

**А.И. Калмыкова, Н.А. Пальчикова, Н.П. Бгатова,
Ю.Г. Дружинина, В.Г. Селятицкая**

СИСТЕМНАЯ РЕАКЦИЯ ОРГАНИЗМА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ НА ДЛИТЕЛЬНЫЙ ПРИЕМ ПРОБИОТИКА

ГУ Научный центр клинической и экспериментальной медицины СО РАМН

ГУ Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии СО РАМН
ЗАО «Био-Веста», Новосибирск

Исследовано влияние длительного приема комплексного пробиотика «Биовестин-Лакто» на состояние микробиоценоза, слизистую кишечника и гормонально-метаболические показатели у экспериментальных животных. Показано, что использование пробиотика приводит к фазному изменению состава микробиоты кишечника, усилению барьерных свойств слизистой оболочки тонкой кишки и оказывает модулирующее влияние на иммунные и обменные процессы в организме экспериментальных животных, зависящее от длительности его применения.

Ключевые слова: пробиотик, экспериментальные животные, микробиоценоз, слизистая кишечника, гормонально-метаболические показатели

Результаты исследований отечественных авторов показали, что в нашей стране более чем у половины населения выявляются микробиологические нарушения в кишечнике, т.е. дисбактериоз. Многие заболевания желудочно-кишечного тракта в 100% случаев сопровождаются синдромом дисбактериоза кишечника. Он также проявляется при целом ряде заболеваний и патологических состояний внекишечной локализации: при респираторно-вирусных и гнойно-септических инфекциях, заболеваниях урогенитального тракта, аллергопатологии, у реанимационных больных, при беременности, стрессах и т.д. [1]. Это обусловлено тем, что нормальная микрофлора является обязательным и полноправным участником многих физиологических процессов, протекающих в органах и тканях хозяина: пищеварения, выделения, дыхания, дифференцировки клеток, регуляции газового состава полостей и жидкостей, водно-солевого обмена, физико-химического гомеостаза, метаболизма углеводов, белков, липидов, стероидов, желчных кислот, детоксикации экзо- и эндогенных субстратов и метаболитов, продукции биологически активных соединений [6].

Существуют различные способы специфического воздействия на микробиоценоз, которые направлены на восстановление и поддержание эндоекологии кишечника. Одним из подходов к проблеме коррекции нарушений кишечной микрофлоры является использование живых микроорганизмов. Они входят в состав бактериальных

препаратов, которые получили название пробиотиков [10]. Многочисленные исследования показали высокую эффективность пробиотиков в дерматологии, акушерстве, гинекологии, стоматологии, при заболеваниях опорно-двигательного аппарата, ревматизме, туберкулезе, сахарном диабете и другой патологии [1].

Учитывая зависимость многих процессов жизнедеятельности в макроорганизме от индигенной микрофлоры, можно предположить, что пробиотики имеют достаточно широкий спектр эффектов не только в кишечнике, но и системных, которые необходимо учитывать при их использовании в профилактических и лечебных целях. В последнее время увеличивается количество исследований, демонстрирующих иммуномодулирующие эффекты пробиотиков. Они обладают регулирующим влиянием на продукцию цитокинов, функциональную активность фагоцитирующих клеток, стимулируют синтез иммуноглобулинов и т.д. [9].

Целью настоящего исследования было изучение влияния длительного приема пробиотиков на слизистую кишечника и гормонально-метаболические показатели у экспериментальных животных, получавших в течение длительного времени комплексный пробиотик «Биовестин-Лакто».

Методика

Эксперименты были проведены на 27 половозрелых белых лабораторных крысах-самцах Вистар, полученных из питомника Института

цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск). Содержание, питание, уход за животными и выведение их из эксперимента осуществляли в соответствии с требованиями «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу МЗ СССР от 12.08.1977 г. № 755).

