

МИКРОЭКОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В КИШЕЧНИКЕ ПРИ ДИСБАКТЕРИОЗЕ: ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ КОРРЕКЦИИ ДИСБИОТИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ ПРЕБИОТИКОМ СТИМБИФИД

Бредихин В.Н.¹, Чичерин И.Ю.², Погорельский И.П.³, Лундовских И.А.³, Лещенко А.А.³, Лазыкин А.Г.³

¹ ФГУЗ «Противочумный центр» Роспотребнадзора, ² Научное общество «Микробиота», ³ Вятский государственный университет, кафедра микробиологии

MICROECOLOGICAL CHANGES IN THE INTESTINE DURING DYSBACTERIOSIS: EXPERIMENTAL SUBSTANTIATION THE POSSIBILITY OF CORRECTION DYSBIOTIC CHANGES WITH PREBIOTIC STIMBIFID

V.N. Bredikhin¹, I.Yu. Chicherin², I.P. Pogorelsky³, I.A. Lundovskikh³, A.A. Leshchenko³, A.G. Lazykin³

¹ FGUZ «Anti-Plague Center» Rospotrebnadzor, ² Scientific society «Microbiota», ³ Vyatka State University, Department of Microbiology

РЕЗЮМЕ

Изучен состав кишечной микрофлоры у белых мышей и морских свинок в норме и при антибиотико-ассоциированном дисбактериозе. Показано положительное влияние пребиотика Стимбифид на полное восстановление общего количества кишечной микрофлоры и отдельных ее представителей (бифидобактерий, лактобактерий и эшерихий) у экспериментальных животных.

Ключевые слова: экспериментальный дисбактериоз, лабораторные животные, кишечная микрофлора, коррекция микрофлоры, пребиотик Стимбифид.

SUMMARY

The composition of the intestinal microflora of white mice and guinea pigs in norm and in an antibiotic-associated dysbacteriosis was studied. The positive effect of the prebiotic Stimbifid has been shown for full recovery of the total amount of the intestinal microflora and its individual representatives (bifidobacteria, lactobacilli and escherichia) in experimental animals.

Key words: experimental dysbacteriosis, laboratory animals, intestinal microflora, microflora correction, prebiotic Stimbifid.

ВВЕДЕНИЕ

Дисбактериозы отнесены А.А. Воробьевым с соавторами [2] к актуальной проблеме медицины. Авторы цитируемой работы указывают, что дисбактериозом следует называть любое количественное или качественное изменение типичного для данного биотопа состава нормальной микрофлоры человека или животного, возникающее в результате воздействия на макроорганизм или микроорганизмы различных факторов экзогенного и эндогенного характера и влекущие за собой выраженные клинические проявления со стороны макроорганизма либо являющиеся следствием каких-то патологических процессов в нем.

Нормальная микрофлора кишечника взрослых животных и людей характеризуется выраженным разнообразием. Так, у мышей она представлена 13 биологическими видами (общее количество микроорганизмов – $5,0 \cdot 10^{10}$ КОЕ·г⁻¹), у морских свинок – также 13 биологическими видами (общее количество микроорганизмов – $3,6 \cdot 10^9$ КОЕ·г⁻¹), у взрослых людей – 11-12 биологическими ви-

дами при общем количестве микроорганизмов $1,2 \cdot 10^9$ КОЕ·г⁻¹ [5]. Но если у мышей общее количество микроорганизмов примерно на порядок выше, чем у морских свинок и людей, то по группам микроорганизмов, входящих в состав фекальной микрофлоры, животные и люди различаются иногда незначительно, а иногда на несколько порядков.

Кишечная микрофлора, наряду с другими микроорганизмами различных биотопов организма человека, считается главным биогенным фактором, определяющим здоровье или развитие заболевания. Однако при дисбактериозах происходит снижение не только общего числа кишечной микрофлоры, но и отдельных ее представителей: бифидобактерий (до 10^7 - 10^8 КОЕ·г⁻¹), лактобактерий (до 10^5 - 10^6 КОЕ·г⁻¹), эшерихий (до 10^6 - 10^8 КОЕ·г⁻¹) [5].

