

Влияние пробиотических штаммов эшерихий и энтерококков на активность кишечных пищеварительных ферментов при коррекции экспериментального дисбиоза у крыс



А. В. Громова

А. В. Громова, д.б.н., зав. лабораторией физиологии питания¹
Е. И. Ермоленко, д.м.н., зав. лабораторией биомедицинской микроэкологии², проф. кафедры физиологии медицинского факультета³
Ю. В. Дмитриева, к.б.н., ст.н.с. лаборатории физиологии питания¹
А. С. Алексеева, н.с. лаборатории физиологии питания¹
А. Л. Сепп, аспирантка кафедры внутренних болезней животных⁴, ст. лаборант лаборатории физиологии питания¹
М. П. Котылева, н.с. лаборатории биомедицинской микроэкологии²
А. Н. Суворов, проф., член-корр. РАН, зав. отделом молекулярной микробиологии², зав. кафедрой фундаментальных проблем медицины и медицинской технологии факультета стоматологии и медицинских технологий³



Е. И. Ермоленко

¹ФГБУН «Институт физиологии имени И. П. Павлова» Российской академии наук, г. Санкт-Петербург

²ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», г. Санкт-Петербург

³ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», г. Санкт-Петербург

⁴ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская академия ветеринарной медицины», г. Санкт-Петербург



А. Л. Сепп

Effect of probiotic strains of escherichia and enterococci on activities of intestinal digestive enzymes at correction of experimental dysbiosis in rats

L. V. Gromova, E. I. Ermolenko, Y. V. Dmitrieva, A. S. Alekseeva, A. L. Sepp, M. P. Kotyleva, A. N. Suvorov
Institute for Physiology n.a. I. P. Pavlov, Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg State University, Saint Petersburg Academy of Veterinary Medicine; Saint Petersburg, Russia

Резюме

В опытах на крысах «Вистар» сопоставлены эффекты пробиотических штаммов бактерий *Enterococcus faecium* L3 и *Escherichia coli* M17 в отношении восстановления микробиоты и активности кишечных пищеварительных ферментов после экспериментального дисбиоза. Дисбиоз вызывали введением интражелудочно в течение трех дней ампициллина и метронидазола. Затем животным вводили интражелудочно в течение пяти дней пробиотики, содержащие *E. faecium* L3 (Е. ф.), *E. coli* M17 (Е. с.), или молоко (контроль-1, К1). В контроле К0 крысам вместо антимикробных препаратов вводили воду, а затем молоко. Активности ферментов в слизистой оболочке тонкой кишки оценивали биохимическими методами, а состав микробиоты — бактериологически и методом ПЦР в режиме реального времени. После применения Е. ф. наблюдалось более быстрое восстановление кишечной микробиоты, чем после применения Е. с. или в группе К1 (без пробиотика). В группе К1 были повышены по сравнению с контролем К0 (без антимикробных препаратов и пробиотиков) активности мальтазы, лактазы, щелочной фосфатазы и аминопептидазы N в тонкой кишке. Применение пробиотиков Е. ф. и Е. с. не влияло на восстановление активности аминопептидазы N, но сопровождалось частичным восстановлением активности щелочной фосфатазы и тенденцией к восстановлению активности мальтазы, а в случае пробиотика Е. ф. наблюдалось также полное восстановление активности лактазы. Таким образом, пробиотические бактерии *E. faecium* L3 по сравнению с *E. coli* M17 более эффективны при восстановлении микробиоты и активности некоторых ключевых кишечных ферментов (в частности, лактазы) после нарушений, вызванных кишечным дисбиозом.

Ключевые слова: кишечник, пищеварительные ферменты, микробиота, *Enterococcus faecium* L3, *Escherichia coli* M17.

