

УДК 616.34-008.8:615.37

ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОСВЯЗИ АКТИВНОСТИ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ И ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ МИКРОБИОЦЕНОЗА ТОЛСТОЙ КИШКИ У ДЕТЕЙ РАННЕГО ВОЗРАСТА ПРИ ИЗМЕНЕНИИ БИОЦЕНОЗА КИШЕЧНИКА

¹Точилина О.А., ²Частоедова И.А.¹*Московский университет государственного управления (Кировский филиал),
Киров, e-mail: olga.tochilina2011@yandex.ru;*²*Кировская государственная медицинская академия Минздрава России,
Киров, e-mail: kf17@kirovgma.ru*

Показано, что изменения биоценоза кишечника детей раннего возраста сопровождаются не только достоверным снижением численности *E. coli* и лактобактерий, увеличением частоты встречаемости гемолитических кишечных палочек, клостридий, условно-патогенной флоры, но и отклонениями биохимического гомеостаза, заключающимися в изменении активности ферментов слюны и кала (амилаза, щелочная фосфатаза). Обоснована взаимосвязь активности ферментов кала и нарушений микробиоценоза толстого кишечника у детей раннего возраста. Например, при изменении количественного и качественного состава нормоценоза происходит нарушение взаимозависимого функционирования ферментных систем слюны, копрофильтрата и микрофлоры кишечника. Восстановление нормального уровня бифидо- и лактобактерий после введения пробиотиков приводит к уменьшению экскреции ферментов кишечником, что подтверждается корреляционными взаимоотношениями.

Ключевые слова: пищеварительные ферменты, микробиоценоз

THE FEATURES OF INTERRELATION BETWEEN ACTIVITY OF DIGESTIVE ENZYMES AND REPRESENTATIVES OF THE MICROBIOTICENOSIS IN LARGE INTESTINE OF YOUNG CHILDREN WITH CHANGES OF BIOTICENOSIS IN INTESTINE

¹Tochilina O.A., ²Chastosedova I.A.¹*Branch of Moscow State University of Management, Kirov, e-mail: olga.tochilina2011@yandex.ru;*²*Kirov State Medical Academy (KSMA), Kirov, e-mail: kf17@kirovgma.ru*

It has been shown that changes of biocenosis in intestine of young children are accompanied not only by reliable decrease in the number of *E.coli* and lactic bacteria, increase frequency of occurrence of globulicidal colibacilli, clostridias, opportunistic flora, but also by deviations in biochemical homeostasis consisting of changes in saliva and faeces enzymatic activity (amylase, alkalotic phosphatase). The interrelation between faeces enzymatic activity and disorders in the microbiocenosis in large intestine of young children has been grounded. For example, changing the quantitative and qualitative composition of normocenosis of the interdependent functioning of the enzyme systems of saliva, koprofiltrate and the intestinal microflora damages. The recovery of normal level of bifid and lactic bacteria after administration of probiotics reduces the excretion of enzymes in the intestine, which is confirmed by the correlation.

Keywords: digestive enzymes, microbiocenosis

По современным представлениям кишечный микробиоценоз во взаимосвязи с организмом хозяина рассматривается как своеобразный «экстракорпоральный орган», состоящий из огромного числа микроорганизмов, объединенных в единую экологическую систему «макроорганизм – микрофлора» [1, 3, 4, 6]. При этом кишечная микрофлора оперативно и постоянно реагирует на изменения в состоянии внутренней среды макроорганизма изменением своего качественного и количественного состава [2, 7, 8].

Ферменты играют основную роль в поддержании гомеостаза организма. Гомеостаз достигается сбалансированностью процессов инкреции ферментов с их экскрецией,

связью с ингибиторами и протеолизом. При изменении нормальной жизнедеятельности организма возможно возрастание роли других путей перераспределения ферментов и изменение соотношения между ними [5], а качественные и количественные изменения состава микрофлоры в свою очередь сопровождаются сдвигами рН кишечного содержимого и другими изменениями химизма, которые препятствуют инактивации ферментов, что в результате приводит к изменению гомеостаза ферментативных систем.

Целью нашего исследования явилось установление взаимосвязей между активностью ферментов слюны и копрофильтрата как показателями функционального состояния

пищеварительного тракта и микробиологическими нарушениями толстого отдела кишечника у детей раннего возраста.

