

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ им. И.П. ПАВЛОВА

На правах рукописи

БОРЩЕВ

Юрий Юрьевич

**ВЛИЯНИЕ ПРОБИОТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ НА КИШЕЧНЫЕ
ПИЩЕВАРИТЕЛЬНЫЕ ФЕРМЕНТЫ У КРЫС ПРИ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ДИСБИОЗЕ**

03.03.01 – физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2012

Работа выполнена в лаборатории физиологии питания
Федерального Государственного Бюджетного Учреждения Науки
Института физиологии им. И.П. Павлова РАН

- Научный руководитель: доктор биологических наук
Громова Людмила Викторовна
- Официальные оппоненты: доктор биологических наук, чл.- корр. РАН
Филаретова Людмила Павловна
ФГБУН Институт физиологии
им. И.П.Павлова РАН
- доктор медицинских наук
Шемеровский Константин Александрович
ФГБУ Научно-исследовательский институт
экспериментальной медицины СЗО РАМН
- Ведущая организация: ФГБУН Институт эволюционной физиологии и
биохимии им. И.М. Сеченова РАН

Защита диссертации состоится “ 19 “ ноября ” 2012 года в 13 часов на заседании
Диссертационного совета по защите докторских и кандидатских диссертаций
(Д002.020.01) при ФГБУН Институте физиологии им. И.П. Павлова РАН
(199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУН Института
физиологии им. И.П.Павлова РАН

Автореферат разослан « _____ » _октября_ 2012 года.

Ученый секретарь Диссертационного совета,
доктор биологических наук

Н.Э. ОРДЯН

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Одним из важнейших достижений в области физиологии и медицины в последние десятилетия явилось установление того факта, что микрофлора, населяющая организм человека и животных, не только полезна, но и необходима для его жизнедеятельности. Этим определяется актуальность исследования влияния живых бактерий, входящих в состав нормальной микробиоты человека и животных, на организм в целом и его различные системы в норме и при различных нарушениях состава микробиоты.

Известно, что наиболее многочисленная и сложная по составу популяция бактерий находится в кишечнике, в особенности в его нижних отделах (Уголев, 1991; Шендеров, 1998; Falk, 1998; Bäckhed et al., 2005; Sekirov et al., 2010). О важности этой популяции свидетельствует ее участие в питании организма (Уголев, 1991; Шендеров, 1998; Falk, 1998; Sekirov et al., 2010) и регуляции его жирового обмена (Bäckhed et al., 2004), в регуляции обновления кишечного эпителия (Falk, 1998; Rakoff-Nahoum, Medzhitov, 2008), в усилении воспалительных, иммунных ответов и защиты от патогенных микроорганизмов (Шендеров, 1998; Falk, 1998; Дисбиоз кишечника, 2009; Sekirov et al., 2010). Показано, что различные нарушения состава кишечной микробиоты, именуемые дисбиозами, могут провоцировать вторичные нарушения, менять реактивность организма, вызывать различные патологии (Уголев, 1991; Noverr et al., 2005; Дисбиоз кишечника, 2009; Sekirov et al., 2010).

Многие из этих представлений нашли отражение в современной теории адекватного питания и междисциплинарной науке трофологии, основы которых были заложены академиком А.М. Уголевым (Уголев, 1991).

В последнее время всё более широкое применение в клинической практике находят пробиотики – препараты или продукты, созданные на основе живых представителей резидентной микрофлоры желудочно-кишечного тракта человека и животных или полезных микроорганизмов, выделенных из пищевых продуктов. Они позволяют существенно повысить эффективность восстановления функций органов пищеварительной системы и, как следствие, общего состояния организма после нарушений, обусловленных воздействием различных факторов окружающей среды, в том числе антимикробных препаратов (Бельмер, Гасилина, 2005; Ардатская, Минушкин, 2006; Ткаченко, Успенский, 2006; Lutful, Kabir, 2009). Применение пробиотиков оказалось также весьма успешным при лечении многих заболеваний (Ткаченко, Успенский, 2006; Goldin, Gorbach, 2008).

Несмотря на накопленный обширный материал в отношении функциональной роли кишечной микробиоты в организме человека и животных, до сих пор остаются открытыми многие вопросы, касающиеся, в частности, структурных и

функциональных перестроек пищеварительной системы под влиянием различных изменений в составе кишечной микробиоты. Весьма существенным из них является вопрос об изменениях, происходящих в структуре кишечника и мембранном пищеварении в здоровом организме под действием пробиотиков, вводимых в профилактических целях. Исследование данной проблемы в отношении мембранного пищеварения особенно важно в связи с тем, этот тип пищеварения, будучи заключительным этапом переваривания пищевых веществ, в значительной степени определяет общий метаболизм организма и его гомеостазис.

Слабо изучен вопрос о влиянии современных антимикробных препаратов на структуру кишечника и на мембранное пищеварение.

В настоящее время практически отсутствуют сведения об эффективности и особенностях действия используемых пробиотических препаратов в отношении восстановления структурных и функциональных показателей слизистой оболочки кишечника, нарушенных, в частности, вследствие применения антибиотиков.

В связи с методическими ограничениями проведение соответствующих исследований на людях практически неосуществимо. Работа с экспериментальными животными также сопряжена с определенными методическими трудностями, чем, вероятно, объясняется незначительное число работ, посвященных этим вопросам.

Цель и задачи исследования. В экспериментах на крысах изучить влияние живых пробиотических бактерий на мембранные пищеварительные ферменты у здоровых животных и оценить эффективность и особенности действия различных пробиотических штаммов в коррекции нарушений мембранного пищеварения, вызванных применением антимикробных препаратов.

Для достижения этой цели были поставлены следующие **задачи**:

1. После внутрижелудочного введения здоровым крысам живых пробиотических бактерий *Enterococcus faecium* L3 в течение 7 и 14 суток определить у этих животных в слизистой оболочке и химусе кишечника активности ряда ферментов, участвующих в заключительных стадиях гидролиза эфиров фосфорной кислоты (щелочная фосфатаза), углеводов (мальтаза) и белков (аминопептидаза М и глицил-L-лейциндипептидаза). В этих условиях оценить также функциональное состояние организма животных (масса тела, внешний вид, физическая активность, характер фекалий).

2. При внутрижелудочном введении крысам антимикробных препаратов (ампициллин + метронидазол) в течение трех и пяти суток исследовать изменения структуры кишечника и активности указанных кишечных ферментов в слизистой оболочке и химусе различных его отделов, а также состав кишечной микробиоты и функциональное состояние организма.

3. В модели экспериментального дисбиоза, индуцированного введением крысам антимикробных препаратов, оценить возможность и специфические особенности коррекции нарушений мембранного пищеварения, состава кишечной микробиоты и функционального состояния организма животных с использованием живых пробиотических бактерий *Enterococcus faecium* L3 (*E. f. L3*) и *Lactobacillus fermentum* Z (*L. f. Z*) .

Научная новизна работы. Впервые показано, что действие пробиотических бактерий *E. f. L3* на структурно-функциональные параметры кишечника зависит от длительности введения препарата; характер изменений указанных параметров специфичен в отношении различных (по функциональной роли) кишечных пищеварительных ферментов.

Установлено, что трехсуточное введение антимикробных препаратов (ампициллин+метронидазол) в нетоксических дозах изменяет структурно-функциональные показатели кишечника, большинство из которых после пятисуточного введения восстанавливается в отношении слизистой оболочки, но не химуса.

Получены новые данные об эффективности применения пробиотических бактерий *E. f. L3* и *L. f. Z* животным с экспериментальным дисбиозом кишечника в отношении восстановления ряда его функциональных показателей. Выявлены сходство и специфические особенности в действии указанных пробиотиков на прирост массы тела животных, массу слизистой оболочки кишечника и активности различных кишечных пищеварительных ферментов в его слизистой оболочке и химусе.

Теоретическое и практическое значение работы. В теоретическом плане полученные результаты расширяют существующие представления об адаптации пищеварительной системы, описывая перестройки структурно-функциональных характеристик тонкой кишки у взрослых животных под влиянием изменений в кишечной микробиоте, вызванных введением пробиотических бактерий.