Summary

In experiments on Wistar rats, the effects of probiotic bacteria *Enterococcus faecium* L3 and *Escherichia coli* M17 on the restoration of the microbiota and activities of the intestinal digestive enzymes after experimental dysbiosis were compared. Dysbiosis was caused by intragastric administration of ampicillin and metronidazole for 3 days. Subsequently, probiotics containing *E. faecium* L3 (E. f.) and *E. coli* M17 (E. c.), or milk (control-1, K1) were administered to the animals intragastrically for 5 days. In the control K0, rats were given water, instead of antimicrobials, and then milk. Activities of the enzymes in the small intestinal mucosa were evaluated by biochemical methods, and the microbiota composition — bacteriologically and by PCR in real time. After using the E. f. there was a faster recovery of the intestinal microbiota than after using the E. c. or without probiotics (in the group K1). In the group K1, the activity of maltase, lactase, alkaline phosphatase and aminopeptidase N in the small intestine was increased in comparison with the control K0 (without antimicrobial agents and probiotics). Use of the E. f. and E. c. did not affect a recovery of the activity of aminopeptidase N, but was accompanied by a partial restoration of alkaline phosphatase activity and a tendency to restore maltase activity, and in the case of the E. f. a complete recovery of lactase activity was also observed. Thus, the probiotic *E. faecium* L3 bacteria, compared to the *E. coli* M17, are more effective in restoring the microbiota and the activity of some key intestinal enzymes (in particular lactase) after the disorders caused by intestinal dysbiosis.

Key words: intestine, digestive enzymes, microbiota, *Enterococcus faecium* L3, *Escherichia coli* M17.

Введение

Микробиота желудочно-кишечного тракта участвует в выполнении многих жизненно важных функций, в частности, таких, как питание и защита от патогенных микроорганизмов [1–4]. Показано, что существенные нарушения состава кишечной микробиоты — дисбиозы, возникающие по разным причинам, могут приводить к сдвигу метаболического баланса организма, провоцировать развитие патологии практически любой его системы [1–3]. В последнее время для коррекции и профилактики дисбиозов кишечника успешно применяются пробиотики, в состав которых входят различные штаммы живых бактерий, обладающих полезными свойствами и при введении в адекватных количествах оказывающих благотворное действие на организм [2, 3, 5]. Вместе с тем относительно немного известно об эффективности используемых пробиотических препаратов в отношении восстановления пищеварительной функции желудочно-кишечного тракта, оказывающей существенное влияние на общий метаболизм организма. В нашей предшествующей работе, используя модель экспериментального дисбиоза у крыс, были показаны специфические особенности действия двух штаммов молочнокислых пробиотических бактерий *Lactobacillus fermentum* Z («Биламинолакт») и *Enterococcus faecium* L3 («Ламинолакт», «Бакфир», «Био-Био») при коррекции микробиоты и активности ряда ключевых кишечных пищеварительных ферментов [6]. В настоящей работе были продолжены исследования в данном направлении и проанализировано влияние пробиотических бактерий *Escherichia coli* M17 («Бификол», «Колибактерин») на восстановление микробиоты и активности кишечных пищеварительных ферментов после экспериментального дисбиоза у крыс. В качестве сравнения использовались пробиотические бактерии *E. faecium* L3.

Материалы и методы исследования

Работа выполнена на 40 крысах («Вистар», самцы, масса тела 200–250 г). Содержание, питание и уход

за животными осуществляли в соответствии с требованиями комиссии по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных при Институте экспериментальной медицины.

В трех опытных группах крысам сначала в течение трех дней ежедневно внутрижелудочно вводили ампициллин и метронидазол (в дозах соответственно 15 и 10 мг на животное), растворенные в 0,5 мл дистиллированной воды. Затем в течение пяти дней аналогичным способом и в таком же объеме вводили молочнокислые закваски, содержащие *E. faecium* L3 (группа *E. f.*) и *E. coli* M17 (группа *E. c.*) или молоко (контроль-1, K1). В контрольной группе K0 животным сначала аналогичным способом вводили дистиллированную воду (вместо антимикробных препаратов), а затем молоко.

Пробиотики вводились в дозе 8 lg КОЕ/мл, которая в пересчете на массу тела крысы соответствует максимальной дозе, применяемой на людях в клинике.

В конце экспериментов у крыс отбирали пробы фекалий для анализа состава кишечного микробиоценоза, а после декапитации животных — пробы слизистой оболочки из различных отделов тонкой кишки (двенадцатиперстная, тощая, подвздошная) и из толстой кишки для определения в них активности кишечных мембранных пищеварительных ферментов.

Состав кишечной микробиоты анализировался бактериологическим методом и при помощи полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ), как указано ранее [7].

