

ЛИНКОМИЦИН – АССОЦИИРОВАННЫЙ ДИСБИОЗ КИШЕЧНИКА КРЫС

Скворцов Е. В., Усольцев К. В., Мухаммадиев Риши. С., Мусин Р. Р., Быкова П. В.

ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности»
420075, Россия, г. Казань, ул. Научный городок-2
e-mail: eskvortsov@rambler.ru

Антибиотики широко применяются в животноводстве во всем мире. Настоящее исследование посвящено процессам трансформации кишечной микрофлоры крыс, как модельных животных, возникающим в результате действия антибиотиков. Была поставлена задача – определить влияние линкомицина на микробное сообщество кишечника. Для определения количества ДНК бактерий микрофлоры кишечника в анализируемых пробах был использован метод полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР РВ). Были проанализированы количества облигатных представителей микрофлоры кишечника (бифидобактерий, лактобацилл, кишечной палочки), а также условно-патогенных и патогенных микроорганизмов при воздействии антибиотика линкомицина. Объектом исследования были белые беспородные крысы-самцы в начальном возрасте 8 недель массой (163 ± 13) г. Введение антибиотиков в кормовой рацион крыс опытной группы не приводило к диарее и развитию побочных эффектов. В конце эксперимента физическое состояние крыс нормальное, шерстяной покров густой, глянцевый, глаза блестящие. Результаты исследования показали возникновение дисбиоза кишечной микрофлоры у крыс, принимавших линкомицин. На 14 сутки, в конце приема линкомицина в кале опытной группы было очень большое количество *Staphylococcus aureus* (14.5 ± 0.5) Ig ГЭ/г и *Bacteroides fragilis* (14.0 ± 0.5) Ig ГЭ/г и большое количество *Clostridium difficile* (9.5 ± 1.0) Ig ГЭ/г. Тогда как количество основных бактерий в кале контрольной группы, не получавшей линкомицина, за время эксперимента существенно не изменилось. То, что содержание основных бактерий в кале контрольной группы за время эксперимента существенно не менялось говорит о том, что изменение состава кишечной микрофлоры опытной группы крыс вызвано применением антибиотика - линкомицина.

Ключевые слова: антибиотики, микробное сообщество кишечника, линкомицин, генетический анализ, дисбиоз.

Введение. Антибиотики широко применяются в животноводстве во всем мире. Однако бессистемное неконтролируемое их использование приводит к нарушению нормальной микрофлоры кишечника сельскохозяйственных животных, и это в конечном итоге приводит к потере продуктивности. Кроме того, продукты животноводства (мясо, молоко, яйца и др.) способны аккумулировать антибиотики и попадая в организм человека, оказывают отрицательное действие. Настоящее исследование посвящено процессам трансформации кишечной микрофлоры крыс, как модельных животных, возникающим в результате действия антибиотиков. Исследовано дисбиотическое действие линкомицина на микробное сообщество кишечника крыс.

Применение антибиотиков вызывает дисбаланс кишечной микрофлоры, приводит к увеличению патогенных бактерий, заболеваниям кишечника и других органов [1]. В данном исследовании для генерации дисбиоза мы применяли линкомицин. Линкомицин действует путем ингибиции рибосомальной транслокации и синтеза белка [11].

Наиболее серьезным кишечным заболеванием – последствием применения антибиотиков является псевдомембранный колит, который является типичной антибиотико-ассоциированной болезнью, вызываемой увеличением количества *C. difficile* [2, 6 - 8]. Недавние оценки показывают, что инфекции *C. difficile* убивают десятки тысяч человек каждый год [3, 9]. Лечение антибиотиками зачастую является

причиной размножения *C. difficile* в кишечнике. Анализ литературных данных показал, что около 90 % пациентов с диагнозом инфекции *C. difficile* использовали антибиотики в течение предыдущих 3 месяцев, причем цефалоспорины третьего поколения и линкомицины наиболее сильно коррелировали с последующей инфекцией *C. difficile* [4, 10].

В данной работе была поставлена задача – исследовать влияние линкомицина на микробное сообщество в кишечнике лабораторных крыс.

Для решения этой задачи был использован метод полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР РВ).

Необходимо отметить, что качество стандартных микробиологических методов, по данным наших исследований, очень низкое. Большое количество бактерий погибают в процессе взятия проб и проведения анализов. Результаты анализов сильно зависят от минимальных отличий в процедурах микробиологических операций посева, избежать которых невозможно. Погрешность таких методов зачастую превосходит величину эффекта от применения антимикробных препаратов.