Материалы и методы исследования

Обследованы 43 ребенка раннего возраста (от 1 года до 3 лет) с анамнестически выявленными дезадаптирующими факторами развития микробиоценоза кишечника (рахит, гипотрофия и дерматит), воспитывающихся в детском дошкольном учреждении с 24-часовым пребыванием (Дом ребёнка). У обследованных был изучен микробиоценоз кишечника, выявленные нарушения корректировались пробиотическими препаратами. Анализ кала на дисбактериоз проводился дважды до и после коррекции дисбиотических изменений. Одновременно изучалась ферментативная активность (амилаза и щелочная фосфатаза) слюны и кала. Обследованные находились в условиях стандартного режима дня и рациона питания. Группу сравнения составили 25 практически здоровых детей раннего возраста (от 1 года до 3 лет), у которых отсутствовали желудочно-кишечные заболевания и анамнестически исключены дезадаптирующие факторы развития микробиоценоза кишечника (рахит, гипотрофия и дерматит), обследование которых осуществлялось однократно.

Кишечную микрофлору изучали в соответствии с требованиями ОСТа 91500.11.0004-2003. Количественное содержание основных представителей нормальной микрофлоры кишечника выражали в lg КОЕ/г. Для коррекции изменений биоценоза у детей были выбраны пробиотические препараты «Бифидофлорин», «Лактофлорин», «Бифидумбактерин» и «Аципол». Обследованные принимали препараты по назначению врача, согласно инструкции.

Активность α-амилазы определялась ферментативным колориметрическим тестом с использованием 4,6-этилиден (G₁)-p-нитрофенилом (G₁)-α-D-мальтогептозидом (этилиден – G₇ПНФ) в качестве субстрата (реактив фирмы «Bioscop»). Активность щелочной фосфатазы определяли колориметрическим тестом с использованием p-нитрофенилфосфата в качестве субстрата в глициновом буфере (Бессей, Лоури, Брок, 1946). Для определения был использован биохимический анализатор «Cobas Mira Plus» фирмы «Roche».

Статистическая обработка данных осуществлялась с помощью статистического пакета Statistika 6.0. Критический уровень значимости (p) при проверке статистических гипотез принимался за 0,05. Проверка на нормальность распределения измеренных переменных проводилась по критерию Shapiro-Wilk. В случае нормального распределения переменных применялся параметрический метод по Стьюденту, при ненормальном распределении – непараметрический метод по Вилкоксоу. Корреляционный анализ параметров проведен с учетом ранговой корреляции по Спирмену.

Результаты исследования и их обсуждение

При анализе микробиоценоза кишечника детей раннего возраста с анамнестически выявленными дезадаптирующими факторами развития микробиоценоза кишечника (рахит, гипотрофия и дерматит) отмечалось достоверное снижение титра лактобактерий $6,79 \pm 0,2 \lg$ ($p < 0,05$) и бифидобактерий $8,05 \pm 0,17 \lg$ (табл. 1).

Таблица 1

Состав микробиоценоза кишечника обследованных детей раннего возраста

Название и уровень м/о	Группа сравнения (n = 25)		Обследованные дети раннего возраста (n = 43) (первичное обследование)		Обследованные дети раннего возраста (n = 43) (после пробиотической коррекции)	
	Процент обнаружения	M ± m lg КОЕ/г	Процент обнаружения	M ± m lg КОЕ/г	Процент обнаружения	M ± m lg КОЕ/г
<i>Lactobacillus</i> ≤ 10 ⁶	8	7,56 ± 0,28**	41,9	6,79 ± 0,2**	–	7,93 ± 0,04@
<i>Bifidobacterium</i> ≤ 10 ⁷	32	7,96 ± 0,33	23,2	8,05 ± 0,17	–	8,99 ± 0,004@
<i>Escherichia coli</i> ≤ 10 ⁶	20	6,68 ± 0,14*	60,5	5,35 ± 0,27*	37,2	6,63 ± 0,83@
<i>Escherichia coli</i> (гемолизующая) 20% и более	84*		41,9*		30,2@@	
<i>Clostridium</i> ≥ 10 ⁵	84	5,8 ± 0,33*	51,2	4,19 ± 0,29*	9,3	2,93 ± 0,15@
<i>Staphylococcus</i> ≥ 10 ³	16	0,6 ± 0,28	27,9	1,07 ± 0,27	–	0,02 ± 0,02@
<i>Enterococcus</i> > 10 ⁷	16	7,36 ± 0,17	4,6	7,05 ± 0,07	–	7,01 ± 0,01
УПФ (<i>Proteus</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Enterobacter</i> и др.) > 10 ⁴	72*		30,2*		6,97@	

