

УДК 619:616.34-002:615.246:636.2.053

ДИСБИОТИЧЕСКИ ОПОСРЕДОВАННЫЕ РАССТРОЙСТВА ГИДРОЛИЗА БЕЛКОВ У ЖИВОТНЫХ ПРИ ПАТОЛОГИИ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА

Ковалёнок Ю.К., Напреенко А.В.

УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»,
г. Витебск, Республика Беларусь

*Экспериментально установлено, что дисбиоз, сопровождающийся количественно-качественной реорганизацией кишечной микробиоты, обуславливает рост слизистой и химусной активностей аминопептидазы М и глицил – L-лейциндипептидазы в проксимально-дистальном направлении с максимумом (37-66%, $p < 0,05$) в биосубстратах толстой кишки. **Ключевые слова:** крысы, дисбиоз, диарея, кишечные ферменты.*

DYSBIOSIS-MEDIATED DISORDERS OF THE PROTEINS HYDROLYSIS IN ANIMALS WITH THE PATHOLOGY OF THE GASTROINTESTINAL TRACT

Kavalionak Y.K., Napreenko A.V.

Vitebsk State Academy of Veterinary Medicine, Vitebsk, Republic of Belarus

*We experimentally proved that dysbiosis, accompanied by quantitative and qualitative reorganization of the intestinal microbiota, causes the growth in the mucous and chyme activities of the aminopeptidase M and glycyl-L-leucine dipeptidase in the proximal-distal direction with a maximum (37-66%, $p < 0.05$) in biosubstrates of the colon. **Keywords:** rats, dysbiosis, diarrhea, intestinal enzymes.*

Введение. Одним из научных открытий 2013 года стало установление значительного влияния кишечной микробиоты на функционирование всего организма человека, не исключая деятельности головного мозга [11]. Результатами современных научных исследований доказана роль дисбаланса кишечного микробиоценоза в генезе сахарного диабета, ожирения, ряда сердечно-сосудистых заболеваний, аутизма [11]. Значительно меньше научных работ [1, 4, 5, 7, 8] посвящено исследованию взаимосвязи дисбиоза и расстройства пристеночного (мембранного) гидролиза, большинство из них относятся к области фундаментальных медицинских исследований. В свете вышеизложенного целью настоящих исследований явилось изучение влияния дисбиоза на расстройство мембранного гидролиза у животных при патологии желудочно-кишечного тракта.

Материалы и методы исследований. Исследования проводились на базе кафедры клинической диагностики УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины». Объектом исследования являлись белые половозрелые крысы массой 200-250 г, материалом – эпителий и пристеночная слизь, полостное содержимое (химус) из различных участков тонкой и толстой кишки, фекалии, предметом – количественно-качественный состав кишечной микробиоты, активность аминопептидазы М, глицил–L-лейциндипептидазы.

Для реализации цели исследования были созданы 2 группы — опытная и контрольная ($n=3$). Подопытные животные ранее не подвергались токсическому воздействию и находились в одинаковых условиях содержания, кормления и ухода. Дисбиоз у опытных крыс индуцировался в соответствии со «Способом моделирования дисбиоза кишечника у лабораторных животных» [7]. Животным контрольной группы аналогичным способом вводили дистиллированную воду в равном объеме. В течение опыта за животными было установлено ежедневное наблюдение. Методология опыта была построена на использовании клинических, микробиологических, биохимических и статистических методов исследования. Ежедневно крыс исследовали с использованием общепринятых методик. В конце эксперимента у животных отбирались фекалии, а после декапитации - эпителий и пристеночная слизь, полостное содержимое (химус) из различных участков тонкой и толстой кишки в соответствии с методикой, используемой в лаборатории физиологии питания Санкт-Петербургского института физиологии им. И.П. Павлова РАН для исследования кишечных ферментов и микробиоты. Нами исследовались активности аминопептидазы М (НФ 3.4.11.2) по методу Фарра и др. (Farr et al., 1968) [12] и глицил–L-лейциндипептидазы (НФ 3.4.13.2) по приросту глицина (Уголев, Тимофеева, 1969) [9] с использованием в качестве субстрата раствора глицил–L-лейцина (20 мМ), приготовленного на растворе Рингера (рН 7,4) с использованием спектрофотометра PV 1251 C (SOLAR). Для каждого фермента определялась удельная активность (мкмоль/мин на 1 г влажной массы кишки), характеризующая активность усредненного энтероцита, а также интегральная активность, позволяющая оценить энзимную активность конкретного участка кишки (выражалась в мкмоль/мин на участок кишки). Химусную активность фермента мы определяли в расчете на массу химуса в каждом исследуемом участке кишки.