В прикладном аспекте данные, полученные в работе, способствуют пониманию тех процессов, которые могут иметь место в кишечнике, при назначении пробиотиков в лечебно-профилактических целях. Кроме того, они дополняют имеющиеся сведения о пробиотической эффективности штаммов *E. f. L3* и *L. f. Z*, демонстрируя их эффективность в коррекции ряда структурно-функциональных нарушений в кишечнике, вызванных применением антимикробных препаратов.

Данные о нарушении структуры и пищеварительной функции кишечника после трёхсуточного введения антимикробных препаратов указывают на важность контроля состояния кишечника в ранний период и, в случае необходи-

мости, применения фармакологических средств для коррекции указанных нарушений.

Полученные результаты могут быть использованы в научно-исследовательской работе, а также в курсах лекций по физиологии, энзимологии и микробиологии.

Апробация работы. Основные положения работы докладывались на: II Съезде физиологов СНГ (2008); VI Всероссийской конференции с международным участием, посвящённом 50-летию открытия А.М. Уголевым мембранного пищеварения (2008); 2-м Международном конгрессе по пробиотикам «С.-Петербург–Пробиотики 2009»; 7-й Научной сессии Института гастроэнтерологии и клинической фармакологии СПбГМА им. И.И.Мечникова (2010); Всероссийской конференции с международным участием, посвящённой 85-летию со дня основания Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (2010); 13-ом Международном Славяно-Балтийском научном форуме «С.-Петербург – Гастро-2011»; Конгрессе международного союза микробиологических сообществ (IUMUS) Sapporo 2011; VIII Всероссийской конференции с международным участием, посвящённой 220-летию со дня рождения акад. К.М. Бэра (2012).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 14 печатных работ: 3 статьи (в рецензируемых журналах) и 10 тезисов докладов.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на _147_ страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания методов и материалов исследования, результатов собственных исследований и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего _130_ отечественных и _169_ иностранных источников. Работа содержит _1_ таблицу _37_ рисунков.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Действие пробиотических бактерий *E. f. L3* на структурные и функциональные показатели кишечника здоровых крыс зависит от продолжительности введения пробиотика; характер изменений указанных параметров специфичен в отношении различных (по функциональной роли) кишечных пищеварительных ферментов.
2. Введение крысам ампициллина и метронидазола в нетоксических дозах приводит к существенным изменениям ряда структурных и функциональных показателей тонкой и толстой кишки на третьи сутки и к восстановлению многих из них в отношении слизистой оболочки (но не химуса) на пятые сутки введения препаратов.
3. Введение крысам с экспериментальным дисбиозом кишечника в течение 5 суток пробиотических энтерококков (*E. f. L3*) и лактобацилл (*L. f. Z*) эффек-

тивно в отношении восстановления ряда структурно-функциональных показателей кишечника, нарушенных вследствие дисбиоза. В действии указанных штаммов на структурно-функциональные параметры кишечника имеют место, как сходство, так и специфические особенности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на 205 крысах-самцах Вистар (масса тела 180 – 220 г). Содержание, питание и уход за животными осуществляли в соответствии с требованиями Комиссии по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных при ФГБУН Институте физиологии им. И.П. Павлова РАН.

В предварительных опытах изучалось влияние процедуры внутрижелудочного введения препаратов животным (на примере введения дистиллированной воды) и введения в их рацион молока (как контроля к пробиотическим закваскам, приготовленным на молоке). В основных опытах крысам ежедневно вводили внутрижелудочно либо антибиотики, растворенные в 0.5 мл дистиллированной воды, либо пробиотики в объёме 0.5 мл. Животным контрольных групп тем же способом вводили 0.5 мл дистиллированной воды (контроль к введению антимикробных препаратов) или молока (контроль к пробиотикам).

В качестве антимикробных препаратов использовалась комбинация ампициллина и метронидазола, обладающих широким спектром действия. Препараты вводились в нетоксических дозах (15 мг ампициллина и 10 мг метронидазола на одно животное).

В качестве пробиотиков применялись молочнокислые бактерии *Enterococcus faecium* L3 (патент РФ № 2220199) и *Lactobacillus fermentum* Z (патент РФ № 2412239), предназначенные для производства молочнокислых пищевых продуктов, а также лечения и профилактики различных заболеваний. Пробиотики готовились в виде молочнокислых заквасок и вводились в дозе 8 lg КОЕ/мл, которая в пересчёте на массу тела крысы соответствует максимальной дозе, применяемой в клинике для человека.

По окончании каждого эксперимента у крыс отбирали пробы фекалий для бактериологического анализа, а после декапитации животных – пробы химуса и слизистой оболочки из проксимальной, медиальной и дистальной третьей тонкой кишки (без двенадцатиперстной), а также из толстой кишки для определения в них активности кишечных пищеварительных ферментов. В отдельной серии опытов у крыс после трёхсуточного введения антимикробных препаратов отбирали кусочки тонкой кишки из различных её участков для последующего морфологического анализа.

В гомогенатах слизистой оболочки кишки и химуса определяли активности кишечных пищеварительных ферментов: мальтазы (НФ 3.2.1.20) – глюкозо-

оксидазным методом (Dahqvist, 1964); щелочной фосфатазы (НФ 3.1.3.1) – с использованием *p*-нитрофенилфосфата натрия (0.6 мМ) в качестве субстрата и раствора Рингера в качестве буфера (рН 7.4); аминопептидазы М (НФ 3.4.11.2) и глицил-L-лейциндипептидазы (НФ 3.4.13) по методикам Farr et al. (1968) и Уголева и Тимофеевой (1969). Активность ферментов выражали в мкмоль/мин на г влажного веса ткани (удельная активность) и в мкмоль/мин на участок кишки (интегральная активность). По удельной активности судили о ферментативной активности усредненного энтероцита, а по интегральной активности – о ферментативной активности данного участка кишки. Значения ферментативных активностей в химусной фракции в расчете на массу химуса в каждом данном участке кишечника позволяли судить о соотношении скоростей поступления кишечных ферментов в полость кишечника и их последующей деградации.

Морфологический анализ фрагментов кишечника проводился на срезах толщиной 1 мкм, окрашенных толуидиновым голубым, с использованием световой микроскопии (Миронов и др., 1994).

Состав кишечной микробиоты анализировался бактериологическими методами (Клинические аспекты диагностики..., 2003).

Статистическая обработка данных проводилась с использованием *t*-критерия Стьюдента. Для каждого из определяемых показателей рассчитывалось среднее значение (*M*) и среднеквадратичная ошибка среднего ($\pm m$). Достоверными считались изменения при уровне значимости $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Влияние пробиотических энтерококков на структурные и функциональные показатели кишечника здоровых крыс

Введение пробиотических энтерококков здоровым крысам в течение 7 и 14 суток не влияло на внешний вид и физическую активность животных, прирост массы их тела, характер фекалий.

Масса слизистой оболочки увеличилась на 17% в дистальном участке тонкой кишки ($P < 0.02$) и уменьшилась на 20% в толстой кишке ($P < 0.01$) через 14 суток введения пробиотика. Масса химуса в различных участках кишечника не менялась.

Активности кишечных пищеварительных ферментов. Через 7 суток введения пробиотика интегральная (в расчёте на участок кишки) и удельная (в расчете на г ткани) активности щелочной фосфатазы снизились примерно в 2 раза в слизистой оболочке дистального участка тонкой кишки (Рис. 1). Эти данные позволили заключить, что через 7 суток изменение интегральной активности щелочной фосфатазы происходило за счёт изменения активности в самих энтероцитах. Однако через 14 суток интегральная и удельная активности щелоч-

ной фосфатазы в тонкой кишке не отличались от уровня в контроле. Сходные изменения наблюдались в отношении интегральных и удельных активностей мальтазы и аминопептидазы М в слизистой оболочке тонкой кишки.