Примечания: *p ≤ 0,01, ** – p ≤ 0,05 – различия достоверны при сравнении результатов с группой сравнения; @p ≤ 0,01, @@ – p ≤ 0,05 – различия достоверны при сравнении результатов до и после пробиотической коррекции.

Отмечалось снижение титра нормальной *E. coli* $5,35 \pm 0,27$ lg ($p < 0,01$), в 41,9% случаев отмечался рост количества *E. coli* с измененными ферментативными свойствами (гемолизирующая кишечная палочка) ($p < 0,01$). Также были обнаружены бактерии рода *Clostridium* $4,19 \pm 0,29$ lg ($p < 0,01$), чаще, чем у детей группы сравнения, встречались бактерии *S. aureus* $1,07 \pm 0,27$ lg, у 30,2% обследованных были обнаружены высокие титры грамотрицательных представителей УПФ (*Proteus*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Alcaligenes* и др.) ($p < 0,01$) (табл. 1). Обнаружение УПФ, вероятно, связано со снижением регуляторной функции бифидобактерий.

На фоне пробиотической коррекции было отмечено восстановление резидентной микрофлоры обследованных детей (табл. 1). Достоверно повышались титры лактобактерий $7,93 \pm 0,04$ lg ($p < 0,01$) и бифидобактерий $8,99 \pm 0,004$ lg ($p < 0,01$), что подтверждает гипотезу о физиологически целесообразном включении биокоррекции в собственные механизмы защиты организма. На фоне пробиотической коррекции содержание *E. coli* повышалось до возрастной нормы $6,63 \pm 0,83$ lg ($p < 0,01$), обнаружение *E. coli* с измененными ферментативными свойствами (гемолизирующая кишечная палочка) резко уменьшилось и стало достоверно ниже исходного уровня – 30,2% ($p < 0,05$). Данный факт указывает на позитивное воздействие пробиотиков не только на количественные характеристики *E. coli*, но и на функциональную активность кишечной палочки.

Одновременно констатировалось достоверное значительное снижение количества условно-патогенной микрофлоры за счёт элиминации бактерий рода *Clostridium*, их количество составляло в среднем $2,93 \pm 0,15$ lg ($p < 0,01$), и снижения титра *S. aureus* до $0,02 \pm 0,02$ lg ($p < 0,01$). Кроме того, у обследованных детей раннего возраста уменьшалась концентрация других представителей УПФ (*Proteus*, *Citrobacter*, *Enterobacter* и др.), так, достоверно наблюдалась полная их элиминация из фекалий у 23,2% обследованных ($p < 0,01$) (табл. 1).

Амилитическая активность слюны детей группы сравнения ($n = 25$) в пределах нормальных значений составляет $4767,0 \pm 481,8$ ед./л амилаза слюны, $13,6 \pm 5,5$ ед./л щелочная фосфатаза слюны. Уровень указанных ферментов в копрофильtrate $3380,0 \pm 610,0$ и $2606,5 \pm 110,1$ ед./л соответственно. Нами условно эти значения были приняты за показатели для сравнения с уровнем указанных ферментов у обследованных детей раннего возраста.

Активность амилазы слюны 22301,1 \pm 1497,5 ед./л обследованных детей раннего возраста значительно выше ($p \leq 0,05$) показателей детей группы сравнения. Щелочнофосфатазная активность слюны $12,4 \pm 2,5$ ед./л обследованных соответствовала показателям сравнения. Однако в копрофильtrate уровень энзима $14267,4 \pm 2168,9$ ед./л значительно превышал ($p \leq 0,05$) соответствующие данные у детей группы сравнения. Уровень амилазы кала обследованных составил $13077,2 \pm 2563,4$ ед./л, что значительно выше показателей группы сравнения (табл. 2).

