

**Авдеева Ю.А., Медведева О.А., Королев В.А., Калущий А.П.**  
Курский государственный медицинский университет  
E-mail: juliana16.12@mail.ru ; olgafrida@rambler.ru ; medecol1@yandex.ru

## **ВЛИЯНИЕ ПРОБИОТИКОВ БАКТИСТАТИН И НОРМОБАКТ НА СОСТАВ МИКРОБИОЦЕНОЗА ТОЛСТОГО КИШЕЧНИКА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ДИСБИОЗЕ**

Изменение качественного и количественного состава микробиоценоза толстого кишечника – дисбиоз является фоновым состоянием для развития большого спектра заболеваний, а также – фактором ослабления иммунной системы организма.

Изучено влияние лекарственных препаратов с выраженным пробиотическим эффектом бактистатин и нормобакт на состав микрофлоры толстого кишечника в условиях экспериментального гентамицинового дисбиоза. При коррекции гентамицинового дисбиоза пробиотиками бактистатин и нормобакт отмечено изменение количественного и качественного состава представителей мукозного микробиоценоза толстого кишечника. При этом применение бактистатина и нормобакта приводило к нормализации содержания 12 из 13 и 9 из 13 микроорганизмов, соответственно, определяемых в составе мукозной микрофлоры толстого кишечника. Более выраженный эффект коррекции количественного и качественного состава кишечной микрофлоры наблюдается при применении препарата бактистатин.

По нашему мнению, выявленные различия в нормализации микробиоты толстого кишечника, связаны с видовым составом микроорганизмов использованных пробиотиков. Это позволяет рекомендовать в клинической практике применение данных препаратов для избирательной коррекции дисбиоза после исследования качественного и количественного состава микробиоценоза толстого кишечника.

**Ключевые слова:** мукозная микрофлора толстого кишечника, дисбиоз, бактистатин, нормобакт.

### **Введение**

Нормальную микрофлору организма человека в настоящее время рассматривают как первичную мишень приложения любого внешнего воздействия, попадающего в организм человека. Нормофлора вовлекается в переработку, трансформацию естественных и чужеродных субстанций, как орган, на котором происходит первичная адсорбция и через который транслируются полезные и потенциально вредные агенты. Нормальная микрофлора – тот барьер, после прорыва которого включаются неспецифические механизмы защиты [1], [2].

Изменение качественного и количественного состава микробиоценоза толстого кишечника – дисбиоз является фоновым состоянием для развития большого спектра заболеваний, а также – фактором ослабления иммунной системы организма [6], [7].

Среди основных причин развития дисбиоза кишечника выделяют стрессы, неблагоприятное воздействие окружающей среды, прием лекарственных препаратов (антибактериальных, гормональных, цитостатиков), заболевания гастроинтестинального тракта, нерациональное питание, нарушения иммунитета, оперативные вмешательства [3]–[5].

Терапия больных с дисбиозом включает лечение основного заболевания (этиологическое лечение) и восстановление нормального состава кишечных бактерий. Для целенаправленной коррекции микробиоты кишечника применяют про-, пребиотики и синбиотические препараты [3], [8].

Пробиотики – это живые микроорганизмы, которые оказывают прямое антагонистическое действие на патогенную и условно-патогенную микрофлору. Они стимулируют рост облигатной микрофлоры, повышают колонизационную резистентность слизистых оболочек, способствуют регенерации, росту кишечного эпителия и нормализации функций слизистой оболочки кишечника, улучшению пищеварения и синтеза витаминов [5], [9], [10].

Цель исследования: изучить влияние пробиотиков бактистатин и нормобакт на качественный и количественный состав мукозной микрофлоры толстого кишечника при экспериментальном дисбиозе у мышей.

### **Материалы и методы**

Исследование проведено на 80 мышах линии BALB/c массой 18–20 грамм, которых содержали на обычном пищевом рационе в усло-

виях вивария. Все животные были разделены на четыре группы по 20 особей в каждой. Первая (контрольная) группа состояла из интактных мышей. Во вторую группу входили животные, у которых моделировали лекарственный дисбиоз путём внутрибрюшинного введения в течение 5 дней раствора гентамицина в концентрации 80 мкг/мл в пересчёте на массу тела животного (0,02 мл) [11]. Мышам третьей группы по окончании введения антибиотика интрагастрально вводили пробиотик бактистатин по 0,02 мл в течение 21 дня. Мыши четвёртой группы после формирования дисбиоза интрагастрально получали пробиотик нормобакт по 0,06 мл в течение 21 дня. Исследования проводили с соблюдением принципов, изложенных в Конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других целей (г. Страсбург, Франция, 1986).