Клинико-лабораторные исследования, связанные с изучением различных аспектов дисбиотических изменений в желудочно-кишечном тракте людей, явились основой формирования концепции, согласно которой

микробное сообщество в кишечнике человека имеет четко выраженную индивидуальность, что в конечном итоге предопределяет индивидуализацию создания пробиотиков из аутоштаммов и симбиотических микроорганизмов.

Апробация таких пробиотиков, а также внедряемых в клиническую практику пребиотиков, может проводиться на лабораторных животных с экспериментальным антибиотико-ассоциированным дисбактериозом. Как показали клинические наблюдения, его формированию как у детей, так и у взрослых способствует длительное и бесконтрольное применение антибиотиков и химиотерапевтических препаратов.

Цель настоящего исследования – экспериментальная оценка возможности коррекции дисбиотических изменений микрофлоры кишечника у белых мышей и морских свинок пребиотиком Стимбифид.

Материалы и методы исследования.

В экспериментах использовали пребиотический препарат Стимбифид (серия 030910, произведен ООО «В-МИН»/ООО «МедСтар», Россия). Препарат создан на основе фруктоолиго- и фруктополисахаридов, содержит премикс витаминно-минеральный «Immunity» и вспомогательные вещества (натрия бикарбонат, лактоза, кальция стеарат). Эффективность пребиотика Стимбифид подтверждена клиническими исследованиями [3].

Гентамицин для парентерального введения произведен фирмой-изготовителем KRKA, Словения.

Выращивание бифидобактерий и лактобактерий, выделяемых из состава кишечной микрофлоры, проводили на селективных плотных питательных средах в микроаэрофильных условиях при температуре 37°C с использованием системы для анаэробного культивирования. Выращивание эшерихий проводили на агаре Хоттингера и агаре Эндо.

Общее количество микробных клеток в 1 грамме фекалий экспериментальных животных определяли подсчетом в камере Горяева. Количество жизнеспособных микроорганизмов в пересчете на 1 г фекалий ($\text{КОЕ} \cdot \text{г}^{-1}$) определяли высевом соответствующих десятикратных разведений суспензий биоматериала на плотные питательные среды в чашках Петри и подсчета выросших колоний бактерий по истечении времени инкубирования при температуре 37°C.

В работе использовали прошедших акклиматизацию белых мышей массой 18–20 г и морских свинок массой 250–300 г, беспородных, обоего пола.

Статистическую обработку результатов экспериментов проводили в соответствии с рекомендациями, изложенными в руководстве И.П. Ашмарина и А.А. Воробьева [1].

Результаты и обсуждение.

Представленные в работе Б.А. Шендерова [5] данные свидетельствуют о том, что при пероральном введении ряда аминокликозидов концентрация последних в 1 г фекалий людей может достигать 20000–24000 мкг, что значительно превышает минимальную подавляющую концентрацию для большинства бактерий фекальной микрофлоры. Гентамицин в отличие от других аминокликозидов при приеме внутрь практически не всасывается в желудочно-кишечном тракте и оказывает местное действие. Вызывая микробиологические нарушения в кишечнике, гентамицин инициирует развитие дисбактериоза кишечника у подопытных лабораторных животных при пероральном введении.

С учетом представленных в работе [5] данных, а также среднесуточных доз препарата для людей, с целью

инициации дисбактериоза гентамицин вводили белым мышам и морским свинкам *per os* в дозах 2,9 и 30 мг, соответственно, 2 раза в сутки в пересчете на единицу поверхности тела. Начиная с первого дня введения антибиотика, у животных отбирали фекалии для определения общего количества фекальной микрофлоры. Кроме того, на 1, 2, 5 и 7 сутки экспериментов определяли содержание бифидобактерий, лактобактерий и эшерихий.

Было установлено, что к 7 суткам эксперимента общее содержание микроорганизмов кишечной микрофлоры в 1 г фекалий белых мышей снизилось по сравнению с исходным количеством в $2,8 \cdot 10^4$ раз, а морских свинок – в $2,3 \cdot 10^5$ раз.

Наряду со снижением общего количества фекальной микрофлоры у белых мышей и морских свинок под влиянием гентамицина отмечалось снижение количества бифидобактерий, лактобактерий и эшерихий. Даже после прекращения перорального введения животным гентамицина в течение последующих 4 суток происходит дальнейшее понижение количества указанных представителей фекальной микрофлоры.