В эпителии и пристеночной слизи кишок исследовался состав мукозной флоры (М-флора), а в химусе и фекалиях – просветной (П-флора), в качестве диагностически значимых маркеров дисбиоза определялось количество бифидо- и лактобактерий, энтеробактерий, ста-

фило- и стрептококков, дрожжеподобных грибов рода *Candida*, анаэробных бацилл. Состав микробиоты кишечника изучали в соответствии со «Справочником по бактериологическим методам исследования в ветеринарии» [8]. Подсчет колоний микроорганизмов производили в натуральных числах, умноженных на 10 в степени, равной разведению бактериологического материала, с последующим традиционно принятым выражением их через десятичный логарифм. Выделенные чистые культуры идентифицировали по морфологическим, тинкториальным, биохимическим, культуральным свойствам в соответствии с рекомендациями «Краткий определитель бактерий Берги» (1980) [3].

Статистическая обработка данных проводилась с использованием статистической программы SPSS. Проверка формы распределения переменных проводилась с использованием теста Колмогорова-Смирнова для одной выборки. Для описательного представления материала в случае нормального распределения переменной применялись среднее значение (M) и стандартное отклонение (σ), заключенное в круглые скобки и помещаемое после среднего значения. При проверке статистических гипотез различия выборочных средних считались статистически значимыми при вероятности ошибки $p < 0,05$ [6].

Результаты исследований. Дисбиоз у опытных крыс характеризовался угнетением, анорексией и полидипсией. Регистрировалась диарея, полифекалия с выделением жидких светлых фекалий, взъерошенность шерсти, а также снижение двигательной активности и массы тела. Интактные крысы на протяжении всего эксперимента были энергичными, охотно поедали корм и набирали массу тела. При взвешивании крыс было установлено, что масса опытных животных значительно снизилась на 12,4% ($p=0,018$) по сравнению с контролем, что связано с ухудшением аппетита животных, нарушением процессов пищеварения и, как следствие, повышением перистальтики и эвакуации химуса при диарее.

При микробиологическом исследовании было установлено, что у крыс опытной группы в слизистой оболочке тощей кишки количество бифидобактерий было значительно ниже на 25,6%, а в химусе – на 35,2%, чем у контрольных животных ($p=0,007$). Количество лактобацилл в слизистой оболочке опытных и контрольных крыс различалось на 30,8%, со значимым преобладанием у последних ($p=0,042$). Уровень лактобактерий в химусе опытных крыс значительно превышал контрольный на 18,7% ($p=0,042$). Количество стафилококков в слизистой оболочке и химусе тощей кишки опытной группы было выше, чем в соответствующих контролях, в среднем на 23% ($p=0,024$). Важно отметить, что большинство стафилококков, выделенных из слизистой оболочки и химуса опытных крыс, идентифицированы нами как гемолитические, в то время как у интактных крыс преобладали кокки, относящиеся к факультативной нормофлоре кишечника животных. Сравнением средних значений стрептококков в слизистой оболочке опытных и интактных крыс выявлено, что у первых их было значительно больше – на 35,9% ($p=0,016$). При исследовании химуса крыс наблюдалось значимое превалирование стрептококков на 22,3% у животных с клиническими признаками дисбиоза ($p=0,014$). Анаэробные бациллы из биоматериалов тощей кишки были выделены только у опытных животных.

При исследовании состава микробиоты подвздошной кишки были получены схожие результаты исследования, за исключением выделения из материала опытных крыс кишечных палочек с низкой ферментативной активностью, не высеваемых из субстратов интактных крыс. Следует отметить, что в химусе опытных животных данный показатель был на 27% ($p=0,01$) выше, чем в слизистой оболочке. Анаэробные бациллы, грибы рода *Candida* и протей также были обнаружены в биоматериале опытных крыс, при этом в химусе их было значительно больше, чем в пристеночном муцине, в среднем на 25% ($p=0,01$).