Ежедневно утром животным из опытной группы (n=15) вводили *per os* по 0,5 мл комплексного пробиотика «Биовестин-Лакто» (ЗАО «Био-Веста», Новосибирск), содержащего 2 штамма бифидобактерий (*Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium adolescentis*), 1 штамм лактобактерий (*Lactobacillus plantarum*), продукты метаболизма представителей индигенной микрофлоры. Крысы из контрольной группы (n=12) по той же схеме получали по 0,5 мл молока.

В ходе эксперимента проводили изучение видового состава микрофлоры; морфологическое исследование слизистой оболочки тонкого и толстого кишечника; измеряли массу тела и внутренних органов животных; уровни метаболитов — глюкозы, холестерина, триглицеридов — и гормонов — кортикостерона, тестостерона; иммунореактивного инсулина (ИРИ) в крови; активность ферментов — аспартатаминотрансминазы (АСТ), аланинаминотрансминазы (АЛТ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в печени.

Изучение видового состава микрофлоры проводили бактериологическим методом.

Определение процентного соотношения клеток в собственной пластинке слизистой тонкой и толстой кишки проводили на полутонких срезах (1 мкм), окрашенных толуидиновым голубым, с помощью светооптического микроскопа при использовании квадратной тестовой системы (площадью 6400 мкм²). Долю межэпителиальных лимфоцитов (МЭЛ) и бокаловидных клеток в эпителиальной выстилке кишечных ворсинок и крипт определяли на тех же срезах из расчета на 100 энтероцитов.

Определение концентрации глюкозы, холестерина, триглицеридов в крови проводили с использованием наборов «FLUTEST GLU», «FLUTEST CHOL», «Biosub TG» (Bioscon, Германия), активности ферментов в печени — с использованием наборов Biozyme (Bioscon, Германия).

Содержание гормонов в сыворотке крови измеряли радиоиммунным или иммуноферментным методами с использованием следующих наборов: кортикостерон — производства ВЕКТОР-Бест (Новосибирск); тестостерон — СтероидИФА-тестостерон-01 (Алкор Био, Санкт-Петербург); ИРИ — IRMAZENco INSULIN (ZenTech, Бельгия).

Статистическую обработку материала проводили с использованием пакета статистических про-

грамм Statistica 5.5 («StatSoft», США). Значения в таблице представлены как $M \pm m$, где M — среднее арифметическое значение, m — стандартная ошибка среднего. Достоверность различий между средними значениями после проведения дисперсионного анализа оценивали при помощи методов множественного сравнения (критерий Стьюдента с поправкой Бонферони и критерий Даннета). Вероятность справедливости нулевой гипотезы была принята при 5% уровне значимости.

Результаты

Видовой состав микрофлоры обследованных отделов тонкого и толстого кишечника контрольных крыс был представлен преимущественно кишечной палочкой (10^4 - 10^6 и 10^4 - 10^7 КОЕ/г), бифидобактериями (10^6 - 10^7 и 10^6 КОЕ/г), лактобактериями (10^4 - 10^5 и 10^4 - 10^5 КОЕ/г), энтерококками (10^4 - 10^5 и 10^4 КОЕ/г). В единичных случаях встречались лактозонегативная и гемолизированная кишечные палочки, клебсиелла и энтеробактер. Практически полное отсутствие патогенной микрофлоры в биотопах тонкой и толстой кишки крыс является следствием стандартных условий содержания и использования специализированных сертифицированных кормов для животных (комбикорм ПК-120-1).

В ходе эксперимента количество кишечной палочки у опытных крыс не претерпело заметных изменений. В тонком кишечнике животных, получавших пробиотик в течение 21 дня, содержание бифидо- и лактобактерий увеличилось до 10^7 КОЕ/г, а через 35-56 дней эксперимента — вернулось к исходному состоянию.

В толстом кишечнике опытных крыс через 21 день приема пробиотика количество бифидо- и лактобактерий также увеличилось до 10^7 КОЕ/г. В отличие от тонкой, в толстой кишке через 35-56 дней эксперимента содержание этих бактерий оставалось повышенным: бифидобактерий — 10^6 - 10^7 , лактобактерий — 10^5 - 10^7 КОЕ/г.