Иная закономерность имела место в отношении активности глицил-L-лейциндипептидазы (рис. 2). Через 14 суток интегральная активность этого фер-

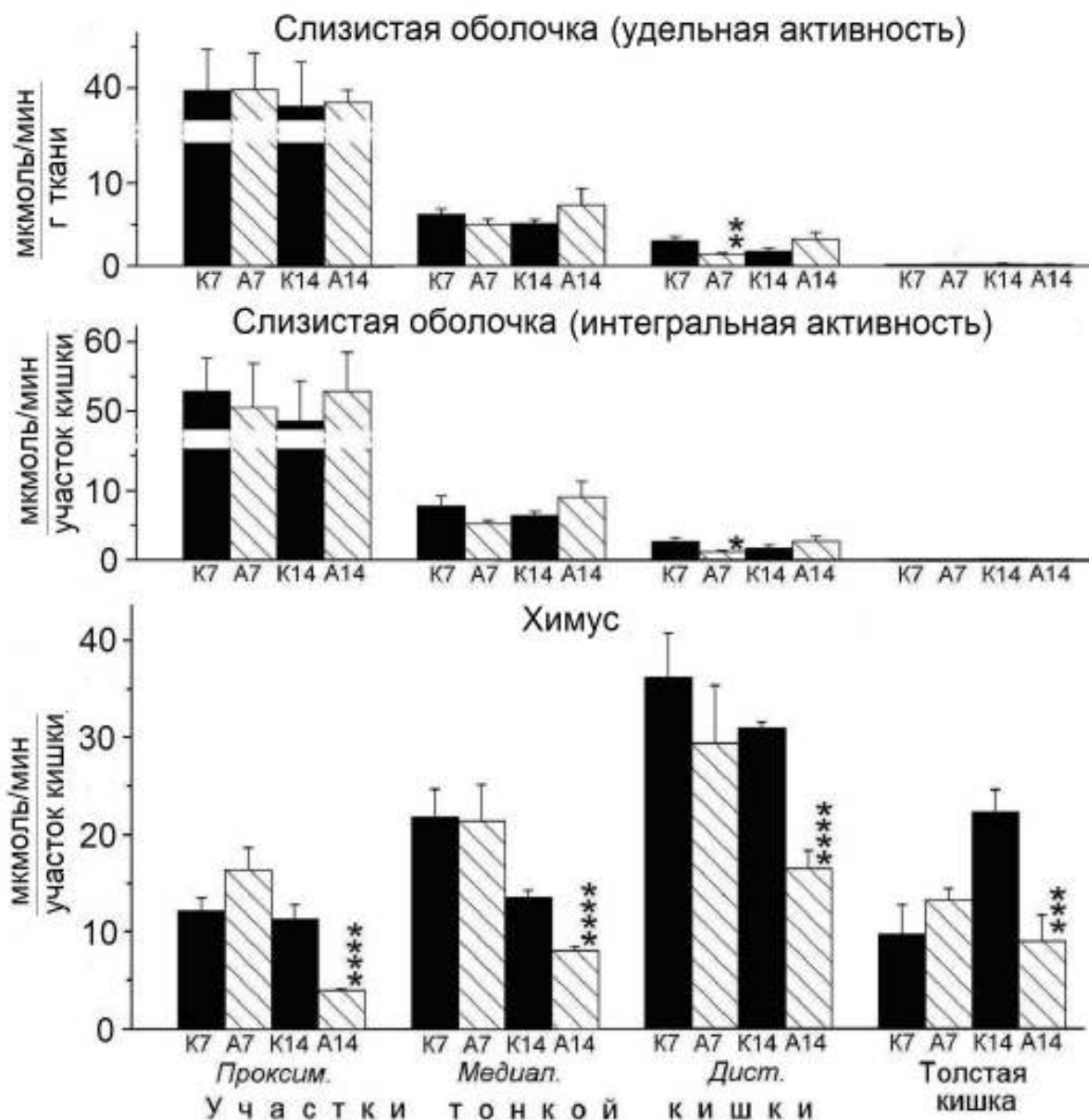


Рис. 1. Активность щелочной фосфатазы в слизистой оболочке и в химусе различных участков кишечника крыс через 7 и 14 суток введения пробиотических бактерий *E. f. L3* (A7 и A14, соответственно). K7 и K14 – соответствующие контроли (введение молока). Обозначения: *Проксим.*, *Медиа.* и *Дист.* – проксимальная, медиальная и дистальная трети тонкой кишки, соответственно.

* $P < 0.05$; ** $P < 0.02$; *** $P < 0.01$; **** $P < 0.0027$ по отношению к соответствующим контролям.

мента в слизистой оболочке дистального участка тонкой кишки повысилась почти в 2 раза, а в отношении его удельной активности в том же участке прослеживалась тенденция к повышению. Следовательно, повышение интегральной активности этой дипептидазы было обусловлено как повышением активности в самих энтероцитах, так и увеличением массы слизистой оболочки.

Введение пробиотика влияло также на активности кишечных пищеварительных ферментов в химусе кишечника. Через 7 суток активность аминокептидазы М повысилась в проксимальном участке тонкой кишки (на 44%, $P < 0.02$) и

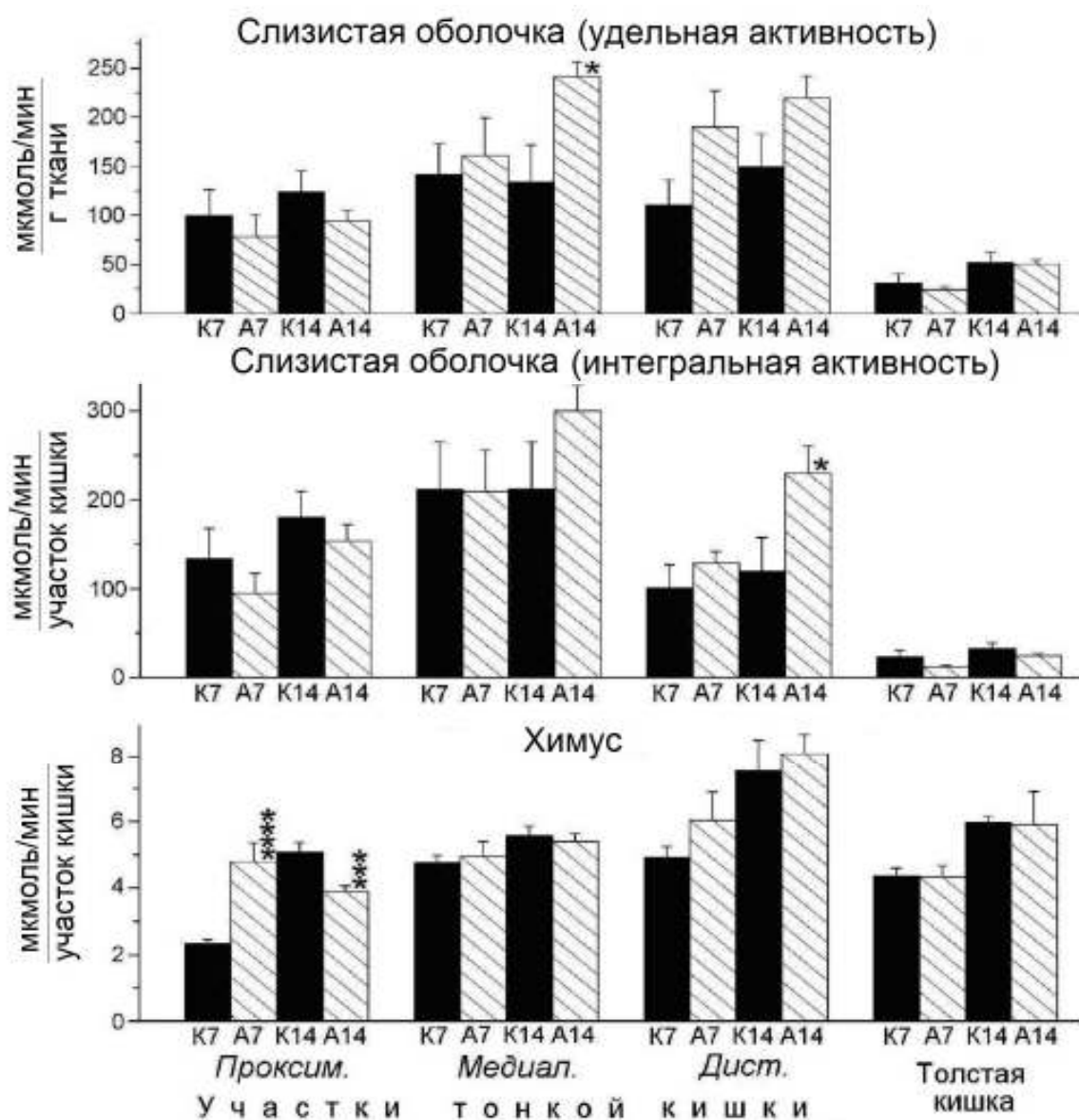


Рис. 2. Активность глицил-L-лейциндипептидазы М в слизистой оболочке и химусе различных участков кишечника крыс через 7 и 14 суток введения пробиотических бактерий *E. f. L3*. Обозначения такие же, как на рис 1.