Результаты исследования микробиоценоза толстой кишки иллюстрируют 16,9% и 27,2%-ное ($p=0,023$) снижение количества бифидобактерий у опытных крыс по сравнению с контролем. При этом уровень лактобактерий в слизистой оболочке и химусе контрольных крыс был на 15% ($p=0,01$) и 30,6% ($p=0,001$) соответственно выше чем у опытных особей. Нами было отмечено, что эшерихия коли с нормальной ферментативной активностью высевалась из слизистой оболочки и химуса опытных крыс, а у контрольных – только из содержимого просвета толстой кишки. Численное преобладание стрепто- и стафилококков в муцине опытных крыс над контролем в среднем на 25,1% ($p=0,004$) может свидетельствовать о снижении колонизационной резистентности колоноцитов в динамике дисбиоза и согласуется с отмеченным выше снижением количества бифидо- и лактофлоры. Сравнением полостного содержимого установлено преобладание обсуждаемых условных патогенов у опытных крыс на 19% ($p=0,012$). Важно отметить, что бактерии рода *Proteus* высевались только из материала опытных крыс. Как и при исследовании дистальной части тонкой кишки, в толстом отделе кишечника нами установлено, что кандиды и анаэробные бациллы выделялись из слизистой и химусной фракций опытных животных, у здоровых крыс же проявляли преимущественно полостную локализацию. Так, в химусе здоровых крыс количество грибов и бацилл было значительно ниже, чем у животных опытной группы, в среднем на 49,3% ($p=0,001$).

В отношении активности кишечных ферментов, обеспечивающих терминальный гидролиз пептидов, отмечался рост показателей у опытных крыс при сравнении с контрольными позициями. Максимальное увеличение удельной и интегральной активности аминопептидазы M установлено в толстой кишке на 40% и 34,5% соответственно (таблица 1). В химусе активность фермента увеличилась преимущественно в тощей и толстой кишках на 16% и 27% соответственно.

В ходе эксперимента было установлено, что удельная активность глицил – L-лейциндипептидазы в слизистой оболочке тощей, подвздошной и толстой кишок выросла на 23,5%, 34,9% % и 46,6% соответственно, а интегральная – в среднем на 17% в тонкой и на 27,1% – в толстой кишках. В химусе активность фермента максимально выросла преимущественно в тощей и толстой кишках на 29,2% и 66,7% ($p=0,03$) (таблица 1).

В обсуждении проанализированных нами результатов хотелось бы отметить, что активность исследуемых ферментов увеличивается преимущественно за счет активизации функции энтероцитов, о чем свидетельствуют значения удельной активности аминопептидазы М. В то же время повышение интегральной активности аминопептидазы М и глицил – L-лейциндипептидазы происходило меньше вследствие снижения массы слизистой оболочки.

Таблица - Активность некоторых ферментов тонкой и толстой кишок крыс опытной и контрольной групп при моделировании дисбиоза ($M \pm \sigma$, p)

Ферменты	Материал для исследования	Активность	Опытная группа			Контрольная группа		
			Тщ	П	Тл	Тщ	П	Тл
Аминопептидаза М	С	1	7,12 $\pm 1,838$	6,50 $\pm 1,219$	0,698 $\pm 0,1732$	6,48 $\pm 1,283$	6,21 $\pm 1,443$	0,502 $\pm 0,1428$
		2	10,5 $\pm 1,6$	6,92 $\pm 0,913$	0,269 $\pm 0,0382$	9,81 $\pm 2,057$	7,3 $\pm 1,271$	0,209 $\pm 0,1412$
	П	3	11,3 $\pm 1,49$	3,14 $\pm 1,038$	7,54 $\pm 1,792$	9,75 $\pm 0,714$	2,94 $\pm 0,548$	5,96 $\pm 0,946$
Глицил –L-лейциндипептидаза	С	1	368 $\pm 36,9$	541 $\pm 99,8$	213,6 $\pm 22,7$	298,4 $\pm 53,62$	401 $\pm 87,01$	146,4 $\pm 34,87$
		2	523 $\pm 44,5$	103 $\pm 15,4$	75,3 $\pm 8,17$	451,4 $\pm 69,51$	87,4 $\pm 9,91$	59,1 $\pm 9,34$
	П	3	31,1 $\pm 6,09$	41,83 $\pm 8,357^*$	34,7 $\pm 5,76^*$	23,63 $\pm 3,710$	37,7 $\pm 6,025$	20,73 $\pm 4,581$

Примечания: 1 - удельная активность (мкмоль/мин г ткани); 2 - интегральная активность (мкмоль/мин г участок кишки); 3 - активность химуса (мкмоль/мин г участок кишки). * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$ при сравнении с контролем.

