

РЕАКЦИЯ ПРИСТЕНОЧНОЙ МИКРОФЛОРЫ ТОЛСТОГО КИШЕЧНИКА И ПОКАЗАТЕЛЕЙ ФУНКЦИОНАЛЬНО-МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛОВ КРОВИ МЫШЕЙ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПРОБИОТИКА «ЛИНЕКС» ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО ДИСБИОЗА В УСЛОВИЯХ ВОЗДЕЙСТВИЯ МАГНИТНОГО ПОЛЯ ПОВЫШЕННОЙ НАПРЯЖЁННОСТИ

**О.А. МЕДВЕДЕВА
П.В. КАЛУЦКИЙ
А.В. БЕСЕДИН
Л.В. ЖИЛЯЕВА
А.И. ЛАЗАРЕВ
А.В. ИВАНОВ
Е.В. ОСТАП
С.К. МЕДВЕДЕВА**

*Курский государственный
медицинский университет*

e-mail:olgafrida@rambler.ru

Изучено влияние пробиотика «Линекс» на пристеночную микрофлору толстого кишечника и функционально-метаболическую активность нейтрофилов крови мышей при дисбиозе, индуцированном гентамицином, в условиях воздействия магнитных полей различной напряжённости. Установлено, что применение линекса способствует более полному восстановлению облигатных представителей нормофлоры в муциновом слое толстой кишки именно в условиях магнитного поля повышенной напряжённости. Показатели функционально-метаболической активности нейтрофилов крови мышей вне зависимости от напряжённости магнитного поля, в условиях которого они содержались, реагировали на терапию линексом снижением их значений.

Ключевые слова: дисбиоз, магнитные поля, микрофлора кишечника, нейтрофилы, линекс.

Многочисленные исследования последних лет доказали огромное значение кишечной микрофлоры для организма хозяина. Самые различные функции желудочно-кишечного тракта так или иначе связаны с жизнедеятельностью кишечной микрофлоры. Для организма человека состояние биоценоза кишечника имеет важное физиологическое значение [14]. Бактерии-симбионты обладают выраженной антагонистической активностью по отношению к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам. Доказано участие нормофлоры в обменных процессах организма, а также формировании иммунобиологической реактивности организма. Представители нормофлоры обладают высоким сродством к рецепторам энтероцитов. Прикрепляясь к ним, они уменьшают возможность патогенного воздействия на стенку кишечника со стороны болезнетворных микробов [1, 3]. Кроме того, нормофлора вызывает антигенное раздражение слизистой оболочки кишечника, тем самым потенцирует включение механизмов неспецифической резистентности, системного и местного иммунитета: увеличение синтеза иммуноглобулинов, пропердина, комплемента, лизоцима [1]. В результате антигенной стимуляции иммунной системы в организме человека создаётся и поддерживается общий пул иммуноглобулинов [2]. Ассоциативные связи между энтероцитами и микробными колониями нормофлоры приводят к формированию на поверхности интестинальных слизистых оболочек защитного биослоя, «уплотняющего» стенку кишечника и препятствующего проникновению в кровоток токсинов болезнетворных возбудителей [6].

Нормальная микробная флора с её специфическими функциями определяет биоценоз кишечника и экологическое равновесие. Нарушения микроэкологии кишечника получили название дисбактериоз, который сам не является нозологической единицей, но может быть серьёзной предпосылкой для развития различных заболеваний. К сожалению, число факторов, дестабилизирующих микробную экосистему, с каждым годом возрастает. Наиболее опасным является злоупотребление медикаментозными средствами, прежде всего антибиотиками, нерациональное питание, нервно-эмоциональные стрессы, нарушение экологии внешней среды, условий труда и быта.

Магнитное поле Земли является постоянным и средний показатель его напряжённости колеблется от 0,2 до 0,4 эрстед. Однако на отдельных территориях обнаружены магнитные аномалии, связанные с залеганием мощных пластов железосодер-



жащих руд, где этот показатель может увеличиваться в 3-5 раз и более. Уникальной в этом отношении является Курская магнитная аномалия, расположенная на территории Курской и Белгородской областей. В этом регионе напряжённость геомагнитного поля достигает 3,5-4 эрстед, тогда как фоновое значение геомагнитного поля (ГМП) не превышает, обычно, 0,45 эрстеда. Это даёт основание предположить, что в районе Курской магнитной аномалии могут возникнуть изменения биологических характеристик живых существ, а также будет происходить потенцирование воздействия электромагнитных полей и пребывание в аномальной зоне может оказать более глубокое влияние на здоровье человека.

