

СОСТОЯНИЕ МИКРОБИОЦЕНОЗА ТОЛСТОЙ КИШКИ И МЕСТНЫХ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ ПРИ КОРРЕКЦИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ДИСБАКТЕРИОЗА ЖИДКОЙ И СУХОЙ ФОРМАМИ БИФИДУМБАКТЕРИНА

*Лаборатория микробиологии и разработки иммунобиологических препаратов
ФБУН Ростовского научно-исследовательского института
микробиологии и паразитологии Роспотребнадзора,
Россия, 344000, г. Ростов-на-Дону, пер. Газетный, 119;
тел. (863) 234-91-83. E-mail: rostovniimp@aanet.ru*

Представлены результаты исследования изменения состава микробиоценоза толстой кишки и содержания местных метаболитов (малонового диальдегида, супероксиддисмутазы, каталазы) при коррекции антибиотикообусловленного дисбактериоза сухим коммерческим и жидким авторским бифидумбактерином. Отмечено, что одновременное использование жидкого бифидумбактерина с антибиотиком предохраняет экспериментальных животных от развития дисбактериоза (не уменьшается количество лакто- и бифидобактерий, эшерихий, не увеличивается количество лактозонегативных энтеробактерий), тогда как использование сухого бифидумбактерина способствует сохранению численности только бифидобактерий. При использовании жидкой формы не изменяется физиологическая активность местных метаболитических процессов за счет сбалансированного функционирования супероксиддисмутазы и каталазы при нормальном содержании малонового диальдегида. Установлено, что корригирующее действие жидкой формы бифидумбактерина эффективнее сухой.

Ключевые слова: дисбактериоз, местный метаболизм, жидкий и сухой бифидумбактерин.

M. N. GAPON, L. N. TERNOVSKAYA, O. V. DENISENKO

THE STATE OF THE MICROBIOCENOSIS OF THE COLON AND LOCAL METABOLIC PROCESSES WHEN CORRECTING EXPERIMENTAL DISBACTERIOSIS WITH THE LIQUID AND DRY FORMS OF BIFIDUMBACTERIN

*Laboratory of microbiology and the development of immunobiological preparations
FBUN Rostov institute of microbiology and parasitology of Rospotrebnadzor,
Russia, 344000, Rostov-on-Don, Gazetny per., 119;
tel. (8-63) 234-91-83. E-mail: rostovniimp@aanet.ru*

There were presented the results of the investigation of changes in the composition of microbiocenosis of the colon and the content of local metabolites (malondialdehyde, superoxide dismutase, catalase) in the correction of disbacteriosis caused by antibiotic with dry commercial and liquid copiright bifidumbacterin. It was noted that the simultaneous use of liquid bifidumbacterin with an antibiotic protects experimental animals from the development of disbacteriosis (the number of lacto- and bifidobacteria, Escherichia does not decrease, the amount of lactose-negative enterobacteria does not increase), whereas the use of dry bifidumbacterin helps to preserve only the number of bifidobacteria. When using the liquid form, the physiological activity of the local metabolic processes does not change, due to the balanced functioning of superoxide dismutase and catalase with the normal content of malondialdehyde. It was established that the corrective action of the liquid form of bifidumbacterin is more effective than the dry one.

Key words: disbacteriosis, local metabolism, liquid and dry bifidumbacterin.

Введение

Дисбактериоз толстой кишки является широко распространенным состоянием и представляет собой одну из актуальных проблем современной медицины [2]. Нарушение нормального состава микрофлоры толстой кишки и обусловленное этим изменение колонизационной резистентности кишечника служат патогенетическим фактором развития многочисленных и разнообразных по локализации патологических процессов, особенно хронического системного воспаления [1, 19]. Поэтому коррекция состава микробиоценоза толстой кишки рассматривается как одна из первооче-

редных задач, решение которой будет способствовать повышению качества здоровья и продолжительности жизни населения.

