

# ВЛИЯНИЕ ПОДАВЛЕНИЯ СЕКРЕЦИИ ЖЕЛУДОЧНОГО СОКА ПРЕПАРАТОМ ПАРИЕТ НА ПРИЖИВАЕМОСТЬ БИФИДОБАКТЕРИЙ И ЛАКТОБАКТЕРИЙ В ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОМ ТРАКТЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ\*

Чичерин И.Ю.<sup>1</sup>, Лундовских И.А.<sup>2</sup>, Погорельский И.П.<sup>2</sup>, Гаврилов К.Е.<sup>2</sup>, Янов С.Н.<sup>2</sup>, Дармов И.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Научное общество «Микробиота», Сергиев Посад, Россия (141306, Сергиев Посад-6 МО, ул. Октябрьская, 19-3), e-mail: rpatron@mail.ru

<sup>2</sup> ФГБОУ ВПО «Вятский государственный университет», Киров, Россия (610000, Киров, ул. Московская, 36), e-mail: kaf\_mb@vyatsu.ru

## EFFECT OF THE SUPPRESSION OF GASTRIC JUICE SECRETION BY PREPARATION PARIET ON THE SURVIVAL RATE OF BIFIDOBACTERIA AND LACTOBACILLI IN THE GASTROINTESTINAL TRACT OF EXPERIMENTAL ANIMALS

I.Yu. Chicherin<sup>1</sup>, I.A. Lundovskikh<sup>2</sup>, I.P. Pogorelsky<sup>2</sup>, K.E. Gavrilov<sup>2</sup>, S.N. Yanov<sup>2</sup>, I.V. Darmov<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Scientific society «Microbiota», Sergiev Posad, Russia (Oktyabrskaya st., 19-3, Sergiev Posad-6, Russia, 141306), e-mail: rpatron@mail.ru,

<sup>2</sup> Vyatka State University, Kirov, Russia (Moskovskaya st., 36, Kirov, Russia, 610000), e-mail: kaf\_mb@vyatsu.ru

### РЕЗЮМЕ

Представлены результаты изучения приживаемости гомопробиотических бифидобактерий и лактобактерий, выделенных от белых мышей линии BALB/c, в кишечнике конвенциональных белых мышей с антибиотико-ассоцированным дисбактериозом в условиях подавления секреции желудочного сока препаратом Париет (ингибитором протонного насоса в желудке, блокирующим финальную стадию продукции кислоты).

Установлено, что функционально активные, маркированные по признаку устойчивости к рифампицину гомопробиотические бифидобактерии и лактобактерии, введенные перорально экспериментальным конвенциональным белым мышам с антибиотико-ассоцированным дисбактериозом и медикаментозным подавлением секреции желудочного сока, не приживаются в кишечнике животных и элиминируются к 10 суткам после прекращения их введения.

Представленные экспериментальные данные свидетельствуют о необходимости стимулирования восстановления собственной кишечной микрофлоры при дисбактериозах различного генеза ввиду неприжизнения и отторжения пробиотических микроорганизмов, поступающих энтерально с лечебной или профилактической целью.

**Ключевые слова:** гомопробиотические микроорганизмы, приживаемость в кишечнике, дисбактериоз, подавление секреции желудочного сока, элиминация.

### ВВЕДЕНИЕ

Для реализации концепции заместительной терапии [1] необходимо, чтобы пробиотические микроорганизмы достигли толстой кишки в жизнеспособном состоянии в количестве, достаточном для преодоления колонизаци-

### SUMMARY

The results are presented of studying the survival rate of homoprobiotic lactobacilli and bifidobacteria isolated from the feces of white mice of BALB/c line, in the intestine of conventional white mice with antibiotic-associated dysbacteriosis under conditions of the suppression of gastric juice secretion by preparation Pariet (proton pump inhibitor in the stomach, blocking the final step of acid production).

It is found that functionally active, labeled on the basis of rifampicin resistance homoprobiotic bifidobacteria and lactobacilli that administered orally to the conventional white mice with antibiotic-associated dysbacteriosis under conditions of the suppression of gastric juice secretion, do not survive in the intestines of animals and eliminates to 10 days after the cessation of administration.

The experimental data indicate the need to stimulate the restoration of their own intestinal microflora at dysbacteriosis of various origins due to rejection of probiotic microorganisms received enterally for therapeutic or prophylactic purposes.

**Key words:** homoprobiotic microorganisms, survival rate in the intestine, dysbacteriosis, suppression of gastric juice secretion, elimination

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

онной резистентности слизистой оболочки кишечника, и прижились в пристеночном слое, став составной частью микробиоценоза кишечника.