В кишечнике постоянно происходит деление и отмирание существующих там бактерий и их вынос с каловыми массами в живом и мертвом виде. Содержание бактерий в кале пропорционально их содержанию в

кишечнике.

Каждый род бактерии имеет свой, присущий только ему набор генов. Содержание бактерий, а значит и их генов, в кале пропорционально их содержанию в кишечнике. Определить количество генов бактерий можно методом ПЦР-РВ.

Цель работы – исследование микробного сообщества кишечника крыс при линкомицинах – ассоциированном дисбиозе.

Материалы и методы. Объектом исследования были белые беспородные крысы-самцы в начальном возрасте 8 недель массой (163 ± 13) г. Исследование выполнено в соот-

ветствии с этическими нормами, одобренными Локальным этическим комитетом ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности» (приказ № 251-п от 22. 11. 2017 г.). Содержание, питание, уход за животными и выведение их из эксперимента осуществляли в соответствии с ОСТ 42-511-99 «Правила проведения качественных клинических испытаний в Российской Федерации» и ГОСТ Р 52379-2005 «Надлежащая клиническая практика».

Опытная группа в количестве 10 беспородных крыс-самцов получала ячмень кормовой и линкомицин в растворе с помощью зонда 2 раза в сутки из расчета 60 мг линкомицина/кг веса крысы в сутки. Контрольная группа в количестве 10 крыс получала ячмень кормовой, равный по количеству опытной группе, но без линкомицина (количества приведены в таблице 1). Дача линкомицина продолжалась 14 дней (9 и 10 недели возраста крыс).

Получение каловых проб. Для получения проб кал усредняли, перемешиванием в фарфоровой ступке, и определяли его влажность методом высушивания при 105 °C до постоянной массы. Эту процедуру проводили с калом исследуемой и контрольной групп крыс.

ПЦР с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени. Количество ДНК основных бактерий микрофлоры кишечника в анализируемых пробах определяли с помощью набора реагентов «Колонофлор-8» (ООО «АльфаЛаб», Россия). Он предназначен для количественной оценки состояния микробиоценоза толстого кишечника методом полимеразной цепной реакции с флуоресцентной детекцией результатов амплификации в режиме реального времени (ПЦР РВ). Праймеры и зонды набора соответствуют консервативным участкам генов кишечных бактерий. Количество ДНК бактерий микрофлоры кишечника в пробах выражали в $\lg \text{ГЭ/г}$ кала – в десятичных логарифмах ген-эквивалентов в 1

Таблица 1 - Рационы кормления и дозы антибиотиков

Возраст крыс, недели	Контрольная группа	Опытная группа	
	Ячмень грамм/сутки	Ячмень грамм/сутки	Линкомицин мг/сутки
9	20	20	9.7
10	20	20	9.7