На фоне пробиотической коррекции биоценоза кишечника отмечалось сохранение повышенной экскреции ферментов слюнными железами и кишечником. Активность амилазы слюны оставалась достоверно высокой $18998,6 \pm 1362,7$ ед./л ($p \leq 0,05$), при этом отмечено достоверное снижение щелочнофосфатазной активности слюны в пределах возрастных норм $9,4 \pm 1,1$ ед./л ($p \leq 0,05$) (табл. 2). На фоне применения пробиотических препаратов при отсутствии динамики щелочнофосфатазной активности копрофильtrate $13905,2 \pm 2355,7$ ед./л, экскреция амилазы кишечником достоверно снижалась до $7657,0 \pm 1440,9$ ед./л ($p \leq 0,05$) (табл. 2). Снижение экскреции кишечной амилазы на фоне пробиотической коррекции закономерно свидетельствует о расщеплении избытков данного фермента представителями нормальной микрофлоры кишечника и пробиотиков.

Щелочная фосфатаза является биохимическим маркером дисбактериоза, что подтверждено очень высокой её активностью (в 5 и более раз) у детей с нарушениями биоценоза. Данный факт является показателем недостаточного восстановления функциональной активности симбионтов и может служить критерием необходимости продления курса биокоррекции для закрепления результатов положительной динамики количественного и качественного восстановления микробиоценоза при пробиотической коррекции.

Изменение функционального состояния организма при нарушении кишечного биоценоза сопровождается коррелятивным увеличением активности ферментов слюны – амилазы и щелочной фосфатазы ($r = 0,3$, при $p = 0,049$), что может указывать на энергетическое обеспечение ферментными системами измененного метаболизма углеводов.

Обнаруженные внутрисистемные взаимосвязи микробного гомеостаза иллюстрируют дисбиотические нарушения функционирования системы. Корреляци-

онное увеличение количества представителей условно-патогенной микрофлоры: клостридий и стафилококка ($r = 0,34$, при $p = 0,026$), клостридий и *E.coli* гемолизирующей ($r = 0,52$, при $p = 0,000389$), клостридий и УПФ ($r = 0,397$, при $p = 0,008377$), энтерококков и УПФ ($r = 0,33$, при $p = 0,03$) прежде всего связано со снижением антагонистических свойств представителей нормофлоры (рис. 1).

Несмотря на обособленность и стабильность бифидофлоры, обнаружены её корреляционные связи с бактериями рода *Staphylococcus* ($r = 0,36$, при $p = 0,016$) и обратная корреляция бифидофлоры и *E. coli* ($r = -0,41$, при $p = 0,006$), что указывает на некоторое напряжение в системе облигатной микрофлоры. Данные связи, по-видимому, характеризуют формирование глубоких нарушений кишечного микробиоценоза, что является следствием длительного воздействия неблагоприятных факторов.

Достоверной зависимости между показателями облигатной микрофлоры толстой кишки и уровнем ферментов слюны и копрофильтрата у детей раннего возраста с изменениями биоценоза кишечника не отмечалось. Следовательно, при изменении количественного и качественного состава нормоценоза происходит нарушение взаимозависимого функционирования ферментных систем слюны и копрофильтрата и микрофлоры кишечника.

Анализ корреляционных зависимостей между микроорганизмами на фоне пробиотической коррекции показал восстановление функционирования системы микробного гомеостаза. Отмечены достоверные обратные корреляционные связи представителей нормофлоры и условно-патогенной микрофлоры: бифидобактерий и клостридий ($r = -0,41$, при $p = 0,006$), лактобактерий и стафилококка ($r = -0,45$, при $p = 0,0026$). Данные связи характеризуют восстановление собственных защитных механизмов организма (рис. 2).

Таблица 2

Активность пищеварительных ферментов в слюне и копрофильтрате (ед./л) обследованных детей раннего возраста

Показатели	Группа сравнения ($n = 25$)	Обследованные дети раннего возраста ($n = 43$) (первичное обследование)	Обследованные дети раннего возраста ($n = 43$) (после пробиотической коррекции)
Слюна: Амилаза, Ед/л ЩФ, Ед/л	4767,0 ± 481,8* 13,6 ± 5,5	22301,1 ± 1497,5* 12,4 ± 2,5	18998,6 ± 1362,7@@ 9,4 ± 1,1@@
Кал: Амилаза, Ед/л ЩФ, Ед/л	3380,0 ± 610,0 2606,5 ± 110,1*	13077,2 ± 2563,4 14267,4 ± 2168,9*	7657,0 ± 1440,9@@ 13905,2 ± 2355,7

Примечания: * $p \leq 0,05$ – различия достоверны при сравнении результатов с группой сравнения;

@ $p \leq 0,01$, @@ – $p \leq 0,05$ – различия достоверны при сравнении результатов до и после пробиотической коррекции.