В то же время одним из основных выводов, сформулированных нами в ходе изучения выживаемости про-

\* Ссылка для цитирования: Чичерин И.Ю., Лундовских И.А., Погорельский И.П., Гаврилов К.Е., Янов С.Н., Дармов И.В. Влияние подавления секреции желудочного сока препаратом Париет на приживаемость бифидобактерий и лактобактерий в желудочно-кишечном тракте экспериментальных животных. Журнал Международной Медицины. - 2012. - №1(1). - С.98-104.

биотических микроорганизмов в модельных средах [2, 3], а также в желудочно-кишечном тракте экспериментальных животных [4], был вывод о значительном снижении количества жизнеспособных пробиотических бифидобактерий и лактобактерий, что является одной из причин, которая не позволяет им приживаться в кишечнике экспериментальных животных.

Использование в экспериментах в качестве модельных сред желудочного сока и дуоденального содержимого людей подтвердило факт значительного сокращения количества пробиотических микроорганизмов в исследуемых пробах, вплоть до единичных клеток в случае бифидобактерий [5]. При этом была установлена более высокая сохраняемость жизнеспособности бифидобактерий и лактобактерий в случае их инкубирования в желудочном соке пациента с пониженной кислотностью [5].

С учетом признания того, что кислотность желудочного сока может быть отнесена к разряду критических факторов, негативно влияющих на жизнеспособность пробиотических микроорганизмов, а также наряду с широким использованием кислотоустойчивых капсул с сухими коммерческими пробиотиками, представлялось целесообразным изучить выживаемость и приживаемость пробиотических микроорганизмов в пищеварительном тракте экспериментальных животных в условиях подавления секреции желудочного сока.

Таким действием обладает препарат Париет (международное непатентованное название рабепразол) [6]. Механизм действия препарата состоит в подавлении секреции желудочного сока путем специфического ингибирования  $H^+/R^+$ -АТФазы на секреторной поверхности париетальных клеток желудка.  $H^+/R^+$ -АТФаза представляет собой белковый комплекс, который функционирует как протонный насос, и, таким образом, Париет (рабепразол) является ингибитором протонного насоса (помпы) в желудке и блокирует финальную стадию продукции кислоты в желудке. После перорального приема Париета антисекреторный эффект развивается в течение часа. Величина ингибирующего действия Париета на секрецию кислоты в желудке достигает плато после трех дней приема. После прекращения приема секреторная активность восстанавливается в течение 1-2 дней [6].

**Цель настоящего исследования** – оценка выживаемости и приживаемости гомопробиотических бифидобактерий и лактобактерий в желудочно-кишечном тракте белых мышей в условиях подавления секреции желудочного сока препаратом Париет.

## Материалы и методы

В экспериментах использовали культуры бифидобактерий и лактобактерий, выделенные из фекалий мышей линии BALB/c – лабораторной линии домашних мышей, используемых в исследованиях по иммунологии и в онкологии [7]. Выделенные чистые культуры микроорганизмов были идентифицированы с использованием комплекса микробиологических и биохимических методов как бифидобактерии и лактобактерии.

Выращивание гомопробиотических бифидобактерий и лактобактерий проводили на плотных питательных средах рекомендованного состава [8, 9] в микроаэрофильных условиях с использованием системы для анаэробного культивирования (анаэробстат) Anaerobic system Mark III-LE003 (HiMedia Laboratories Pvt. LTD, Мумбаи, Индия) с пакетами газогенераторными HiAnaero Gas Pacet.

Общее количество микробных клеток в пересчете на 1 г фекалий животных определяли подсчетом в камере Горяева (модель 851, ЛПО «Красногвардеец», Россия).

Количество живых бифидобактерий и лактобактерий в содержимом кишечника, а также гомопробиотических микроорганизмов в суспензиях, определяли высевом соответствующих десятикратных серийных разведений изучаемых суспензий на плотные питательные среды в чашках Петри и подсчетом выросших колоний по истечении времени инкубирования. Выращивание эшерихий и подсчет выросших колоний проводили на агаре Эндо.