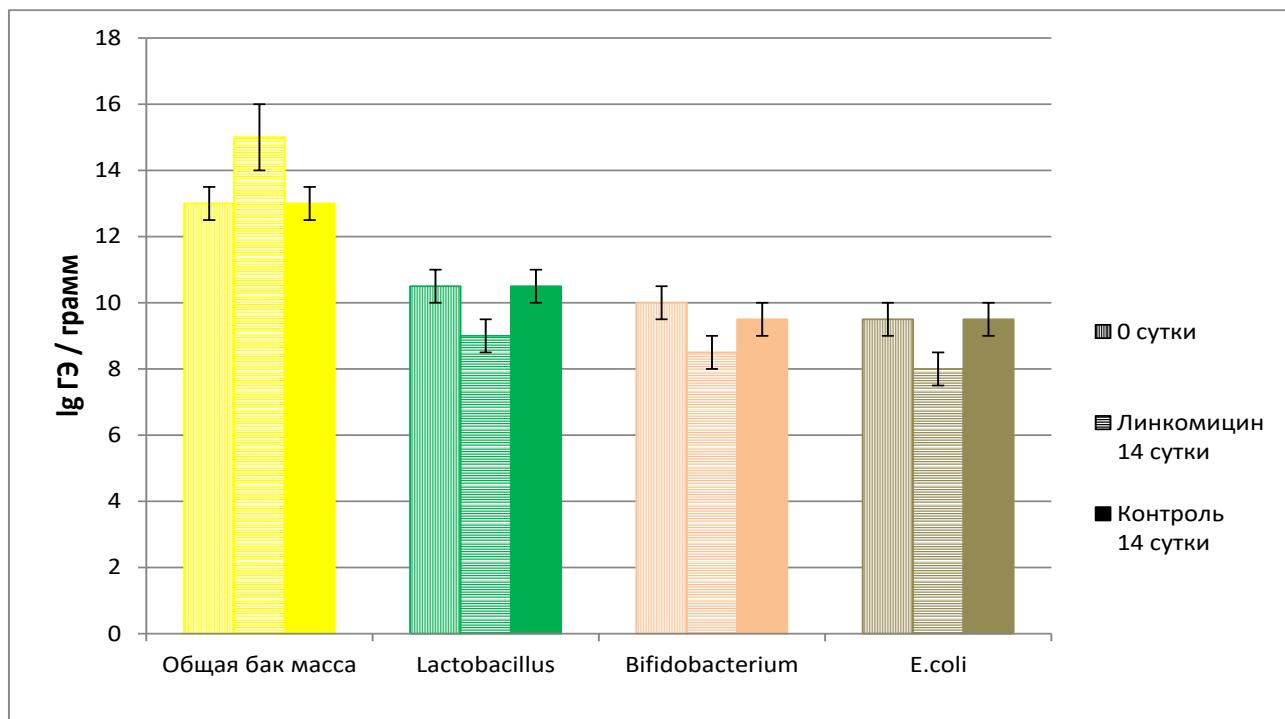


Рисунок 1 - Диаграммы изменения количества кишечных бактерий при приеме линкомицина. Исследовано методом (ПЦР-РВ) с флуоресцентной детекцией

граммме кала.

Для приготовления каловой суспензии в соответствующее пробам количество микропробирок (объемом 1,5 мл) вносили 0,8 мл стерильного изотонического раствора натрия хлорида.

Далее в каждую пробирку отдельным подрезанным наконечником с аэрозольным барьером вносили 0,1 г усредненных проб кала и тщательно ресус-пендировали на вортексе до образования гомо-генной суспензии. ДНК, анализуемых микроорганизмов, выделяли из каловых суспензий с помощью реагентов набора «Коленофлор-8» в соответствии с

протоколом производителя.

Постановку ПЦР РВ и интерпретацию полученных данных осуществляли с использованием амплификатора с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени «CFX 96» («Bio-Rad», США). Общий объем реакционной смеси – 35 мкл, включая объем пробы ДНК – 5 мкл ПЦР, проводили по следующей программе: (1 цикл) 94 °C - 15 минут, (2 цикл) 5 повторов: 94 °C - 5 секунд (денатурация), 58 °C - 11 секунд (отжиг праймеров), 72 °C - 10 секунд (эло-ингация), (3 цикл) 40 повторов: 94 °C - 5 секунд, 58 °C - 30 секунд (регистрация флуоресценции по