Мы полагаем, что констатируемое изменение активностей обсуждаемых энзимов в слизистой и химусной фракциях, главным образом толстой кишки, происходило вследствие активизации субстратного механизма их выработки, а также значимого снижения количества лакто- и бифидобактерий, участвующих в утилизации ферментных активностей в толстокишечной полости. Приведенные умозаключения верифицируются приведенными выше результатами собственных исследований и в целом согласуются с немногочисленными литературными данными [1, 2, 9, 10].

Учитывая тот факт, что характер питания животных определяет количественно-качественный состав кишечной микрофлоры, мы скармливали крысам корма, входящие в рацион телят, чтобы максимально приблизить «модель» к производственной ветеринарии. Этот аспект, а также использование данного приема другими исследователями [1, 9, 10], позволил нам считать модель адекватной, а межвидовую экстраполяцию полученных результатов – корректной и биологически обоснованной.

Закключение. В ходе эксперимента было установлено, что дисбиоз, сопровождающийся количественно-качественной реорганизацией кишечной микрофлоры, обуславливает рост слизистой и химусной активностей аминопептидазы М и глицил – L-лейциндипептидазы в проксимально-дистальном направлении с максимумом в биосубстратах толстой кишки.

Литература. 1. Борщев, Ю. Ю. Влияние пробиотических бактерий на кишечные пищеварительные ферменты у крыс при экспериментальном дисбиозе : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.03.01 / Ю. Ю. Борщев ; ФГБУН «Институт физиологии им. И.П. Павлова». – Санкт-Петербург, 2012. – 21 с. 2. Борщев, Ю. Ю. Реакция пептидгидролаз тонкой и толстой кишки крыс на введение антибиотиков / Ю. Ю. Борщев [и др.] // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – Санкт-Петербург, 2012. – Т. 98. № 6. – С. 724-733. 3. Краткий определитель бактерий Берги : пер. с англ. / под ред. Д. Хоулта. – М.: Мир, 1980. – 495 с. 4. Ковалёнок, Ю. К. Особенности дисбиоза в патогенезе абомазоэнтерита телят / Ю.К. Ковалёнок, А. В. Напреенко // Ученые записки учреждения образования «Витебская ордена «Знак Почета» гос. акад. ветеринар. медицины» : науч.-практ. журнал. Витебск, 2017. – Т. 53. – В. 2. – С. 59-62. 5. Ковалёнок, Ю. К. Активность мальтазы при кишечном дисбиозе животных / Ю. К. Ковалёнок, А. В. Напреенко // Ученые записки учреждения образования «Витебская ордена «Знак Почета» гос. акад. ветеринар. медицины» : науч.-практ. журнал. Витебск, 2017. – Т. 53. – В. 2. – С. 56-59. 6. Наследов, А. Д. SPSS 19 : профессиональный статистический анализ данных / А. Д. Наследов. – СПб. : Питер, 2011. – 399 с. 7. Способ моделирования дисбактериоза кишечника у лабораторных животных : пат. 2477894 Россия : МПК G09B23/28 (2006.01) / Д. И. Дармов, И. Ю. Чичерин, А. С. Ердякова, И. П.

Погорельский, И. А. Лундовских ; дата публ. : 20.03.2013. 8. Справочник по бактериологическим методам исследований в ветеринарии / Министерство сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь ; сост.: А. Э. Высоцкий, З. Н. Барановская. – Минск : Белтаможсервис, 2008. – 821 с. 9. Уголев, А. М. Функциональная топография ферментативных и транспортных процессов в тонкой кишке / А. М. Уголев, Н. М. Тимофеева, Н. Н. Иезуитова // Физиология всасывания / под ред. А.М. Уголева. – Ленинград : Наука, 1977. – С. 524–565. 10. Уголев, А. М. Определение протеолитической активности / А. М. Уголев, Н. М. Тимофеева // Исследование пищеварительного аппарата у человека. – Ленинград : Наука, 1969. – С. 176. 11. Фундаментальные и прикладные аспекты физиологии пищеварения и питания : Всероссийский симпозиум с международным участием, посвященный 90-летию со дня рождения академика А. М. Уголева, Санкт-Петербург (15-17 марта 2016 г.) : материалы симпозиума. – Санкт-Петербург, 2016. – 133 с. 12. Aminosaurearylamidase in serum / W. Farr [et al] // Z. Med. Labortechnik. – 1968. – Bd. 9. – P. 78–86.