Содержание энтерококков в обоих обследованных отделах кишечника опытных крыс увеличилось через 21 день приема пробиотика до 10^5 - 10^6 КОЕ/г, через 35 дней — до 10^5 - 10^7 КОЕ/г, а через 56 дней вернулось к исходному уровню. Повышение содержания энтерококков может быть связано с процессами восстановления соотношения анаэробных и аэробных представителей микрофлоры. Снижение содержания энтерококков к 56-му дню связано с понижением концентрации бифидобактерий в тонкой кишке и нормализацией содержания анаэробной флоры в толстом кишечнике.

Таким образом, наиболее существенное увеличение содержания бифидо-, лактобактерий и энтерококков в обоих отделах кишечника крыс

было отмечено через 21-35 дней приема животными пробиотика «Биовестин-Лакто».

Морфологическое исследование тонкого и толстого кишечника крыс показало, что наиболее значимые эффекты приема пробиотика проявляются изменением соотношения клеток в эпителиальной выстилке слизистой оболочки и в диффузной лимфоидной ткани собственной пластинки, а также эозинофилией последней. Содержание макрофагов, тучных клеток и фибробластов в собственной пластинке слизистой оболочки как подвздошной, так и толстой кишки в исследованные сроки эксперимента не менялись.

Направленность, синхронность и амплитуда изменений в структурной организации компонентов тканевых микрорайонов тонкого и толстого кишечника крыс, получавших пробиотик, имели свою специфику. На рисунках 1 А, Б показано изменение (в % от контроля) показателей состояния слизистой кишечника крыс, получавших «Биовестин-Лакто».

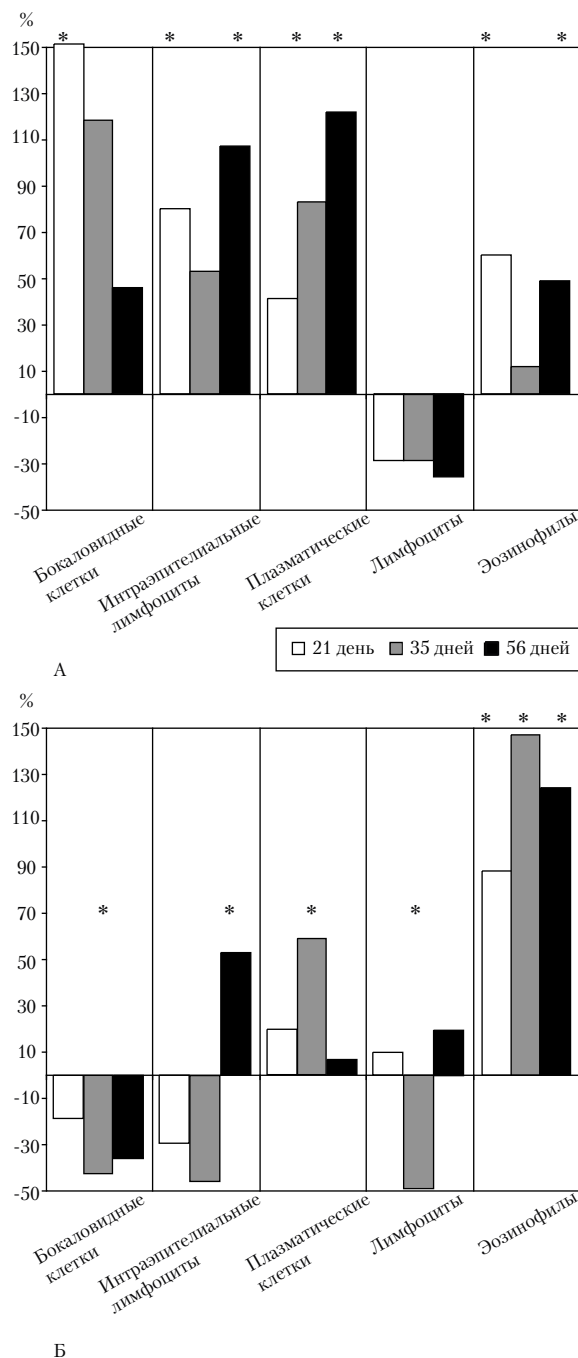
Видно, что у животных, получавших пробиотик, возрастало количество бокаловидных клеток и МЭЛ в эпителиальной выстилке подвздошной кишки (Рис. 1А). В собственной пластинке слизистой оболочки тонкой кишки опытных животных на 21-й день эксперимента достоверно увеличивалось количество эозинофилов, на 35-й день — плазматических клеток, и через 56 дней количество тех и других клеток оставалось выше контрольного уровня.

