

И. С. САВИЦКАЯ

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ КЛЕТОК ЛАКТОБАЦИЛЛ ДЛЯ КОРРЕКЦИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АНТИБИОТИКОИНДУЦИРОВАННОГО ДИСБАКТЕРИОЗА

(Казахский национальный университет им. аль-Фараби)

На модели экспериментального дисбактериоза проведена комплексная оценка состояния кишечной микрофлоры. Иммуобилизованные на активированном угле пробиотики эффективно восстанавливают микробиологический баланс в кишечнике. Установлена возможность профилактики кишечного дисбактериоза у экспериментальных животных при совместном введении ципрофлоксацина и устойчивых к нему штаммов лактобацилл.

Применение фторхиноловых препаратов наряду с несомненной терапевтической эффективностью часто приводит к развитию дисбактериозов, характеризующихся падением популяционного уровня лактобактерий в кишечнике [1]. Совместное применение этих препаратов с пробиотиками, предназначенными для восстановления микрофлоры, может быть неэффективным из-за чувствительности производственных штаммов лактобацилл к фторхинолонам [2,3]. Это означает, что такое этиотропное лечение необходимо сочетать с использованием препарата, в состав которого включены штаммы лактобацилл, обладающие устойчивостью к этим антибиотикам.

Полезные свойства пробиотических микроорганизмов, обеспечивающие их главную протективную функцию – колонизационную резистентность, удастся увеличить при иммобилизации таких бактерий на углеродных сорбентах [4]. Поскольку подобные препараты на основе антибиотикоустойчивых штаммов лактобацилл пока отсутствуют, целью настоящего исследования явилось определение возможности восстановления микрофлоры кишечника у животных с экспериментальным ципрофлоксацин-индуцированным дисбактериозом с помощью свободных и иммобилизованных клеток антибиотикоустойчивых штаммов лактобацилл.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проводили на 6–8 недельных беспородных крысах, у которых индуцировали экспериментальный дисбактериоз [5]. Для этого использовали антибиотик ципрофлоксацин, один из наиболее эффективных и популярных препаратов [6].

Начиная со следующего дня после предварительного бактериологического исследования животные, разделенные на 5 групп, получали в течение пяти дней ципрофлоксацин в дозе, близкой к терапевтической – 5 мкг на 1 г массы тела. Первая группа получала только антибиотик, вторая после проведения этиотропной терапии *устойчивый к ципрофлоксацину штамм L. fermentum AK-2 R*, третья – после приема ципрофлоксацина – этот же штамм, иммобилизованный на активированном угле. Две другие группы получали свободный, чувствительный к ципрофлоксацину штамм *L. fermentum AK-2* и он же, иммобилизованный на носителе. В каждой группе использовали по 6 животных. Анализ проводили через 5 дней (сразу после отмены антибиотика) и через 20 дней от начала эксперимента.

Результаты коррекции микробиоценоза оценивали по принятой методике исследования на дисбактериоз [7]. При проведении статистических расчетов использовали табличный процессор Excel 7.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Перед введением антибиотика проводился посев фекалий интактных животных на дифференциально-диагностические среды для определения содержания основных групп индигенных бактерий в кишечнике крыс. Эти данные, а также результаты, полученные после определения состава кишечной микрофлоры у крыс, получавших в течение 5 дней антибиотик ципрофлоксацин, сведены в табл. 1.

Было установлено, что после 5-дневного курса введения ципрофлоксацина у животных происходило значительное снижение (на два поряд-

Таблица 1. Состав микрофлоры кишечника у крыс с экспериментальным дисбактериозом, индуцированным ципрофлоксацином