Селекцию спонтанных мутантов выделенных гомопробиотических бифидобактерий и лактобактерий проводили по отработанной методике [4, 10] на плотной питательной среде с рифампицином, используя антибиотик рифампицин – Ферейн (ЗАО «Брынцалов-А», Россия). Стабильность признака антибиотико-резистентности оценивали, характеризуя популяционный состав мутантов гомопробиотических бифидобактерий и лактобактерий по признаку антибиотико-резистентности (R-признаку). Электронную микроскопию исходных бифидобактерий и лактобактерий и их Rif<sup>r</sup>-производных (мутантов, устойчивых к рифампицину) проводили с помощью просвечивающего электронного микроскопа JEOL JEM-1200 EV. Просмотр препаратов после пробоподготовки вели при ускоряющем напряжении 72 кВ.

Для подавления секреции желудочного сока у белых мышей использовали препарат Париет (международное непатентованное название рабепразол), производитель «Эсai Ко», ЛТД, Япония, Токио [6].

В экспериментах по изучению выживаемости и приживаемости выделенных рифампицинустойчивых (Rif<sup>r</sup>-мутантов) бифидобактерий и лактобактерий в желудочно-кишечном тракте животных использовали конвенциональных белых мышей, обоего пола, массой 18-20 г, прошедших акклиматизацию в виварии. Антибиотико-ассоциированный дисбактериоз кишечника у белых мышей инициировали путем перорального введения гентамицина (продукция ОАО «Биохимик», Россия) [11].

Статистическую обработку результатов исследований проводили согласно рекомендациям, изложенным в руководстве И.П. Ашмарина и А.А. Воробьева [12].

## Результаты исследования

Экспериментальные данные, представленные в работе В.М. Коршунова и др. [13], а также данные, опубликованные нами в работе [14], свидетельствуют о целесообразности использования гомопробиотических микроорганизмов для изучения их приживаемости в кишечнике экспериментальных животных. Кроме того, дисбиотические изменения в кишечнике, вызванные пероральным введением гентамицина [4, 11], позволяют проследить судьбу гомопробиотических микроорганизмов и их маркированных производных (Rif<sup>r</sup>-мутантов) при энтеральном поступлении в организм животных в условиях подавления секреции желудочного сока препаратом Париет.

Гомопробиотические бифидобактерии и лактобактерии выделяли из фекалий белых мышей линии BALB/c. Отобранные фекалии суспендировали в изотоническом растворе хлорида натрия, после чего центрифугировали в центрифужных пробирках для осаждения фрагментов непереваренной пищи. Надосадочную жидкость использовали для посева на соответствующие плотные питательные среды для получения роста морфологически однородных изолированных колоний, их выделения, изучения морфологических и тинкториальных свойств бактерий, соответствия видовым характеристикам [14, 15].

На основании комплексного изучения свойств выделенных бактерий они были идентифицированы как

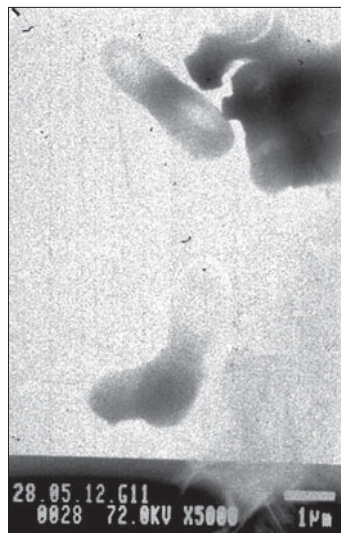
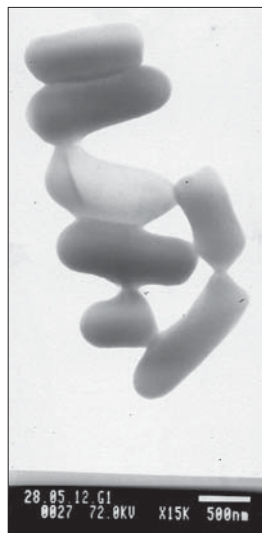


Рисунок 1 – Микроскопическая картина клеток исходных бифидобактерий (1) и их Rif<sup>r</sup>-мутантов (2).  
Электронная микроскопия. Ув. х 5000

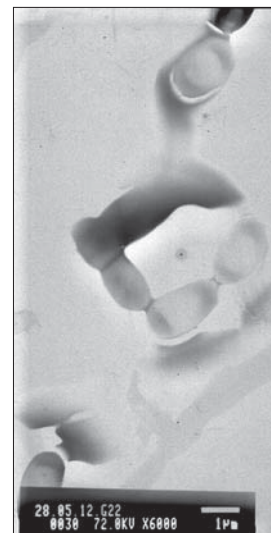
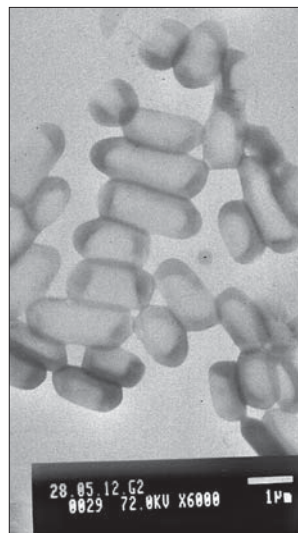


