

---

## КОРРЕКЦИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ДИСБАКТЕРИОЗА ПРОБИОТИКАМИ

**И.Г. Осипова, В.Ф. Евлашкина,**

**Н.В. Терешкина**

ФГУН ГИСК им. Л.А. Тарасевича

*Пер. Сивцев Вражек, 41, Москва, Россия, 119002*

**Е.А. Васильева**

Кафедра микробиологии РУДН

*Медицинский факультет,*

*ул. Миклухо-Маклая, д. 8, Москва, Россия, 117198*

**Е.В. Буданова**

Кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии

ММА им. И.М. Сеченова

*Ул. Моховая, 11, ст. 10, Москва, Россия, 119881*

В модельных экспериментах по изучению лечебной эффективности пробиотиков при коррекции дисбактериоза получены доказательства необходимости стандартного доклинического изучения различных доз применения препаратов-пробиотиков в опытах *in vivo*. Применение различных коммерческих пробиотиков при экспериментальном дисбактериозе приводило к разным результатам коррекции кишечной микрофлоры: к увеличению нормофлоры без коррекции УПБ при воздействии препаратов нормофлоры; к увеличению лактозоположительных *E. coli*, лактобактерий, без изменения бифидобактерий и к элиминации грибов и стафилококков в случае биоспорина. Бактисубтил не восстанавливал нормофлору, не проявлял корректирующего действия на грибы и стафилококки.

В нашей стране при отборе штаммов-кандидатов в пробиотики основное внимание уделяют спектру и выраженности их антагонистической активности, которую изучают в опытах *in vitro*. Подобная характеристика является недостаточной, поскольку она не раскрывает механизма терапевтического эффекта пробиотика, его позитивного воздействия на макроорганизм и биосовместимости с другими видами бактерий нормальной микрофлоры. Отсутствие достаточно полных данных о взаимоотношениях между пробиотическими и условно-патогенными бактериями приводит порой к неправильному выбору пробиотика для лечения и, как следствие этого, к отсутствию положительного эффекта.

В решении многих проблем биологии и медицины важную роль играют экспериментальные исследования на животных, позволяющие моделировать необходимые состояния, изучать динамику патологического процесса и тонкие метаболические процессы. В литературе описаны различные подходы к моделированию дисбактериоза у животных. Известны модели дисбактериоза, вызванные голоданием, тотальной кровопотерей, радиационным облучением, введением антибиотиков [1—4].

**Материалы и методы.** Использовали следующие коммерческие пробиотики:

- *споровые* — биоспорин и бактисубтил;
- *колисодержащие* — колибактерин;
- *бифидосодержащие* — бифидумбактерин и бифидин;
- *лактосодержащие* — лактобактерин и ацилакт.

Анализ количества микрофлоры проводили по методике, разработанной И.А. Бочковым с соавт. [6], используя стандартные питательные среды, традиционно применяемые в микробиологических исследованиях. Определение количества микрофлоры кишки и фекалий проводили через 24 ч после последнего введения пробиотика.

Изучение адгезивных свойств осуществлялась на эпителиальных клетках кишечника мышей [7].

Исследование транслокации было проведено на мышах, получавших ампиокс 4 мг/сут в течение 10 сут (количество животных каждой группы — 10). Определение количества УПБ транслоцированных в органы (легкие, печень, почки, селезенка, тимус) и кровь проводили через 24 ч после последнего введения ампиокса. Навески органов растирали в ступке со стерильным песком, готовили серийные десятикратные разведения до 10<sup>7</sup> и делали высевы на чашки со средами МПА, Эндо, солевой агар, кровяной агар и Сабуро. Кровь посуде обогащения на жидкой питательной среде высевали на те же среды. Посевы инкубировали 24—48 ч при температуре 37 °С. В эксперименте по коррекции дисбактериоза животные были разделены на группы:

- I группа ( $n = 10$ ) получала только *per os* ЗФР в течение 14 сут.;
- 2 группа животных ( $n = 10$ ), мыши с экспериментальным дисбактериозом (без лечения);
- 3—9 группы животных ( $n = 20$  в каждой) с экспериментальным дисбактериозом, ежедневно перорально 1 раз в сут получали исследуемый пробиотик (курс приема пробиотика составил 14 сут.) в двух дозировках: ч.д. — «человеческая» доза ( $n = 10$ ) и м.д. — «мышьяная» доза ( $n = 10$ ).

Полученные данные обработаны с помощью методов вариационной статистики, позволяющих вычислять параметры достоверной значимости результатов исследования.

Результаты оценивали на основании данных 3 или 5 опытов.

**Полученные результаты и обсуждение.** При изучении влияния ампиокса на состав микрофлоры было показано резкое изменение в составе микрофлоры. Выявлено увеличение общего количества микроорганизмов: лактозоположительных кишечных палочек (примерно на 2 lg), лактозоотрицательных *E. coli* (более чем на 5 lg), грибов рода *Candida* (на 2 lg). Появляются бактерии рода *Proteus*. Возрастает количество *Pseudomonas aerogenosa*, *Staphylococcus epidermidis* и *Enterococcus faecium* (на 1 lg). Уровень бифидобактерий, лактобактерий и *Clostridium spp.* не изменяется.

