,5$ ) вошли показатели цитокинов плазмы крови IL-6 и TNF- $\alpha$  и представителей микробиоты тонкого кишечника *Prevotella* spp., *Bifidobacterium* spp., *Eubacterium* spp., *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Fusobacterium* spp. и *Alcaligenes* spp. Показатели, вошедшие в этот паттерн, позволяют разделить обследуемых людей на молодых доноров и лиц пожилого возраста (вне зависимости от когнитивного статуса). При этом показатели *Bifidobacterium* spp. и *Eubacterium* spp. были статистически значимо снижены, а остальные показатели первого паттерна — значимо повышены в группах пожилых людей, по сравнению с данными группы доноров.

Основу второго паттерна (ГК2; 11,2% общей изменчивости показателей) составили показатели цитокинов плазмы IL-1 $\beta$ , IL-18 и IL-10, имеющие высокую силу корреляционных связей между собой (значения показателей  $>0,9$ ) и низкую корреляцию с показателями микробиоты тонкого кишечника.

Третий паттерн взаимосвязанных показателей (ГК3; 10,1% общей дисперсии) позволил разделить пожилых людей в зависимости от когнитивного статуса. В него с высокой положительной нагрузкой вошли показатели IL-6, *Lactobacillus* spp., *Staphylococcus aureus* и *Campylobacter mucosalis*; с высокой отрицательной нагрузкой — *Corynebacterium* spp., *Propionibacterium jensenii* и *Moraxella* spp., а также *B. cereus* и *Fusobacterium* spp. — со средней силой связи. При этом уровень IL-6 был статистически значимо повышен, а количество микроорганизмов *P. jensenii*, *Moraxella* spp., *B. cereus* и *Fusobacterium* spp. значимо снижено у людей с выраженными когнитивными расстройствами (группа М) по сравнению с лицами пожилого возраста без значительных когнитивных нарушений (группа А/Д). Изменения остальных показателей, вошедших в третий паттерн, не достигали статистической значимости.

## ОБСУЖДЕНИЕ

В этой статье мы рассмотрели возраст-ассоциированные различия в системном воспалительном статусе и структуре микробиоты тонкого кишечника, а также вклад данных показателей в развитие когнитивной недостаточности у пожилых людей. Нами обнаружено статистически значимое повышение системного уровня провоспалительных цитокинов (IL-6 и TNF- $\alpha$ ) у пожилых людей, что согласуется с концепцией развития с возрастом системного хронического низкоградуированного воспаления [Franceschi C. et al., 2014]. Системный воспалительный уровень этих цитокинов у лиц пожилого возраста коррелировал с изменением структуры сообщества микробов тонкого кишечника: наблюдалось снижение количества бактерий типов Firmicutes (особенно бактерий рода *Eubacterium* spp.) и Actinobacteria (рода *Bifidobacterium* spp.), по сравнению с молодыми донорами. Освободившуюся нишу заняли микроорганизмы типов Fusobacteria, Bacteroidetes и Proteobacteria. Таким образом, нами показано, что в тонком кишечнике пожилых людей также, как и

в фекальной микробиоте [12], происходит изменение соотношения типов Bacteroidetes/Firmicutes в сторону увеличения Bacteroidetes. Снижение количества бифидобактерий, которые являются важными пробиотиками, участвующими в поддержании гомеостаза кишечника и предотвращении инфекции [2], и увеличение числа «патобионтов», таких как *C. perfringens*, *B. cereus*, *Fusobacterium* spp. и *Alcaligenes* spp., может являться ответом на системное воспаление или одним из его триггеров [7]. Интересно отметить, что показатели микробиоты тонкого кишечника имели корреляционные связи только с IL-6 и TNF- $\alpha$ , тогда как системный уровень остальных исследуемых цитокинов (IL-1 $\beta$ , IL-18 и IL-10 и IFN- $\gamma$ ) образовывал обособленный кластер, абсолютно не взаимосвязанный со структурой микробиоты.