Рисунок 2 – Микроскопическая картина клеток исходных лактобактерий (1) и их Rif<sup>r</sup>-мутантов (2).  
Электронная микроскопия. Ув. х 6000

*Lactobacillus plantarum* и *Bifidobacterium bifidum* [15], которые были использованы в дальнейшей работе по получению их маркированных по устойчивости к рифампицину (Rif<sup>r</sup>-мутантов) производных. С учетом проведенных ранее экспериментов, результаты которых опубликованы в работе [4], мутанты бифидобактерий и лактобактерий получали, высевая выделенные гомопробиотические бактерии, а в последующем – отобранные спонтанные мутанты, на селективные плотные питательные среды с повышающимися концентрациями рифампицина от 10 мкг • мл<sup>-1</sup> до 150 мкг • мл<sup>-1</sup> [10].

Отобранные мутанты гомопробиотических бифидобактерий и лактобактерий, устойчивые к рифампицину, стабильно сохраняли признак антибиотико-резистентности. Изучение популяционного состава мутантных бактерий по признаку антибиотико-

резистентности на плотных питательных средах, содержащих рифампицин в концентрации 140 мкг • мл<sup>-1</sup>, свидетельствовало о сохранении бифидобактериями и лактобактериями наследственно закрепленного признака устойчивости к рифампицину (Rif<sup>r</sup>-признака).

Мутантные бактерии, как и исходные бифидобактерии и лактобактерии, являются грамположительными. На электронных микрофотографиях (рисунки 1, 2) представлены исходные и мутантные микробные телетки.

Их размеры соответствуют размерам типовых видов бифидобактерий и лактобактерий, указанным в руководстве Берджи [15]. Так, размер исходных бифидобактерий составляет 0,5-0,7 x 1,4-1,6 мкм, а их Rif<sup>r</sup>-мутантов 0,8-0,9 x 1,7-2,1 мкм; исходных лактобактерий 0,8-0,9 x 1,6-1,9 мкм, а их Rif<sup>r</sup>-мутантов 0,8-0,9 x 1,8-2,2 мкм. Мутантные бифидобактерии и

Таблица 1.

Динамика концентрации микроорганизмов в кишечном содержимом конвенциональных белых мышей при пероральном введении гентамицина ( $\bar{X} \pm I_{95}$ , n=6)			
Микроорганизмы	Содержание живых бактерий в 1 г фекалий на ... сутки эксперимента, КОЕ • г <sup>-1</sup>		
	начало эксперимента	2	7
Общее количество	$(7,2 \pm 0,5) \cdot 10^9$	$(7,6 \pm 0,6) \cdot 10^5$	$(3,6 \pm 0,7) \cdot 10^4$
Бифидобактерии	$(6,5 \pm 0,5) \cdot 10^6$	$(2,2 \pm 0,5) \cdot 10^4$	$(1,6 \pm 0,6) \cdot 10^2$
Лактобактерии	$(2,0 \pm 0,6) \cdot 10^8$	$(1,4 \pm 0,4) \cdot 10^6$	$(1,2 \pm 0,5) \cdot 10^3$
Эшерихии	$(1,5 \pm 0,5) \cdot 10^4$	$(2,2 \pm 0,5) \cdot 10^3$	$(1,9 \pm 0,7) \cdot 10^1$

Примечание – здесь и в таблице 2 «n» – количество повторных определений

Таблица 2.

Содержание Rif <sup>r</sup> -микроорганизмов в кишечном содержимом белых мышей с экспериментальным антибиотико-ассоциированным дисбактериозом на фоне введения препарата Париет, подавляющего секрецию желудочного сока ( $\bar{X} \pm I_{95}$ , n=10)												
Группа животных	Микроорганизмы	Содержание живых бактерий в 1 г фекалий на ... сутки эксперимента, КОЕ • г <sup>-1</sup>										
		1	2	4	7	9	12	14	15	16	17	24
Опытная группа белых мышей, получавших препарат Париет	Бифидобактерии	0	196±15	246±19	654±46	810±35	996±30	230±18	106±12	84±10	24±5	0
	Лактобактерии	0	232±19	288±22	696±40	845±40	1015±45	210±15	116±15	76±9	32±6	0
Контрольная группа белых мышей	Бифидобактерии	0	126±10	140±16	151±18	180±15	210±15	105±12	98±10	32±7	Единичные клетки	0
	Лактобактерии	0	132±6	148±12	160±19	196±20	220±20	118±15	96±12	24±6	Единичные клетки	0