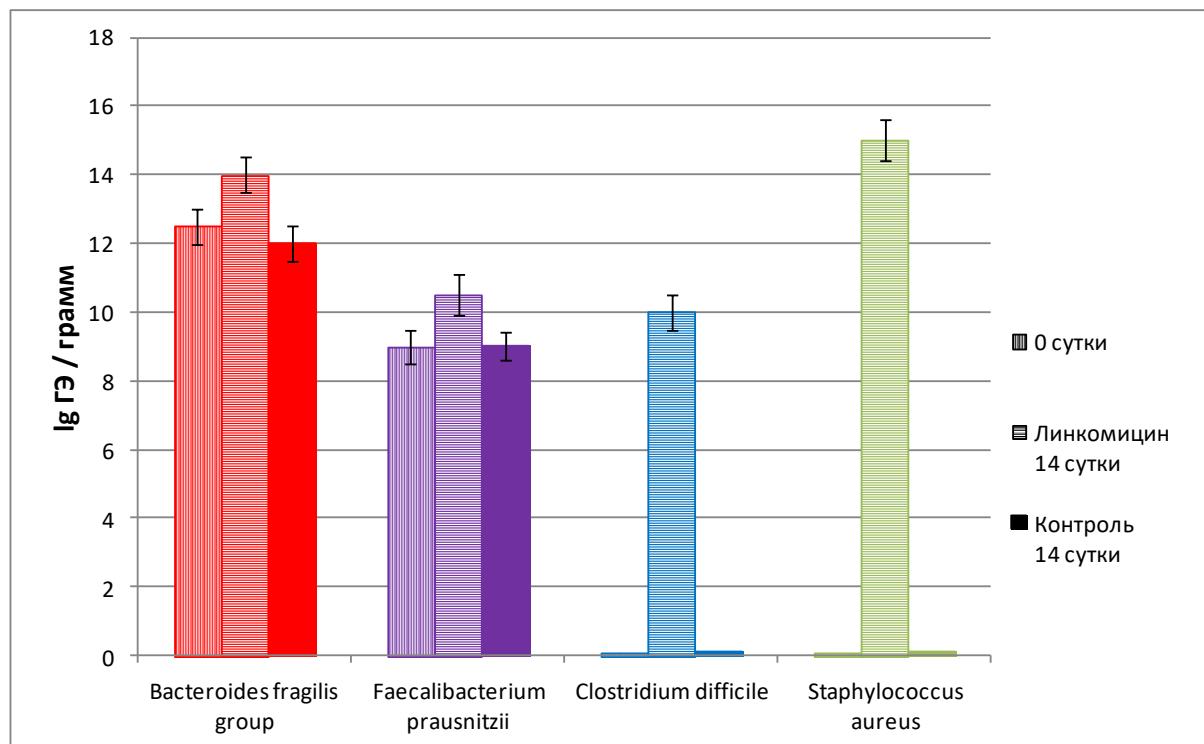


Рисунок 2 - Диаграммы изменения количества кишечных бактерий при приеме линкомицина. Исследовано методом (ПЦР-РВ) с флуоресцентной детекцией

каналам FAM и HEX), 72 °C - 10 секунд.

Анализ полученных результатов для определения концентрации ДНК микроорганизмов в образцах проводили на основе калибровочных кривых накопления сигнала по каналам FAM и HEX с помощью программного обеспечения использованного набора.

Анализируемые показатели измеряли в 3-х повторностях. В статье приведены средние арифметические данные проанализированных повторностей образцов и их стандартные ошибки. Для статистической обработки результатов использовали математический аппарат программы Microsoft Excel. Достоверность различий между сравниваемыми средними величинами устанавливали, используя t-тест Стьюдента; различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследований. Эксперимент проведен с целью выяснения влияния линкомицина на микрофлору кишечника крыс. Опытная группа животных получала ячмень кормовой и линкомицин в растворе с помощью зонда 2 раза в сутки из расчета 60 мг линкомицина/кг веса крысы в сутки. Контрольная

группа получала ячмень кормовой, равный по количеству опытной группе, но без линкомицина. Количество ячменя и линкомицина в рационе крыс приведено в таблице 1.

Эксперимент проводили с крысами в возрасте 8 недель массой (163 ± 13) г. Общая продолжительность дачи линкомицина составила 2 недели (14 дней), до возраста крыс 10 недель.

Методом ПЦР РВ проведены исследования содержания ДНК основных родов бактерий в кале опытной группы крыс до и после 2-х недельного перорального введения линкомицина и контрольной группы (рисунки 1, 2).

Исследования показали, что содержание ДНК основных бактерий в кале контрольной группы, не получавшей линкомицин, за время эксперимента существенно не изменилось и составило на 14 день эксперимента: общая бактериальная масса (13.0 ± 0.5) lg ГЭ/г, *Lactobacillus spp* (10.5 ± 0.5) lg ГЭ/г, *Bifidobacterium spp* (9.5 ± 0.5) lg ГЭ/г, *E. coli* (9.5 ± 0.5) lg ГЭ/г (рисунок 1), *B.fragilis group* (12.0 ± 0.5) lg ГЭ/г, *Faecalibacterium prausnitzii*

(9.0 ± 0.5) lg ГЭ/г, *C. difficile* и *S. aureus* не обнаружены (рисунки 1, 2).

В кале опытной группы, принимавшей линкомицин, на 14 сутки обнаружено высокое содержание общей бактериальной массы (15.0 ± 1.0) lg ГЭ/г, что больше аналогичного показателя контрольной группы на 2 порядка. Считается, что избыточный микробный рост происходит в результате подавления облигатной интестинальной микробиоты [6]. Между тем количество типичных представителей кишечной микрофлоры *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *E. coli* у опытной группы крыс на 14 сутки, хотя и было меньше, чем у контрольной группы, но в пределах нормы (рисунок 1).

