ORIGINAL PAPERS

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

DOI: 10.56871/4633.2022.37.29.005
УДК 577.18+615.33+616.3-06-002.1

ИЗМЕНЕНИЯ СОСТАВА КИШЕЧНОЙ МИКРОБИОТЫ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ СИСТЕМНОГО ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА У КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА

© Алёна Борисовна Карасёва[1], Инесса Юрьевна Буровенко[2], Анна Николаевна Цапиева[1], Юрий Юрьевич Борщев[2], Александр Николаевич Суворов[1], Михаил Михайлович Галагудза[2]

[1] Институт экспериментальной медицины. 197376, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12
[2] Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова. 197341, Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, 2

Контактная информация: Михаил Михайлович Галагудза — член-корреспондент РАН, д.м.н., профессор, директор. E-mail: galagudza@almazovcentre.ru. Orcid ID: 0000-0001-5129-9944

Поступила: 01.02.2022 ***Одобрена: 22.02.2022*** ***Принята к печати: 01.03.2022***

РЕЗЮМЕ. Цель работы — исследование изменений качественного и количественного состава кишечной микробиоты на модели синдрома системного воспалительного ответа (ССВО), вызванного химически индуцированным колитом и осложненного антибиотик-индуцированным дисбиозом, у крыс стока Wistar под влиянием пробиотической терапии. Моделирование ССВО с использованием антимикробных препаратов широкого спектра действия характеризуется снижением титра потенциально полезных микроорганизмов при увеличении этого показателя для условно патогенных представителей, таких как *Proteus* spp., *K. oxytoca*. Отмечено снижение общего бактериального числа, представительства лактобацилл, бифидобактерий, *Akkermansia muciniphila* и *F. Prausnitzii* и увеличение относительного количества грамотрицательных бактерий. Для здоровых крыс в возрасте 12–14 недель характерно отсутствие в фекалиях таких условно патогенных представителей нормобиоты, как *Proteus* spp., *Klebsiella oxytoca* и *Enterobacter* spp. с их манифестацией после моделирования ССВО. При введении пробиотических штаммов крысам в возрасте 8–9 недель отмечается увеличение общего бактериального числа, *F. prausnitzii* с повышением колонизационной резистентности за счет роста популяции *Bacteroides* spp. Исследование причин данных различий важно для понимания перспектив применения пробиотических препаратов в различных периодах онтогенеза.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: синдром системной воспалительной реакции; антибиотик-индуцированный дисбиоз; пробиотики.

CHANGES IN THE COMPOSITION OF GUT MICROBIOTA IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF SYSTEMIC INFLAMMATORY RESPONSE IN RATS OF DIFFERENT AGES

© Alena B. Karaseva[1], Inessa Yu. Burovenko[2], Anna N. Tsapieva[1], Yuriy Yu. Borshchev[2], Aleksandr N. Suvorov[1], Mikhail M. Galagudza[1]

[1] Institute of Experimental Medicine. 197376, Saint-Petersburg, Akademika Pavlova str., 12
[2] V.A. Almazov National Medical Research Center. 197341, Saint-Petersburg, ul. Akkuratova, 2

Contact information: Mikhail M. Galagudza — MD, DSc, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Science, Director. E-mail: galagudza@almazovcentre.ru Orcid ID: 0000-0001-5129-9944.

Received: 01.02.2022 ***Revised: 22.02.2022*** ***Accepted: 01.03.2022***

SUMMARY. The aim of this work was to study qualitative and quantitative changes in gut microbiota in an experimental model of systemic inflammatory response syndrome (SIRS) caused by chemically induced colitis and complicated by antibiotic-induced dysbiosis in Wistar rats under the influence of probiotic therapy. Modeling of SIRS using broad-spectrum antimicrobials was characterized by a decrease in titer of potentially beneficial microorganisms with an increase in titer of opportunistic representatives, such as *Proteus* spp., *K. oxytoca*. There was a decrease in the total bacterial number, suppressed representation of *lactobacilli, bifidobacteria, Akkermansia muciniphila* and *F. prausnitzii* and an increase in the relative number of gram-negative bacteria. Healthy rats aged 12–14 weeks were marked by the absence of such conditionally pathogenic representatives of normobiota as *Proteus* spp., *Klebsiella oxytoca* and *Enterobacter* spp. in the faeces with their manifestation after the SIRS simulation. When probiotic strains were administered to rats aged 8–9 weeks, there was an increase in the total bacterial number and *F. prausnitzii* with increased colonization resistance due to the growth of the *Bacteroides* spp. population. The study of the causes of these differences is important for understanding the prospects for the use of probiotic drugs in different periods of ontogenesis.

KEY WORDS: systemic inflammatory response syndrome; antibiotic-induced dysbiosis; probiotics.

ВВЕДЕНИЕ

Глобальный характер распространения ожирения [10], воспалительных заболеваний кишечника [24], заболеваний сердечно-сосудистой системы [14] в связи с изменениями качественного и количественного состава кишечной микробиоты [6, 17, 28] вследствие антибиотик-индуцированного дисбиоза (АИД) [7, 22] в настоящее время можно рассматривать как отдельный патогенетический комплекс. Экспериментальное моделирование отмеченных ко- и полиморбидных состояний требует изучения влияния факторов пола, возраста, наследственности, диеты и прочих с целью доклинических исследований лекарственных препаратов.

К настоящему времени для определения эффективности пробиотических препаратов нами разработана модель синдрома системного воспалительного ответа (ССВО), включающая первичное висцеральное ожирение (ПВО), АИД и химически индуцированный колит (ХИК) [1]. Ранее при проведении исследований на данной модели показано влияние базового микробного статуса экспериментальных животных [3, 9], их пола [8] и качества жиров в диете [2] на устойчивость миокарда к ишемическому-реперфузионному повреждению. В наших предыдущих опытах животным со статусом SPF для моделирования АИД внутрижелудочно вводили антимикробные препараты (АМП) широкого спектра действия в виде смеси амоксициллина, метронидазола и кларитромицина при соблюдении базового протокола эксперимента, в некоторых случаях нами отмечены противоречивые показатели в группе моделирования ССВО, что, несомненно, исключает возможность однозначной интерпретации результатов опыта или доклинического исследования.

