

ИЗМЕНЕНИЕ СОСТАВА МИКРОБИОЦЕНОЗА ТОЛСТОГО КИШЕЧНИКА И АНТИОКСИДАНТНЫХ СВОЙСТВ КОЛОНОЦИТОВ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ДИСБИОЗА И ЕГО КОРРЕКЦИИ

Калуцкий П.В., Медведева О.А., Королев В.А., Агейченко А.В., Веревкина Н.А.

ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России, Курск, e-mail: alina7227@mail.ru

Проведено изучение эффективности сочетанного использования пробиотика и антиоксиданта с целью коррекции качественного и количественного состава микробиоценоза толстого кишечника мышей и антиоксидантных свойств колоноцитов в условиях экспериментального дисбиоза. Животным, у которых формировали лекарственный дисбиоз внутрибрюшинным введением гентамицина, с целью коррекции вводили пробиотик РиоФлора Иммуно Нео и антиоксидант эмоксипин. Количественное и качественное исследование мукозной микрофлоры толстой кишки мышей проводили бактериологическим методом. О состоянии системы перекисного окисления липидов судили по содержанию ацилгидроперекисей и малонового диальдегида, системы антиоксидантной защиты – по активности ферментов (каталазы и супероксиддисмутазы). Экспериментальный дисбиоз кишечника проявлялся изменениями в составе мукозной микрофлоры животных и антиоксидантных свойств колоноцитов. Коррекция дисбиоза пробиотиком и антиоксидантом привела к восстановлению качественного и количественного состава микробиоценоза толстого кишечника, нормализации активности ферментов антиоксидантной защиты и содержания продуктов перекисного окисления липидов в колоноцитах.

Ключевые слова: дисбиоз, антиоксидантная система, перекисное окисление липидов, РиоФлора Иммуно Нео, эмоксипин.

CHANGES IN THE COMPOSITION OF LARGE INTESTINE MICROBIOCENOSIS AND ANTIOXIDANT PROPERTIES OF COLONOCYTES IN EXPERIMENTAL DYSBIOSIS AND ITS CORRECTION

Kalutsky P.V., Medvedeva O.A., Korolev V.A., Ageychenko A.V., Verevkin N.A.

Kursk State Medical University, Kursk, e-mail: alina7227@mail.ru

To study the composition of large intestine microbiocenosis and antioxidant properties of colonocytes in experimental dysbiosis with probiotic and antioxidant correction. Drug dysbiosis was simulated by administration of gentamicin intraperitoneally. For correction we administered probiotic Rio Flora Immuno Neo and antioxidant emoxipin. Quantitative and qualitative study of mucous microflora of the mice large intestine was performed by bacteriological method. The state of lipid peroxidation system was judged about by content of acylhydroperoxide and malonic dialdehyde, antioxidant protection system – by catalase and superoxide dismutase. Experimental dysbiosis manifested as significant changes in mucosal microflora, changes antioxidant properties of colonocytes. Correction of dysbiosis by probiotics and antioxidant normalized qualitative and quantitative microbiocenosis composition of large intestine, normalized enzyme activity of antioxidant protection, lipid peroxidation products in intestinal tissue.

Keywords: dysbiosis, antioxidant system, lipid peroxidation, Rio Flora Immuno Neo, emoxipin.

Нормальная микрофлора организма человека – это открытый биоценоз микроорганизмов, встречающийся у здоровых людей. Микробные популяции различных биотопов в норме выступают в роли симбионтов или сапрофитов, находясь в экологическом равновесии с организмом хозяина [14].