В опубликованных нами ранее работах установлено, что магнитное поле аномальных характеристик само по себе является фактором, приводящим к изменениям в составе микробиоценоза, состоянии слизистой оболочки кишечника и функции иммунной системы организма животных. Кроме того нами было установлено, что сочетанное воздействие антибактериальных препаратов и магнитного поля аномальных характеристик вызывает более глубокие изменения, нежели каждый из перечисленных факторов в отдельности [5].

При устранении причин, вызывающих изменения в микрофлоре кишечника и при эффективной коррекции установленных изменений пробиотиками происходит восстановление состава нормальной микрофлоры и ее нарушений [7, 12]. Однако нельзя забывать о том, что не все причины дисбиотических изменений могут быть устранены. Сотни тысяч людей живут на территориях со значениями напряжённости геомагнитного поля, значительно превышающие фоновые. Поэтому **целью настоящего исследования** было изучить влияние пробиотического препарат «Линекс» на восстановление микробиоценоза толстого кишечника и функционально-метаболические характеристики фагоцитов мышей в условиях дисбиоза, вызванного введением антибиотика и влиянием магнитного поля аномальных характеристик.

Материалы и методы исследования. Эксперимент проводили на мышах линии СВА весом 18-20 грамм. 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 № 755). Все животные содержались при сходных условиях в отношении температуры, влажности, освещения, а также рациона питания. Животные были разделены на 5 групп: мыши 1-й группы находились при фоновых значениях геомагнитного поля на территории г. Курска – 0,45 эрстеда (ГМП-контроль); у животных 2-й, 3-й, 4-й и 5-й опытных групп моделировали дисбиоз. При этом мыши 2-й и 3-й групп находились в аномальном магнитном поле (АМП), сопоставимым по своим характеристикам с ГМП региона КМА (напряжённость 3 эрстеда) при предварительном «омагничивании» до моделирования экспериментального дисбиоза в течение 2 недель, а также всё остальное время эксперимента. Животные 4-й и 5-й групп (группы сравнения) находились при фоновых значениях геомагнитного поля на территории г. Курска. Экспериментальный лекарственный дисбиоз моделировался путём ежедневного внутрибрюшинного введения раствора гентамицина в течение 5 дней. Затем в 3-й (АМП-коррекция) и 5-й (ГМП-коррекция) опытных группах проводили 3-недельную коррекцию нормофлоры введением пробиотика «Линекс» в дозе, рассчитанной согласно инструкции с пересчётом на единицу массы животных (пробиотик вводили интрапищеводно при помощи калиброванной канюли). Во 2-й (АМП-дисбиоз) и 4-й (ГМП-дисбиоз) опытных группах животные не получали препарат для коррекции нормофлоры.

Для исследования пристеночной микрофлоры у мышей после выведения из опыта путём дислокации шейных позвонков забирали биоптаты толстого кишечника (слепой и прямой кишки), свободные от химуса. Материал помещали в стерильный фосфатный буфер (рН 6,0) в соотношении 1 мг ткани в 100 мкл раствора на срок 2 часа для разжижения муцина. Микробиологические исследования пристеночного муцина проводили согласно методике, предложенной Л.И. Кафарской и Н.А. Коршуновым [4, 9].

Из материала готовились мазки, которые окрашивали по Граму. Разведение исследуемого материала готовили до концентраций 10^{-1} ; 10^{-2} ; 10^{-3} ; 10^{-4} и по 0,1 мл суспензии соответствующего разведения засеивали на питательные среды (табл.1)

Идентификация выделенных культур проводилась на микробиологическом анализаторе «Multiscan-Ascent» с использованием коммерческих тест систем «Лакхем-Чехия» ЭНТЕРОтест-16, СТАФИтест-16, СтрептоТест-16, ЭН-КОККУСтест-16, АРІ 20САux (BioMerieux 20 210).

Количество бактерий в 1 г биологического материала вычисляли по числу выросших колоний микроорганизмов - колониеобразующих единиц (КОЕ) при посеве из максимального разведения, где наблюдался рост не менее 10 колоний. При этом учитывали объём посевного материала. Для расчёта использовали следующую формулу: $КОЕ = E / (k * v * n)$, где КОЕ – колониеобразующая единица, E – общее количество бактерий, K – количество внесённого материала, v – количество чашек Петри, n – разведение материала. Количество выделенных микроорганизмов выражали в Ig КОЕ/г массы биологического материала.