У мышей контрольной группы, а также экспериментальных групп после окончания введения гентамицина (вторая группа) или пробиотиков (третья и четвёртая группы) производили изучение состава мукозной микрофлоры толстого кишечника. Количественное и качественное исследование мукозной микрофлоры толстого кишечника мышей проводилось по методике Л.И. Кафарской и В.М. Коршунова [12]. Биоптаты слизистой оболочки толстого кишечника освобождались от химуса и взвешивались в асептических условиях. После этого материал помещался в стерильный раствор фосфатного буфера в соотношении 1:10 и выдерживался в нём 2 часа для разжижения муцина. Затем готовились разведения материала до концентраций  $10^{-2}$ – $10^{-4}$ . По 0,1 мл каждого разведения взвеси засеивали газоном 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 °С в аэробных и анаэробных условиях. Идентификацию микроорганизмов проводили с помощью микробиологического анализатора «Multiskan-Ascent» с использованием тест-систем ЭНТЕРОтест-16, СТАФИтест-16, Стрептотест-16, Эн-КОККУСтест-16; API 50 CHL – для идентификации лактобацилл и бифидобактерий. Количество 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:

$$K = E / k \cdot v \cdot n,$$

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 [13]–[15].

Статистическую значимость различий средних величин вычисляли по  $t$ -критерию Стьюдента после проверки нормальности распределения изучаемых параметров с помощью программы Statistica 6.0 [16].

### Результаты исследования

При исследовании количественного и качественного состава мукозной микрофлоры толстого кишечника интактных животных установлено, что в ее составе доминировали бифидобактерии  $\lg$ КОЕ=(8,10±1,05), кишечные палочки с нормальной ферментативной активностью  $\lg$ КОЕ=(6,58±0,75) и лактобактерии  $\lg$ КОЕ=(6,48±0,66) (таблица 1).

Кроме того, в муциновом слое толстого кишечника были идентифицированы представители рода *Salmonella*  $\lg$ КОЕ=(5,07±0,63), бактерии родов *Enterococcus*  $\lg$ КОЕ=(3,85±0,90) и *Citrobacter*  $\lg$ КОЕ=(3,74±0,72), кишечные палочки со сниженной ферментативной активностью  $\lg$ КОЕ=(3,48±0,57) и бактерии рода *Enterobacter*  $\lg$ КОЕ=(3,01±0,47). Несколько ниже была численность коагулазоотрицательных стафилококков  $\lg$ КОЕ=(2,54±0,67), грибов рода *Candida*  $\lg$ КОЕ=(2,38±0,49) и бактерий рода *Streptococcus*  $\lg$ КОЕ=(2,14±0,55). Следует отметить, что в составе мукозной микрофлоры интактных мышей не выявлены золотистый стафилококк и микроорганизмы рода *Proteus*.

Введение гентамицина привело к уменьшению численности доминантных представителей микрофлоры здоровых животных. Содержание бифидобактерий снизилось в 1,7 раза, а лактобактерий и кишечных палочек с нормаль-

ной ферментативной активностью – в 1,8 раза и в 2,1 раза, соответственно. При этом число стрептококков увеличилось в 3,1 раза, коагулазотрицательных стафилококков – в 2,3 раза, микроорганизмов рода *Enterobacter* – в 1,7 раза по отношению к значениям определяемого показателя контрольной группы. В составе кишечного биоценоза данной экспериментальной группы не выявлены микроорганизмы родов *Citrobacter* и *Enterococcus*, тогда как отмечалось появление золотистых стафилококков и бактерий рода *Proteus* ( $IgKOE=(5,87\pm 1,48)$  и  $IgKOE=(3,12\pm 0,45)$ , соответственно). На фоне применения гентамицина в составе микробиоценоза толстого кишечника мышей количество грибов рода *Candida* увеличилось в 2,3 раза.

Применение бактистатина оказало положительное воздействие на количественное содержание 12 из 13 микроорганизмов, определяемых в составе мукозной микрофлоры толстого кишечника. При этом использование пробиотика привело к увеличению численности бифидобактерий, лактобактерий, эшерихий с нормальной ферментативной активностью, восстановлению качественных и количественных характеристик представителей родов *Citrobacter* и *Enterococcus*.