Активности мальтазы (НФ 3.2.1.20), лактазы (НФ 3.2.1.23), щелочной фосфатазы (НФ 3.1.3.1) и аминопептидазы N (НФ 3.4.11.2) определялись в гомогенатах сегментов слизистой оболочки кишечника в соответствии с методиками, описанными ранее [6, 7, 8]. Для каждого фермента рассчитывались значения как удельной (мкмоль/мин. на 1 г ткани), так и интегральной активности с учетом массы слизистой оболочки (мкмоль/мин. на участок тонкой кишки или мкмоль/мин. на всю кишку). Поскольку при разных вариан-

тах расчетов наблюдались в основном близкие закономерности в изменении ферментативных активностей, в статье приведены лишь данные в отношении интегральной активности (мкмоль/мин. на всю кишку).

Статистический анализ проводился с использованием t-критерия Стьюдента. Достоверными считались изменения при уровне значимости $P < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Физиологическое состояние животных и бактериологический анализ

После введения антимикробных препаратов и на ранних сроках после их отмены у крыс, получавших пробиотики (группы *E. f.* и *E. c.*) или молоко (контроль K1), отмечались признаки диспепсии: маслянистая консистенция фекалий, в некоторых случаях понос или полифекалия. Введение животным пробиотических бактерий *E. faecium* L3 (группа *E. f.*) и *E. coli* M17 (группа *E. c.*) в течение пяти дней ускоряло устранение симптомов диспепсии по сравнению с контролем K1. При бактериологическом анализе фекалий в конце опытов у животных всех групп, получавших антимикробные препараты, были выявлены остаточные признаки дисбиоза кишечника. Они в наибольшей степени проявлялись в контрольной группе K1 (снижение содержания бифидобактерий и лактобацилл, увеличение популяции условно патогенных бактерий и грибов по сравнению с нормой) и в группе *E. c.* (снижение количества *Bifidobacterium spp.* и *Faecalibacterium prausnitzii*, увеличение количества *Enterococcus spp.*, *E. coli*, *Bacteroides fragilis* по сравнению с нормой). У крыс этих двух групп в фекалиях были обнаружены также *Proteus mirabilis* или *Klebsiella spp.* в количестве более 4 lg КОЕ/г. Полученный в настоящей работе результат в отношении эффективности пробиотических бактерий *E. faecium* L3 при коррекции экспериментального дисбиоза у крыс хорошо согласуется с данными нашего предшествующего исследования [6].

*Масса тела животных
и морфометрические показатели
тонкой кишки*

Во всех исследованных группах крыс (K0, K1, *E. f.*, *E. c.*) в конце опытов наблюдалось увеличение массы тела по сравнению с исходным уровнем — до их начала. Масса слизистой оболочки в кишечнике, а также в его отдельных участках (двенадцатиперстная, тощая, подвздошная и толстая кишка), определенная в конце опытов в контрольной группе K1 и в группе *E. c.*, не отличалась от таковой в контроле K0, а в группе *E. f.* она была выше, чем в группе K0 (в подвздошной кишке на 27%, $P < 0,05$) (рис. 1).

Вместе с тем мы не обнаружили, как и ранее [6], влияния исследованных пробиотических бактерий на восстановление массы химуса. В конце опытов у крыс в контроле K1 (без пробиотика) и в группах с пробиотиками масса химуса была повышенной (в основном в толстой кишке) по сравнению с таковой в контроле K0 (рис. 1). По-видимому, и в случае пробиотических бактерий *E. coli* M17 использованного срока применения этого пробиотика недостаточно для проявления восстановления двигательной активности кишечника.

Активности кишечных ферментов

Мальтаза — ключевая дисахаридаза при гидролизе полимеров глюкозы [9, 10]. В отсутствие пробиотиков после отмены антимикробных препаратов (контроль K1) наблюдалось повышение по сравнению с K0 активности мальтазы в слизистой оболочке тонкой кишки (на 62%, $P < 0,05$) (рис. 2). Применение пробиотических бактерий *E. faecium* L3 и *E. coli* M17 сопровождалось лишь тенденцией к снижению этой активности в тонкой кишке по сравнению с K1.