* $P < 0.05$; *** $P < 0.01$; **** $P < 0.0027$ по отношению к соответствующим контролям.

в толстой кишке (почти в 2 раза, $P < 0.02$), а через 14 суток во всех участках кишечника снизилась активность щелочной фосфатазы (на 43 – 72%) (рис. 1). Активность глицил-L-лейциндипептидазы в проксимальном участке тонкой кишки через 7 суток увеличилась более чем в 2 раза, а через 14 суток снизилась на 23% (рис. 2). Активность мальтазы в химусе кишечника не менялась. Следовательно, введение пробиотика влияет на соотношение скоростей поступления кишечных ферментов в полость кишечника и последующей их деградации.

Выявленные различия в изменении структурно-функциональных параметров кишечника на разных сроках введения пробиотика, по-видимому, обусловлены вариациями в составе кишечной микробиоты, так как имеются данные (Калмыкова и др., 2005) об изменении состава кишечной микробиоты и сопутствующих изменениях структуры кишечника у здоровых животных при длительном применении пробиотических бактерий.

Таким образом, введение живых пробиотических бактерий *E. f. L3* здоровым крысам в течение 7 и 14 суток вызывает изменение массы слизистой оболочки кишечника и активности пищеварительных ферментов в его слизистой оболочке и химусе. Характер изменений указанных параметров зависит от длительности введения препарата и по-разному проявляется в отношении различных кишечных пищеварительных ферментов.

2. Влияние антимикробных препаратов на структурные и функциональные показатели кишечника

При введении крысам антимикробных препаратов в течение 3 и 5 суток у них отмечались признаки дисбиоза кишечника: маслянистая консистенция фекалий, в отдельных случаях понос, полифекалия. Вместе с тем в период введения антибиотиков мы, в отличие от других авторов (Ермоленко и др., 2009), не наблюдали у крыс снижения прироста массы тела по сравнению с контролем. При бактериологическом анализе фекалий выявлено снижение количества лактобацилл, бифидобактерий и энтерококков, а также увеличение числа патогенных и условно патогенных бактерий и грибов.

Структура кишечника и масса химуса. После трехсуточного введения антимикробных препаратов масса слизистой оболочки (г/участок кишки) снизилась по отношению к контролю на 32% в проксимальном участке тонкой кишки ($P < 0.0027$) и на 24% в толстой кишке ($P < 0.05$). Эти изменения сопровождались уменьшением на 15% ширины ворсинок ($P < 0.05$) в тонкой кишке, а также увеличением количества бокаловидных клеток в эпителии ворсинок. Следовательно, снижение массы слизистой оболочки тонкой кишки происходило в основном за счёт уменьшения численности популяции энтероцитов. После пятисуточного введения препаратов масса слизистой оболочки в указанных отделах

кишечника восстанавливалась до контрольных значений. При обоих сроках введения антимикробных препаратов была повышена масса химуса в слепой и толстой кишке, что, по-видимому, было следствием нарушения в этих отделах процессов, протекающих с участием бактериальной флоры.

Активности кишечных пищеварительных ферментов. После трехсуточного введения антимикробных препаратов интегральная активность щелочной фосфатазы в слизистой оболочке проксимального участка тонкой кишки была в 2.5 раза ниже, чем в контроле, тогда как её удельная активность в том же участке не менялась (рис. 3).

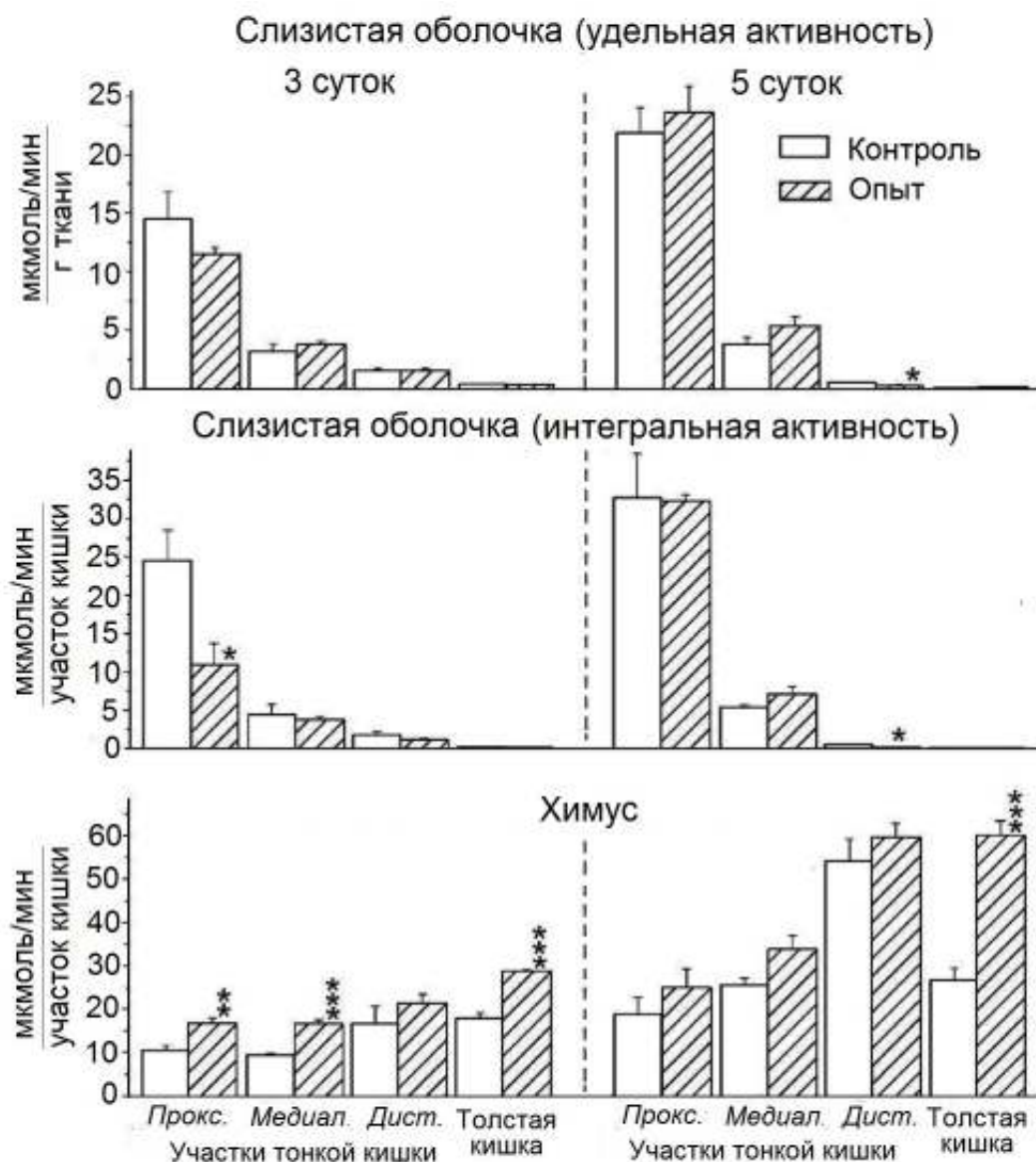


Рис.3. Активность щелочной фосфатазы в слизистой оболочке и в химусе различных участков кишечника крыс через 3 и 5 суток внутрижелудочного введения антимикробных препаратов или воды (контроль).