На 14 сутки, в конце приема линкомицина в кале опытной группы было большое количество *B. fragilis group* (14.0 ± 0.5) lg ГЭ/г, что на 2 порядка выше контрольной группы, *S. aureus* (14.5 ± 0.5) lg ГЭ/г и *C. difficile* (9.5 ± 1.0) lg ГЭ/г при их отсутствии в контроле (рисунок 2). Количество *B. fragilis group*, хотя и было выше нормы, это не так опасно для организма хозяина, как увеличенное количество патогенных *S. aureus*, и особенно *C. difficile*.

То, что содержание основных бактерий в кале контрольной группы за время экспери-

мента существенно не менялось говорит о том, что изменение состава кишечной микрофлоры опытной группы крыс вызвано применением антибиотика - линкомицина.

Введение антибиотиков в кормовой рацион крыс не приводило к диарее и развитию побочных эффектов. В конце эксперимента физическое состояние крыс нормальное. У крыс всех групп шерстяной покров густой, глянцевый, глаза блестящие.

Исследование показало, что воздействие линкомицина на микрофлору кишечника вызывает дисбиоз с сильным увеличением количества патогенных *C. difficile* и *S. aureus*.

Заключение. Таким образом, методом ПЦР РВ нами были проанализированы количества облигатных представителей микрофлоры кишечника (бифидобактерий, лактобацилл, кишечной палочки), а также условно-патогенных и патогенных микроорганизмов в образцах кала крыс при воздействии антибиотика линкомицина. Исследования показали значительное увеличение количества *C. difficile*, *S. aureus* в кишечнике крыс, получавших линкомицины.

Литература

1. Шендеров, Б.А., Медицинская микробная экология и функциональное питание / Б.А. Шендеров. - М.: Гранть, 1998. - 288 с.
2. Bartlett, J.G., Historical perspectives on studies of *Clostridium difficile* and *C. difficile* infection / J.G. Bartlett // Clin. Infect. Dis. - 2008. - Vol. 46. - P. 4-11.
3. Feuerstadt, P., The evolution of urban *C. difficile* infection (CDI): CDI in 2009-2011 is less severe and has better outcomes than CDI in 2006-2008 / P. Feuerstadt, R. Das, L.J. Brandt // Am. J. Gastroenterol. - 2014 - Vol. 109. - P. 1265-1276.
4. Garey, K.W., Meta-analysis to assess risk factors for recurrent *Clostridium difficile* infection / K.W. Garey, S. Sethi, Y. Yadav et al. // J. Hosp. Infect. - 2008. - Vol. 70. - P. 298-304.
5. Gilbert, D.N., Aspects of the safety profile of oral antimicrobial agents / D.N. Gilbert // Infect. Dis. Clin. Pract. - 1995. - Vol. 4. - P. 103-112.
6. Kelly, C.P., *Clostridium difficile* colitis / C.P. Kelly, C. Pothoulakis, J.T. LaMont // N. Engl. J. Med. - 1994. - Vol. 330. - P. 257-262.
7. Lessa, F.C., Burden of *Clostridium difficile* infection in the United States / F.C. Lessa, Y. Mu, W.M. Bamberg et al. // N. Engl. J. Med. - 2015. - Vol. 372. - P. 825-833.
8. Ley, R.E., Harnessing microbiota to kill a pathogen: the sweet tooth of *Clostridium difficile* / R.E. Ley // Nat. Med. - 2014. - Vol. 20. - P. 248-249.
9. Pépin, J., *Clostridium difficile*-associated diarrhea in a region of Quebec from 1991 to 2003: a changing pattern of disease severity / J. Pépin, L. Valiquette, M.E. Alary et al. // CMAJ. - 2004. - Vol. 171. - P. 466-472.
10. Slimings, C., Antibiotics and hospital-acquired *Clostridium difficile* infection: update of systematic review and meta-analysis / C. Slimings, T.V. Riley // J. Antimicrob. Chemother. - 2014. - Vol. 69. - P. 881-891.

11. Spížek, J., Lincosamides: Chemical structure, biosynthesis, mechanism of action, resistance, and applications / J. Spížek, T. Řezanka // Biochem. Pharmacol.- 2017. - Vol. 133. - P. 20-28.

LINCOMYCIN - ASSOCIATED DYSBIOSIS INTESTIN OF RATS

Skvortsov E. V., Usoltsev K.V., Mukhammadiev Rish. S., Musin R. R., Bykova P. V.