Арсенал средств для коррекции состава микробиоценоза толстой кишки достаточно велик. Имеется широкий выбор препаратов, содержащих живые лиофильно высушенные микроорганизмы из числа представителей резидентной микрофлоры (пробиотики), средств, представляющих собой селективный субстрат, стимулирующий рост и/или метаболическую активность полезных представителей нормальной микрофлоры (пребиотики), средств, сочетающих живые

микроорганизмы со стимулирующими субстанциями (синбиотики) [18].

Новую группу корректирующих препаратов, обладающих свойствами синбиотиков, представляют эуфлорины (нормофлорины). Это жидкие формы живых культур-пробиотиков, выращенных на ферментативных белковых гидролизатах животного или растительного происхождения, содержащих кроме живых микроорганизмов продукты их метаболизма (витамины, органические кислоты, антибиотикоподобные вещества и низкомолекулярные пептиды) [5]. Преимуществом данных форм корректирующих препаратов является их способность оказывать трофическое действие на энтероциты и колоноциты, вследствие продукции летучих жирных кислот повышать содержание секреторного иммуноглобулина А [16].

По мнению С. А. Шевелевой, идеальным «мог бы быть синбиотик, содержащий весь комплекс пребиотических факторов грудного молока» [18].

Известно, что молозиво коров также содержит пребиотические факторы, стимулирующие рост представителей нормальной микрофлоры (олигосахара, лактаминовые кислоты и др.) [17].

Нами был разработан способ получения гидролизата [13] из молозивного творога, являющегося отходом производства лечебного препарата лактоглобулина [10], и показана возможность использования этого гидролизата в качестве основы питательной среды для выделения и культивирования бифидобактерий [12], а также для получения низкомолекулярных пептидов [14]. На ранее разработанной питательной среде был получен жидкий бифидумбактерин, содержащий живые клетки бифидобактерий в количестве 10^9 – 10^{10} , органические кислоты, низкомолекулярные пептиды и широкий набор аминокислот [5].

Целью настоящего исследования явилось сопоставление действия коммерческой сухой и жидкой форм бифидумбактерина, выращенных на среде из гидролизата молозивного творога, на состав микробиоценоза толстой кишки и активность местных метаболических процессов при экспериментальном дисбактериозе, обусловленном применением антибиотика широкого спектра действия.

Материалы и методы исследования

Экспериментальный дисбактериоз воспроизводили на белых беспородных мышах-самцах весом 16–18 г, полученных из питомника ФБУН РНИИМП путем внутрибрюшинного введения антибиотика широкого спектра действия (гентамицина) в терапевтической дозе (80 мкг/мл) в перерасчете на массу животного в объеме 0,2 мл. Гентамицин был выбран как препарат, оказывающий антимикробное действие как на грамположительные, так и на грамотрицательные микробы, устойчивый к действию микробных ферментов, обладающий сравнительно высокой токсичностью.

В эксперименте использовано 160 животных, которые были разделены на четыре группы по 40 голов в каждой. Первую группу составляли интактные мыши, не получавшие ни антибиотик, ни бифидосодержащий препарат. Вторую группу составляли мыши, получавшие внутрибрюшинно гентамицин в течение 5 дней. Третья группа животных одновременно с 5-дневным курсом

гентамицина в течение 2 недель получала перорально жидкий бифидумбактерин, содержащий 10^9 живых микробных тел, в количестве 1,5 мл в сутки. Четвертая группа – одновременно с гентамицином получала перорально сухой бифидумбактерин в количестве 5 доз (1,5 мл) в сутки в течение 2 недель.

Изучение состава микробиоценоза толстой кишки мышей всех групп проводили в соответствии с Отраслевым стандартом [3], забирая материал (фекалии) для исследования на 3, 10, 17, 24-е сутки после окончания введения антибиотика.

Основными критериями оценки состава микробиоценоза толстой кишки считали количество нормальных эубионтов (бифидо-, лактобактерий, эшерихий с нормальной ферментативной активностью), количество и видовой состав условно-патогенных микроорганизмов. Выделенные культуры идентифицировали по морфологическим, культуральным, тинкториальным и биохимическим свойствам. Видовую принадлежность устанавливали в соответствии с определителем микробных видов Берджи [7].