Микробиоценозы различных полостей и тканей организма человека включают в себя большое многообразие микроорганизмов, но самое многочисленное их сообщество обнаруживается в толстом кишечнике. В норме представители кишечной микрофлоры не оказывают отрицательного влияния на макроорганизм, однако нарушение качественного

и/или количественного состава нормофлоры, называемое в отечественной литературе дисбиозом, приводит к нарушению механизмов взаимодействия нормальной микрофлоры и, как следствие, развитию различных патологических состояний [2, 4]. То есть в основе изменения качественного и количественного состава микробиоценоза лежит нарушение равновесия между размножающейся, колонизирующей желудочно-кишечный тракт условно-патогенной микрофлорой и защитными факторами организма хозяина, включающими симбионтную микрофлору, которая препятствует этому процессу [11, 13].

Микроэкологические нарушения биотопов организма человека формируются под воздействием самых различных факторов, в том числе при воздействии физических, химических и биологических ксенобиотиков. Особое место в ряду ксенобиотиков занимают антимикробные препараты широкого спектра действия [5].

Воздействие антибиотиков на организм человека является одним из провоцирующих факторов образования свободных радикалов, что в свою очередь приводит к накоплению продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ). Известно, что одним из пусковых механизмов функционально-метаболических нарушений является декомпенсация системы антиоксидантной защиты организма (АОС), которая регулирует процессы перекисного окисления липидов, уровень активных форм кислорода, являющихся повреждающими факторами. Поэтому состояние антиоксидантной защиты является важным фактором, влияющим на состояние микрофлоры [7].

В настоящее время для коррекции дисбиоза используются препараты, которые можно подразделить на три группы: пребиотики, пробиотики и синбиотики [15]. Однако эффективность применения препаратов антиоксидантного ряда для коррекции нарушений молекулярно-биохимических показателей колоноцитов при дисбиозе до сих пор не изучена.

В связи с вышеизложенным, целью нашего исследования было изучение эффективности сочетанного использования пробиотика и антиоксиданта в условиях экспериментального дисбиоза у мышей.

Материалы и методы. Исследование проведено на 60 мышах линии BALB/c, которые были разделены на три группы по 20 особей в каждой. Первая группа – контрольная (интактные мыши). Вторую группу составили животные, у которых моделировали лекарственный дисбиоз путём ежедневного в течение 5 дней внутрибрюшинного введения раствора гентамицина в концентрации 80 мкг/мл в пересчёте на массу животного [6]. В третью группу входили мыши, которым с целью коррекции интрагастрально вводили пробиотик «РиоФлора Иммуно Нео» в течение трех недель и внутримышечно антиоксидант эмоксипин в дозе 167,18 мг/кг в пересчёте на массу животного в течение 10 суток после формирования дисбиоза.

У мышей контрольной группы, а также экспериментальных групп после окончания введения гентамицина производили изучение состава мукозной микрофлоры толстого кишечника, исследование состояния перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты колоноцитов.

Количественное и качественное исследование мукозной микрофлоры толстого кишечника мышей проводилось по методике Л.И. Кафарской и В.М. Коршунова [3, 12]. Биоптаты слизистой оболочки толстого кишечника освобождались от химуса и взвешивались в асептических условиях. Материал помещали в стерильный фосфатный буфер в соотношении 1:10 и выдерживали в нём 2 часа для разжижения муцина. После этого готовили разведения материала до концентраций 10^{-2} - 10^{-4} . По 0,1 мл каждого разведения взвеси засеивали газон на поверхность питательных сред (Эндо, Сабуро, SSA-агар, ЦПХ-агар, кровяной агар, желточно-солевой агар, висмут-сульфит агар, лактоагар, бифидоагар) и инкубировали при температуре 37°C в аэробных и анаэробных условиях. Выделенные микроорганизмы идентифицировали с использованием микробиологического анализатора «Multiskan-Ascent» и тест-систем ЭНТЕРОтест-16, СТАФИтест-16, Стрептотест-16, Эн-КОККУСтест-16; API 50 CHL – для идентификации лактобацилл и бифидобактерий. Содержание микроорганизмов в 1 грамме материала рассчитывали, исходя из числа выросших колоний микроорганизмов – колониеобразующих единиц (КОЕ) при посеве из максимального разведения, где отмечался рост не менее 10 колоний, учитывая при этом объём посевного материала. Для расчёта использовали формулу: $K = E / k * v * n$, где K – колониеобразующая единица, E – общее количество бактерий, k – количество внесённого материала, v – количество чашек Петри, n – разведение. Удельное содержание микроорганизмов вычисляли как количество микроорганизмов, выделенных из биопроб, и выражали в lg КОЕ/г массы биологического материала [10, 12].