Количественные значения определяемого показателя для сальмонелл, стрептококков, коагулазотрицательных стафилококков и грибов рода *Candida* на фоне терапии достоверно снизились по отношению к группе животных с дисбиозом. При этом в составе мукозной микрофлоры не выявлены золотистый стафилококк и микроорганизмы рода *Proteus*.

В группе животных, получавших пробиотик нормобакт, достоверно изменились значения  $IgKOE$  9 из 13 микроорганизмов, определяемых в составе мукозной микрофлоры толстого кишечника. Количество эшерихий с нормальной ферментативной активностью и лактобактерий увеличилось и достигло достоверных значений группы интактных животных, а содержание стрептококков и коагулазотрицательных стафилококков снизилось. При этом в составе мукозной микрофлоры не выявлены золотистый стафилококк, микроорганизмы родов *Proteus* и *Enterococcus*. Микроорганизмы рода *Citrobacter*, отсутствовавшие в группе дисбиоз, определялись в количестве  $IgKOE=(3,14\pm 0,72)$ , что является сопоставимым результатом со значением определяемого показателя контрольной группы. Достоверных изменений содержания

Таблица 1. Влияние пробиотиков бактистатин и нормобакт на состав мукозной микрофлоры толстого кишечника мышей

Выделенные микроорганизмы	Количество микроорганизмов, $IgKOE/г$ ( $M\pm m$ )			
	Группы животных			
	1	2	3	4
	Контроль (интактные мыши)	Дисбиоз	Применение бактистатина	Применение нормобакта
<i>E. coli</i> с нормальной ферментативной активностью	6,58±0,75	3,18±0,46***	6,63±0,58xxx	6,35±0,73xxx
<i>E. coli</i> со сниженной ферментативной активностью	3,48±0,57	5,22±0,73	3,76±0,46	3,31±0,90
<i>Enterobacter</i> spp.	3,01±0,47	5,08±0,48**	5,85±0,78	5,61±0,78
<i>Salmonella</i> spp.	5,07±0,63	6,14±0,76	3,04±0,68xxx	4,79±0,69
<i>Citrobacter</i> spp.	3,74±0,72	0±0***	4,27±0,68xxx	3,14±0,72xxx
<i>Enterococcus</i> spp.	3,85±0,90	0±0***	5,85±0,71xxx	0±0xxx
<i>Streptococcus</i> spp.	2,14±0,55	6,64±0,78***	3,21±0,51xxx	4,34±0,68x
<i>Staphylococcus</i> (коагулазотрицательные)	2,54±0,67	5,87±0,94**	3,14±0,66x	2,90±0,64x
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	5,87±1,48***	0±0xxx	0±0xxx
<i>Proteus</i> spp.	0	3,12±0,45***	0±0xxx	0±0xxx
<i>Candida</i> spp.	2,38±0,49	5,43±0,90**	1,25±0,55xxx	2,34±0,75xx
<i>Lactobacillus</i> spp.	6,48±0,66	3,60±0,82*	6,43±0,85x	6,81±0,79xx
<i>Bifidobacterium</i> spp.	8,10±1,05	4,76±0,94*	8,60±1,02xx	7,78±1,22

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.

эшерихий со сниженной ферментативной активностью, бактерий рода *Enterobacter*, сальмонелл и бифидобактерий не выявлено.

### **Обсуждение**

При коррекции гентамицинового дисбиоза пробиотиками бактистатин и нормобакт отмечено изменение количественного и качественного состава представителей мукозного микробиоценоза толстого кишечника. При этом применение бактиститина и нормобакта приводило к нормализации содержания 12 из 13 и 9 из 13 микроорганизмов, соответственно, определяемых в составе мукозной микрофлоры

толстого кишечника. Более выраженный эффект коррекции количественного и качественного состава кишечной микрофлоры наблюдается при применении препарата бактистатин.

По нашему мнению, выявленные различия в нормализации микробиоты толстого кишечника, связаны с видовым составом микроорганизмов использованных пробиотиков. Это позволяет рекомендовать в клинической практике применение данных препаратов для избирательной коррекции дисбиоза после исследования качественного и количественного состава микробиоценоза толстого кишечника.