Статья передана в печать 26.09.2018 г.

УДК 619:618. 14-085

ЭФФЕКТИВНОСТЬ СРЕДСТВА «ТЕСТМАСТИН» ПРИ ДИАГНОСТИКЕ СУБКЛИНИЧЕСКИХ МАСТИТОВ У КОРОВ

Ковзов В.В., Гарбузов А.А., Красочко П.П., Ковзов И.В.

УО «Витебская государственная ордена «Знак Почета» академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь

В результате проведенных исследований установлено, что средство «Тестмастин», предназначенное для диагностики субклинических (скрытых) маститов у коров, обладает высокой диагностической эффективностью. При проведении исследований 56% обследованных коров дали положительный результат теста на субклинический мастит, 17% – сомнительный, 27% – отрицательный. При проведении исследований с использованием средства KerbaTEST 53% обследованных коров дали положительный результат теста на субклинический мастит, 19% – сомнительный, 28% – отрицательный. Таким образом, в 3% случаев более чувствительным было средство «Тестмастин». **Ключевые слова:** коровы, субклинический мастит, тестмастин, KerbaTEST, диагностика маститов.

EFFICIENCY OF «TESTMASTIN» MEANS IN DIAGNOSTICS OF SUBCLINICAL MASTITES IN COWS

Kovzov V.V., Garbuzov A.A., Krasochko P.P., Kovzov I.V.

Vitebsk State Academy of Veterinary Medicine, Vitebsk, Republic of Belarus

As a result of the research it was found that the means “Testmastin”, intended for the diagnosis of subclinical (hidden) mastitis in cows, has high diagnostic efficiency. When conducting research, 56% of the cows surveyed tested positive for subclinical mastitis, 17% – questionable, 27% – negative. When conducting research using KerbaTEST, 53% of the examined cows tested positive for subclinical mastitis, 19% – questionable, 28% – negative. Thus, in 3% of the cases, the “Testmastin” was more sensitive. **Keywords:** cows, subclinical mastitis, Testmastin, KerbaTEST, mastites diagnostics.

Введение. Мастит, или воспаление молочной железы коров – широко распространенное заболевание. Это заболевание причиняет животноводству значительный ущерб, состоящий из снижения продуктивности, ухудшения питательных и технологических свойств молока, затрат на диагностику и лечение животных. Молоко от больных коров и изготовленная из него продукция является источником инфицирования людей и молодняка животных [1, 6, 7].

Чаще всего маститом заболевают высокопродуктивные коровы. За период болезни и после клинического выздоровления потери молока на одну корову составляют в среднем 10-15% от годового удоя. У части животных восстановление молочной продуктивности не происходит из-за необратимых процессов в молочной железе, что приводит к преждевременной выбраковке животных и сокращению их продуктивного использования.

Мастит в скрытой форме является одной из главных причин снижения санитарного качества молока, массовых желудочно-кишечных заболеваний и гибели телят в раннем постнатальном периоде. Поэтому он представляет наибольшую хозяйственно-экономическую проблему. Кроме того, скрыто протекающий субклинический мастит встречается в 4-5 раз чаще, чем клинически выраженный, и наносит большой экономический ущерб животноводству. Больные маститом коровы служат источником повышения соматических клеток и микрофлоры в сборном молоке, ингибирующих веществ в виде остаточных количеств химиотерапевтических препаратов, применяемых для лечения, что ведет к нарушению технологии приготовления сыров и молочно-кислой продукции. Примесь 5-10% молока больных скрытым маститом коров делает все молоко непригодным для переработки на сыры и молочные продукты [2, 4, 6, 8].

В целях увеличения объемов производства молока и повышения его санитарного качества, наряду с укреплением кормовой и материально-технической базы, совершенствованием