Для оценки антиоксидантных свойств колоноцитов навеску ткани толстого кишечника массой 100 мг гомогенизировали в 1 мл 0,025 М трис-HCL буфера (pH 7,4). О состоянии ПОЛ судили по содержанию ацилгидроперекисей (АГП) и малонового диальдегида (МДА). Состояние антиоксидантной защиты оценивали по активности ферментов: супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы в ткани кишечника. Данные показатели оценивали традиционными методами [8, 9].

Статистическую значимость различий средних величин вычисляли по t-критерию Стьюдента после проверки нормальности распределения изучаемых величин, используя параметрические методы обчёта данных. Все вычисления выполнялись с помощью аналитического пакета приложения Excel Office 2010, лицензией на право использования которой обладает ФГБОУ ВО КГМУ Минздрава РФ.

Результаты исследования и их обсуждение. В условиях экспериментального дисбиоза зарегистрированы изменения качественного и количественного состава микробиоценоза толстого кишечника экспериментальных животных (таблица 1).

Таблица 1

Количественный состав мукозной микрофлоры кишечника мышей в условиях экспериментального дисбиоза и его коррекции

Выделенные микроорганизмы	Количество микроорганизмов, lg КОЕ/г (M±m)		
	Группы животных		
	Контроль (интактные мыши)	Дисбиоз	Коррекция «Эмоксипин и «РиоФлора Иммуно Нео»
<i>E. coli</i> с нормальной ферментативной активностью	6,77±0,78	3,95±0,53**	8,13±0,86 ^{xxx}
<i>E. coli</i> со сниженной ферментативной активностью	4,37±0,76	7,03±0,95*	1,93±0,51 ^{*xxx}
<i>Enterobacter</i> spp.	4,47±0,79	2,37±0,56*	7,21±1,00 ^{*xxx}
<i>Salmonella</i> spp.	5,65±0,66	6,44±0,86	4,12±0,73
<i>Citrobacter</i> spp.	4,37±0,92	0±0 ^{***}	4,02±0,89 ^{xxx}
<i>Enterococcus</i> spp.	3,42±0,90	0±0 ^{***}	4,95±0,65 ^{xxx}
<i>Streptococcus</i> spp.	2,93±0,60	6,17±1,09*	3,26±0,67 ^x
<i>Staphylococcus</i> (коагулазоотрицательные)	2,74±0,60	4,10±0,75	2,86±0,56
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	3,40±0,62 ^{***}	2,09±0,39 ^{***}
<i>Proteus</i> spp.	0	4,01±0,66 ^{***}	1,07±0,30 ^{***xxx}
<i>Candida</i> spp.	1,26±0,32	4,94±0,74 ^{***}	1,29±0,40 ^{xxx}
<i>Lactobacillus</i> spp.	6,15±0,70	3,73±0,77*	8,14±0,82 ^{xxx}
<i>Bifidobacterium</i> spp.	7,93±0,93	4,24±0,72 ^{**}	8,89±0,56 ^{xxx}

Примечание: * – $p \leq 0,05$ по сравнению с контрольной группой, ** – $p \leq 0,01$ по сравнению с контрольной группой, *** – $p \leq 0,001$ по сравнению с контрольной группой; ^x – $p \leq 0,05$ по сравнению с группой «дисбиоз», ^{xx} – $p \leq 0,01$ по сравнению с группой «дисбиоз», ^{xxx} – $p \leq 0,001$ по сравнению с группой «дисбиоз».