Показателями местных метаболических процессов в копрофильтратах служили сопряженные антиоксидантные ферменты: супероксиддисмутаза (СОД), каталаза, а также вторичный продукт перекисного окисления липидов – малоновый диальдегид (МДА).

Активность супероксиддисмутазы определяли по методу Н. Р. Misra и I. Fridovich [21] в модификации, осуществленной на кафедре общей и клинической биохимии № 1 Ростовского государственного медицинского университета [9]. Активность фермента выражали в усл. ед/мг белка/час.

Активность каталазы определяли по методу М. А. Королук с соавт. [6], выражали в мКатал/мг белка/час.

Содержание МДА определяли по методике И. Д. Стальной с соавт. [11], выражали в нмоль/мг белка. Содержание общего белка определяли по методу С. Lowry [20].

Все полученные результаты обрабатывали методами вариационного и статистического анализа [15] на персональном компьютере по программам, разработанным в пакете EXCEL с использованием библиотеки статистических функций. Достоверность различий между исследуемыми группами определяли с помощью критерия Стьюдента (t). Статистически достоверными считали отличия, соответствующие величине ошибки достоверности $p < 0,05$ (при $t > 2$).

Несомненно, мы учитывали, что одновременное использование антибиотика с разными формами бифидумбактерина снижает количество жизнеспособных бифидобактерий, однако именно этот факт и позволил более четко выявить приоритетную форму препарата с пребиотической активностью.

Результаты и обсуждение

В таблице приведены средние показатели количественного состава микрофлоры толстой кишки всех четырех групп животных за весь период наблюдения (24 дня).

Как видно из представленных данных, в составе микробиоценоза толстой кишки мышей, получавших гентамицин (группа II), по сравнению с животными контрольной группы (I) отмечается существенное снижение содержания нормальных эубионтов (бифидо-, лактобактерий, эшерихий), увеличивается количество

Состав полостной микрофлоры толстой кишки у мышей разных групп

Виды микроорганизмов	Количество микробов Lg КоЕ/г у животных разных групп			
	I группа К	II группа Г	III группа Г±БЖ	IV группа Г±БС
	n=40	n=40	n=40	n=40
Бифидобактерии	8,5±0,5	7,5±0,3	9,2±0,2	8,8±0,3
Лактобактерии	7,2±0,6	6,8±0,1	7,0±0,3	6,8±0,5
Общее кол-во эшерихий	6,4±0,3	4,9±0,9	7,0±0,2	5,4±0,3
Лактозонегативные ЭБ	3,3±0,1	5,7±0,1	3,0±0,2	5,0±0,3
Протеи	0,8±0,2	4,1±0,5	0	0
Кандиды	1,4±0,1	3,5±0,2	0	0
Стафилококки:				
золотистый	0	4,3±0,1	0	0
коагулазоотрицательные	3,5±0,5	4,7±0,3	3,0±0,2	5,2±0,2

Примечание: * – достоверность различий при $p < 0,05$.

условно-патогенных микроорганизмов (лактозонегативных энтеробактерий, протеев, грибов рода *Candida*, стафилококков, в том числе золотистых).

У животных, получавших одновременно сухой бифидумбактерин и гентамицин (группа IV), количество бифидобактерий в составе микробиоценоза толстой кишки остается на уровне их содержания в контрольной группе, но отмечаются некоторое снижение содержания лактобактерий и эшерихий, а также повышенное содержание лактозонегативных энтеробактерий.

В группе животных (III), получавших жидкий бифидумбактерин, существенных изменений состава микробиоценоза толстой кишки по сравнению с мышами контрольной группы не отмечено. Содержание бифидобактерий, лактобактерий и эшерихий соответствовало нормальным показателям, а количество бифидобактерий несколько превышало значения контрольной группы. Не происходило и увеличения содержания условно-патогенных микробов.