На 5 сутки после прекращения перорального введения гентамицина белые мыши и морские свинки с выраженными дисбиотическими изменениями фекальной микрофлоры были разделены на две группы. Опытным группам животных вводили пребиотик Стимбифид. Контрольные группы животных не получали пребиотик Стимбифид. Согласно инструкции по применению пребиотика Стимбифид, препарат вводили *per os* в суточных дозах с учетом переводного коэффициента на единицу поверхности тела, которые составили для белых мышей 13 мг, а для морских свинок 131 мг.

Непосредственно в день начала введения пребиотика Стимбифид у животных опытных и контрольных групп отбирали фекалии для бактериологического исследования. По результатам бактериологического исследования фекалий животных судили об эффективности пребиотика Стимбифид. Результаты определений представлены в таблицах 1–3.

Из приведенных результатов следует, что исходное общее содержание фекальной микрофлоры составило: у белых мышей – $8,2 \cdot 10^4$ $\text{КОЕ} \cdot \text{г}^{-1}$, у морских свинок – $5,5 \cdot 10^3$ $\text{КОЕ} \cdot \text{г}^{-1}$. Однако уже через сутки после начала перорального введения препарата Стимбифид животным опытных групп общее содержание фекальной микрофлоры как у белых мышей, так и у морских свинок, превысило почти в 1000 раз аналогичный показатель у животных контрольных групп, не получавших пребиотик Стимбифид.

Определение количества жизнеспособных бифидобактерий, лактобактерий и эшерихий на 2 сутки экспериментов, как и общего количества микроорганизмов, содержащихся в фекалиях животных опытных групп, свидетельствует о преобладающем их увеличении в сравнении с увеличением микроорганизмов в фекалиях животных контрольных групп.

В дальнейшем, вплоть до 7 суток наблюдений, отмечается положительное влияние пребиотика Стимбифид на количественное содержание кишечной микрофлоры таких контролируемых видов микроорганизмов, как бифидобактерии, лактобактерии и эшерихии. У животных контрольных групп, получавших только пищевой рацион, восстановление нарушений кишечного микробиоценоза значительно отстает от животных экспериментальных групп, получавших пребиотик Стимбифид.

Определение пребиотикам, данное М.В. Робертс [6], относится к избирательно ферментируемым ингредиентам пищи, которые специфически меняют состав и (или) активность микрофлоры желудочно-кишечного

Таблица 1.

Динамика концентрации микроорганизмов в кишечном содержимом белых мышей опытной группы при антибиотико-ассоциированном дисбактериозе на фоне введения пребиотика Стимбифид ($\bar{X} \pm I_{95}$, n=5)								
Микроорганизмы	Содержание живых бактерий в 1 г фекалий на ... сутки эксперимента, КОЕ·г ⁻¹							
	начало эксперимента	1	2	3	4	5	6	7
Общее количество	$(8,2 \pm 0,5) \cdot 10^4$	$(2,2 \pm 0,4) \cdot 10^7$	$(1,5 \pm 0,2) \cdot 10^8$	$(8,2 \pm 0,4) \cdot 10^9$	$(3,5 \pm 0,4) \cdot 10^9$	$(8,6 \pm 0,4) \cdot 10^9$	$(2,4 \pm 0,4) \cdot 10^{10}$	$(3,2 \pm 0,3) \cdot 10^{10}$
Бифидобактерии	$(1,6 \pm 0,5) \cdot 10^2$	н	$(2,4 \pm 0,3) \cdot 10^5$	н	н	$(2,1 \pm 0,5) \cdot 10^7$	н	$(3,2 \pm 0,3) \cdot 10^7$
Лактобактерии	$(1,4 \pm 0,3) \cdot 10^4$	н	$(4,2 \pm 0,4) \cdot 10^6$	н	н	$(2,4 \pm 0,5) \cdot 10^8$	н	$(5,4 \pm 0,4) \cdot 10^8$
Эшерихии	$(1,3 \pm 0,3) \cdot 10^1$	н	$(3,1 \pm 0,3) \cdot 10^2$	н	н	$(3,2 \pm 0,3) \cdot 10^3$	н	$(3,4 \pm 0,3) \cdot 10^4$

Таблица 2.