Лактаза — дисахаридаза, незаменимая при гидролизе молочного сахара — лактозы [9, 10]. В контроле K1 (в отсутствие пробиотика) и в группе с пробиотиком *E. coli* M17 активность лактазы в слизистой оболочке тонкой кишки была повышенной по сравнению с контролем K0 на 38 и 40% соответственно (рис. 2). В то же время применение пробиотика *E. faecium*

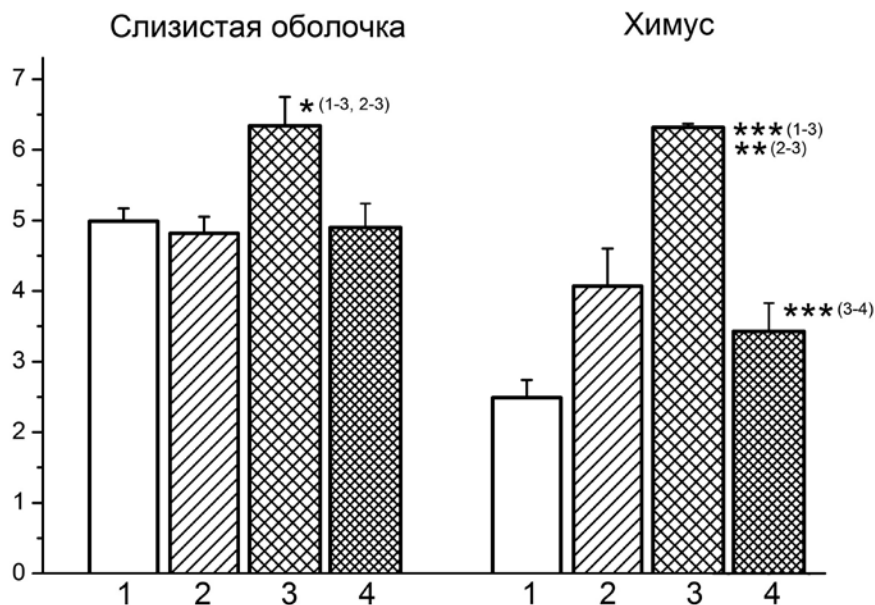


Рисунок 1. Масса слизистой оболочки и химуса в кишечнике.

По вертикалям: масса слизистой оболочки и химуса (г).

Обозначения: 1 — контроль K0: введение воды (3 дня), затем молока (5 дней); 2 — контроль K1: введение антимикробных препаратов (3 дня), затем молока (5 дней); 3 — введение антимикробных препаратов (3 дня), затем бактерий *E. faecium* L3 (5 дней); 4 — введение антимикробных препаратов (3 дня), затем бактерий *E. coli* M17 (5 дней).

Примечание: * — $P < 0,05$; $P < 0,01$; *** — $P < 0,003$ по отношению к контролям K0 и K1.

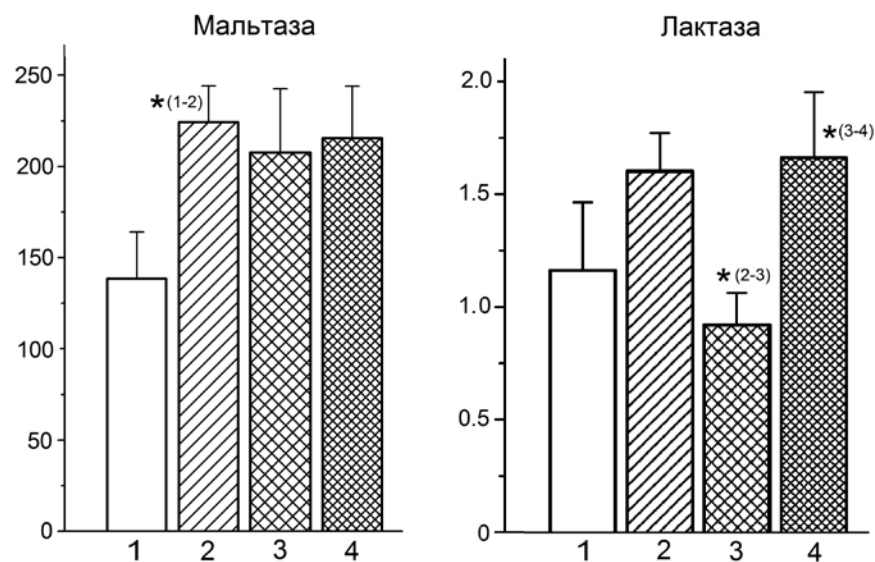


Рисунок 2. Активность мальтазы и лактазы в слизистой оболочке кишечника крыс.

По вертикалям: интегральные активности ферментов (мкмоль/мин. на всю кишку).

Обозначения такие же, как в подписи к рис. 1.

Примечание: * — $P < 0,05$; по отношению к контролям K0 и K1

L3 приводило к снижению этой активности в тонкой кишке до уровня в контроле K0.