При изучении состава микробиоценоза толстой кишки в этой группе животных в динамике экспериментального дисбактериоза было обнаружено, что содержание бифидобактерий было стабильным во все сроки забора материала (3, 10, 17, 24-й дни исследования), некоторое уменьшение численности лактобактерий отмечалось на 3-й день наблюдения, которое нормализовалось к 10-му дню и достигало lg 8,0 на 17-е и 24-е сутки. Некоторое снижение количества эшерихий наблюдалось на 3-й и 10-й дни, а нормализация – к 17-му дню. Лактозонегативные энтеробактерии, присутствующие в составе микробиоценоза на 3-й день исследования, исчезали к 10-му дню и не регистрировались в дальнейшем.

Из анализа состава микробиоценозов всех групп мышей следует, что одновременное применение жидкого бифидумбактерина с гентамицином предохраняет экспериментальных животных от развития дисбиотических нарушений, что может свидетельствовать

о профилактическом действии жидкого препарата. Возможно, более выраженная корректирующая активность жидкой формы бифидумбактерина по сравнению с сухим препаратом обуславливается наличием в культуральной жидкости бифидостимулирующих субстанций и биологически активных веществ гидролизата молочивного творога, а также низкомолекулярных пептидов.

Известно, что одной из причин не всегда эффективной корректирующей способности пробиотических препаратов является агрессивность местной среды обитания микроорганизмов вследствие накопления в ней при нарушении состава нормальной микрофлоры токсических продуктов. В качестве показателя, отражающего степень активности местных метаболических процессов в биологических субстратах макроорганизма, рекомендуется использовать содержание в них малонового диальдегида, повышение количества которого может косвенно свидетельствовать о дестабилизации клеточных мембран [8].

Проведенные исследования показали, что в процессе развития экспериментального дисбактериоза происходят существенные изменения показателей местной метаболической активности: повышается содержание СОД (202% от показателей контрольных животных), снижается активность каталазы (64% от уровня контроля), что свидетельствует о резком дисбалансе сопряженных ферментов и указывает на увеличение количества свободных радикалов, накопление в местной среде гидроперекисей. Повышение содержания в копрофильтратах животных МДА (117% от показателей контрольной группы) свидетельствует о повреждении клеточных мембран.

При использовании жидкого бифидумбактерина сравнительно высокая активность СОД (166% от показателей контрольной группы) компенсируется высокой активностью каталазы (138% от показателей контрольной группы). Практически нормальное содержание МДА в копрофильтратах (98% от показателей конт-

рольной группы) свидетельствует о сбалансированном состоянии антиоксидантной защиты, нейтрализации цитотоксического компонента в местной среде и целостности клеточных мембран.

При использовании сухого бифидумбактерина подобного эффекта не наблюдается, хотя у мышей данной группы в копрофильтратах отмечались менее выраженные, чем при использовании одного гентамицина, метаболические нарушения (активность СОД – 196%, активность каталазы – 109% от контроля, при количестве МДА – 109%). У животных, получавших вместе с гентамицином сухой бифидумбактерин, также регистрировали в копрофильтратах повышенную по сравнению с контрольной группой активность СОД. Однако показатели активности каталазы и содержания МДА свидетельствуют о более сбалансированной работе сопряженных ферментов и значительно меньшей агрессивности местной среды, чем у животных, получавших только антибиотик.