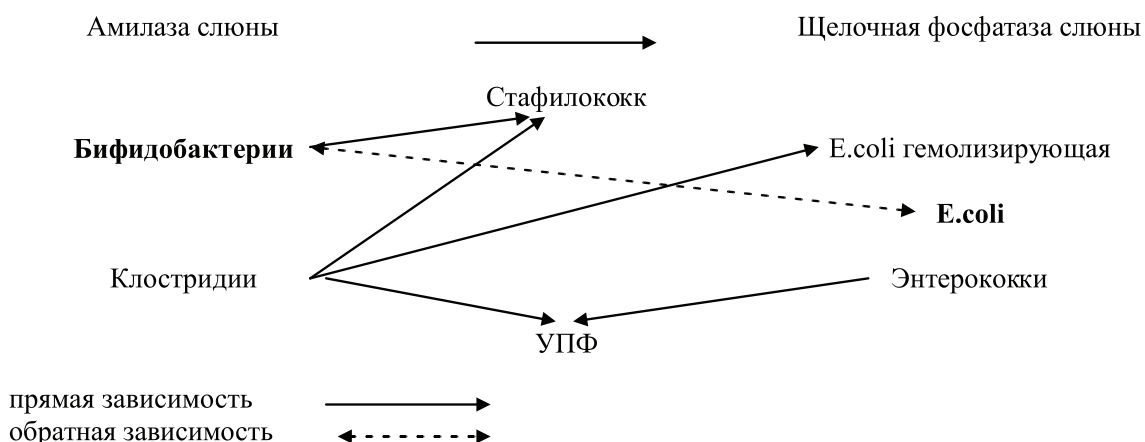


Рис. 1. Корреляционные взаимосвязи ферментативного спектра и микробиологических показателей (до пробиотической коррекции)

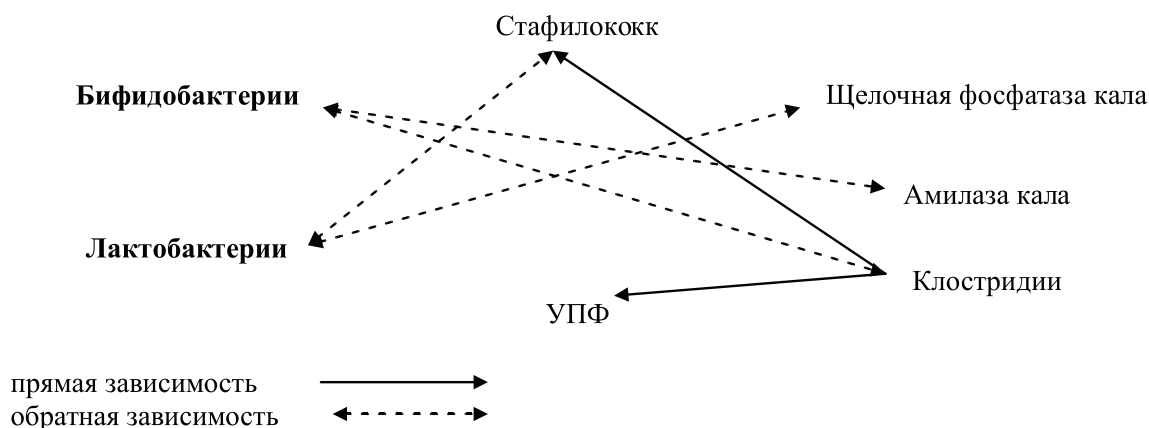


Рис. 2. Корреляционные взаимосвязи ферментативного спектра и микробиологических показателей (после пробиотической коррекции)

После пробиотической коррекции значительно изменилась структура и значимость корреляционных связей между пищеварительными ферментами и микроэкологией. Были отмечены обратные корреляционные зависимости между кишечными симбионтами и ферментами: щелочная фосфатаза кала и лактобактерии ($r = -0,407$, при $p = 0,007$), амилаза кала и бифидобактерии ($r = -0,312$, при $p = 0,044$), подобных связей не отмечалось до пробиотической коррекции. Восстановление нормального уровня бифидо- и лактобактерий приводит к уменьшению экскреции ферментов кишечником, что и подтверждается корреляционными взаимоотношениями.