лактобактерии сохранили свои видовые признаки: способность к росту на богатых питательных средах при температуре 37°C в микроаэрофильных условиях, морфологическую особенность колоний; бактерии каталазоотрицательные, активно сбраживают углеводы, желатину не разжижают (видовой признак лактобактерий) [15].

Культуры маркированных гомопробиотических бифидобактерий и лактобактерий, выросшие на плотных питательных средах при температуре 37°C в микроаэрофильных условиях, использовали в экспериментах по изучению их приживаемости в организме конвенциональных белых мышей с экспериментальным антибиотико-ассоциированным дисбактериозом. Для инициации дисбактериоза кишечника конвенциональным белым мышам в течение 7 дней перорально вводили дважды в сутки гентамицин в дозе 3 мг. В начале введения, на 2 и 7 сутки введения антибиотика у животных отбирали фекалии для бактериологического исследования. Всего в опытах было использовано 40 животных. Результаты опытов представлены в таблице 1.

Данные, представленные в таблице 1, свидетельствуют о выраженных дисбиотических изменениях микрофлоры кишечника у конвенциональных белых мышей под влиянием перорального введения гентамицина. Это проявляется снижением (на 5 порядков) как общего содержания микроорганизмов в пересчете на 1 г фекалий, так и отдельных представителей фекальной микрофлоры (на 3-5 порядков).

Для проведения последующих экспериментов животные с антибиотико-ассоциированным дисбактериозом были разделены на 2 группы по 20 особей в каждой. Животные первой группы были контрольными. Животным второй опытной группы перорально вводили препарат Париет сразу по завершении введения гентамицина. Суточную дозу препарата рассчитывали, исходя из инструкции по медицинскому применению для взрослых людей с учетом соотношения доз для различных видов животных в перерасчете на единицу поверхности тела, что составило 0,052 мг на одно животное.

Оценку влияния препарата Париет на понижение секреции желез желудка конвенциональных белых мышей исследовали на 4 сутки его введения животным. Оказалось, что у животных опытной группы кислотность содержимого в просвете желудка составила 6,1-6,9 ед. рН, а у животных контрольной группы 1,8-3,6 ед. рН, что в целом соответствует данным, представленным в работе Т.А. Замошиной с соавторами [16].

Животным опытной и контрольной групп пероральное введение гомопробиотических маркированных (Rif<sup>r</sup>) бифидобактерий и лактобактерий начинали на 5 сутки после завершения введения гентамицина *per os*, в течение которых его концентрация в кишечном содержимом животных значительно понизилась.

Важно подчеркнуть, что в отличие от животных контрольной группы животным опытной группы ежедневно в течение 5 суток перорально вводили препарат Париет для максимального проявления ингибирующего действия на базальную и стимулируемую секрецию кислоты в желудке [6]. В день начала введения гомопробиотических микроорганизмов обе группы животных, опытная и контрольная, были разделены на две подгруппы.

Животным одной подгруппы вводили гомопробиотические Rif<sup>r</sup>-мутанты бифидобактерий, а животным второй подгруппы – Rif<sup>r</sup>-мутанты лактобактерий. Суточная доза вводимых Rif<sup>r</sup>-бифидобактерий составила 130 тыс. бактерий в 2 приема, а Rif<sup>r</sup>-лактобактерий –

26 млн. бактерий в 2 приема с учетом переводного коэффициента для суточных доз препаратов Бифидумбактерин и Лактобактерин, указанных в инструкциях по их медицинскому применению у взрослых людей. Введение гомопробиотических Rif<sup>r</sup> микроорганизмов животным опытной группы осуществляли через 3 часа после перорального введения препарата Париет согласно инструкции по его медицинскому применению [6]. Отбор фекалий у животных опытной и контрольной подгрупп осуществляли ежедневно на протяжении всего срока наблюдения, составившего 14 суток и еще 5 суток после прекращения введения мутантных бактерий. Отобранные фекалии использовали для обнаружения в них гомопробиотических микроорганизмов, устойчивых к рифампицину.