Таким образом, проведенное исследование показало, что сочетанное с антибиотиком широкого спектра действия использование как сухой, так и жидкой формы бифидумбактерина в определенной степени способствует восстановлению состава микрофлоры и повышению активности местных метаболических процессов, что свидетельствует о профилактическом действии обеих форм препарата. Однако очевидно и то, что жидкий бифидумбактерин, полученный на среде из гидролизата молозивного творога, более эффективен, что, по всей вероятности, обусловлено не только бифидостимулирующими субстанциями, содержащимися в гидролизате молозивного творога, но и наличием в них мембранотропных низкомолекулярных пептидов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бондаренко В. М., Рябиченко Е. В. Роль дисфункции кишечного барьера в поддержании хронического воспалительного процесса различной локализации // Журн. микробиол. – 2010. – № 1. – С. 92–100.
2. Воробьев А. А., Абрамов Н. А., Бондаренко В. М. и др. Дисбактериоз – актуальная проблема медицины // Вест. РАМН. – 1997. – № 3. – С. 4–7.
3. Вялова А. И., Воробьев П. А., Воробьев А. А., Бондаренко В. М. и др. Отраслевой стандарт «Дисбактериоз кишечника» (ОСТ 91500. 11. 0004-2003). Приказ МЗ РФ № 231 от 09.06.2003.
4. Гапон М. Н., Терновская Л. Н., Калинина Т. Э., Суханова С. М. Питательная среда для выделения и культивирования бифидобактерий // ЖМЭИ. – 2011. – № 4. – С. 124–126.
5. Казаков А. В. Эуфлорины – истоки жидких форм БАД микробного происхождения. Пробиотики, пребиотики, синбиотики

и продукты функционального питания. Современное состояние и перспективы // Сб. мат. Междунар. конфер. – Москва, 2004. – С. 102–103.

6. Королук М. А., Иванова Л. И., Майорова И. Г., Токарев В. Е. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16–19.
7. Краткий определитель бактерий Берджи: Пер. с англ. / Под ред. Дж. Хоулта. – М.: Мир, 1980. – 454 с.
8. Мухамбетова Л. Х. Разработка биохимических подходов к оценке влияния на организм ксенобиотиков // Гигиена и санитария. – 2004. – № 6. – С. 24–26.
9. Саркисян О. Г. Особенности изменений метаболических процессов при атрофических кольпитах и их коррекции. – Ростов-на-Дону, 2000. – 125 с.
10. Соболева С. В., Гузеева В. С. и др. Лактоглобулин противомикробный коровий сухой для перорального применения. Регламент производства № 328–91.
11. Стальная И. Д., Гаришвили Т. Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты // Современные методы в биохимии. – М.: Медицина, 1977. – С. 66–68.
12. Терновская Л. Н., Калинина Т. Э. и др. Питательная среда для культивирования бифидобактерий. Патент РФ № 2080376. 1997.
13. Терновская Л. Н., Калинина Т. Э. и др. Способ получения гидролизата творога для приготовления питательных сред. Патент № 2078811. 1997.
14. Терновская Л. Н., Гапон М. Н., Васерин Ю. И. и др. Способ выделения низкомолекулярных пептидов. Патент № 2416243. 2011.
15. Урбах В. Ю. Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях. – Москва, 1975. – 354 с.
16. Успенский Ю. Л., Суворов А. Н. Современные принципы коррекции дисбиоза кишечника // Дисбиоз кишечника. Руководство по диагностике и лечению / Под редакцией Е. И. Ткаченко, А. Н. Суворова. – СПб: Информ. Мед., 2009. – С. 246–271.
17. Шареев П. Н., Рябов В. И., Гумаров Г. Х. и др. Определение свободных и связанных форм аминокислот в биологических объектах // Клин. лаб. диагностика. – 1993. – № 3. – С. 44–48.
18. Шевелева А. С. Пробиотики, пребиотики и пробиотические продукты. Современное состояние вопроса // Вопросы питания. – 1999. – № 2. – С. 32–39.
19. Шендеров Б. А. Нормальная микрофлора и ее роль в поддержании здоровья человека // Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол., колопроктол. – 1998. – № 1. – С. 61–65.
20. Lowry C., Rosebrough N., Farr A., Randall R. Protein measurement with the folin phenol. Reagent // J. biol. chem. – 1953. – V. 193. – P. 265–275.
21. Mistr H. P., Fridovich I. // J. biol. chem. – 1972. – V. 247. – P. 188.

Поступила 01.11.2013