В эпителиальной выстилке толстого кишечника опытных крыс через 35 дней приема пробиотика отмечено снижение количества бокаловидных клеток, а через 56 дней — увеличение МЭЛ (Рис. 1Б). В собственной пластинке слизистой оболочки толстой кишки опытных животных на 35-й день опыта отмечено увеличение количества плазматических клеток и снижение — лимфоцитов, а через 56 дней количество этих клеток возвращалось к исходным значениям. Содержание эозинофилов на протяжении всего эксперимента было в 2 раза выше контрольного уровня.

Слизь, выделяемая бокаловидными клетками, содержит ингибиторы роста микроорганизмов. Увеличенное слизиобразование за счет роста числа бокаловидных клеток в подвздошной кишке может быть одной из причин постепенного снижения содержания исследованных бактерий до исходного уровня, несмотря на продолжающееся ежедневное алиментарное поступление пробиотика в организм животных. Это предположение подтверждается полученными результатами. Так, на фоне уменьшения к 56-му дню эксперимента повышенного в начале приема пробиотика содержания микроорганизмов в тонкой кишке снизи-

лось до исходных значений и количество бокаловидных клеток в эпителиальной выстилке.

В толстом кишечнике — биотопе с высокой степенью микробной обсемененности, где исходное количество бокаловидных клеток было в 3,5 раза выше, чем в подвздошной кишке ($49,5 \pm 5,7$ и $14,2 \pm 2,8$ соответственно, $p < 0,01$), подобной защитной реакции со стороны слизистой оболочки



Б

Рис. 1. Изменение показателей состояния слизистой оболочки кишечника крыс в динамике приема пробиотика (в % к контролю): А — подвздошная кишка; Б — толстая кишка. * — отличия достоверны с контролем ($P < 0,05$)

в ответ на дополнительное введение микроорганизмов в составе пробиотика отмечено не было.

Межэпителиальные лимфоциты, представляющие собой преимущественно CD8⁺-Т-клетки, находятся в постоянном длительном контакте с антигенами кишечного просвета через эпителиальный слой и являются первой структурой иммунной системы, которая отвечает на эти антигены [7]. Известно, что лактобактерии способны стимулировать дифференцировку МЭЛ в сторону супрессорного и цитотоксического фенотипов [4]. С помощью взаимодействия Т-супрессоров и кишечного эпителия поддерживается алиментарная толерантность к внешним антигенам, находящимся в просвете кишечника [7].

Количество лимфоцитов в собственной пластинке слизистой кишечника, представленных в основном Т-хелперами типа CD4⁺ [7], у крыс, получавших пробиотик, имело тенденцию к снижению. Количество плазматических клеток в собственной пластинке, наоборот, постоянно увеличивалось в ходе эксперимента. Увеличение МЭЛ и плазматических клеток в слизистой оболочке стенки кишки свидетельствует, что ежедневное поступление пробиотика в организм животных вызывает иммунный ответ, прежде всего в структурированной лимфоидной системе кишечника.

Установлено, что 90% плазматических клеток, т.е. зрелых В-лимфоцитов, в собственной пластинке секретируют Ig A, который является активным компонентом иммунной системы слизистых оболочек не только кишечника, но и других органов [7]. Иммуноглобулины обеспечивают подведение патогенных субстанций к клеткам, име-

ющим специальные биохимические механизмы деструкции [2]. К таковым, в частности, относятся эозинофилы, количество которых, по нашим данным, увеличивается в слизистой кишечника в ответ на прием пробиотика, что согласуется и с данными литературы [8].