Учитывая исследование роли кишечной микробиоты в патогенезе моделируемых состояний в эксперименте, исключительно важным представляется как относительное постоянство микробного статуса экспериментальных животных перед опытом, так и воспроизводимость изменений качественного и количественного состава кишечной микробиоты по ходу эксперимента. Хорошо известно, что возбудители инвазивных заболеваний не только потенциально опасны для животных и человека, но и искажают результаты исследований. Примерами таких инфекций с оральным и воздушно-капельным путем передачи могут служить гепатоэнтеротропный вирус гепатита мышей (MHV) (coronavirus), возбудители пневмонии *Pneumonia virus* мышей (PVM) (*paramyxovirus*), *Coronavirus* крыс (RCV) (*coronavirus*), *Klebsiella pneumoniae*; заболеваний кожи и абсцессов — *Staphylococcus aureus*; энтеритов — *Enterobacter sp*., инфекции мочевыводящих путей, абсцессов, дерматитов, энтеритов — некоторые серотипы

Escherichia coli и *Proteus sp.* и многие другие [4].

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Цель данной работы — анализ собственных данных об изменении качественного и количественного состава кишечной микробиоты в фекалиях у крыс-самцов стока Wistar двух возрастных групп, полученных методом ПЦР-РВ (Колонофлор-16) на модели ССВО с последующей пробиотической коррекцией с помощью смеси штаммов *Lactobacillus acidophilus* и *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* для оценки возможной связи имеющихся микробиологических, иммунологических и физиологических параметров.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты выполнены на самцах крыс стока Wistar SPF статуса (г. Пущино), содержавшихся в условиях барьерного вивария, в соответствии с Директивой Европейского совета по соблюдению этических принципов в работе с лабораторными животными. Было проведено 2 серии экспериментов: 1) крысы с массой тела от 320 до 350 грамм (взрослые: 12–14 недель); 2) крысы с массой тела от 220 до 250 грамм (молодые: 8–9 недель). Разработанная нами модель химически индуцированного колита, сопровождающаяся синдромом системного воспалительного ответа (ССВО), подробно описана ранее [3]. Животные случайным образом распределялись в одну из трех групп (n=10–12 в каждой группе): 1) контроль (КТР): крысы получали стандартный корм *ad libitum* с ежедневным внутрижелудочным введением 4 мл питьевой воды в течение 28 дней; 2) ПВО + ХИК + АИД (СВО): животные в течение 28 дней до ХИК в дополнение к стандартной диете внутрижелудочно ежедневно получали 4 мл смеси раствора 1 г сахарозы и 2 г полиненасыщенных жиров; далее им одноразово ректально вводили 1 мл смеси 3% раствора уксусной кислоты и 3% раствора этанола; с этого же дня животным внутрижелудочно вводили 1 мл раствора смеси амоксициллина, метронидазола и кларитромицина (АМК) по 15 мг каждого антимикробного препарата на крысу, каждые 24 часа в течение 3 суток; в течение последующих пяти дней перорально вводили 1 мл физиологического раствора; 3) пробиотическая коррекция (ПРК): крысам, прошедшим процедуры согласно предыдущему протоколу, вместо 1 мл физиологического раствора в течение 8 дней вводили 1 мл раствора смеси пробиотических штаммов *Lactobacillus acidophilus* (LA-5) и *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* (BB-12) в концентрации 10×8 КОЕ на одно животное.

Через 8 дней после ХИК на фоне соответствующей диеты животных наркотизировали изофлураном, брали цельную кровь из задней полой вены для иммунологического анализа. Уровень фактора некроза опухоли-α (TNF-α), интерлейкинов-1a, -2, -6, -8, -10 (IL-1a, -2, -6, -8, -10) оценивали иммуноферментным методом (MR-96A, Mindray, Китай). Отбирались также пробы фекалий для генетического исследования толстокишечной микробиоты. Использовали метод ПЦР-РВ с использованием реагентов для выделения ДНК из образцов фекалий (QIAamp DNA Stool Mini Kit, США, Интерлаб-сервис) и комплекта реагентов «Колонофлор-16» ООО «Альфалаб». На протяжении всего эксперимента ежедневно с 9 до 10 утра проводили оценку клинического статуса животных, потребления корма и воды, а также массы тела животных.

Для каждого из определяемых показателей в группе рассчитывали медианные значения (M) и стандартное отклонение (±SD). Статистический анализ результатов исследований по отношению к контролю КТР или группе сравнения СВО проводился с использованием непараметрического U-критерия Манна–Уитни (программный пакет STATISTICA 9.0). Для проверки различий микробного состава между группами крыс в качестве данных для анализа использовались десятичные логарифмы полученных значений КОЕ/г для каждой из определяемых групп бактерий методом ПЦР-РВ. Значимыми считались различия при $p < 0{,}05$. Выбор критериев оценки различий для данных, полученных в малых выборках, проводился на общепринятых основаниях [5].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследовании проводили анализ изменений количественного состава ряда представителей кишечной микробиоты у крыс на модели ССВО (группа СВО) относительно контроля (группа КТР), а также в результате введения пробиотических бактерий (группа ПРК) для оценки эффекта пробиотической терапии.