Было выявлено, что численность бифидобактерий и лактобактерий снизилась на 46,5 % ($p \leq 0,01$) и 39,3 % ($p \leq 0,05$) соответственно по отношению к группе контроля. Количество кишечных палочек со сниженной ферментативной активностью увеличилось на 61 % ($p \leq 0,05$), а число эшерихий с нормальной ферментативной активностью снизилось на 41,7 % ($p \leq 0,01$). Lg КОЕ/г условно-патогенных бактерий рода *Enterobacter* в контроле составил 4,47±0,79, а после воздействия антибиотика широкого спектра действия гентамицина уменьшился на 47 % ($p \leq 0,05$). Численность факультативных микроорганизмов – стрептококков возросла в 2,1 раза ($p \leq 0,05$) по отношению к значениям, определяемым у интактных животных. В составе биоценоза экспериментальной группы с дисбиозом не

выявлялись микроорганизмы рода *Citrobacter* и *Enterococcus*, но были обнаружены отсутствующие в составе микробиоценоза мышей контрольной группы золотистые стафилококки и протей, которые составили $\lg 3,40 \pm 0,62$ и $\lg 4,01 \pm 0,66$ соответственно. На фоне применения гентамицина в составе микробной популяции толстого кишечника мышей содержание грибов рода *Candida* увеличилось в 3,9 раза ($p \leq 0,001$). Изменения численности коагулазотрицательных стафилококков и сальмонелл были не достоверны.

Развитие лекарственного дисбиоза сопровождалось снижением активности обоих изученных ферментов антиоксидантной защиты колоноцитов мышей: каталазы и СОД (таблица 2).

Таблица 2

Активность ферментов антиоксидантной защиты колоноцитов мышей в условиях экспериментального дисбиоза и его коррекции

Группы мышей	Активность каталазы, мкат/г белка ткани (M±m)	Активность супероксиддисмутазы, у.е (M±m)
Контроль (интактные мыши)	14,11±0,88	14,23±1,03
Дисбиоз	10,12±1,62*	7,79±1,22***
Коррекция «Эмоксипин» и «РиоФлора Иммуно Нео»	17,92±0,90**xxx	19,99±0,92***xxx

Примечание: * – $p \leq 0,05$ по сравнению с контрольной группой, ** – $p \leq 0,01$ по сравнению с контрольной группой, *** – $p \leq 0,001$ по сравнению с контрольной группой; ^x – $p \leq 0,05$ по сравнению с группой дисбиоз, ^{xx} – $p \leq 0,01$ по сравнению с группой дисбиоз, ^{xxx} – $p \leq 0,001$ по сравнению с группой дисбиоз.

Полученные данные показывают, что у мышей при экспериментальном дисбиозе отмечается снижение активности каталазы на 28,2 % ($p \leq 0,05$) и СОД на 45,3 % ($p \leq 0,001$) соответственно в сравнении с контрольной группой.

После введения антибиотика у мышей происходило увеличение концентрации промежуточных и конечных продуктов ПОЛ в ткани кишечника (таблица 3).

Таблица 3

Содержание продуктов перекисного окисления липидов в колоноцитах мышей в условиях экспериментального дисбиоза и его профилактики эмоксипином

Группы мышей	Содержание малонового диальдегида, мкмоль/г ткани (M±m)	Содержание ацилгидроперекисей, у.е (M±m)
Контроль (интактные мыши)	3,57±0,57	0,31±0,03
Дисбиоз	6,82±0,72***	0,70±0,08***
Коррекция «Эмоксипин» и «РиоФлора Иммуно Нео»	2,21±0,34 ^{xxx}	0,23±0,06 ^{xxx}

Примечание: * – $p \leq 0,05$ по сравнению с контрольной группой, ** – $p \leq 0,01$ по сравнению с контрольной группой, *** – $p \leq 0,001$ по сравнению с контрольной группой; ^x –

$p \leq 0,05$ по сравнению с группой дисбиоз, ^{xx} – $p \leq 0,01$ по сравнению с группой дисбиоз, ^{xxx} – $p \leq 0,001$ по сравнению с группой дисбиоз.