Структурными признаками возрастания барьерных свойств слизистой оболочки кишки являлись: возрастание количества бокаловидных клеток, образующих протективный секрет — высокомолекулярный гликопротеин муцин; повышение количества эозинофилов, являющихся антагонистами тучных клеток и способствующих снижению проницаемости мембран и возрастанию вязкости внеклеточного матрикса; увеличение количества МЭЛ и плазматических клеток, осуществляющих местный иммунный гомеостаз.

В таблице 1 приведены результаты измерения гормонально-биохимических показателей у контрольных и опытных животных.

Видно, что количество показателей со статистически значимыми отклонениями от контрольных уровней в динамике эксперимента было невелико: в крови отмечено достоверное увеличение содержания триглицеридов на 21-й день, холестерина — на 35-й день и глюкозы — на 56-й день эксперимента; активность ЛДГ в печени достоверно снизилась у крыс, получавших пробиотик в течение 21 дня. Статистически значимых изменений в уровнях кортикостерона и тестостерона выявлено не было. Однако обращает на себя внимание скоординированная фазность колебаний их уровней. Так, на 21-й день выявлено снижение содержания в крови кортикостерона на 30% относительно исходного уровня, при этом содержание тестостеро-

Таблица 1

Гормонально-биохимические показатели крыс в динамике приема пробиотика

Показатель	Контроль (n=12)	Длительность приема пробиотика «Биовестин-Лакто»			Р
		21 день (n=5)	35 дней (n=5)	56 дней (n=5)	
	1	2	3	4	
Глюкоза, ммоль/л	6,6±0,2	6,6±0,2	6,4±0,2	7,5±0,2	1,2,3-4<0,05
Холестерин, ммоль/л	1,67±0,09	1,69±0,07	1,97±0,06	1,82±0,08	1-3<0,05
Триглицериды, ммоль/л	1,35±0,15	2,00±0,24	1,22±0,24	1,35±0,20	2-1,4<0,05
Кортикостерон, нмоль/л	69,8±5,9	51,2±4,4	70,4±4,5	67,7±4,0	
Тестостерон, нмоль/л	10,6±2,5	13,6±4,7	7,6±1,0	13,5±6,7	
Иммунореактивный инсулин (ИРИ), пкмоль/мл	15,5±1,4	13,7±1,8	12,1±1,2	18,1±1,5	
ИРИ/глюкоза, усл.ед	2,38±0,24	2,10±0,30	1,87±0,24	2,43±0,21	
Аспаратаминотрансфераза (АСТ), Ед/мг белка	2,47±0,25	1,75±0,19	2,13±0,25	1,85±0,32	
Аланинаминотрансфераза (АЛТ), Ед/мг белка	1,21±0,20	0,76±0,15	1,36±0,33	1,17±0,25	
Лактатдегидрогеназа (ЛДГ), Ед/мг белка	14,8±0,7	10,0±0,4	14,4±0,9	12,8±2,3	1-2<0,05

на возрастало также на 30%. Через 35 дней уровень кортикостерона возрастал до 100%, а тестостерона — снижался до 70% от исходных значений. Через 56 дней содержание кортикостерона не изменялось, а тестостерона — увеличивалось, что указывает на превалирование анаболических процессов при длительных сроках приема пробиотика.

Выраженные колебания средних значений, отмеченные для показателей, характеризующих углеводно-липидный обмен, могут быть связаны с тем, что в кишечнике в качестве конечных продуктов процессов ферментации различных субстратов кишечной микрофлорой образуются так называемые короткоцепочечные жирные кислоты, например пропионовая, молочная, уксусная и др., которые активно включаются в метаболизм организма хозяина. Пропионовая кислота транспортируется в печень и включается в гликонеогенез, уксусная поступает в ткани в качестве энергетического субстрата, масляная служит источником энергии для клеток кишечного эпителия [3]. Изменение пула ацетата, пропионата и других карбоновых кислот может менять и количество синтезируемого холестерина в организме [5].