Динамика концентрации микроорганизмов в кишечном содержимом белых мышей контрольной группы при антибиотико-ассоциированном дисбактериозе ($\bar{X} \pm I_{95}$, n=5)								
Микроорганизмы	Содержание живых бактерий в 1 г фекалий на ... сутки эксперимента, КОЕ·г ⁻¹							
	начало эксперимента	1	2	3	4	5	6	7
Общее количество	$(8,2 \pm 0,5) \cdot 10^4$	$(3,2 \pm 0,6) \cdot 10^4$	$(4,2 \pm 0,4) \cdot 10^4$	$(8,6 \pm 0,4) \cdot 10^5$	$(8,2 \pm 0,4) \cdot 10^5$	$(7,5 \pm 0,2) \cdot 10^5$	$(4,5 \pm 0,4) \cdot 10^6$	$(2,1 \pm 0,4) \cdot 10^6$
Бифидобактерии	$(1,6 \pm 0,4) \cdot 10^2$	н	$(3,2 \pm 0,4) \cdot 10^2$	н	н	$(2,4 \pm 0,3) \cdot 10^3$	н	$(4,5 \pm 0,3) \cdot 10^4$
Лактобактерии	$(1,0 \pm 0,4) \cdot 10^3$	н	$(2,5 \pm 0,4) \cdot 10^3$	н	н	$(1,2 \pm 0,5) \cdot 10^4$	н	$(3,5 \pm 0,4) \cdot 10^5$
Эшерихии	$(1,2 \pm 0,3) \cdot 10^1$	н	$(2,2 \pm 0,3) \cdot 10^1$	н	н	$(2,1 \pm 0,4) \cdot 10^2$	н	$(1,6 \pm 0,4) \cdot 10^3$

Таблица 3.

Динамика концентрации микроорганизмов в кишечном содержимом морских свинок опытной группы при антибиотико-ассоциированном дисбактериозе на фоне введения пребиотика Стимбифид ($\bar{X} \pm I_{95}$, n=5)								
Микроорганизмы	Содержание живых бактерий в 1 г фекалий на ... сутки эксперимента, КОЕ·г ⁻¹							
	начало эксперимента	1	2	3	4	5	6	7
Общее количество	$(5,5 \pm 0,6) \cdot 10^3$	$(2,5 \pm 0,4) \cdot 10^6$	$(6,5 \pm 0,4) \cdot 10^6$	$(8,8 \pm 0,5) \cdot 10^9$	$(4,4 \pm 0,6) \cdot 10^9$	$(4,6 \pm 0,5) \cdot 10^9$	$(4,4 \pm 0,5) \cdot 10^9$	$(5,4 \pm 0,4) \cdot 10^9$
Бифидобактерии	$(1,5 \pm 0,4) \cdot 10^2$	н	$(3,4 \pm 0,5) \cdot 10^4$	н	н	$(1,5 \pm 0,6) \cdot 10^6$	н	$(2,1 \pm 0,5) \cdot 10^7$
Лактобактерии	$(5,5 \pm 0,4) \cdot 10^1$	н	$(3,6 \pm 0,4) \cdot 10^4$	н	н	$(2,5 \pm 0,3) \cdot 10^5$	н	$(3,4 \pm 0,4) \cdot 10^6$
Эшерихии	$(1,3 \pm 0,3) \cdot 10^1$	н	$(1,7 \pm 0,3) \cdot 10^2$	н	н	$(3,6 \pm 0,4) \cdot 10^4$	н	$(2,4 \pm 0,5) \cdot 10^5$

тракта, что сопровождается улучшением самочувствия и здоровья человека.

Пребиотический эффект созданного в России препарата Стимбифид, содержащего фруктоолиго- и фруктополисахариды и премикс витаминно-минеральный, был зафиксирован в экспериментах *in vitro* и на людях разных возрастных категорий, о чем свидетельствуют клинические отчеты, в частности отчет о клинико-лабораторном исследовании современных про- и пребиотических препаратов, проведенном в ФГУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» [3].

На фоне лечения пребиотиком Стимбифид у больных отмечалась нормализация диспептических явлений со стороны желудочно-кишечного тракта, а также отчетливая тенденция к закреплению стула и исчезновение побочных эффектов – «вздутия живота» и повышенной перистальтики кишечника.