Известно, что колонизация УПБ усиливается в организме больных, подвергнутых воздействию антибиотиков, особенно при нерациональной антибио-

тикотерапии [2]. Проведено сравнительное изучение адгезивной активности УПБ (тест-штаммы) к эпителиальным клеткам тонкого кишечника здоровых мышей и мышей с экспериментальным дисбактериозом (получавших ампиокс в течение 14 сут) — таблица.

Таблица

**Адгезия условно патогенных бактерий к энтероцитам**

| Штаммы                 | 1-я группа «N1» |                  | 2-я группа «N2» |             | 3-я группа «Д» |            |
|------------------------|-----------------|------------------|-----------------|-------------|----------------|------------|
|                        | СПА             | К (%)            | СПА             | К (%)       | СПА            | К (%)      |
| <i>S. aureus</i> 209   | 4,28 ± 0,3      | 89,2 ± 1,36      | 5,46 ± 0,7      | 94,2 ± 1,6  | 8,78 ± 0,5     | 95,8 ± 1,8 |
| <i>S. xylois</i> 25    | 4,75 ± 0,31     | 89,0 ± 1,2       | —               | —           | 8,6 ± 0,42     | 90,0 ± 3,4 |
| <i>E. coli</i> 157     | 7,18 ± 0,8      | 90,6 ± 0,97      | 8,21 ± 0,4      | 92,8 ± 1,5  | 11,2 ± 0,4     | 98,1 ± 1,9 |
| <i>P. vulgaris</i> 177 | 4,3 ± 0,5       | 84,3 ± 1,44<br>* | 5,25 ± 0,5      | 90,7 ± 1,42 | 8,52 ± 0,4     | 97,2 ± 1,4 |

Примечание: 1-я группа «N1» — энтероциты от здоровых мышей в начале опыта; 2-я группа «N2» — энтероциты от здоровых мышей в конце опыта; 3-я группа «Д» — энтероциты от мышей с экспериментальным дисбактериозом; «—» — не изучали.

Из полученных результатов (табл.) следует, что бактерии проявляют больший уровень адгезии к энтероцитам, выделенным от животных с экспериментальным дисбактериозом, чем от здоровых животных ( $p < 0,05$ ). Таким образом, при экспериментальном дисбактериозе, вызванном ампиоксом, усиливается адгезия УПБ к эпителиальным клеткам кишечника. Возможно, причина заключается в модификации рецепторов эпителиальных клеток.

Известно, что маркером нарушения колонизационной резистентности (КР) у животных, помимо изменений в составе фекальной микрофлоры, служит транслокация кишечной флоры во внутренние органы.

У животных с экспериментальным дисбактериозом наблюдалась транслокация лактозоотрицательной кишечной флоры (*E. coli*, *Proteus spp.*) в легкие на 4 lg (очень высокая степень транслокации), почки (средняя степень транслокации — на 2 lg), тимус и печень (низкая степень транслокации — на 1 lg). Селезенка и кровь оставались стерильными. Следует отметить, что лактозоположительная кишечная флора не транслоцировалась. В контрольной группе животных, не получавших ампиокс, все органы и кровь оставались стерильными.

Транслокация условно патогенной флоры при дисбактериозе объясняется значительным увеличением ее количества, что, в свою очередь, приводит к массовому выбросу в кровь эндотоксинов и параллельному снижению как клеточного, так и гуморального антиэндотоксинового иммунитета.

Следовательно, полученные результаты коррелируют с данными литературы о том, что наибольшей степенью транслокации обладает кишечная палочка [3; 8; 9], а также о том, что одним из пусковых механизмов транслокации служит чрезмерное увеличение количества кишечной флоры [4; 10].

Широкая практика применения пробиотиков из различных видов и штаммов микроорганизмов представителей нормофлоры свидетельствует об их нор-

мализующем влиянии на кишечный микробиоценоз [10; 11]. В связи с этим нами проведено исследование воздействия различных коммерческих пробиотиков на состав микрофлоры мышей при экспериментальном дисбактериозе.

При изучении влияния колибактерина на состав микрофлоры было установлено: увеличение лактозоположительных кишечных палочек (примерно на 2—3 lg), незначительное увеличение количества лактобактерий. Выявлено, что содержание бифидобактерий, стафилококков и грибов рода *Candida* не изменялось.

При изучении влияния лактосодержащих ПБ на состав микрофлоры обнаружено увеличение количества лактобактерий (примерно на 2—3 lg), статистически значимое уменьшение стафилококков, тогда как содержание бифидобактерий и грибов рода *Candida* не изменялось. В группе животных, применявших бифидумбактерин, увеличилось только количество бифидобактерий (на 2—3 lg), состав остальной флоры не менялся. В группе животных, применявших бифидин, обнаружено увеличение уровня бифидобактерий (на 3—4 lg), статистически значимое уменьшение стафилококков и лактозонегативных эшерихий. Следует, отметить, что разница между дозами препарата не выявлена.