Особо следует отметить, что аутофлора кишечника конвенциональных белых мышей с антибиотико-ассоциированным дисбактериозом оставалась чувствительной к рифампицину и не росла на плотной питательной среде с антибиотиком в концентрации 150 мкг • мл<sup>-1</sup> в микроаэрофильных условиях.

Результаты бактериологического изучения фекалий животных опытной и контрольной групп представлены в таблице 2.

Как следует из представленных в таблице 2 данных, в первые сутки после начала введения животным устойчивых к рифампицину бифидобактерий и лактобактерий в отобранных фекалиях не было обнаружено микробных клеток, способных расти на селективной плотной питательной среде с рифампицином в концентрации 150 мкг • мл<sup>-1</sup>. Появившиеся в фекалиях животных на вторые сутки после начала введения Rif<sup>r</sup>-бифидобактерий и Rif<sup>r</sup>-лактобактерий возрастали количественно, особенно в группе белых мышей, получавших препарат Париет: на 12 сутки их численность достигала примерно одной тысячи в перерасчете на 1 г фекалий. К этому же сроку численность устойчивых к рифампицину бифидобактерий и лактобактерий в 1 г фекалий животных контрольной группы была примерно в 5 раз меньше.

К 14 дню перорального введения гомопробиотических Rif<sup>r</sup>-микроорганизмов отмечено их понижение в фекалиях как опытной группы, так и контрольной группы. Начиная с 15 дня экспериментов, когда прекратили введение гомопробиотических Rif<sup>r</sup>-микроорганизмов животным обеих групп, происходило последовательное снижение их численности в фекалиях животных. В частности, на 17 день экспериментов в фекалиях животных контрольной группы были выявлены лишь единичные микробные клетки, а у животных опытной группы – не более трех десятков микробных клеток.

Необходимо отметить, что выделение гомопробиотических Rif<sup>r</sup>-микроорганизмов из кишечного содержимого белых мышей контрольной группы прекратилось на 4 день после окончания их перорального введения. В то же время выделение Rif<sup>r</sup>-микроорганизмов из кишечного содержимого животных опытной группы, получавших препарат Париет, продолжалось вплоть до 24 дня экспериментов (т.е. до 10 дня после прекращения их перорального поступления в организм подопытных животных).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что в условиях подавления секреции желудочного сока у белых мышей опытной группы под влиянием перорального введения препарата Париет гомопробиотические бифидобактерии и лактобактерии продолжают персистировать в кишечнике животных довольно продолжительное время. Наличие их более высоких концентраций в кишечном содержимом позволяет утверждать, что микроорганизмы

успешно преодолевают кислотный барьер желудка, и вся популяция гомопробиотических микроорганизмов имеет потенциальную возможность для приживания.

Однако щелочной барьер кишечника, колонизационная резистентность, антагонизм резидентной микрофлоры и другие естественные механизмы не позволяют в полной мере проявиться потенциалу гомопробиотических микроорганизмов, которые постепенно, особенно после прекращения их перорального введения животным, элиминируются из кишечника, и на 24 день эксперимента не обнаруживаются в кишечном содержимом.

### Обсуждение полученных результатов

Настоящие исследования являются прямым продолжением выполненных нами ранее исследований, в ходе которых было экспериментально установлено, что рифампициноустойчивые мутанты гомопробиотических микроорганизмов – бифидобактерий и лактобактерий в полной мере сохранили свою видовую принадлежность и могут быть использованы для оценки их приживаемости в кишечнике конвенциональных белых мышей с антибиотико-ассоцированным дисбактериозом.

Этими исследованиями было показано, что рифампициноустойчивые бифидобактерии и лактобактерии не приживаются в кишечнике животных и элиминируются соответственно к 3 и 5 суткам после прекращения перорального введения животным. В этой связи было сделано заключение о необходимости стимулирования при дисбактериозах восстановления собственной кишечной микрофлоры, а не полагаться только на возможное заместительное действие поступающих извне в кишечник пробиотических микроорганизмов.

Тем не менее закономерна постановка вопроса о влиянии на выживаемость, а в последующем и на приживание в биопленке кишечника гомопробиотических микроорганизмов, кислоты желудочного сока. Логично предположить, что устранение кислотного барьера (имитация использования кислотоустойчивых капсул) на пути гомопробиотических бифидобактерий и лактобактерий будет способствовать сохранению максимально возможного их количества при пероральном введении как в желудке лабораторных животных, так и в кишечнике.