В таблице 1 представлены медианные значения числа различных бактерий, обнаруженные в фекалиях молодых (8–9 недель) и

Таблица 1

Медианы значений численности бактерий, выраженных в lgKOE/гр, выявленных в составе кишечной микробиоты крыс методом ПЦР-РВ

Экспериментальная серия	Взрослые крысы (320–350 г)			Молодые крысы (220–250 г)		
Группы	КТР	СВО	ПРК	КТР	СВО	ПРК
Общая бактериальная масса	11,65	8,30*	9,45*	12,00	10,30*	11,00
Lactobacillus spp.	6,0	0,0 *	0,0 *	9,00***	6,95*	6,87*
Bifidobacterium spp.	6,9	0,0*	5,9*	8,0***	8,30	8,48
Escherichia coli	6,2	8,2*	8,2*	6,9***	9,0*	9,0*
Bacteroides fragilis	11,4	6,8*	6,9*	12,0	7,7*	10,7
Faecalibacterium prausnitzii	7,4	0,0*	0,0*	8,5	0,0*	0,0*
Akkermansia muciniphila	11,2	0,0*	0,0*	10,2***	0,0*	0,0*
Enterococcus spp.	0,0	0,0*	0,0*	0,0	0,0	0,0
S.aureus	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Klebsiella oxytoca	0,0	7,3*	6,7*	0,0	0,0	0,0
Proteus vulgaris/mirabilis	0,0	7,2*	6,9*	0,0	8,7*	8,90*
Enterobacter spp.	0,00	8,5 *	8,9* и **	0,0	10,0*	10,4*

* — p <0,05 по отношению к КТР; ** — p <0,05 по отношению к СВО, *** — p <0,05 при сравнении групп КТР молодых и взрослых крыс

взрослых (12–14 недель) крыс методом ПЦР-РВ. Ни у молодых, ни у взрослых крыс методом ПЦР-РВ не были обнаружены *Citrobacter* spp., *Bacteroides thetaomicron, Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Fusobacterium nucleatum, Parvimonas micra, Clostridium difficile, Clostridium perfringens, Candida* spp., энтеропатогенные *Escherichia coli*, а также *Klebsiella pneumoniae* в составе кишечной микробиоты. Для молодых контрольных крыс в сравнении с взрослыми характерны значимо более высокие значения численности лактобацилл, бифидобактерий и *E. coli.* Наоборот, численность *Akkermansia muciniphila* была ниже у молодых крыс в сравнении с взрослыми, в то время как *Klebsiella oxytoca* и энтерококки не были обнаружены у молодых крыс. Различий в численности остальных бактерий между молодыми и взрослыми крысами не было выявлено.

Общее бактериальное число в обеих возрастных группах крыс исходно составляло по логарифмической шкале 10,6–12,6 lgKOE/гр и снижалось в среднем на два порядка в группах СВО. В группах, получающих пробиотики, было отмечено увеличение медианы значений общего числа бактерий, однако этот показатель не повышался до уровня группы контроля и достоверно не отличался от группы СВО.

В группе СВО у молодых крыс было определено существенно меньшее количество ***лактобацилл*** по отношению к контролю (p <0,05), а в группе ПРК их численность хотя и была больше, но значимо не отличалась от группы СВО. Количество лактобацилл у взрослых крыс в группе КТР было ниже, чем у более молодых животных (эти бактерии были найдены у 9 из 12 животных (75%). В группе СВО (12–14 недель) лактобациллы полностью отсутствовали. В группе ПРК (12–14 недель) лактобациллы в количестве в среднем 5 lgKOE/гр были обнаружены у трех взрослых крыс из 12 (25%). ***Бифидобактерии***, обнаруженные у 100% взрослых крыс в контроле, в группе СВО встречаются только у четырех животных (33,3%), хотя средняя численность бифидобактерий при этом остается сопоставимой с группой контроля. В группе ПРК бифидобактерии обнаруживаются у восьми животных (66,7%) в сходных с группой контроля порядках. У молодых крыс во всех группах у 100% животных были обнаружены бифидобактерии, при этом их средняя численность значимо не отличалась от контроля ни в группе СВО, ни в группе ПРК. Количество непатогенных ***Escherichia coli*** в обеих возрастных когортах увеличивается в среднем на два порядка в группе СВО относительно контроля и не снижается после пробиотикотерапии. ***Bacteroides fragilis*** в группах СВО снижается почти на 4 порядка относительно контроля независимо от возраста животных, но при этом только у молодых крыс в группе ПРК отмечено повышение численности бактероидов до значений, сопоставимых с группой КТР.

У взрослых крыс не выявлено увеличения численности бактероидов после пробиотикотерапии. ***Faecalibacterium prausnitzii*** были обнаружены в контрольных группах у 100% молодых и взрослых крыс в количестве приблизительно 7–10 lgKOE/гр, а в группах СВО полностью отсутствовали у взрослых крыс, у молодых были найдены только у одного животного в значении 12 lgKOE/гр. После применения пробиотиков *F. prausnitzii* были выявлены только у 4 молодых крыс (40%) в сниженных относительно группы КТР количествах, у взрослых крыс полностью отсутствовали. Изменение численности ***Akkermansia muciniphila*** сходно с изменением *F. prausnitzii*. Исходно обнаруженные у 100% животных аккермансии полностью отсутствуют в группах СВО. В группе ПРК выявляются только у одного молодого животного (10%), у взрослых — отсутствуют. ***Enterococcus*** spp. были обнаружены только у двух взрослых животных в контрольной группе. ***S. aureus*** не были выявлены у взрослых