Заключение

Таким образом, длительный прием пробиотиков экспериментальными животными вызывало изменения функциональной активности различных систем организма. Изменения как гормонально-биохимических, так и морфометрических показателей у животных, получавших пробиотик, носили фазный характер. Выраженность этих изменений была наибольшей в системах, непосредственно контактирующих с принимаемыми микроорганизмами. Так, амплитуда изменений для морфометрических показателей слизистой оболочки кишечника составила -46% ... +150% от исходного уровня. Для гормонально-биохимических показателей амплитуда изменений была меньше (-37% ... +60%). Результирующим эффектом этих изменений явилось увеличение в 1,4 раза относительной массы жировых депо крыс, получавших пробиотик в течение 56 дней, по сравнению с контрольными животными ($3,4 \pm 0,4$ и $2,4 \pm 0,2$ г/100г массы тела соответственно, $p < 0,05$). Полученные данные согласуются с результатами измерения уровня гормонов в крови, которые указывают на преобладание к этому сроку активности анаболических процессов. Следовательно, прием пробиотиков оказывает множественные эффекты, которые затрагивают разные стороны жизнедеятельности организма, включая активность иммунной и эндокринной систем.

Systemic response of experimental animals' organism on a prolonged intake of probiotic

A.I. Kalmykova, N.A. Palchikova, N.P. Bgatova,
Yu.G. Druzhinina, V.G. Selyatitskaya

There has been studied the influence of a prolonged intake of the «Biovestin-Lacto» probiotic on state of microbiocenosis, bowels mucous and hormonal metabolic indices in experimental animals. It is shown that intake of the probiotic leads to phase changes of bowels microbiote composition, increases the barrier properties of small intestine mucous tunica and has modulating impact on the immune and metabolic processes in experimental animals' organism, depending on intake duration.

Литература

1. Воробьев А.А. Микроэкологические нарушения при клинической патологии и их коррекция бифидосодержащими пробиотиками / А.А. Воробьев, В.М. Бондаренко, Е.А. Лыкова и др. // Вестник РАМН. — 2004. — № 2. — С.13-17.
2. Игнатъева Г.А. Современные представления об иммунитете (Контуры общей теории) // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. — 2003. — № 2. — С. 2-7.
3. Микрофлора кишечника: метаболические эффекты и роль в регуляции моторной функции желудочно-кишечного тракта // Международный бюллетень: гастроэнтерология, 2003. — № 12.
4. Николаева Т.Н. Иммуностимулирующая и антиканцерогенная активность нормальной лактофлоры кишечника / Т.Н. Николаева, В.В. Зорина, В.М. Бондаренко // Терапевтическая гастроэнтерология. — 2004. — № 4. — С. 39-44.
5. Петухов В.А. Нарушения функций печени и дисбиоз при липидном дистресс-синдроме Савельева: современный взгляд на проблему / В.А. Петухов, Л.А. Стернина, А.Е. Травкин // Consilium medicum. — 2004. — Т. 6. — № 6. — С. 406-412.
6. Пименов Е.В. Современные представления о патогенезе инфекционных заболеваний / Е.В. Пименов, А.А. Тотолян, А.А. Бывалов и др. // Вестник РАМН. — 2003. — № 6. — С. 3-9.
7. Трушина Э.Н. Лимфоидная система кишечника и иммуномодулирующее действие пробиотиков / Э.Н. Трушина, О.К. Мустафина, Д.Б. Никитюк // Вопросы питания. — 2004. — № 6. — С. 49-53.
8. Хавкин А.И. Микробиоценоз кишечника и иммунитет // Русский медицинский журнал. — 2003. — Т. 11. — № 3. — С. 122-125.
9. Хорошилова Н.В. Иммунотерапевтические аспекты применения пробиотиков в клинической практике // Лечащий врач. — 2003. — № 2. — С. 71-73.
10. Lebenthal E. Пробиотики: концепция лечебного применения, ожидающая своего признания / E. Lebenthal, Y. Lebenthal // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 2003. — № 4. — С. 88-90.