8.06.2016

### **Список литературы:**

1. Крамарь В.С., Савченко Т.Н. и др. Микрoэкология человека, коррекция дисбактериоза // Вестник ВолГМУ. 2010. Выпуск 4 (36). С. 73-76.
2. Круглякова Л.В., Нарышкина С.В. и др. Клинико-лабораторные особенности хронической обструктивной болезни легких, ассоциированной с дисбактериозом кишечника // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. 2015. Выпуск 55. С. 27-34.
3. Костюкевич О.И. Влияние кишечной микрофлоры на здоровье человека. От патогенеза к современным методам коррекции дисбиоза // Русский медицинский журнал. 2011. Т.19, №5. С. 304-308.
4. Минушкин О.Н. Дисбактериоз кишечника: современное состояние проблемы // Consilium medicum. 2009. Т.9, №7. С.59-64.
5. Яковенко Э.П., Иванов А.Н., Казарина А.В. и соавт. Нарушение нормального состава кишечных бактерий: клиническое значение и вопросы терапии // Русский медицинский журнал. 2008. Т.10, №2. С. 41-46.
6. Сулима М.В., Солянова И.П., Круглякова Л. В. Нарушение нормального состава кишечной микрофлоры при заболеваниях органа пищеварения (учебное пособие). – Благовещенск, 2014. – 104 с.
7. Агейченко А.В., Калуцкий П.В., Медведева О.А., Королев В.А. Изменение состава микробиоценоза толстого кишечника и антиоксидантных свойств колоноцитов в условиях экспериментального дисбиоза и профилактики эмоксипином // Журнал микробиологии, эпидемиологии, иммунологии. 2015. №4. С. 84-88.
8. Шульцкова Ю.О. Патологические изменения состава кишечной микрофлоры: клинические варианты и возможности лечения // Справочник поликлинического врача. 2007. №12. С. 33-38.
9. Лоранская И.Д., Лаврентьева О.А. Функциональный анализ микробиоценоза желудочно-кишечного тракта // Русский медицинский журнал. Т.19, 2011. С. 1057-1060.
10. Лазарева Т.С., Жвания Ф. Ф. Желудочно-кишечный тракт, микрофлора и иммунитет // Педиатрическая фармакология. 2009. Т.6, №1. С 46-50.
11. Кашкин К.П., Караев З.О. Иммунная реактивность организма и антибиотическая терапия. – Л.: Медицина, 1984. – 200 с.
12. Ефимов Б.А., Кафарская Л.И., Коршунов В.М. Современные методы оценки качественных и количественных показателей микрофлоры кишечника и влагалища // Журнал микробиологии. 2002. №4. С 72-78.
13. Воробьев А.А., Несвижский Ю.В., Богданова Е.А., Корнеев М.Л. Исследование пристеночной микрофлоры кишечника крыс // Журнал микробиологии. 2005. №3. С 61-65.
14. Воробьев А.А., Несвижский Ю.В., Богданова Е.А., Корнеев М.Л. Особенности микробиоценоза пристеночного муцина желудочно-кишечного тракта крыс // Журнал микробиологии. 2005. №6. С 3-7.
15. Несвижский Ю.В., Богданова Е.А., Зверев В.В., Воробьев А.А. Микробиоценоз пристеночного муцина желудочно-кишечного тракта крыс с индуцированным дисбиозом // Журнал микробиологии. 2007. №3. С 57-60.
16. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета программ Statistica. – М.: МедиаСфера, 2006. – 312 с.

### **Сведения об авторах:**

**Авдеева Юлиана Александровна**, ООО «Курскхимволокно», аспирант кафедры биологической и химической технологии Курского государственного медицинского университета, e-mail: juliana16.12@mail.ru; 305008 г. Курск, ул. Верхняя Луговая, 424.

**Медведева Ольга Анатольевна**, доцент кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии Курского государственного медицинского университета, доктор биологических наук, доцент  
E-mail: olgafrida@rambler.ru;

**Королев Владимир Анатольевич**, завуч кафедры биологии, медицинской генетики и экологии Курского государственного медицинского университета, доктор биологических наук, доцент, профессор  
E-mail: medecoll@yandex.ru

**Калуцкий Алексей Павлович**, аспирант кафедры хирургических болезней Курского государственного медицинского университета, e-mail: lex91@mail.ru  
305041, г. Курск, ул. Карла Маркса, 3