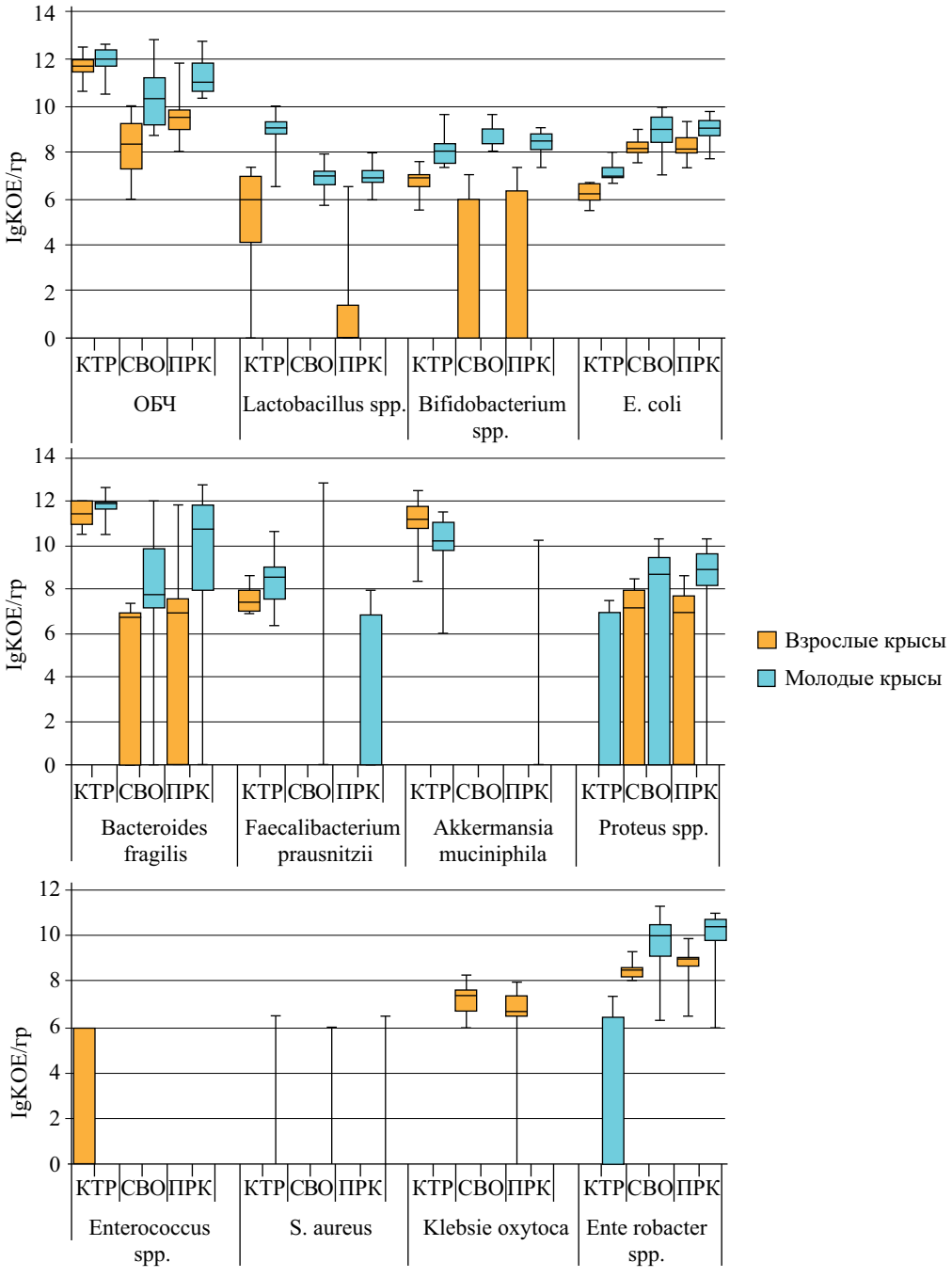


Рис. 1. Количественный состав кишечной микробиоты взрослых крыс (массой 320–350 грамм) и молодых крыс (массой 220–250 грамм) из различных групп

животных, а у молодых были найдены в каждой из трех групп в единичных случаях (у 1–2 животных, что составляет от 9 до 20% в зависимости от группы) в значениях около 6 lgКОЕ/гр. ***Klebsiella oxytoca*** была найдена только у взрослых крыс и только в группах СВО и ПРК. ***Proteus*** spp. не был обнаружен у взрослых крыс в группе КТР, а у молодых крыс в этой группе был найден у 41,7% животных. В группе СВО протей был найден уже у 58,3% крыс независимо от возраста. В группах ПРК не обнаружено достоверного снижения численности протея относительно групп СВО. ***Enterobacter*** spp. также не были обнаружены в контрольной группе взрослых крыс, у молодых крыс были найдены у 4 животных (33,3%), при этом их численность значительно возрастала в группах СВО, в которых энтеробактеры были найдены уже у 100% животных в более высоких количествах относительно контроля. Эти значения не менялись в группах ПРК и оставались такими же, как и в группах СВО.

На рисунке 1 показано распределение численности микроорганизмов в различных группах крыс. При оценке изменения микробиоты в результате СВО было выявлено, что в обеих возрастных группах крыс наблюдается значимое снижение общей численности бактерий (ОБЧ), в частности представителей *Lactobacillus* spp., *Akkermansia muciniphila, Faecalibacterium prausnitzii* и *Bacteroides* spp. относительно группы контроля КТР. И наоборот, было отмечено повышение во всех группах относительно контроля численности *Escherichia coli, Proteus vulgaris/mirabilis, K. oxytoca* и *Enterobacter* spp., причем у взрослых крыс представители трех перечисленных родов бактерий не были вовсе обнаружены в группе КТР.

Похожий характер изменений в большинстве случаев в группах после моделирования СВО показывает, что на этих сроках наблюдения не происходит восстановления нормобиоты, а в ряде случаев СВО способствует манифестации условно-патогенной микрофлоры. Применение же пробиотических препаратов на основе лактобактерий и бифидобактерий способствует некоторому увеличению численности этих бактерий в тестах. Кроме того, на фоне применения пробиотиков имеется тенденция к повышению численности *Bacteroides fragilis* и *F. prausnitzii* у молодых животных.

Результаты ИФА-анализа крови у взрослых крыс в группах показаны в таблице 2, а у молодых крыс — в таблице 3.

По отношению к контролю у крыс из групп СВО отмечено увеличение концентрации в крови TNF-α, TGF-β, и IL-6, IL-10. Напротив, в группе ПРК отмечено уменьшение цитокинов TNF-α, IL-1a, IL-2, IL-8. По отношению к контролю в группе СВО отмечено значимое снижение концентрации IL-10 в сыворотке крови и увеличение TNF-α, IL-1a, IL-8, тогда как в группе ПРК отмечено увеличение концентрации TGF-β по отношению к контролю, а по отношению к СВО уменьшение показателей провоспалительных цитокинов IL-1a, IL-8 и TNF-α, и увеличение концентрации противовоспалительного IL-10.

Таблица 2

Уровни исследованных цитокинов в крови крыс массой 320–350 грамм в группах КТР, СВО и ПРК, n=10

Цитокины	Группа		
	КТР	СВО	ПРК
TNF-α	5,4±1,4	10,2±3,7*	6,9±2,6**
IL-1a	118±18	88±29	34±15*
IL-2	4,2±1,2	4,7±2,1	2,9±0,7*
IL-6	1,7±0,5	2,4±0,7*	2,0±0,9
IL-8	8,4±1,4	6,4±1,2	5,0±1,6*
IL-10	10,3±4,1	22,5±7,2*	11,7±0,9**

* — p<0,05 по отношению к КТР; ** — p <0,05 по отношению к СВО.