* $P < 0.05$; ** $P < 0.02$; *** $P < 0.01$ по отношению к соответствующим контролям.

Сходные по характеру изменения наблюдались в отношении интегральной и удельной активностей мальтазы в дистальном участке тонкой кишке, где она была примерно в 2 раза ниже, чем в контроле ($P < 0.02$). Однако после пятисуточного введения этих препаратов в дистальном участке тонкой кишки снижались как интегральная (в 2.3 раза), так и удельная (в 2.5 раза) активности щелочной фосфатазы, тогда как в случае мальтазы эти активности в различных участках кишечника достоверно не менялись. Из этого следует, что после трёхсуточного введения антибиотиков изменение интегральных активностей щелочной фосфатазы и мальтазы в соответствующих участках кишки обусловлено преимущественно изменением массы слизистой оболочки (численности популяции энтероцитов), тогда как после пятисуточного введения антибиотиков – в случае щелочной фосфатазы – изменением этой активности в самих энтероцитах.

Другие закономерности имели место в отношении пептидгидролаз. После трёхсуточного введения антимикробных препаратов удельная активность глицил-L-лейциндипептидазы по сравнению с соответствующими контролями была выше в 1.8 раза в проксимальном участке тонкой кишки и в 2.2 раза – в её медиальном участке (рис. 4). Наблюдалась тенденция к повышению удельной активности аминопептидазы М в слизистой оболочке тонкой и толстой кишки. При этом значения интегральной активности указанных ферментов в соответствующих участках кишечника не отличались от контроля. Таким образом, сохранение на исходном уровне интегральных активностей пептидгидролаз происходило за счёт повышения их удельных активностей.

Одной из причин нарушения структурных и функциональных параметров кишечника после трёхсуточного введения антимикробных препаратов может быть снижение под влиянием метронидазола толщины пристеночного слоя слизи, что приводит к повышению потока патогенов и их продуктов к поверхности кишечного эпителия (Wlodarska et al., 2011). В этой связи реакцию пептидгидролаз энтероцитов, как и бокаловидных (слизеобразующих клеток), на трёхсуточное введение антибиотиков можно считать адаптивной, направленной на сохранение защитного барьера слизистой оболочки кишечника в условиях снижения её массы.

После пятисуточного введения антимикробных препаратов значения как интегральной, так и удельной активностей этих ферментов в тонкой и толстой кишке в основном не отличались от таковых в соответствующих контролях, за исключением более высокой (на 34%) удельной активности аминопептидазы М в проксимальном участке тонкой кишки ($P < 0.05$). Эти данные свидетельствуют

о быстрой адаптации слизистой оболочки кишечника к действию антимикробных препаратов.

Важно отметить, что в химусе кишечника активности исследованных ферментов в большинстве случаев повышались по сравнению с соответствующими

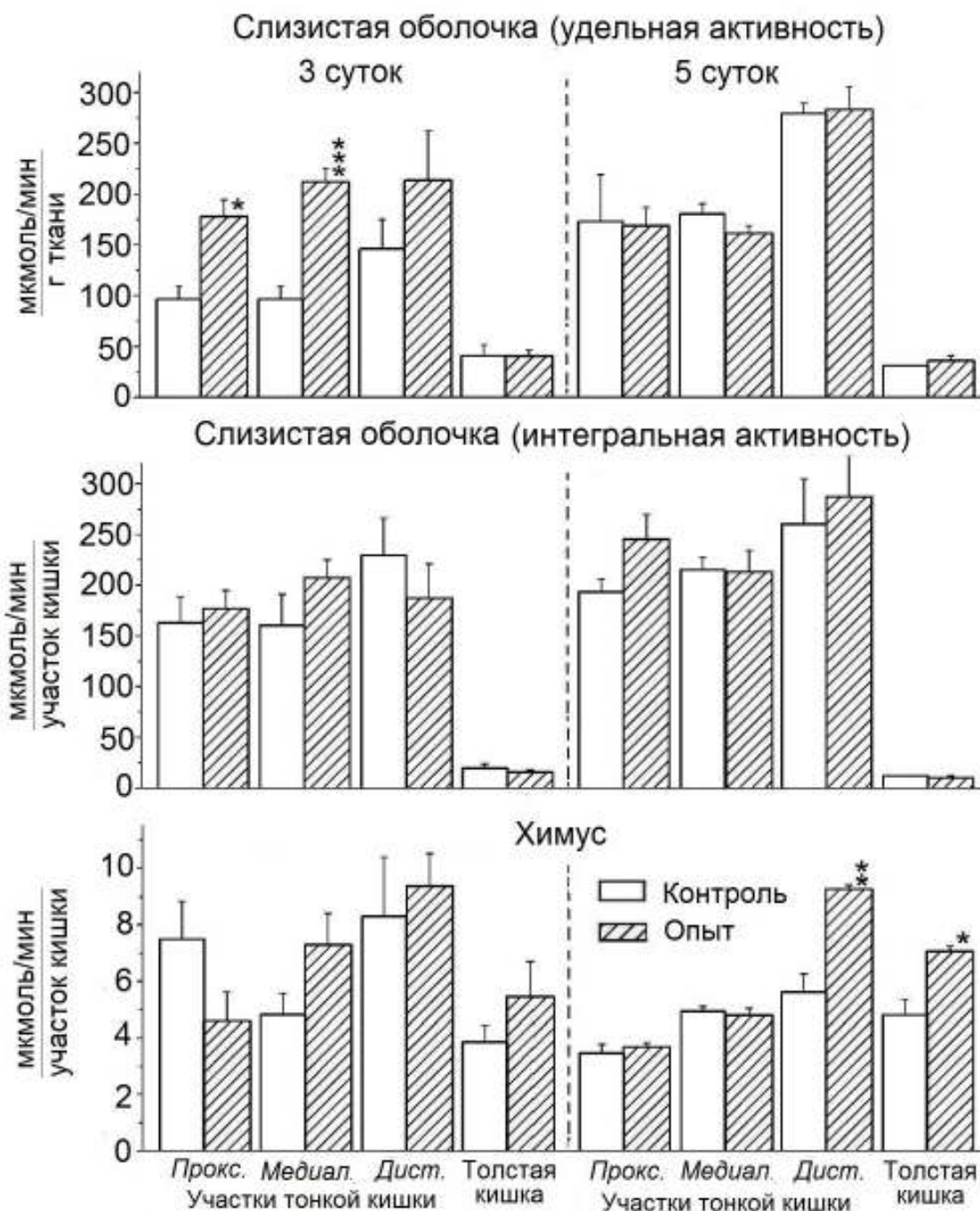


Рис. 4. Активность глицил-L-лейцилдипептидазы в слизистой оболочке и в химусе различных участков кишечника крыс через 3 и 5 суток внутрижелудочного введения антибиотиков или воды (контроль).

*P<0.05; **P<0.02; ***P<0.01 по отношению к соответствующим контролям.

контролями как после трехсуточного, так и после пятисуточного введения анти-микробных препаратов. Например, активность щелочной фосфатазы была повышена в 1.5 раза в толстой кишке через 3 суток и более чем в 2 раза через 5 суток (рис. 3), а активность глицил-L-лейциндипептидазы – в 1.7 раза в дистальном участке тонкой кишки и в 1.5 раза в толстой кишке через 5 суток (рис. 4). Повышение активности кишечных пищеварительных ферментов в химусе кишечника, в особенности в его нижних отделах, по-видимому, обусловлено снижением скорости деградации кишечных ферментов с участием бактериальных протеаз, так как ранее было показано их участие в деградации панкреатических ферментов (Hofmann, 1999).

Таким образом, трехсуточное введение крысам ампициллина и метронидазола в нетоксических дозах приводит к изменениям структурных и функциональных показателей кишечника, многие из которых в отношении слизистой оболочки (но не химуса) восстанавливаются на пятые сутки.