Для оценки функционально-метаболической активности нейтрофильного звена врождённого иммунитета производили забор периферической крови животных. Функционально-метаболическая активность нейтрофилов крови оценивалась по активности фагоцитоза (процент нейтрофилов, принимающих участие в фагоцитозе, из общего числа сосчитанных нейтрофилов); фагоцитарному числу (среднее число частиц латекса, поглощённых одним фагоцитом из числа сосчитанных полиморфноядерных лейкоцитов). Кислородзависимую активность бактерицидных систем нейтрофилов оценивали в тесте восстановления нитросинего тетразолия [10, 11]. Индекс стимуляции нейтрофилов (ИСН) рассчитывали как отношение диформаза-позитивных клеток в стимулированной реакции к диформаза-позитивным клеткам в спонтанной реакции НСТ-теста. Функциональный резерв нейтрофилов (ФРН) определялся как разница между диформаза-позитивными клетками в стимулированной зимозаном реакции и диформаза-позитивными клетками в спонтанной реакции НСТ-теста.

Уровень миелопероксидазы определялся цитохимически по методу Грехема-Кнолля [8]. Состояние кислороднезависимых бактерицидных систем оценивалось по среднему гистохимическому коэффициенту при постановке лизосомально-катионного теста [13].

Статистическую обработку результатов исследования проводили путём вычисления средней арифметической (M) и средней ошибки средней (m); используя непараметрические методы: критерии Вилкоксона-Манна-Уитни, Крускала-Уоллиса, Фридмана и непараметрический вариант критерия Ньюмена-Кейлса. При оценке достоверности различий сравниваемых данных за уровень значимости принимали $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение. После курса пробиотической терапии препаратом «Линекс», количественное содержание таких представителей облигатной флоры, как лактобактерии, в группе мышей, подвергавшихся воздействию магнитного поля аномальных характеристик не претерпело достоверных изменений и продолжало оставаться достоверно ниже показателей группы контроля (табл.2). Что касается коррекции дисбиоза при фоновых значениях напряжённости геомагнитного поля, то после применения пробиотика отмечалось ещё большее снижение исследуемого показателя. Причём, если до начала терапии линексом численность лактобактерий не отличалась в группах АМП-дисбиоз и ГМП-дисбиоз, то после её окончания значения показателя группы ГМП-коррекция были достоверно ниже показателя в группе АМП-коррекция.

Что касается бифидобактерий, то использованная пробиотическая терапия как при аномальных, так и при фоновых значениях магнитного поля приводило к увеличению их содержания до уровня показателя группы контроля.

Коррекция дисбиотического состояния у мышей при фоновых значениях геомагнитного поля привело к элиминации из состава микрофлоры негемолитических вариантов кишечной палочки, тогда как в условиях воздействия аномального магнитного поля их содержание не изменилось и продолжало оставаться достоверно ниже показателей группы контроля ($lg 3,45 \pm 0,34$ и $lg 4,83 \pm 0,28$ соответственно).

Применение линекса не оказало достоверного влияния на количественные показатели бактерий рода энтеробактер: независимо от характеристики напряжённости магнитного поля их число продолжало оставаться достоверно ниже контроля.



Что касается представителей рода сальмонелла, то введение гентамицина не вызвало достоверного снижения их количества в группе АМП-дисбиоз, тогда как в группе ГМП-дисбиоз наблюдался рост показателя ($\lg 6,1 \pm 0,65$ в опыте и $\lg 5,14 \pm 0,25$ – в контроле). При этом использование пробиотика привело к тому, что сальмонеллы не определялись в составе микрофлоры обеих опытных групп.

Среди микроорганизмов муцинового слоя толстого кишечника животных опытных групп ГМП-коррекция и ГМП-дисбиоз цитробактер не выделяли, тогда как в опытной группе АМП-коррекция значение \lg КОЕ/г этих бактерий составило $3,05 \pm 0,21$, что меньше значений контроля ($\lg 6,07 \pm 0,34$) на 50% и достоверно не отличалось от значения определяемого показателя в группе АМП-дисбиоз ($\lg 3,27 \pm 0,13$).

Гемолитические энтерококки в опытных и контрольной группах не выделены. Что касается негемолитических вариантов энтерококков, то исходно повышенное после моделирования лекарственного дисбиоза их содержание вследствие терапии линексом достоверно снизилось как в группе АМП-коррекция ($\lg 3,75 \pm 0,28$), так и в группе ГМП-коррекция ($\lg 3,23 \pm 0,2$). Сопоставление этих значений с данными группы контроля ($\lg 3,83 \pm 0,18$) показало, что в случае воздействия аномального магнитного поля наблюдалась коррекция изменённого показателя, а под влиянием фонового геомагнитного поля – снижение его ниже данных контроля.

Стрептококки во всех опытных группах не выделялись, тогда как значение \lg КОЕ/г этих бактерий в контроле составляло 4,8.