Щелочная фосфатаза участвует в гидролизе эфиров фосфорной кислоты, в регуляции всасывания липидов, а также в осуществлении защитных функций (детоксикация

бактериального липополисахарида, снижение воспаления, вызванного этим токсином, а также ограничение бактериальной транслокации через эпителий кишечника) [11–13]. В отсутствие пробиотиков (контроль K1) активность щелочной фосфатазы была повышена по сравнению с контролем

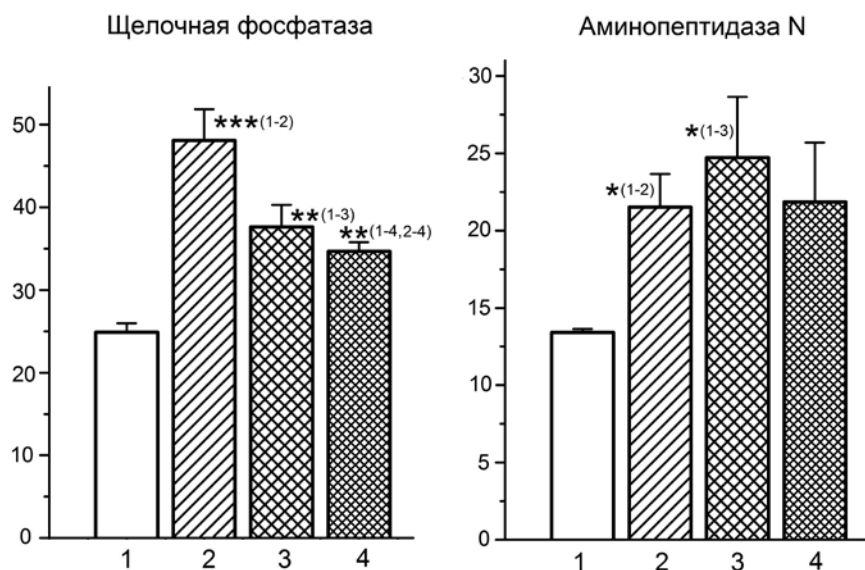


Рисунок 3. Активность щелочной фосфатазы и аминопептидазы N в слизистой оболочке кишечника крыс.

По вертикалям: интегральные активности ферментов (мкмоль/мин. на всю кишку).

Обозначения такие же, как в подписи к рис. 1.

Примечание: * — $P < 0,05$; ** — $P < 0,01$; *** — $P < 0,003$ по отношению к контролям К0 и К1.

К0 в слизистой оболочке тонкой кишки на 93 % ($P < 0,003$) (рис. 3). После введения обоих пробиотиков повышение данного показателя по сравнению с контролем К0 было менее выраженным и составляло 51 % ($P < 0,01$) в группе с *E. faecium* L3 и 39 % ($P < 0,01$) в группе с *E. coli* M17. Сохранение повышенного уровня щелочной фосфатазы после применения пробиотиков, по-видимому, обусловлено наличием в кишечнике в этих условиях остаточного воспалительного процесса, вызванного неполностью скомпенсированным дисбиозом.

Аминопептидаза N участвует в гидролизе олигопептидов, а также вовлечена в транспорт холестерина через кишечный эпителий [14], в иммунные [15] и воспалительные ответы [16]. Активность этого фермента была значительно повышенной (по сравнению контролем К0) как в группе К1 без пробиотика (на 60%; $P < 0,05$), так и в группах с пробиотиками *E. f.* и *E. c.* (соответственно на 84%, $P < 0,05$ и на 63 %, $P > 0,05$). Значение этого факта пока остается неясным. Но, учитывая данные других авторов о том, что ингибиторы пептидаз, включая аминопептидазу N, уменьшают проявление колита у мышей [16], можно предположить, что повышение активности аминопептидазы N в на-

ших опытах связано по крайней мере частично с наличием воспалительного процесса в кишечнике.

Заключение

Пробиотические бактерии *E. faecium* L3 по сравнению с *E. coli* M17 более эффективны при восстановлении состава микробиоты и активностей некоторых ключевых кишечных пищеварительных ферментов (в частности, лактазы), нарушенных вследствие кишечного дисбиоза. Эти данные могут быть полезны при выборе пробиотиков в случае персонифицированной терапии или для разработки новых лекарственных средств.

Работа поддержана грантом РНФ 16–15–10085 и выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных научных исследований государственных академий на 2013–2020 годы (ГП-14, раздел 64).