3. Влияние различных пробиотических бактерий на структурные и функциональные параметры кишечника у крыс с экспериментальным дисбиозом

Введение пробиотических лактобацилл и энтерококков крысам в течение 5 суток после отмены антибиотиков ускоряло устранение симптомов дисбиоза кишечника и способствовало восстановлению кишечной микробиоты. После введения энтерококков увеличивался прирост массы тела животных.

Масса слизистой оболочки кишечника и масса химуса. Масса слизистой оболочки в кишечнике не менялась (по сравнению с контролем 1 – без антибиотиков и пробиотиков) после введения лактобацилл, но повышалась на 15% ($P < 0.01$) в проксимальном участке тонкой кишки после введения энтерококков. Важно отметить, что изменение массы слизистой оболочки под действием энтерококков было менее выраженным по сравнению с тем, которое имело место в медиальном (на 19%, $P < 0.01$) и дистальном (на 21%, $P < 0.05$) участках тонкой кишки в контроле 2 – без пробиотиков после отмены антибиотиков.

Масса химуса была повышенной (по сравнению с контролем 1) во всех отделах кишечника, включая слепую кишку, как после введения пробиотиков, так и в контроле 2. Вероятно, введение пробиотических бактерий в течение 5 суток не устраняет полностью нарушений, которые проявляются в процессах, протекающих в полости кишечника с участием с бактериальной флоры.

Активности кишечных пищеварительных ферментов. Введение каждого из пробиотиков не вызывало повышения интегральной активности мальтазы в слизистой оболочке тонкой кишки, которое происходило в контроле 2 (рис.5).

Однако при этом интегральная активность глицил-L-лейциндипептидазы в

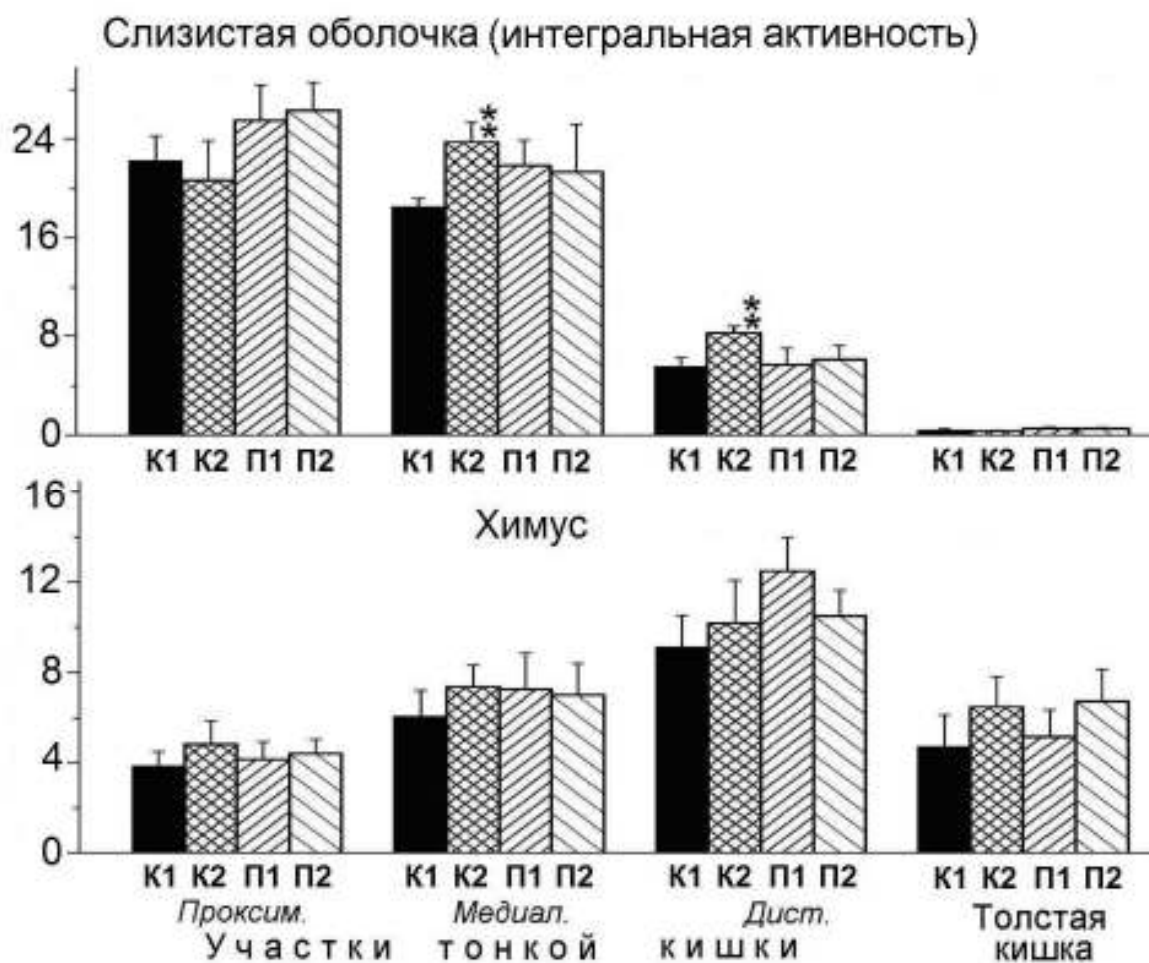


Рис. 5. Активность мальтазы в слизистой оболочке и химусе различных участков кишечника крыс с экспериментальным дисбиозом после применения пробиотиков. По вертикали: ферментативная активность (мкмоль/мин в расчете на участок кишки). Обозначения: К1 – введение воды (3 дня) и затем молока (5 дней); К2 – введение антибиотиков (3 дня) и затем молока (5 дней); П1 – введение антибиотиков (3 дня) и затем лактобацилл (5 дней); П2 – введение антибиотиков (3 дня) и затем энтерококков (5 дней).

** $P < 0.02$ по отношению к соответствующим контролям.

слизистой оболочке дистального участка тонкой кишки снижалась по сравнению с контролем 1 после введения лактобацилл (на 26%) и энтерококков (на 48%) (рис. 6). Сходные изменения имели место в отношении удельной активности этого фермента. Следовательно, повышение его интегральной активности происходило за счет изменения активности фермента в энтероцитах.

Под действием пробиотиков в химусе тонкой кишки повышалась активность щелочной фосфатазы (примерно на 25% в её проксимальном и медиальном участках в случае лактобацилл и на 17% в её проксимальном участке в случае энтерококков) (рис. 7). Приведенные данные свидетельствуют о наличии