Негемолитические стафилококки у животных группы контроля не определялись, в отличие от опытных групп. Причём в группе АМП-коррекция, значение КОЕ составило $\lg 2,75 \pm 0,18$, что было практически вдвое меньше, чем в группе АМП-дисбактериоз ($\lg 5,12 \pm 0,25$) и на 17% больше, чем в группе ГМП-коррекция ($\lg 3,23 \pm 0,15$). При этом показатель группы ГМП-коррекция был на 35,5% меньше, чем в группе ГМП-дисбиоз. Гемолитические стафилококки не выделялись ни в одной из групп, кроме группы АМП-дисбиоз.

Представители дрожжеподобных грибов рода кандиды не входили в состав микрофлоры муцинового слоя толстого кишечника мышей контрольной группы. Появление этих микробов в составе флоры в значительных количествах зарегистрировано после воздействия гентомицином. После использования пробиотических бактерий в качестве препаратов, корригирующих состав микрофлоры, отмечено их уменьшение: в группе АМП-коррекция на 22,8%, а в группе ГМП-коррекция – на 14%.

Характеризуя функционально-метаболическую активность нейтрофилов периферической крови мышей необходимо отметить, что введение гентамицина в условиях воздействия геомагнитного поля фоновых характеристик приводило к изменению только 2-х показателей – увеличению уровня миелопероксидазы и снижению значений спонтанного НСТ-теста (табл.3). В то же время после терапии линексом наблюдались изменения (снижение) всех изученных показателей. В результате значения всех показателей группы ГМП-коррекция стали достоверно ниже группы контроля.

В группе в АМП-дисбиоз, в отличие от группы ГМП-дисбиоз, развитие нарушений состава микрофлоры сопровождалось изменением практически всех характеристик функционально-метаболической активности нейтрофилов. При этом значения фагоцитарной активности, фагоцитарного числа, завершённости фагоцитоза, индекса активности фагоцитов, уровни лизосомальных катионных белков и миелопероксидазы достоверно превышали показатели группы контроля. Ниже контрольных были только значения стимулированного НСТ-теста, индекса стимуляции и функционального резерва нейтрофилов. После использования пробиотика исходно повышенные показатели подверглись уменьшению, причём до значений, достоверно более низких, чем в контроле. Уменьшились также значения и спонтанного НСТ-теста, что на фоне отсутствия изменений со стороны стимулированного НСТ-теста привело к увеличению функционального резерва нейтрофилов, который, однако, по-прежнему был ниже контрольных цифр.

Сопоставляя значения исследованных показателей у мышей с дисбиозом до и после коррекции линексом в условиях воздействия магнитного поля различной напряжённости можно отметить, что до начала терапии только уровень стимулированного НСТ-теста, индекс стимуляции и функциональный резерв нейтрофилов мышей



группы АМП-дисбиоз был ниже значений группы ГМП-дисбиоз. Значения остальных показателей были достоверно выше. После коррекции дисбиоза все показатели группы АМП-коррекция (кроме фагоцитарного числа и индекса активности фагоцитов) достоверно превышали значения мышей группы ГМП-коррекция.

Заключение. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что пероральное применение линекса на фоне лекарственного дисбиоза и аномально-го воздействия магнитного поля способствует более полному восстановлению облигатных представителей нормофлоры в муциновом слое толстой кишки. При этом наблюдается увеличение количества условно-патогенных микроорганизмов идентифицированных как негемолитические и гемолитические стафилококки, которые считаются нетипичными микроорганизмами для кишечного микробиоценоза, относящихся к группе транзиторных. Появление этих бактерий в желудочно-кишечном тракте может привести к воспалительным процессам, пищевой токсикоинфекции.

Показатели функционально-метаболической активности нейтрофилов крови мышей вне зависимости от напряжённости магнитного поля, в условиях которого они содержались, реагировали на терапию линексом снижением их значений. При этом необходимо отметить, что в условиях воздействия геомагнитного поля фоновых характеристик формирование дисбиотического процесса не сопровождалось развитием нарушений фагоцитарного звена врождённого иммунитета. При воздействии же аномального магнитного поля изменялись исходно разбалансированные показатели.

В заключение, хотелось бы отметить, что, несмотря на длительную историю антибактериальной терапии и множество работ, посвящённых коррекции её побочных эффектов, эта проблема остаётся актуальной. Каждый врач, назначая антибактериальный препарат, лишней раз должен продумать тактику терапии и целесообразность данного назначения [14].