Таблица 3

Средние показатели ИФА-исследований крови крыс массой 220–250 грамм в группах, n=10

Цитокины	Группа		
	КТР	СВО	ПРК
TNF-α	7,0±1,8	9,6±1,8*	3,7±2,4**
IL-1a	32±11	51±18*	31±19**
IL-2	0,58±0,39	1,85±1,05	0,39±0,62
IL-6	4,3±0,9	6,7±2,1	6,2±2,7
IL-8	2,2±1,1	7,8±1,4*	1,5±1,7**
IL-10	92±27	11±5*	48±33**

* — p <0,05 по отношению к КТР$ ** — p <0,05 по отношению к СВР.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Изменения цитокинового статуса в крови после моделирования ССВО и пробиотической терапии у молодых и взрослых крыс носят схожий характер, с той разницей, что для IL-1a, IL-2 и IL-8 у молодых крыс на данном сроке определения отмечены более низкие значения, а для IL-6 и IL-10 — более высокие по сравнению с взрослыми крысами.

Анализ полученных результатов ПЦР-РВ в фекалиях показал определенную однонаправленность изменений качественного и количественного состава кишечной микробиоты и иммунологического статуса у крыс двух возрастных групп. Были также отмечены различия между молодыми и взрослыми крысами как в исходных показателях, так и в степени восстановления микробного состава в результате применения пробиотиков. Так, СВО привел к снижению численности грамположительных и увеличению грамотрицательных бактерий за исключением грамотрицательных *A. muciniphila* и *Bacteroides fragilis,* численность которых тоже снизилась в группах СВО. При этом среди бактерий, численность которых снизилась в результате действия повреждающих факторов, были те, что в норме оказывают существенное положительное влияние на организм хозяина. В их число входили лактобациллы и бифидобактерии, играющие важную роль в метаболизме углеводов, синтезе витаминов и антимикробных веществ, а также стимуляции иммунной системы [18, 21]. Отмечено, что у молодых крыс, демонстрирующих исходно более высокие значения численности бифидобактерий, не произошло их полной элиминации в результате моделирования ССВО.

Снижение уровня *A. muciniphila, F. prauznitzii* и *Bacteroides fragilis* исследователи связывают с негативными явлениями в организме хозяина. Например, пониженные уровни аккермансий и *F. prauznitzii* выявляются при болезни Крона и язвенном колите [20, 27, 29]. Кроме того, сниженное число аккермансий обнаруживается у пациентов с острым аппендицитом [25]. *F. prauznitzii* — один из основных продуцентов бутирата, являющегося важным энергетическим ресурсом для колоноцитов, обладающего к тому же противовоспалительным эффектом [12, 15]. Полученные в проведенном исследовании результаты подтвердили данные других авторов о том, что сниженные уровни аккермансий и *F. prausnitzii* могут быть маркером воспалительных заболеваний кишечника [16]. Важность присутствия *A. muciniphila* и *F. prauznitzii* в достаточном количестве в составе микробиоты кишечника позволяет рассматривать их в качестве новых перспективных пробиотиков [31, 15], хотя применение более привычных бифидобактерий и лактобацилл также стимулирует повышение титров *A. muciniphila* и *F. prauznitzii*, которое может быть показателем уменьшения воспаления, что и было продемонстрировано в данной работе.

Физиологическое значение представителей *Bacteroides* spp. связано с антагонистической активностью, которую микробы проявляют к шигеллам, сальмонеллам и энтеропатогенным эшерихиям, в связи с чем увеличение числа этих бактерий в группах с пробиотической терапией можно рассматривать как позитивное явление.

При индуцировании СВО помимо снижения потенциально полезных микроорганизмов произошло увеличение условно патогенных представителей, таких как *Proteus* spp., *K. oxytoca*. Вызывает интерес факт присутствия протея у молодых контрольных животных по сравнению с взрослыми, с общим фактом роста этой популяции после моделирования ССВО. Протей — грамотрицательный факультативный анаэроб из группы условно патогенных микроорганизмов, относящийся к семейству энтеробактерий (*Enterobacteriaceae*), классу гамма-протеобактерии, типу протеобактерии (*Proteobacteria*). В норме *Proteus* spp. рассматриваются как условно патогенные комменсалы кишечника и встречаются в относительно низких количествах в составе микробиоты [13]. Представители этого рода являются причиной инфекций мочевыводящих путей [11]. Кроме того, в последнее время установлена роль *P. mirabilis* в патогенезе болезни Крона [30].

K. oxytoca — это грамотрицательные представители резидентной микробиоты кишечника, некоторые штаммы которых способны продуцировать цитотоксины, повреждающие эпителий кишечника и вызывающие антибиотик-ассоциированный геморрагический колит [26], а также некротизирующий энтероколит у новорожденных [19]. Рост численности грамотрицательных бактерий, в том числе *E. coli*, в группах СВО и ПРК может быть связан с использованием антимикробных препаратов, которые в большей степени воздействуют на грамположительные бактерии, в результате чего более устойчивые грамотрицательные бактерии получают преимущество для колонизации освободившейся ниши. Увеличение числа *K. oxytoca* в группе СВО и ПРК также, вероятно, связано с высокой устойчивостью клебсиелл к действию АМП.

Аналогично описана и картина манифестации *Enterobacter* spp., не обнаруженного у взрослых здоровых крыс, но выявленного в фекалиях у контрольных молодых животных. Энтеробактер в норме является комменсалом кишечника человека и животных, однако эти бактерии входят в группу ESKAPE — группу микроорганизмов с наиболее часто выявляемой мультирезистентностью к антибиотикам [23]. Именно поэтому увеличение

представительства *Enterobacter* spp. вместе с другими условно патогенными микроорганизмами этого семейства, такими как протей, клебсиелла и другие, заслуживает внимания для понимания степени выраженности дисбактериоза.