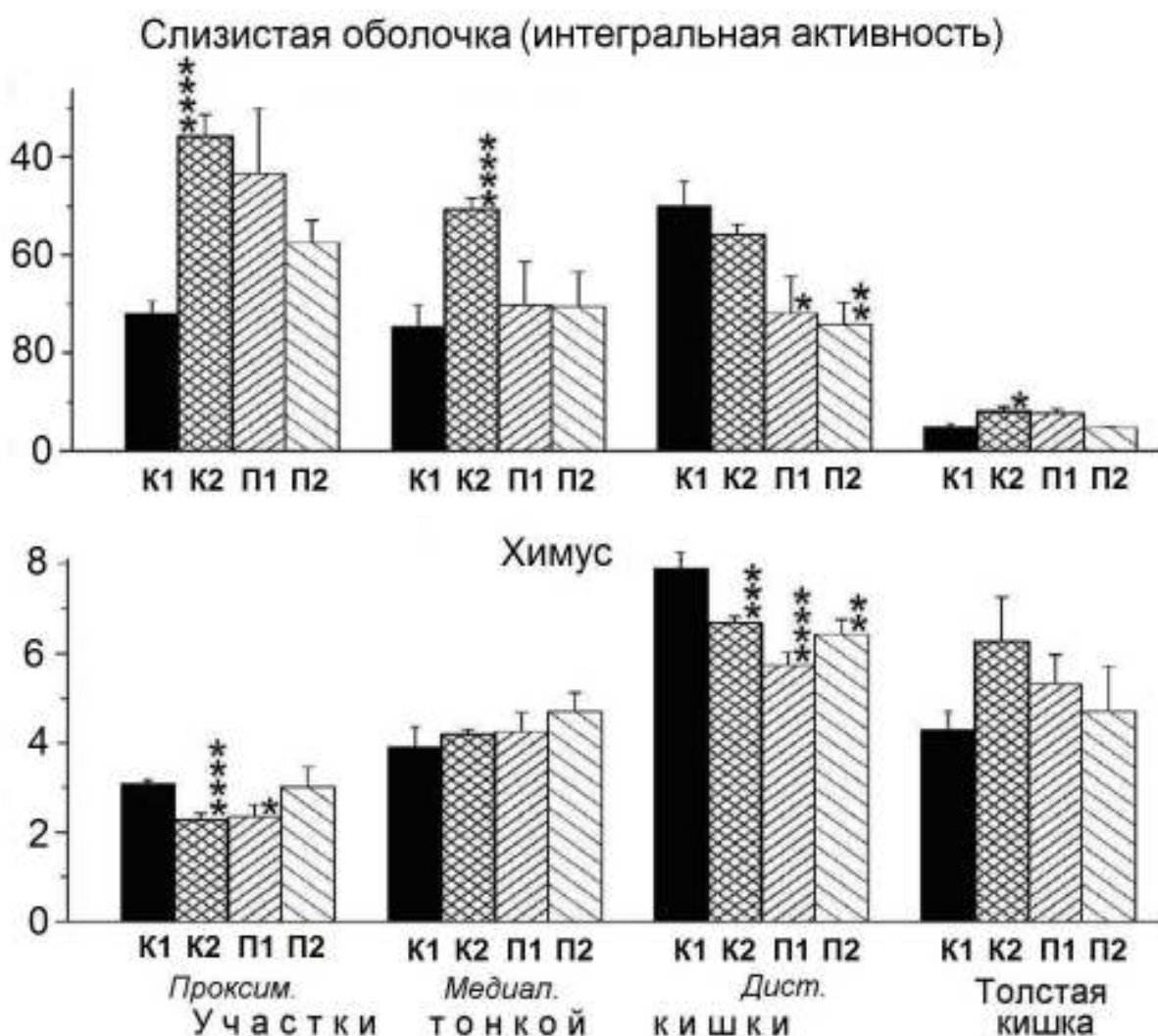


Рис. 6. Активность глицил-L-лейцилдипептидазы в слизистой оболочке и в химусе различных участков кишечника крыс с экспериментальным дисбиозом после применения пробиотиков. Обозначения такие же, как на рис. 5.

* $P < 0.05$; ** $P < 0.02$; *** $P < 0.01$; **** $P < 0.0027$ по отношению к соответствующим контролям.

общих закономерностей в действии исследованных штаммов на кишечные пищеварительные ферменты. Однако имелись и специфические особенности. Так, после введения лактобацилл в слизистой оболочке тонкой кишки повышались интегральные активности щелочной фосфатазы (в медиальном участке на 31%) (рис. 7) и аминопептидазы М (в дистальном участке на 26%, $P < 0.05$), а после введения энтерококков снижалась на 38% активность аминопептидазы М в химусе дистального участка тонкой кишки ($P < 0.05$).

Обращает на себя внимание факт различия в действии пробиотических энтерококков на структурно-функциональные показатели кишечника у

здоровых крыс и у животных с экспериментальным дисбиозом кишечника, что, по-видимому, связано с состоянием кишечника до введения пробиотика.

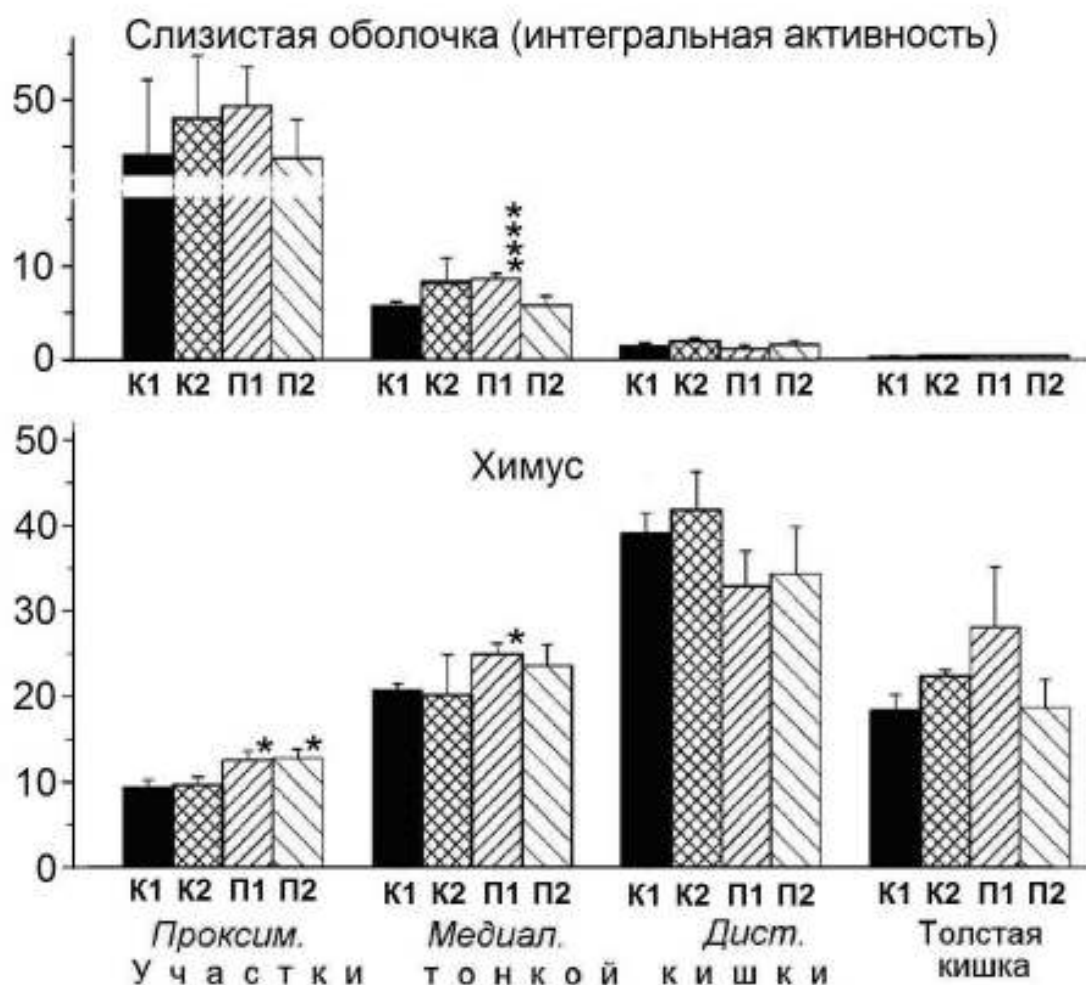


Рис. 7. Активность щелочной фосфатазы в слизистой оболочке и в химусе различных участков кишечника крыс с экспериментальным дисбиозом после применения пробиотиков. Обозначения такие же, как на рис.5 и 6.

* $P < 0.05$; **** $P < 0.0027$ по отношению к соответствующим контролям.

Таким образом, введение пробиотиков крысам с экспериментальным дисбиозом кишечника эффективно в отношении восстановления общего состояния организма, состава кишечной микробиоты и ряда структурных и функциональных параметров кишечника. При этом в действии различных пробиотиков на кишечные пищеварительные ферменты наблюдаются как сходство, так и специфические особенности.

В целом, полученные в работе результаты свидетельствуют о важной роли кишечной микробиоты в регуляции структурно-функциональных параметров кишечника у взрослых животных.

ВЫВОДЫ

1. Введение живых пробиотических бактерий *Enterococcus faecium L3* здоровым крысам в течение 7 и 14 суток по-разному отражается на структурно-функциональных параметрах кишечника. Через 7 суток в слизистой оболочке тонкой кишки снижаются интегральные активности щелочной фосфатазы, мальтазы и аминопептидазы М, а через 14 суток – повышается интегральная активность глицил-L-лейциндипептидазы. В химусе кишечника через 7 суток повышаются активности аминопептидазы М и глицил-L-лейциндипептидазы, а через 14 суток снижаются активности глицил-L-лейциндипептидазы и щелочной фосфатазы. Масса слизистой оболочки увеличивается в тонкой кишке и уменьшается в толстой кишке через 14 суток.