Список литературы

1. Уголев А. М. Теория адекватного питания и трофология. // Л.: Наука. — 1991. — 272 с.
2. Шендеров Б. А. Медицинская микробная экология и функциональное питание. // М.: Издательство «Грантъ». — 1998. — Т. 1 (Микрофлора человека и животных и ее функция). — 288 с.
3. Ткаченко Е. И., Успенский Ю. П. Питание, микробиоценоз и интеллект человека. // СПб. — 2006. — 560 с.

4. Cani P. D., Delzenne N. M. The role of the gut microbiota in energy metabolism and metabolic disease. // *Current Pharmaceutical Design*. — 2009. — Vol. 15. — P. 1546–1558.
5. Goldin B. R., Gorbach S. L. Clinical indication for probiotics: An Overview. // *Clinical Infectious Diseases*. — 2008. — Vol. 46. — P. 96–100.
6. Громова Л. В., Алексеева А. С., Дмитриева Ю. В., Савочкина Е. В., Груздков А. А., Котылева М. П., Ермоленко Е. И., Суворов А. Н. Влияние пробиотических бактерий на пищеварение в кишечнике при коррекции экспериментального дисбиоза у крыс // *Медицинский алфавит*. — 2017. — Т. 1 (Практическая гастроэнтерология), № 9. — С. 46–49.
7. Ermolenko E., Gromova L., Borshchov Yu., Voeikova A., Karaseva A., Ermolenko K., Grudkov A., Suvorov A. Influence of different probiotic lactic acid bacteria on microbiota and metabolism of rats with dysbiosis. // *Bioscience of Microbiota, Food and Health*. — 2013. — Vol. — 32, № 2. — P. 41–49.
8. Ермоленко Е. И., Донец В. Н., Дмитриева Ю. В., Ильясов Ю. Ю., Суворова М. А., Громова Л. В. Влияние пробиотических энтерококков на функциональные характеристики кишечника крыс при дисбиозе, индуцированном антибиотиками. // *Вестник Санкт-Петербургского университета. Серия 11. Медицина*. — 2009. Вып. № 1. — С. 157–167.
9. Тимофеева Н. М., Иезуитова Н. Н., Громова Л. В. Современные представления о всасывании моносахаридов, аминокислот и пептидов в тонкой кишке млекопитающих. // *Успехи физиологических наук*. — 2000. — Т. 31, № 4. — С. 24–37.
10. Lin A. H., Nichols B. L., Quezada-Calvillo R., Avery S. E., Sim L., Rose D. R., Naim H. Y., Hamaker B. R. Unexpected high digestion rate of cooked starch by the Ct-maltase-glucoamylase small intestine mucosal α -glucosidase subunit // *Plos One*. — 2012. — V. 7, № 5: e35473.
11. Lallès J. P. Intestinal alkaline phosphatase: novel functions and protective effects // *Nutr. Rev.* — 2014. — Vol. 72, № 2. — P. 82–94.
12. Tuin A., Poelstra K., de Jager-Krikken A. et al. Role of alkaline phosphatase in colitis in man and rats // *Gut*, 2009. — V. 58, № 3. — P. 379–387.
13. Estaki M., DeCoffe D., Gibson D. L. Interplay between intestinal alkaline phosphatase, diet, gut microbes and immunity // *World J. Gastroenterol.* — 2014. — Vol. 20, № 42. — P. 15650–15656.
14. Kramer W., Girbig F., Corsiero D., Pfenninger A., Frick W. et al. Aminopeptidase N (CD 13) is a molecular target of the cholesterol absorption inhibitor ezetimibe in the enterocyte brush border membrane // *J. Biol. Chem.* — 2005. — Vol. 280, № 2. P. — 1306–1320.
15. Melkebeek V., Rasschaert K., P Bellot P., Tilleman K., Favoreel H., et al. Targeting aminopeptidase N, a newly identified receptor for F4ac fimbriae, enhances the intestinal mucosal immune response // *Mucosal Immunol.* — 2012. — Vol. 5, № 6. — P. 635–645.
16. Bank U., Tadge M., Wolke C., Bukowska A., Ittenson A., et al. Inhibition of alanyl-aminopeptidase on CD4+CD25+ regulatory T-cells enhances expression of FoxP3 and TGF-beta1 and ameliorates acute colitis in mice. // *Int. Mol. Med.* — 2007, Oct. — Vol. 20, № 4. — P. 483–492.