При этом содержание малонового диальдегида увеличивалось на 91,2 % ($p \leq 0,001$), а ацилгидроперекисей – на 127,4 % ($p \leq 0,001$) по сравнению с группой контроля.

С целью коррекции нарушений качественного и количественного состава микробиоценоза толстого кишечника сочетано применяли препарат антиоксидантного ряда эмоксипин и пробиотик «РиоФлора Иммуно Нео». При коррекции вышеупомянутыми препаратами, количество бифидобактерий и эшерихий с нормальной ферментативной активностью возросло в 2,1 раза ($p \leq 0,001$), а лактобактерий в 2,2 раза ($p \leq 0,001$) соответственно (таблица 1). Количество кишечных палочек со сниженной ферментативной активностью на фоне терапии пробиотиком и антиоксидантом снизилось в 3,6 раза ($p \leq 0,001$), содержание условно-патогенных микроорганизмов рода *Enterobacter* повысилось в 3 раза ($p \leq 0,001$) по сравнению с группой «экспериментальный дисбиоз». Численность бактерий рода *Proteus* после коррекции снизилась в 3,7 раза ($p \leq 0,001$), зарегистрировано появление в составе микробиоценоза толстого кишечника представителей родов *Citrobacter* и *Enterococcus*, lg КОЕ которых составил $4,02 \pm 0,89$ и $4,95 \pm 0,65$ соответственно. Количественный показатель факультативных микроорганизмов рода *Streptococcus* снизился в 1,9 раза ($p \leq 0,05$) в сравнении с группой «экспериментальный дисбиоз», количество грибов рода *Candida* после введения антиоксиданта и пробиотика уменьшилось в 3,8 раза ($p \leq 0,001$). Достоверных изменений содержания коагулазоотрицательных, золотистых стафилококков и сальмонелл зарегистрировано не было.

При коррекции экспериментального дисбиоза антиоксидантом эмоксипином и пробиотиком «РиоФлора Иммуно Нео» отмечено положительное влияние на состояние антиоксидантной защиты макроорганизма в колоноцитах. Активность каталазы возросла в 1,3 раза ($p \leq 0,001$) (таблица 2), при этом активность изученного фермента была выше, чем в группе интактных животных. Активность СОД возросла и достигла значений группы интактных мышей в гомогенате ткани кишечника в 1,4 раза ($p \leq 0,001$).

Анализируя количественное содержание продуктов ПОЛ, полученное после коррекции дисбиоза антиоксидантом эмоксипином и пробиотиком «РиоФлора Иммуно Нео» было выявлено, что содержание МДА в ткани кишечника снизилось в 1,6 раза ($p \leq 0,001$) по сравнению с группой экспериментального дисбиоза (таблица 3). Содержание АГП уменьшилось в колоноцитах мышей в 3 раза ($p \leq 0,001$). Количественный показатель содержания продуктов ПОЛ после применения вышеуказанных препаратов достиг значений, полученных в группе интактных животных [1].

Заключение. Воздействие антибиотика широкого спектра действия (гентамицина) привело к существенным изменениям в составе микробиоценоза толстого кишечника, так как были зарегистрированы качественные и количественные изменения состава микрофлоры экспериментальных животных.

Гентамициновый дисбиоз толстого кишечника сопровождался существенным снижением ферментативной активности системы АОЗ в ткани кишечника (каталаза, СОД), что указывает на нарушение адаптационно-компенсаторных механизмов антиоксидантной защиты на местном уровне.

В условиях лекарственного дисбиоза, характеризующегося увеличением численности представителей факультативной микрофлоры толстого кишечника выявлено увеличение концентрации продуктов перекисного окисления липидов (МДА и АГП) в колоноцитах, что обусловлено действием, как самого антибиотика, так и количественным и качественным изменением состава нормобиоценоза исследуемого биотопа.