2. Введение крысам антимикробных препаратов ампициллина и метронидазола в нетоксических дозах в течение 3 суток приводит к дисбиозу кишечника и изменению его структурных параметров: снижению массы слизистой оболочки кишечника, уменьшению ширины ворсинок в тонкой кишке, увеличению числа бокаловидных клеток в эпителии ворсинок.

3. Трёхсуточное введение антимикробных препаратов влияет на активность кишечных пищеварительных ферментов. Значения интегральной активности щелочной фосфатазы и мальтазы в тонкой кишке снижаются за счёт уменьшения массы её слизистой оболочки, а пептидгидролаз – аминопептидазы М и глицил-L-лейциндипептидазы – сохраняются благодаря повышению уровня активности этих ферментов в самих энтероцитах. Адаптивная реакция пептидгидролаз энтероцитов направлена на сохранение защитного барьера тонкой кишки в условиях уменьшения массы слизистой оболочки.

4. При пятисуточном введении антимикробных препаратов восстанавливаются значения большинства параметров, характеризующих состояние слизистой оболочки кишечника (но не химуса), что свидетельствует о её быстрой адаптации к действию антимикробных препаратов.

5. Введение крысам с экспериментальным дисбиозом кишечника пробиотических энтерококков (*Enterococcus faecium L3*) и лактобацилл (*Lactobacillus fermentum Z*) в течение 5 суток способствует восстановлению микрофлоры кишечника и ряда его структурно-функциональных параметров: массы слизистой оболочки кишечника, интегральной активности мальтазы в его слизистой оболочке.

6. Действие пробиотических энтерококков и лактобацилл на кишечные пищеварительные ферменты у крыс с экспериментальным дисбиозом кишечника характеризуется как общими чертами, так и специфическими особенностями. При введении каждого из этих пробиотиков снижаются значения интегральной

активности глицил-L-лейциндипептидазы в слизистой оболочке тонкой кишки и активности щелочной фосфатазы в химусе кишечника. При введении лактобацилл повышаются интегральные активности щелочной фосфатазы и аминопептидазы М в слизистой оболочке тонкой кишки, а при введении энтерококков снижается активность аминопептидазы М в химусе кишечника.

Список работ, опубликованных по теме диссертации.

СТАТЬИ:

1. Tarasova E., Yermolenko E., Donets V., Sundukova Z., Bochkareva A., Borschev I., Suvorova M., Ilyasov I., Simanenkov V., Suvorov A. The influence of probiotic *Enterococcus faecium* strain L5 on the microbiota and cytokines expression in rats with dysbiosis induced by antibiotics // *Beneficial Microbes.*—September 20, 2010.— P. 265 – 270.

2. Громова Л.В., Борщев Ю.Ю., Ермоленко Е.И., Грефнер Н.М., Алексеева А.С., Воейкова А.В., Груздков А.А. Действие антимикробных препаратов на кишечные пищеварительные ферменты у крыс // *Вестник Санкт-Петербургского Университета.*— 2012.— Серия 11, вып.3.— С. 161 – 170.

3. Борщёв Ю.Ю., Громова Л.В., Ермоленко Е.И., Грефнер Н.М., Борщёва И.Ю., Груздков А.А. Реакция пептидгидролаз тонкой и толстой кишки крыс на введение антибиотиков // *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова.* – 2012. – Т. 98. № 6. – С.724–733.

ТЕЗИСЫ:

1. Громова Л.В., Донец В.Н., Борщев Ю.Ю., Грефнер Н.М., Ермоленко Е.И. Действие пробиотических энтерококков на мембранное пищеварение у крыс // VI Всероссийская конференция с международным участием, посвящённая 50-летию открытия А.М. Уголевым мембранного пищеварения. «Механизмы функционирования висцеральных систем». – Санкт-Петербург, 2008.— С.55.

2. Борщев Ю.Ю., Донец В.И., Ермоленко Е.И., Грефнер Н.М., Дмитриева Ю.В., Громова Л.В. Влияние пробиотического штамма *Enterococcus faecium* на пищеварительные ферменты кишечника в норме и при дисбиозе // *Научные труды II Съезда физиологов СНГ «Физиология и здоровье человека».* – Кишинэу, 2008. – С. 134.

3. Борщев Ю.Ю., Донец В.И., Громова Л.В., Ермоленко Е.И., Грефнер Н.М., Груздков А.А. Изменение пищеварительной функции кишечника крыс под влиянием пробиотических энтерококков и эшерихий // VII Всероссийская конференция с международным участием. Механизмы функционирования висцеральных систем. – Санкт-Петербург, 2009. – С. 71– 72.

4. Борщев Ю.Ю., Донец В.И., Громова Л.В., Ермоленко Е.И., Груздков А.А. Особенности действия пробиотических энтерококков и эшерихий на пищеварение в кишечнике крыс // *Материалы 2-го Международного конгресса по пробиотикам и 6-й Объединенной научной сессии Института гастроэнтерологии и*

клинической фармакологии СПбГМА им. И.И. Мечникова, ФГУП «Гос.НИИ ОЧБ» ФМБА России, ФГУН МНИИЭМ им.Г.Н.Габричевского и ФГУ ВГНКИ «Санкт–Петербург – Пробиотики–2009».- Гастроэнтерология Санкт-Петербурга, 2009, №4. – С. М5.

5. Громова Л.В., Борщев Ю.Ю., Ермоленко Е.И., Груздков А.А. Мембранное пищеварение в тонкой кишке крыс после воздействия антибиотиками и его коррекция с помощью пробиотика // Всероссийская конференция с международным участием «Механизмы регуляции физиологических систем организма в процессе адаптации к условиям среды», посвященная 85–летию со дня основания Института физиологии им. И.П. Павлова РАН. – Санкт–Петербург, 2010. – С. 75-76.

6. Громова Л.В., Борщев Ю.Ю., Ермоленко Е.И., Груздков А.А. Активности мембранных пищеварительных ферментов в кишечнике крыс при введении лактобацилл L65 // 7–я Научная сессия Института гастроэнтерологии и клинической фармакологии СПбГМА им. И.И. Мечникова. – Санкт–Петербург, 2010 г. – Гастроэнтерология Санкт-Петербурга, 2010, №4. – С. М 7 – М 8.

7. Громова Л.В., Ермоленко Е.И., Донец В.И., Борщев Ю.Ю., Груздков А.А. Влияние пробиотических энтерококков на пищеварение у крыс при экспериментальном дисбиозе // Материалы 13-го Международного Славяно-Балтийского научного форума «Санкт-Петербург – Гастро – 2011». – Гастроэнтерология Санкт–Петербурга, 2011, № 2-3. – С. М20 – М21.

8. Ermolenko E., Suvorov A., Gromova L., Borschev Y., Voeikova A., Karaseva A., Ermolenko K., Gruzdkov A. Influence of different probiotic lactic acid bacteria on metabolism and digestion in rats with dysbiosis induced by antibiotics // Meeting of the Three Divisions of the international Union of Microbiological Societies. – Japan, Sapporo 2011.

9. Suvorov A., Gromova L., Borschev Y., Ermolenko E., Karaseva A., Gruzdkov A. Influence of probiotic enterococci on the gastrointestinal tract of rats before and after the treatment of antibiotic associated dysbiosis // The Joint Meeting of The XVIIth International Symposium on Gnotobiology and The XXXIVth Congress of the Society for Microbial Ecology and Disease Navios Yokohama. – Japan, Yokohama, 2011. – P.108.

10. Борщев Ю.Ю., Громова Л.В., Елисеев А.В., Ермоленко Е.И., Груздков А.А. Действие некоторых пробиотических бактерий на кишечные пищеварительные ферменты у крыс с дисбиозом кишечника // Материалы 14–го Международного Славяно-Балтийского научного форума «Санкт–Петербург – Гастро – 2012». – Гастроэнтерология Санкт-Петербурга, 2012, № 2 - 3. – С. М12 – М13.