При этом более высокая численность популяций гомопробиотических микроорганизмов, преодолевших кислотно-щелочной барьер желудочно-кишечного тракта, возможно будет содействовать и преодолению колонизационной резистентности естественной микрофлоры кишечника или ее измененного видового и количественного состава при экспериментальном антибиотико-ассоциированном дисбактериозе. В последнем случае создаются более предпочтительные условия для приживания гомопробиотических микроорганизмов.

С целью изучения приживаемости выделенных гомопробиотических бифидобактерий и лактобактерий были получены их маркированные производные с наследственно закрепленным признаком устойчивости к антибиотикам рифампицину. Указанные рифампициноустойчивые мутанты сохранили свои видовые признаки, что обусловило возможность их дальнейшего использования в экспериментах на конвенциональных белых мышах с антибиотико-ассоцированным дисбактериозом в условиях медикаментозного ингибирования секреторной деятельности желудка препаратом Париет. Активным веществом препарата Париет является рабепразол натрия, относящийся к классу антисекреторных веществ, производных бензимидазола [6]. Рабепразол натрия является ингибитором протонного насоса в желудке и блокирует финальную стадию продукции кислоты.

Таким образом, у подопытных конвенциональных белых мышей был инициирован антибиотико-ассоциированный дисбактериоз и медикаментозно была подавлена секреция желудочного сока. Обеспечение данных условий позволило с одной стороны проследить судьбу гомопробиотических бифидобактерий и лактобактерий, устойчивых к рифампицину, после их перорального введения подопытным животным, а с другой – создать условия для их максимальной выживаемости в ЖКТ и возможного приживания. Вводимая доза гомопробиотических микроорганизмов соответствовала, с учетом переводного коэффициента, суточной дозе пробиотиков Бифидумбактерин и Лактобактерин для людей.

Бактериологическое изучение фекалий животных опытной и контрольной (без введения препарата Париет) групп путем посева на специальную селективную плотную питательную среду с рифампицином (150 мкг • мл<sup>-1</sup>) и подсчета выросших на ней колоний бактерий позволило установить, что гомопробиотические бифидобактерии и лактобактерии появляются в содержимом толстой кишки на 2 сутки после начала их перорального введения животным.

В дальнейшем количество гомопробиотических бифидобактерий и лактобактерий в кишечном содержимом нарастало. Причем в группе животных, получавших препарат Париет, уже на 4 сутки после начала перорального введения гомопробиотических микроорганизмов численность последних в перерасчете на 1 г фекалий примерно в 2 раза превышала численность аналогичных микроорганизмов в фекалиях животных контрольной группы. Более быстрые темпы роста гомопробиотических микроорганизмов в фекалиях животных опытной группы отмечались вплоть до 12 суток от начала их перорального введения животным: в 1 г фекалий их количество достигало примерно 1000 КОЕ; в фекалиях животных контрольной группы количество гомопробиотических бифидобактерий и лактобактерий в 1 г фекалий было меньше примерно в 5 раз.

Таким образом, в условиях подавления секреции желудочного сока у животных опытной группы перорально вводимые гомопробиотические микроорганизмы получали определенное селективное преимущество перед аналогичными микроорганизмами, введенными в желудок животных контрольной группы. Тем не менее, перорально вводимые гомопробиотические бифидобактерии и лактобактерии, начиная с 14 суток эксперимента, когда было прекращено их поступление в желудок, стали снижаться численно в кишечном содержимом животных опытной и контрольной групп. Полное прекращение выделения с фекалиями гомопробиотических бифидобактерий и лактобактерий в контрольной группе животных наступило на 8 сутки, а в опытной группе животных – на 10 сутки после прекращения введения.

Таким образом, несмотря на специально созданные условия в организме подопытных конвенциональных белых мышей – фактическое устранение кислотного барьера в желудке и значительное уменьшение (конкуренции) численности естественной кишечной микрофлоры, которые, казалось бы, должны обеспечить сохранение численности популяции вводимых гомопробиотических микроорганизмов и их приживание в составе биопленки кишечника, в действительности приживания не произошло.

Это еще раз подтверждает существование видовой, тканевой и индивидуальной специфичности пробиотических, а также гомопробиотических микроорганизмов и их несовместимость с резидентной микрофлорой кишечника нового хозяина, что является основанием для

корректировки взглядов на существующий принцип заместительного действия пробиотикотерапии на основе живых микроорганизмов.

### Выводы

1. Получены маркированные гомопробиотические бифидобактерии и лактобактерии, выделенные из фекалий линейных белых мышей BALB/c, стабильно сохраняющие видовые характеристики и признак устойчивости к рифампицину.