При сравнении уровня системного воспаления в группах людей пожилого возраста обращает на себя внимание, что у пожилых людей без серьезных когнитивных нарушений концентрация в плазме всех исследуемых цитокинов (как провоспалительных, так и IL-10) была выше, чем у доноров, т.е. можно говорить о «сбалансированном» хроническом низкоградуированном воспалении. Для лиц пожилого возраста с выраженными когнитивными расстройствами характерен высокий уровень только провоспалительных цитокинов IL-6 и TNF- $\alpha$ , по сравнению с донорами, концентрация остальных исследуемых цитокинов была ниже или равна показателям доноров. Обращает на себя внимание, что у индивидуумов с выраженными когнитивными нарушениями обнаружен статистически значимо высокий системный уровень IL-6, по сравнению с пожилыми людьми без когнитивной дисфункции. Известно, что высокий системный уровень IL-6 является сильным предиктором развития сердечно-сосудистых заболеваний, сосудистой деменции и смертности у людей пожилого и старческого возраста [3]. Ранее нами было показано [1], что такая воспалительная реакция может быть обусловлена, в том числе, эндокринными изменениями: в ответ на физиологический уровень адренокортикотропного гормона у пожилых людей с сосудистой деменцией вырабатывается избыточное количество кортизола. По данным Gupta D. et al. это может привести к развитию хронического стресса и к дестабилизации областей мозга, отвечающих за когнитивные функции (префронтальной коры, паравентрикулярных нейронов, гипокампа). Такие изменения, в свою очередь, могут способствовать развитию депрессии, когнитивных расстройств и болезни Альцгеймера у пожилых людей [6].

Филотипическая структура микробиоты тонкого кишечника в целом не отличалась в разных группах пожилых людей, однако наблюдались значимые различия в видовом/родовом составе: количество микроорганизмов *P. jensenii*, *B. cereus*, *Moraxella* spp. и *Fusobacterium* spp. было значимо снижено у людей с выраженными когнитивными расстройствами. Наибольший интерес представляют данные о снижении числа *P. jensenii*, которые наряду с *Propionibacterium fredenreichii* выделяют вещества, обладающие противовоспалительными, антибактериальными и антимуtagenными свойствами, а также участвует в производстве пропионовой кислоты и витамина B<sub>12</sub>, дефицит которого может приводить к неврологическим расстройствам [11]. Полученные нами результаты позволяют предположить, что сигнатура бактериального сообщества тонкого кишечника в ассоциации с высоким системным уровнем IL-6 и когнитивной несостоятельностью у пожилых людей могут презентовать функциональную ось: микробиота тонкого кишечника-иммунная система-мозг. Кроме того, полученные нами показатели могут быть использованы в

качестве биомаркеров для диагностики нарушений когнитивной несостоятельности в пожилом возрасте и для конструирования психобиотиков на основе нейроактивных компонентов и штаммов пробиотиков, способных снижать уровень провоспалительных цитокинов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бурмистрова А.Л., Филиппова Ю.Ю., Михайлова А.С. Нейро-иммуноэндокринная ось у людей пожилого возраста с разным качеством жизни. Российский иммунологический журнал. 2015, 9 (18): 198-200.
2. Бухарин О.В., Иванова Е.В., Перунова Н.Б. и др. Метаболический профиль бифидофлоры при различных микрoэкологических состояниях биотопа толстого кишечника человека. Журн. микробиол. 2017, 1: 3-11.
3. Bruunsgaard H. Effects of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in elderly populations. Eur. Cytokine Netw. 2002, 13 (4): 389-391.
4. Collins S.M., Surette M., Bercik P. The interplay between the intestinal microbiota and the brain. Nat. Rev. Microbiol. 2012, 10 (11): 735-742.
5. El Aidy S., van den Bogert B., Kleerebezem M. The small intestine microbiota, nutritional modulation and relevance for health. Curr. Opin. Biotechnol. 2015, 32: 14-20.
6. Gupta D., Morley J.E. Hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and aging. Compr. Physiol. 2014, 4 (4): 1495-1510.
7. Hollister E.B., Gao C., Versalovic J. Compositional and functional features of the gastrointestinal microbiome and their effects on human health. Gastroenterology. 2014, 146 (6): 1449-1458.
8. Larsson L. Determination of microbial chemical markers by gas chromatography-mass spectrometry — potential for diagnosis and studies on metabolism in situ. APMIS. 1994, 102: 161-169.
9. Leung K., Thuret S. Gut microbiota: A modulator of brain plasticity and cognitive function in aging. Healthcare. 2015, 3 (4): 898-916.
10. Osipov G.A., Boiko N.B., Fedosova N.F. et al. Comparative gas chromatography-mass spectrometry study of the composition of microbial chemical markers in feces. Microbial. Ecol. Health Dis. 2009, 21: 159-171.
11. Rai R.V., Bai J.A. Beneficial microbes in fermented and functional foods. CRC Press. 2015, 551-571.
12. Saraswati S., Sitaraman R. Aging and the human gut microbiota—from correlation to causality. Front. Microbiol. 2014, 5: 764.
13. Wagner K.H., Cameron-Smith D., Wessner B. et al. Biomarkers of aging: From function to molecular biology. Nutrients. 2016, 8 (6): 338.

*Поступила 25.05.17*

Контактная информация: Филиппова Юлия Юрьевна, к.б.н.,  
454001, Челябинск, ул. Братьев Кашириных, 129, р.т. (351)799-71-76

---