Необходимо заметить, что исходное отсутствие бактерий в группах КТР и дальнейшее их появление в группах СВО и ПРК, возможно, не является истинным отсутствием, а связано с порогом чувствительности метода ПЦР-РВ (например, согласно руководству к набору «Колонофлор», лактобациллы в концентрации ниже 10^5 КОЕ/гр не обнаруживаются в образцах фекалий). Возможно, по той же причине в группе молодых крыс не были найдены энтерококки, как и другие бактерии у взрослых крыс.

Таким образом, применение пробиотиков в выбранном режиме не способствовало полному восстановлению микробиоты к исходному уровню, однако проявило некоторый положительный бифидогенный эффект и увеличение колонизационной резистентности, что в большей степени отмечено для молодых крыс.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Моделирование СВО с использованием антимикробных препаратов широкого спектра действия характеризуется существенным нарушением качественного и количественного состава кишечной микробиоты. Для взрослых здоровых крыс характерно отсутствие в фекалиях таких условно патогенных представителей нормобиоты, как *Proteus* spp. и *Enterobacter* spp. с их манифестацией после моделирования СВО. По сравнению с взрослыми животными, введение пробиотических штаммов молодым крысам сопровождается увеличением общего бактериального числа, бифидогенным эффектом и повышением колонизационной резистентности за счет роста популяции *Bacteroides* spp. Исследование причин данных различий важно для понимания перспектив применения пробиотических препаратов в различных периодах онтогенеза.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 18-15-00153).

ЛИТЕРАТУРА

1. Борщев Ю.Ю., Буровенко И.Ю., Карасева А.Б. и др. Моделирование синдрома системной воспалительной реакции химической индукцией травмы толстого кишечника у крыс. Медицинская иммунология. 2020; 22(1): 87–98. DOI: 10.15789/1563-0625-MOS-1839.
2. Борщев Ю.Ю., Буровенко И.Ю., Карасева А.Б. и др. Влияние качественного состава высокожировой диеты на уровень цитокинов и устойчивость миокарда к ишемии-реперфузии у крыс с синдромом системного воспалительного ответа. Медицинская иммунология. 2021; 23(5): 1089–1104. DOI: 10.15789/1563-0625-EOT-2166.
3. Борщев Ю.Ю., Минасян С.М., Буровенко И.Ю. и др. Антибиотик-индуцированный дисбиоз кишечника и устойчивость миокарда к ишемическому-реперфузионному повреждению у крыс с различным микробиологическим статусом. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2018; 10 (158): 62–7. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-158-10-62-67.
4. Каркищенко Н.Н. Основы биомоделирования. М.: ВПК; 2005.
5. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. М.: МедиаСфера; 2000.
6. Abenavoli L., Scarpellini E., Colica C. et al. Gut Microbiota and Obesity: A Role for Probiotics. Nutrients. 2019; 11(11): 2690. DOI: 10.3390/nu11112690.
7. Becattini S., Taur Y., Pamer E.G. Antibiotic-Induced Changes in the Intestinal Microbiota and Disease. Trends Mol Med. 2016; 22(6): 458–78. DOI: 10.1016/j.molmed.2016.04.003.
8. Borshchev Y.Y., Burovenko I.Y., Borshcheva O.V. et al. Age-related factors in experimental modeling of polymorbidity and probiotic therapy for manifestations of systemic inflammatory response syndrome. Adv. Gerontol. 2021; 11(3): 254–60. DOI: 10.1134/S2079057021030024.
9. Borshchev Y.Y., Sinitsa A.V., Zakharchenko M.M. et al. Effect of antiobiotic-induced disbiosis and its correction with probiotics on myocardial tolerance to ischemia-reperfusion injury in spf rats. Bull Exp Biol Med. 2019; 166(4): 440–3. DOI: 10.1007/s10517-019-04368-5.
10. Caballero B. Humans against Obesity: Who Will Win? Adv Nutr. 2019; 10(1): 4–9. DOI: 10.1093/advances/nmy055.
11. Coker C., Poore C.A., Li X., Mobley H.L. Pathogenesis of Proteus mirabilis urinary tract infection. Microbes Infect. 2000; 2(12): 1497–505. DOI: 10.1016/s1286-4579(00)01304-6.
12. Donohoe D.R., Garge N., Zhang X. et al. The microbiome and butyrate regulate energy metabolism and autophagy in the mammalian colon. Cell Metab. 2011; 13(5): 517–26. DOI: 10.1016/j.cmet.2011.02.018.
13. Hamilton A.L., Kamm M.A., Ng S.C., Morrison M. Proteus spp. as Putative Gastrointestinal Pathogens. Clin Microbiol Rev. 2018; 31(3): e00085-17. DOI: 10.1128/CMR.00085-17.
14. Jokinen E. Obesity and cardiovascular disease. Minerva Pediatr. 2015; 67(1): 25–32. Epub 2014 Nov 11. PMID: 25387321.