*FSBSI "Federal center for toxicological, radiation and biological safety"
420075, Russia, Kazan, Nauchny Gorodok-2
e-mail: eskvortsov@rambler.ru*

*Antibiotics are widely used in livestock worldwide. This study is devoted to the processes of transformation rat intestinal microflora as a model animals of antibiotics action. The dysbiotic effect of lincomycin was studied on the microbial community rat intestines. In this research, the task was posed - to study the effect of lincomycin on the microbial community in the intestines of laboratory rats. Real time polymerase chain reaction (PCR) was used to determine the amount DNA of bacteria in intestinal microflora in analyzed samples. Were analyzed amounts of obligate representatives in intestine microflora (bifidobacteria, lactobacilli, E. coli), partially pathogenic and pathogenic microorganisms under the influence antibiotic lincomycin. The object of the study was white outbred male rats at initial age 8 weeks weighing 163 ± 13 g. The introduction of antibiotics into rat experimental group diet did not lead to diarrhea and the development of side effects. Physical condition of the rats was normal, at the end of experiment. In rats of all groups, the coat is thick, glossy. The eyes are bright. Studies have shown the occurrence of intestinal microflora dysbiosis. There was very large amount of, *Staphylococcus aureus* - 14.5 ± 0.5 lg GE/g (Gen equivalent/gram), *Bacteroides fragilis* 14.0 ± 0.5 lg GE / g, large amount *Clostridium difficile* 9.5 ± 1.0 lg GE/g, in the feces of the experimental group on 14 day, at the end of lincomycin inoculation. Whereas the number of major bacteria in control group feces, which did not feed lincomycin, did not change significantly during experiment. Fact that content of main bacteria in feces control group did not change significantly during experiment suggests that change in composition of intestinal microflora experimental rats group was caused by the use of antibiotic - lincomycin.*

Keywords: antibiotics, intestinal microbial community, lincomycin, genetic analysis, dysbiosis

References

1. Shenderov, BA, Medical microbial ecology and functional nutrition / BA. Shenderov. - M.: Grant, 1998 . - 288 p.
2. Bartlett, J.G., Historical perspectives on studies of *Clostridium difficile* and *C. difficile* infection / J.G. Bartlett // Clin. Infect. Dis. - 2008. - Vol. 46. - P. 4-11.
3. Feuerstadt, P., The evolution of urban *C. difficile* infection (CDI): CDI in 2009-2011 is less severe and has better outcomes than CDI in 2006-2008 / P. Feuerstadt, R. Das, L.J. Brandt // Am. J. Gastroenterol. - 2014 - Vol. 109. - P. 1265-1276.
4. Garey, K.W., Meta-analysis to assess risk factors for recurrent *Clostridium difficile* infection / K.W. Garey, S. Sethi, Y. Yadav et al. // J. Hosp. Infect. - 2008. - Vol. 70. - P. 298–304.
5. Gilbert, D.N., Aspects of the safety profile of oral antimicrobial agents / D.N. Gilbert // Infect. Dis. Clin. Pract. - 1995. - Vol. 4. - P. 103-112.
6. Kelly, C.P., *Clostridium difficile* colitis / C.P. Kelly, C. Pothoulakis, J.T. LaMont // N. Engl. J. Med. - 1994. - Vol. 330. - P. 257-262.
7. Lessa, F.C., Burden of *Clostridium difficile* infection in the United States / F.C. Lessa, Y. Mu, W.M. Bamberg et al. // N. Engl. J. Med. - 2015. - Vol. 372. - P. 825-833.

8. Ley, R.E., Harnessing microbiota to kill a pathogen: the sweet tooth of *Clostridium difficile* / R.E. Ley // Nat. Med. - 2014. - Vol. 20. - P. 248-249.
9. Pépin, J., *Clostridium difficile*-associated diarrhea in a region of Quebec from 1991 to 2003: a changing pattern of disease severity / J. Pépin, L. Valiquette, M.E. Alary et al. // CMAJ. - 2004. - Vol. 171. - P. 466-472.
10. Slimings, C., Antibiotics and hospital-acquired *Clostridium difficile* infection: update of systematic review and meta-analysis / C. Slimings, T.V. Riley // J. Antimicrob. Chemother. - 2014. - Vol. 69. - P. 881-891.
11. Spížek, J., Lincosamides: Chemical structure, biosynthesis, mechanism of action, resistance, and applications / J. Spížek, T. Řezanka // Biochem. Pharmacol.- 2017. - Vol. 133. - P. 20-28.