Важно подчеркнуть, что пребиотик Стимбифид, как это указано в работах [3, 4], в равной степени эффективно корригирует различные типы нарушений состава микроорганизмов кишечника. В этой связи представлялось целесообразным в экспериментах на лабораторных животных определить эффективность пребиотика Стимбифид при восстановлении нарушенного микробноценоза кишечника белых мышей и морских свинок, вызванного пероральным введением антибиотика гентамицин.

Результаты проведенных бактериологических исследований фекалий белых мышей и морских свинок показали, что у лабораторных животных на фоне перорального введения гентамицина развился дисбактериоз кишечника, сопровождавшийся «вздутием живота» и нарушением перистальтики кишечника. При этом кишечная микрофлора у лабораторных животных фактически являлась критическим звеном нарушенной регуляции, требующим определенного воздействия для восстановления.

Пероральное введение лабораторным животным с антибиотико-ассоциированным дисбактериозом пребиотика Стимбифид в соответствующих дозировках способствовало увеличению как общего содержания фекальной микрофлоры, так и бифидобактерий, лактобактерий и эшерихий. При этом четко прослеживается тенденция ускоренного восстановления собственной кишечной микрофлоры у животных опытных групп, получавших пребиотик Стимбифид.

Следует подчеркнуть, что экспериментально зафиксирован факт самовосстановления кишечной микрофлоры у лабораторных животных контрольных групп с антибиотико-ассоциированным дисбактериозом: после прекращения перорального введения антибактериального препарата происходит постепенное самовосстановление естественной кишечной микрофлоры, но этот процесс затянут по времени.

Самовосстановлению собственной микрофлоры кишечника у лабораторных животных способствуют такие

компоненты продуктов питания, входящих в пищевой рацион, как пищевые волокна трав, злаковых и фруктов, полисахариды и другие соединения, обладающие пребиотическим эффектом.

На 7 сутки экспериментов (таблицы 1-3) результаты бактериологического исследования фекалий животных опытных и контрольных групп наглядно свидетельствуют о значительном отставании «скорости восстановления» собственной микрофлоры кишечника у животных контрольных групп в сравнении с аналогичным процессом у животных опытных групп.

Резюмируя полученные результаты экспериментальных исследований, можно отметить, что пребиотик Стимбифид характеризуется хорошей переносимостью животными и отсутствием побочных эффектов. При пероральном введении пребиотика Стимбифид у белых мышей и морских свинок отмечается выраженная положительная динамика восстановления общего содержания кишечной микрофлоры, а также отдельных ее представителей – бифидобактерий, лактобактерий и эшерихий.

Полученные результаты с позиции экспериментальной бактериологии подтверждают данные клинко-лабораторных исследований [3, 4] об эффективности пребиотика Стимбифид в коррекции дисбиотических

нарушений желудочно-кишечного тракта, в частности путем восстановления собственной микрофлоры кишечника.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ашмарин И.П. Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. – Л.: Медгиз, 1962. – 280 с.
2. Воробьев А.А., Абрамов Н.А., Бондаренко В.М., Шендеров Б.А. Дисбактериозы – актуальная проблема медицины // Вестн. РАМН. – 1997. – № 3. – С. 4-7.
3. Грачева Н.М., Ардатская М.Д., Аваков А.А., Соловьева А.И. Сравнительная оценка клинко-лабораторной эффективности современных про- и пребиотических препаратов в коррекции дисбиотических нарушений желудочно-кишечного тракта: отчет о клинко-лабораторном исследовании. – М.: Московский НИИ-ЭМ им. Г.Н. Габричевского, 2010. – 23 с.
4. Минушкин О.Н., Ардатская М.Д., Чичерин И.Ю. Фруктоолиго – и фруктополисахариды в коррекции и профилактике нарушений микробиоценоза кишечника у больных бронхолегочной патологии, получающих антибактериальную терапию // Эксп. и клин. гастроэнтерол. – 2011. – № 3. – С. 79-87.
5. Шендеров Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание: в 3 т. Том 1: Микрофлора человека и животных и ее функции. – М.: Издательство ГРАНТЬ, 1998. – 288 с.
6. Roberfroid M.B. Prebiotics: the concept revisited // J. Nutr. – 2007. – Vol. 137, № 3. – P. 830S-837S.