15. Lopez-Siles M., Duncan S., Garcia-Gil L., Martinez-Medina M. Faecalibacterium prausnitzii: from microbiology to diagnostics and prognostics. ISME J. 2017; 11: 841–52. DOI: 10.1038/ismej.2016.176.
16. Lopez-Siles M., Enrich-Capó N., Aldeguer X. et al. Alterations in the Abundance and Co-occurrence of Akkermansia muciniphila and Faecalibacterium prausnitzii in the Colonic Mucosa of Inflammatory Bowel Disease Subjects. Front Cell Infect Microbiol. 2018; 8: 281. DOI: 10.3389/fcimb.2018.00281.
17. Mentella M.C., Scaldaferri F., Pizzoferrato M. et al. Nutrition, IBD and Gut Microbiota: A Review. Nutrients. 2020; 12(4): 944. DOI: 10.3390/nu12040944.
18. O'Callaghan A., van Sinderen D. Bifidobacteria and Their Role as Members of the Human Gut Microbiota. Front Microbiol. 2016; 7: 925. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00925.
19. Paveglio S., Ledala N., Rezaul K. et al. Cytotoxin-producing Klebsiella oxytoca in the preterm gut and its association with necrotizing enterocolitis. Emerg Microbes Infect. 2020; (1): 1321–9. DOI: 10.1080/22221751.2020.1773743.
20. Png C.W., Lindén S.K., Gilshenan K.S. et al. Mucolytic bacteria with increased prevalence in IBD mucosa augment in vitro utilization of mucin by other bacteria. Am J Gastroenterol. 2010; 105(11): 2420–8. DOI: 10.1038/ajg.2010.281.
21. Qi H., Li Y., Yun H. et al. Lactobacillus maintains healthy gut mucosa by producing L-Ornithine. Commun Biol. 2019; 2: 171. DOI: 10.1038/s42003-019-0424-4.
22. Ramirez J., Guarner F., Bustos Fernandez L. et al. Antibiotics as Major Disruptors of Gut Microbiota. Front Cell Infect Microbiol. 2020; 10: 572912. DOI: 10.3389/fcimb.2020.572912.
23. Rice L.B. Federal Funding for the Study of Antimicrobial Resistance in Nosocomial Pathogens: No ESKAPE. The Journal of Infectious Diseases. 2008; 197(8): 1079–81. DOI: 10.1086/533452.
24. Singh S., Dulai P.S., Zarrinpar A. et al. Obesity in IBD: epidemiology, pathogenesis, disease course and treatment outcomes. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2017; 14(2): 110–21. DOI: 10.1038/nrgastro.2016.181.
25. Swidsinski A., Dörffel Y., Loening-Baucke V. et al. Acute appendicitis is characterised by local invasion with Fusobacterium nucleatum/necrophorum. Gut. 2011; 60(1): 34–40. DOI: 10.1136/gut.2009.191320.
26. Unterhauser K., Pöltl L., Schneditz G. et al. Klebsiella oxytoca enterotoxins tilimycin and tilivalline have distinct host DNA-damaging and microtubule-stabilizing activities. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2019; 116 (9): 3774–83. DOI: 10.1073/pnas.1819154116.
27. Wang L., Tang L., Feng Y. et al. A purified membrane protein from Akkermansia muciniphila or the pasteurised bacterium blunts colitis associated tumourigenesis by modulation of $CD8^+$ T cells in mice. Gut. 2020; 0: 1–10. DOI: 10.1136/gutjnl-2019-320105.
28. Wang Z., Zhao Y. Gut microbiota derived metabolites in cardiovascular health and disease. Protein Cell. 2018; 9(5): 416–31. DOI: 10.1007/s13238-018-0549-0.
29. Yuan C., Jun S., Zhi H. R. Association between Faecalibacterium prausnitzii Reduction and Inflammatory Bowel Disease: A Meta-Analysis and Systematic Review of the Literature. Gastroenterology Research and Practice. 2014; 2014: 872725. DOI: 10.1155/2014/872725.
30. Zhang J., Hoedt E.C., Liu Q. et al. Elucidation of Proteus mirabilis as a Key Bacterium in Crohn's Disease Inflammation. Gastroenterology. 2021; 160(1): 317–30.e11. DOI: 10.1053/j.gastro.2020.09.036.
31. Zhang T., Ji X., Lu G., Zhang F. The potential of Akkermansia muciniphila in inflammatory bowel disease. Appl Microbiol Biotechnol. 2021; 105: 5785–94. DOI: 10.1007/s00253-021-11453-1.

REFERENCES

1. Borshhev Ju.Ju., Burovenko I.Ju., Karaseva A.B. i dr. Modelirovanie sindroma sistemnoj vospalitel'noj reakcii himicheskoj indukciej travmy tolstogo kishechnika u krys. [Modeling of systemic inflammatory response syndrome by chemical induction of colon injury in rats]. Medicinskaja immunologija. 2020; 22(1): 87–98. DOI: 10.15789/1563-0625-MOS-1839. (in Russian)
2. Borshhev Ju.Ju., Burovenko I.Ju., Karaseva A.B. i dr. Vlijanie kachestvennogo sostava vysokozhirovoj diety na uroven' citokinov i ustojchivost' miokarda k ishemii-reperfuzii u krys s sindromom sistemnogo vospalitel'nogo otveta. [Effect of the qualitative composition of a high-fat diet in rats with systemic inflammatory response syndrome upon myocardial resistance to ischemic-reperfusion injury and cytokine levels]. Medicinskaja immunologija. 2021; 23(5): 1089–1104. DOI: 10.15789/1563-0625-EOT-2166. (in Russian)
3. Borshhev Ju.Ju., Minasjan S.M., Burovenko I.Ju. i dr. Antibiotik-inducirovannyj disbioz kishechnika i ustojchivost' miokarda k ishemicheskomu-reperfuzionnomu povrezhdeniju u krys s razlichnym mikrobiologicheskim statusom. [Antibiotic-Induced Intestinal Dysbiosis And Myocardial Tolerance To Ischemia-Reperfusion Injury In Rats With Different Microbiological Status]. Jeksperimental'naja i klinicheskaja gastrojenterologija. 2018; 10(158): 62–7. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-158-10-62-67. (in Russian)
4. Karkishhenko N.N. Osnovy biomodelirovanija. [Fundamentals of biomodeling]. Moskva: VPK Publ.; 2005. (in Russian)
5. Rebrova O.Ju. Statisticheskij analiz medicinskih dannyh. Primenenie paketa prikladnyh programm STATISTICA. [Statistical analysis of medical data. Application of the application package STATISTICA]. Moskva: MediaSfera Publ.; 2000. (in Russian)