Список литературы

1. Ардатская, М.Д. Дисбактериоз кишечника: эволюция взглядов. Современные принципы диагностики и фармакологической коррекции / М.Д. Ардатская, О.Н.Минушкин // *Consiliummedicum* / Приложение Гастроэнтерология.-2006.-№2-С.4-18.
2. Бельмер, С.В. Антибиотикоассоциированный дисбиоз у детей /С.В. Бельмер // *Русский медицинский журнал*.- №1.-2004-С.14-16
3. Дисбактериоз кишечника. Руководство по диагностике и лечению / Под редакцией проф. Ткаченко Е.И., проф. Суворова А.Н.- СПб: Спецлит., 2007.- 238с.
4. Ефимов, Б.А., Современные методы оценки качественных и количественных показателей микрофлоры кишечника и влагалища / Б.А. Ефимов, Л.И. Кафарская, В.М.Коршунов // *Журнал микробиологии*. - 2002.- №4.- С.72-78.
5. Исследование пристеночной микрофлоры кишечника мышей в условиях аномального магнитного поля в норме и при экспериментальном дисбиозе / О.А.Медведева, П.В. Калущкий, А.В.Беседин и др.// *Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье»*. – 2010. - №2. - С.15-20
6. Калмыкова, А.И. Клеточные и системные механизмы действия пробиотиков /А.И.Калмыкова, В.Г. Селяцкая, Н.А. Пальчикова и др.- Новосибирск, 2007. - 280С.
7. Копанев, Ю.А., Алешкин В.А. Дисбактериоз кишечника и дисбиотические реакции у детей / Ю.А. Копанев, В.А. Алешкин // *Педиатрия. Журнал имени Г.Н.Сперанского* -2002 - №6 - С.100-103.
8. Нарциссов, Р.П. Критерии лабораторной диагностики болезней / Р.П. Нарциссов // *Лаб. Дело*. – 1964. - № 3. - С.150-151.
9. Несвижский, Ю.В., Микробиоценоз пристеночного муцина желудочно-кишечного тракта крыс с индуцированным дисбиозом / Ю.В.Несвижский, Е.А.Богданов, В.В.Зверев, А.А.Воробьев А.А.// *Журнал микробиологии*.- 2007.-№3.- С.57-60.
10. Определение функциональной активности нейтрофилов в тесте восстановления нитросинеготетразолия / Ю.И. Бажора, В.Н. Тимошевский, П.З. Протченко, А.Н. Головченко // *Лаборатор. дело*. – 1981. - № 4. - С. 198-200.



11. Способ оценки функциональной активности нейтрофилов человека по реакции восстановления нитросинего тетразолия: методич. рекомендации / сост. М.Е. Виксман, А.Н. Маянский. - Казань, 1979. - 14 с.
12. Хавкин, А.И., Терапия антибиотик - ассоциированного дисбактериоза / А.И.Хавкина, Н.С. Жихарева // Медицинский научный и учебно-методический журнал – 2007. -№38. - С.30-44.
13. Шубич, М. Г. Выявление катионных белков в цитоплазме лейкоцитов с помощью бромфенолового синего /М.Г. Шубич // Цитология. – 1974. – № 10. – С. 1321 - 1322.
14. Glanfrilli, P.M. Normal intestinal flora in children and their changes in pathological conditions / P.M. Glanfrilli //Ann Ist super Sanita.1986.-22.-№ 3.-P.783-789.

THE REACTION OF MUCINLARGE INTESTINE MICROFLORA AND BLOOD NEUTROPHILS FUNCTIONAL-METABOLIC ACTIVITY INDICATORS OF MICE UNDER THE USAGE OF PROBIOTIC "LINEX" FOR THE TREATMENT OF EXPERIMENTAL MEDICINE INDUSED DYSBIOSIS IN THE CONDITIONS OF HIGH TENSION MAGNETIC FIELD INFLUENCE

O.A. MEDVEDEVA
P.V. KALUTSKY
A.V. BESEDIN
L.V. ZHILYAeva
A.V. IVANOV
E.V. OSTAP
S.K. MEDVEDEVA

*Kursk State Medical
University*

e-mail:olgafrida@rambler.ru

The influence of probiotic "Linex" on mucosa large intestine microflora and blood neutrophils functional-metabolic activity indicators of mice with dysbiosis, induced gentamicin, under the influence of varying intensity magnetic fields studied. It has been established that application of "Linex" promotes a full restoration of the normal flora obligate representatives in musin layer of large intestine namely in the high tension magnetic field action. Indicators of mice blood neutrophils functional-metabolic activity, regardless of the magnetic field strength, in which conditions they were kept, respond to "Linex" therapy by decreasing their values.

Key words: dysbiosis, magnetic fields, intestine microflora, neutrophils, linex.