2. Изучена приживаемость маркированных гомопробиотических бифидобактерий и лактобактерий в кишечнике конвенциональных белых мышей с антибиотикоассоцированным дисбактериозом в условиях подавления секреции желудочного сока препаратом Париет – ингибитором протонного насоса в желудке, блокирующим финальную стадию продукции кислоты.

3. Установлено, что функционально активные гомопробиотические рифампициноустойчивые бифидобактерии и лактобактерии, введенные перорально конвенциональным белым мышам с антибиотикоассоцированным дисбактериозом и медикаментозным подавлением секреции желудочного сока, не приживаются в кишечнике нового хозяина и элиминируются к 10 суткам после прекращения их введения, что в очередной раз ставит под сомнение существующий принцип заместительной терапии.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Отраслевой стандарт «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника» (ОСТ 91599.11.0004-2003), утв. приказом № 231 МЗ РФ от 09.06.2003 г. М., 2003.
2. Дармов И.В., Чичерин И.Ю., Погорельский И.В., Лундовских И.А. Выживаемость микроорганизмов пробиотиков в условиях *in vitro*, имитирующих процесс пищеварения у человека. *Эксп. клин. гастроэнтерол.* 2011; (3): 6-11.
3. Дармов И.В., Чичерин И.Ю., Ердякова А.С., Погорельский И.В., Лундовских И.А. Сравнительная оценка выживаемости микроорганизмов пробиотиков в составе коммерческих препаратов *in vitro*. *Эксп. клин. гастроэнтерол.* 2011; (9): 96-101.

4. Дармов И.В., Чичерин И.Ю., Погорельский И.В., Лундовских И.А. Дурнев Е.А. Выживаемость микроорганизмов пробиотиков в желудочно-кишечном тракте экспериментальных животных. *Журн. инфектологии* 2012; 4 (1): 68-74.
5. Чичерин И.Ю., Дармов И.В., Погорельский И.В., Лундовских И.А., Гаврилов К.Е. Выживаемость бифидобактерий и лактобактерий в условиях *in vitro* в желудочном соке и дуоденальном содержимом людей. *Медицинский альманах* 2012; (1): 57-59.
6. Инструкция по медицинскому применению препарата Париет. Производитель Эсаи Ко. ЛТД, Япония. Регистрационный номер П N0118890/01.
7. Potter M. History of the BALB/c family. *The BALB/c mouse: Genetic and immunology. Cur Top Microbiol Immunol.* 1985; 122: 1-15.
8. Иванов В.П., Бойцов А.Г., Коваленко А.Г., Ластовка О.Н., Нилова Е.А. Совершенствование методов диагностики дисбактериоза толстого кишечника: информационное письмо, СПб: Центр госсанэпиднадзора 2002; 31 с.
9. Лихачева А.Ю., Бондаренко В.М., Соколова К.Я. Современное состояние вопроса таксономии бактерий рода *Lactobacillus*. *Журн. микробиол.* 1992; (9-10): 74-78.
10. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. Пер. с англ. Ю.Н.Зюграфа, Т.С.Ильиной: М: Мир, 1976. – 436 с.
11. Заявка на выдачу патента РФ. Способ моделирования дисбактериоза кишечника у лабораторных животных. И.В.Дармов, И.Ю.Чичерин, И.В.Погорельский, И.А.Лундовских; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВПО «Вятский государственный университет», № 2011149501/17 (074291); заявл. 15.12.2011.
12. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л: Медгиз, 1962; 280 с.
13. Коршунов В.М., Сеницына Н.А., Гиноман Г.А., Пинегин Б.В. Коррекция микрофлоры кишечника при химиотерапевтических дисбактериозах с помощью аутоштаммов бифидобактерий и лактобактерий. *Журн. микробиол.* 1985; (9): 20-25.
14. Чичерин И.Ю., Погорельский И.В., Дармов И.В., Лундовских И.А., Гаврилов К.Е. Пробиотики: вектор развития. *Практич. медицина* 2012; (3): 185-193.
15. Определитель бактерий Берджи: Девятое издание в 2 т. Т.2. Под ред. Дж.Хоулта, Н.Крига, П.Смита, Дж.Стейли, С.Уилльямса. Пер. с англ. под ред. Г.А.Заварзина; М: Мир, 1997; 368 с.
16. Замошина Т.А., Никифоров Л.А., Просекина Е.Ю., Томова Т.А. Биологическая активность спиртовых извлечений из ряски малой (*Zemna minor L.*) в отношении процесса воспаления. *Вестн. Томского гос. университета. Биология.* 2011; (2): 73-80.