6. Abenavoli L., Scarpellini E., Colica C. et al. Gut Microbiota and Obesity: A Role for Probiotics. Nutrients. 2019; 11(11): 2690. DOI: 10.3390/nu11112690.
7. Becattini S., Taur Y., Pamer E.G. Antibiotic-Induced Changes in the Intestinal Microbiota and Disease. Trends Mol Med. 2016; 22(6): 458–78. DOI: 10.1016/j.molmed.2016.04.003.
8. Borshchev Y.Y., Burovenko I.Y., Borshcheva O.V. et al. Age-related factors in experimental modeling of polymorbidity and probiotic therapy for manifestations of systemic inflammatory response syndrome. Adv. Gerontol. 2021; 11(3): 254–60. DOI: 10.1134/S2079057021030024.
9. Borshchev Y.Y., Sinitsa A.V., Zakharchenko M.M. et al. Effect of antiobiotic-induced disbiosis and its correction with probiotics on myocardial tolerance to ischemia-reperfusion injury in spf rats. Bull Exp Biol Med. 2019; 166(4): 440–3. DOI: 10.1007/s10517-019-04368-5.
10. Caballero B. Humans against Obesity: Who Will Win? Adv Nutr. 2019; 10(1): 4–9. DOI: 10.1093/advances/nmy055.
11. Coker C., Poore C.A., Li X., Mobley H.L. Pathogenesis of Proteus mirabilis urinary tract infection. Microbes Infect. 2000; 2(12): 1497–505. DOI: 10.1016/s1286-4579(00)01304-6.
12. Donohoe D.R., Garge N., Zhang X. et al. The microbiome and butyrate regulate energy metabolism and autophagy in the mammalian colon. Cell Metab. 2011; 13(5): 517–26. DOI: 10.1016/j.cmet.2011.02.018.
13. Hamilton A.L., Kamm M.A., Ng S.C., Morrison M. Proteus spp. as Putative Gastrointestinal Pathogens. Clin Microbiol Rev. 2018; 31(3): e00085-17. DOI: 10.1128/CMR.00085-17.
14. Jokinen E. Obesity and cardiovascular disease. Minerva Pediatr. 2015; 67(1): 25–32. Epub 2014 Nov 11. PMID: 25387321.
15. Lopez-Siles M., Duncan S., Garcia-Gil L., Martinez-Medina M. Faecalibacterium prausnitzii: from microbiology to diagnostics and prognostics. ISME J. 2017; 11: 841–52. DOI: 10.1038/ismej.2016.176.
16. Lopez-Siles M., Enrich-Capó N., Aldeguer X. et al. Alterations in the Abundance and Co-occurrence of Akkermansia muciniphila and Faecalibacterium prausnitzii in the Colonic Mucosa of Inflammatory Bowel Disease Subjects. Front Cell Infect Microbiol. 2018; 8: 281. DOI: 10.3389/fcimb.2018.00281.
17. Mentella M.C., Scaldaferri F., Pizzoferrato M. et al. Nutrition, IBD and Gut Microbiota: A Review. Nutrients. 2020; 12(4): 944. DOI: 10.3390/nu12040944.
18. O'Callaghan A., van Sinderen D. Bifidobacteria and Their Role as Members of the Human Gut Microbiota. Front Microbiol. 2016; 7: 925. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00925.
19. Paveglio S., Ledala N., Rezaul K. et al. Cytotoxin-producing Klebsiella oxytoca in the preterm gut and its association with necrotizing enterocolitis. Emerg Microbes Infect. 2020; (1): 1321–9. DOI: 10.1080/22221751.2020.1773743.
20. Png C.W., Lindén S.K., Gilshenan K.S. et al. Mucolytic bacteria with increased prevalence in IBD mucosa augment in vitro utilization of mucin by other bacteria. Am J Gastroenterol. 2010; 105(11): 2420–8. DOI: 10.1038/ajg.2010.281.
21. Qi H., Li Y., Yun H. et al. Lactobacillus maintains healthy gut mucosa by producing L-Ornithine. Commun Biol. 2019; 2: 171. DOI: 10.1038/s42003-019-0424-4.
22. Ramirez J., Guarner F., Bustos Fernandez L. et al. Antibiotics as Major Disruptors of Gut Microbiota. Front Cell Infect Microbiol. 2020; 10: 572912. DOI: 10.3389/fcimb.2020.572912.
23. Rice L.B. Federal Funding for the Study of Antimicrobial Resistance in Nosocomial Pathogens: No ESKAPE. The Journal of Infectious Diseases. 2008; 197(8): 1079–81. DOI: 10.1086/533452.
24. Singh S., Dulai P.S., Zarrinpar A. et al. Obesity in IBD: epidemiology, pathogenesis, disease course and treatment outcomes. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2017; 14(2): 110–21. DOI: 10.1038/nrgastro.2016.181.
25. Swidsinski A., Dörffel Y., Loening-Baucke V. et al. Acute appendicitis is characterised by local invasion with Fusobacterium nucleatum/necrophorum. Gut. 2011; 60(1): 34–40. DOI: 10.1136/gut.2009.191320.
26. Unterhauser K., Pöltl L., Schneditz G. et al. Klebsiella oxytoca enterotoxins tilimycin and tilivalline have distinct host DNA-damaging and microtubule-stabilizing activities. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2019; 116 (9): 3774–83. DOI: 10.1073/pnas.1819154116.
27. Wang L., Tang L., Feng Y. et al. A purified membrane protein from Akkermansia muciniphila or the pasteurised bacterium blunts colitis associated tumourigenesis by modulation of $CD8^+$ T cells in mice. Gut. 2020; 0: 1–10. DOI: 10.1136/gutjnl-2019-320105.
28. Wang Z., Zhao Y. Gut microbiota derived metabolites in cardiovascular health and disease. Protein Cell. 2018; 9(5): 416–31. DOI: 10.1007/s13238-018-0549-0.
29. Yuan C., Jun S., Zhi H. R. Association between Faecalibacterium prausnitzii Reduction and Inflammatory Bowel Disease: A Meta-Analysis and Systematic Review of the Literature. Gastroenterology Research and Practice. 2014; 2014: 872725. DOI: 10.1155/2014/872725
30. Zhang J., Hoedt E.C., Liu Q. et al. Elucidation of Proteus mirabilis as a Key Bacterium in Crohn's Disease Inflammation. Gastroenterology. 2021; 160(1): 317–30.e11. DOI: 10.1053/j.gastro.2020.09.036.
31. Zhang T., Ji X., Lu G., Zhang F. The potential of Akkermansia muciniphila in inflammatory bowel disease. Appl Microbiol Biotechnol. 2021; 105: 5785–94. DOI: 10.1007/s00253-021-11453-1.