Таким образом, применение пробиотиков нормофлоры (колисодержащие, лактосодержащие и бифидосодержащие) при экспериментальном дисбактериозе способствовало увеличению нормофлоры, тогда как уровень УПМ оставался без изменения.

При изучении состава микрофлоры после введения биоспорина установлено: увеличение лактозоположительных кишечных палочек (примерно на 2—3 lg), лактобактерий (примерно на 2—3 lg), элиминация стафилококков и грибов при неизменном количестве бифидобактерий.

При исследовании влияния бактисубтила на состав микрофлоры было показано, что содержание лакто- и бифидобактерий не изменяется, но незначительно увеличивается количество стафилококков и грибов.

Таким образом, в модельных экспериментах по изучению лечебной эффективности пробиотиков при коррекции дисбактериоза получены доказательства необходимости стандартного доклинического изучения различных доз применения препаратов-пробиотиков в опытах *in vivo*.

## ЛИТЕРАТУРА

- [1] Бонд В.М., Горская Е.М. Новые подходы к моделированию, диагностике и лечению дисбактериозов кишечника // Мед. аспекты микробной экологии. — 1992. — Вып. 6. — С. 23—26.
- [2] Горская Е.М. Механизмы развития микрoэкологических нарушений в кишечнике и новые подходы к их коррекции // Научн. доклад на соискание степени док. мед. наук. — М., 1994. — 53 с.
- [3] Кочурко Л.И., Лиходед В.Г., Лобова Е.А. Показатели иммунитета к эндотоксину грамотрицательных бактерий при кишечных дисбактериозах // ЖМЭИ. — 1998. — № 5. — С. 25—27.

- [4] Berg R.D. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract // *Appl. Environ. Microbiol.* — 1995. — Vol. 3, N 4. — P. 149—154.
- [5] Лиходед В.Г., Яковлев М.Ю., Лиходед П.В. и др. Состояние антиэндоксинного иммунитета при экспериментальном кишечном дисбактериозе у мышей // *ЖМЭИ.* — 1998. — N 4. — С. 14—16.
- [6] Бочков И.А., Трофимов О.Д., Дарбеева О.С. и др. Упрощенная методика подсчета микроорганизмов при изучении аутофлоры человека // *Лаб. Дело.* — 1988. — 6. — С. 43—47.
- [7] Горская Е.М., Манохина И.М., Горелов А.В., Поспелова В.В., Рахимова Н.Г. Методические рекомендации по определению адгезии бактерий кишечного происхождения к эпителиальным клеткам тонкого и толстого кишечника. — М., 1989. — 7 С.
- [8] Иммунологические препараты и перспективы их применения в инфектологии / Под ред. Г.Г. Онищенко, В.А. Алешкина, С.С. Афанасьева, В.В. Поспеловой // ГОУ ВУНМЦ МЗ РФ. — М., 2002. — 595 с.
- [9] Гриценко В.А., Брудастов Ю.А., Журлов О.С., Чертков К.Л. Свойства эшерихий, выделенных из организма мышей при бактериальной транслокации после иммуобилизационного стресса // *Журн. микроб., эпидемиол. и иммунол.* — 2000. — № 1. — С. 37—41.
- [10] Berg R.D. Bacterial translocation from the intestines // *Linken Dobutsu*, 1985, 34:1:1—16.
- [11] Dunne C., O'Mahony L., Murphy L. et al. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings // *Am J Clin Nutr* 2001; 73 (suppl): 386S—92S.

## THE EXPERIMENTAL CORRECTION OF THE DYSBACTERIOSIS BY PROBIOTICS

**I.G. Jossipova, V.F. Evlashkina, N.V. Tereshkina**

FGUN GISK im. L.A. Tarasevicha  
*per. Sivtseva Vrajek, 41, Moscow, 119002*

**E.A. Vasileva**

The department of microbiology RPFU  
*The medical faculty,*  
*Miklukho-Maklaia street, block 8, Moscow, 117198*

**E.V. Budanova**

The department of microbiology, virology and immunology  
of MMA in. I.M. Sechenova  
*Mokhovaia 11, bl. 10, Moscow, Russia, 119881*

In vivo, the obtained evidences were received to necessitate the performance of the standard pre-clinical research of different dosages of the probiotics in experimental model of the probiotics treatment efficiency study in the case of dysbacteriosis correction. The use of different commercial probiotics in the experimental disbiosis lead to various results of the corrections of intestinal microflora balance: to the increasing of normoflora without the correction of potentially harmful organisms in case of using the normoflora medication; to the increasing of lactose-positive E.coli, lactobacteria, without the bifidobacteria level shifting and to the elimination of fungi and staphylococcus in case of the biosporin. Bactisubtil didn't restore the normoflora and didn't correct the level of the fungi and staphylococcus.