Сочетанное применение пробиотика «РиоФлора Иммуно Нео» и антиоксиданта эмоксипина с целью коррекции изменений микробиоценоза толстого кишечника привело к нормализации состава кишечного микробиоценоза. В то же время применение антиоксиданта и пробиотика оказало положительное влияние на активность ферментов антиоксидантной защиты и содержание продуктов перекисного окисления липидов. Это позволяет полагать, что использование эмоксипина приводит к повышению адаптивно-компенсаторных возможностей макроорганизма при экспериментальном дисбиозе.

Список литературы

1. Агейченко А.В. Состояние микробиоценоза толстого кишечника, липидного состава клеточных мембран и антиоксидантного статуса животных при экспериментальном дисбиозе: автореф. дис. ... канд. мед. наук : 03.02.03/ А.В. Агейченко. – Москва, 2016. – 24 с.
2. Блат С.Ф., Хавкин А.И. Микробиоценоз кишечника и иммунитет // Рос. вестн. перинатологии и педиатрии. – 2011. – Т. 56, № 1. – С. 66-71.
3. Богданова Е.А., Несвижский Ю.В., Воробьев А.А. Исследование пристеночной микрофлоры желудочно-кишечного тракта крыс при пероральном введении пробиотических препаратов // Вестн. РАМН. – 2006. – № 2. – С. 6-10.
4. Бойцов А.Г., Нилова Л.Ю., Оришак Е.А. Дисбиотические нарушения микрофлоры толстого кишечника: проблемы диагностики и коррекции // Вестн. Санкт-Петерб. гос. мед. акад. им. И.И. Мечникова. – 2008. – № 3 (28). – С. 120-123.

5. Завгородняя Е.Ф. Особенности микробиологической характеристики дисбиозов кишечника в современных условиях / Е.Ф. Завгородняя // Дальневост. журн. инфекц. патологии. – 2008. – № 12. – С. 161-162.
6. Кашкин К.П., Караев З.О. Иммунная реактивность организма и антибиотическая терапия. – Л.: Медицина, 1984. – 200 с.
7. Курбанов А.И. Антиоксидантные ферменты микроорганизмов: патогенетическая значимость и перспективы использования в медицине / А.И. Курбанов // Междунар. мед. журн. – 2008. – № 2. – С. 105-109.
8. Макаренко Е.В. Комплексное определение активности супероксиддисмутазы и глутатионредуктазы в эритроцитах больных с хроническими заболеваниями печени / Е.В. Макаренко // Лаб. дело. – 1988. – № 11. – С. 48-50.
9. Метод определения активности каталазы / М.А. Королук [и др.] // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16-19.
10. Микробиоценоз пристеночного муцина желудочно-кишечного тракта крыс с индуцированным дисбиозом / Ю.В. Несвижский [и др.] // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2007. – № 3. – С. 57-60.
11. Микрoэкологические изменения в кишечнике при дисбактериозе: экспериментальное обоснование возможности коррекции дисбиотических изменений пребиотиком стимуфид / В.Н. Бредихин [и др.] // Кишечная микрофлора: взгляд изнутри: инновац. сб. науч. ст. – 2013. – № 2. – С. 102-103.
12. Особенности микробиоценоза пристеночного муцина желудочно-кишечного тракта крыс / А.А. Воробьев [и др.] // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2005. – № 6. – С. 3-7.
13. Особенности микробиоценоза толстой кишки при дисбиотических нарушениях / И.В. Вальшева [и др.] // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2011. – № 1. – С. 67-70.
14. Bacterial colonization and intestinal mucosal barrier development / Н. Xiao-Zhong [et al.] // World. J. Clin. Pediatr. – 2013. – Vol. 2, No. 4. – P. 46-53.
15. Probiotics – a helpful additional therapy for bacterial vaginosis / О. Bodean [et al.] // J. Med. Life. – 2013. – Vol. 6, No. 4. – P. 434-436.