Заключение

Таким образом, на фоне дисбиотических изменений происходит напряжение и рассогласование гомеостатических систем, что подтверждается наличием внутрисистемных связей между микроорганизмами и ферментами, но отсутствием межсистемных связей микроорганизмов и активности ферментов. Пробиотическая коррекция меняет структуру функционирования гомеостатических систем, что подтверждается наличием корреляционных связей.

Список литературы

1. Бондаренко В.М., Воробьев А.А. Дисбиозы и препараты с пробиотической функцией // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2004. – № 1. – С. 84–92.
2. Гриневиц В.Б., Захаренко С.М., Осипов Г.А. Принципы коррекции дисбиозов кишечника // Лечащий врач. – 2008. – № 6. – С. 6–9.
3. Лейхтер С.Н. Функциональные взаимодействия пищеварительных ферментов и представителей микрофлоры толстой кишки в норме и при остром алкогольном психозе: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Архангельск, 2010. – 18 с.
4. Симонова Е.В., Пономарева О.А. Роль нормальной микрофлоры в поддержании здоровья человека // Сибирский медицинский журнал. – 2008. – № 8. – С. 20–25.
5. Частоедова И.А. Гомеостаз пепсиногена, амилазы и щелочной фосфатазы у детей с эубиозом и дисбактериозом: Автореф. дис. канд. мед. наук. – Архангельск, 2001. – 18 с.

6. Циммерман Я.С. Эубиоз и дисбиоз желудочно-кишечного тракта: мифы и реалии // Клиническая медицина. – 2013. – Т. 91. – № 1. – С. 4–11.

7. Jernberg C., Lufmark S., Edlund C., Jansson J.K. Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota // The ISME Journal. – 2007. – № 1. – P. 56–66.

8. Sullivan A., Edlund C., Nord C.E. Effect of antimicrobial agents on the ecological balance of human microflora // Lancet Infect. Dis. – 2001. – Vol. 1, № 2. – P. 101–114.

References

1. Bondarenko V.M., Vorobev A.A. Disbiozy i preparaty s probioticheskoj funkciej. Zhurnal mikrobiologii, jepidemiologii i immunobiologii, 2004, no. 1, pp. 84–92.
2. Grinevich V.B., Zaharenko S.M., Osipov G.A. Principy korrekcii disbiozov kishechnika. Lechashhij vrach, 2008, no. 6, pp. 6–9.
3. Lejhter S.N. Funkcionalnye vzaimodejstvija pishhevaritelnyh fermentov i predstavitelej mikroflory tolstoj kishki v norme i pri ostrom alkoholnom psihoze: Avtoref. dis. kand. biol. nauk. – Arhangelsk, 2010. 18 p.
4. Simonova E.V., Ponomareva O.A. Rol normalnoj mikroflory v podderzhanii zdorovja cheloveka. Sibirskij medicinskij zhurnal, 2008, no. 8, pp. 20–25.
5. Chastoedova I.A. Gomeostaz pepsinogena, amilazy i shhelochnoj fosfatazy u detej s jeubiozom i disbakteriozom: Avtoref. dis. kand. med. nauk. Arhangelsk, 2001. 18 p.
6. Cimmerman Ja.S. Jeubioz i disbioz zheludochno-kishechnogo trakta: mify i realii. Klinicheskaja medicina, 2013, Vol. 91, no. 1, pp. 4–11.
7. Jernberg C., Lufmark S., Edlund C., Jansson J.K. Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota // The ISME Journal. 2007. no. 1 P. 56–66.
8. Sullivan A., Edlund C., Nord C.E. Effect of antimicrobial agents on the ecological balance of human microflora // Lancet Infect. Dis. 2001. Vol. 1, no. 2. hh. 101–114.

Рецензенты:

Камакин Н.Ф., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой нормальной физиологии, Кировская государственная медицинская академия Минздрава России, г. Киров;

Спицин А.П., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой патофизиологии, Кировская государственная медицинская академия Минздрава России, г. Киров.