Сроки наблюдения, дни	Количество микроорганизмов в фекалиях, lg КОЕ/г					
	Бифидобактерии	Лактобактерии	Эшерихии	Условно-патогенные энтеробактерии	Энтерококки	Стафилококки
1	8,4 ± 0,3	7,4 ± 0,6	7,4 ± 0,5	2,3 ± 0,1	3,2 ± 0,2	5,6 ± 0,5
5	6,4 ± 0,5	5,3 ± 0,4	5,2 ± 0,6	4,3 ± 0,2	3,2 ± 0,3	4,0 ± 0,4
15	5,2 ± 0,3	4,2 ± 0,3	5,0 ± 0,4	5,4 ± 0,3	5,2 ± 0,1	6,5 ± 0,6
20	6,2 ± 0,4	4,9 ± 0,3	5,6 ± 0,6	3,5 ± 0,2	3,7 ± 0,3	5,4 ± 0,3

ка) популяционных уровней бифидобактерий и лактобактерий. Параллельно с этим уменьшалось количество кишечных палочек и стафилококков. Между тем в кишечнике животных появлялись в больших количествах (до 10^4 в 1 г фекалий) условно-патогенные энтеробактерии, причем особенно протеи, не выявлявшиеся в испражнениях крыс перед проведением антибактериальной терапии.

На 15-й день после начала антибиотикотерапии в дистальном отделе кишечника крыс, не получавших бактериальных препаратов, явления дисбактериоза были резко выражены. В повышенных количествах обнаруживались энтеробактерии – до 10^5 в 1 г фекалий. В то же время, количество ферментативно активных кишечных палочек снижалось на два порядка по сравнению с нормой. Кроме того, на порядок возрастал уровень кокковой флоры – энтерококков и стафилококков.

Через 20 дней после окончания приема ципрофлоксацина наблюдалось естественное улучшение состава микрофлоры, однако полного восстановления ее не наблюдалось, т.е. на 20-й день от начала эксперимента отмечалась лишь тенденция к нормализации.

За основные критерии бактериологической эффективности введения опытным животным экзогенных лактобацилл принимали популяционный уровень бифидобактерий, лактобацилл и эшерихий с неизменными ферментативными свойствами, а также качественные и количественные характеристики содержания в толстом кишечнике гемолизирующих эшерихий, условно-патогенных энтеробактерий, стафилококков и энтерококков (рис. 1).

Исследования, проведенные по окончании приема животными лактобактерий (на 20-й день) показали в большинстве случаев значительное

улучшение состояния кишечного микробиоценоза. Причем введение после приема ципрофлоксацина экзогенных штаммов лактобактерий с естественным и повышенным уровнем устойчивости к ципрофлоксацину в одинаковой степени сказывалось на эффективности антибиотикоиндуцированного дисбактериоза.

Вместе с тем существенные различия выявлены при приеме свободных и иммобилизованных на сорбенте клеток лактобацилл (рис. 2).

Введение экзогенных лактобактерий прежде всего способствовало нарастанию в кишечнике экспериментальных животных бифидобактерий и лактобактерий, причем у крыс, получавших иммобилизованные штаммы, оно было достоверно выше ($p < 0,001$) по сравнению с животными, получавшими неиммобилизованные клетки. Нарастание содержания лактобактерий в кишечнике у крыс, принимавших иммобилизованные клетки *L. fermentum AK-2*, отмечалось у 75%, а клетки *L. fermentum AK-2R* – у 76% и достоверно отличалось от случаев с животными, получавшими обычные культуры, – 26% (*L. fermentum AK-2*) и 25% (*L. fermentum AK-2R*).

Уменьшение количества условно-патогенных энтеробактерий при приеме иммобилизованных лактобацилл наблюдалось у 58% (*L. fermentum AK-2*) и 59% (*L. fermentum AK-2R*) крыс и было достоверно выше, чем у получавших свободные клетки штамма *L. fermentum AK-2*, где аналогичный показатель составил 28% ($p < 0,01$).

Содержание стафилококков также снизилось у большего числа крыс при приеме иммобилизованных штаммов – 61 и 60%. В группе животных, не получавших лактобактерий, снижение уровня энтерококков наблюдалось у 13 и было достоверно меньше, чем у крыс, которым вводили свободные клетки антибиотикорезистентных штаммов (*L. fermentum AK-2R*), где указан-

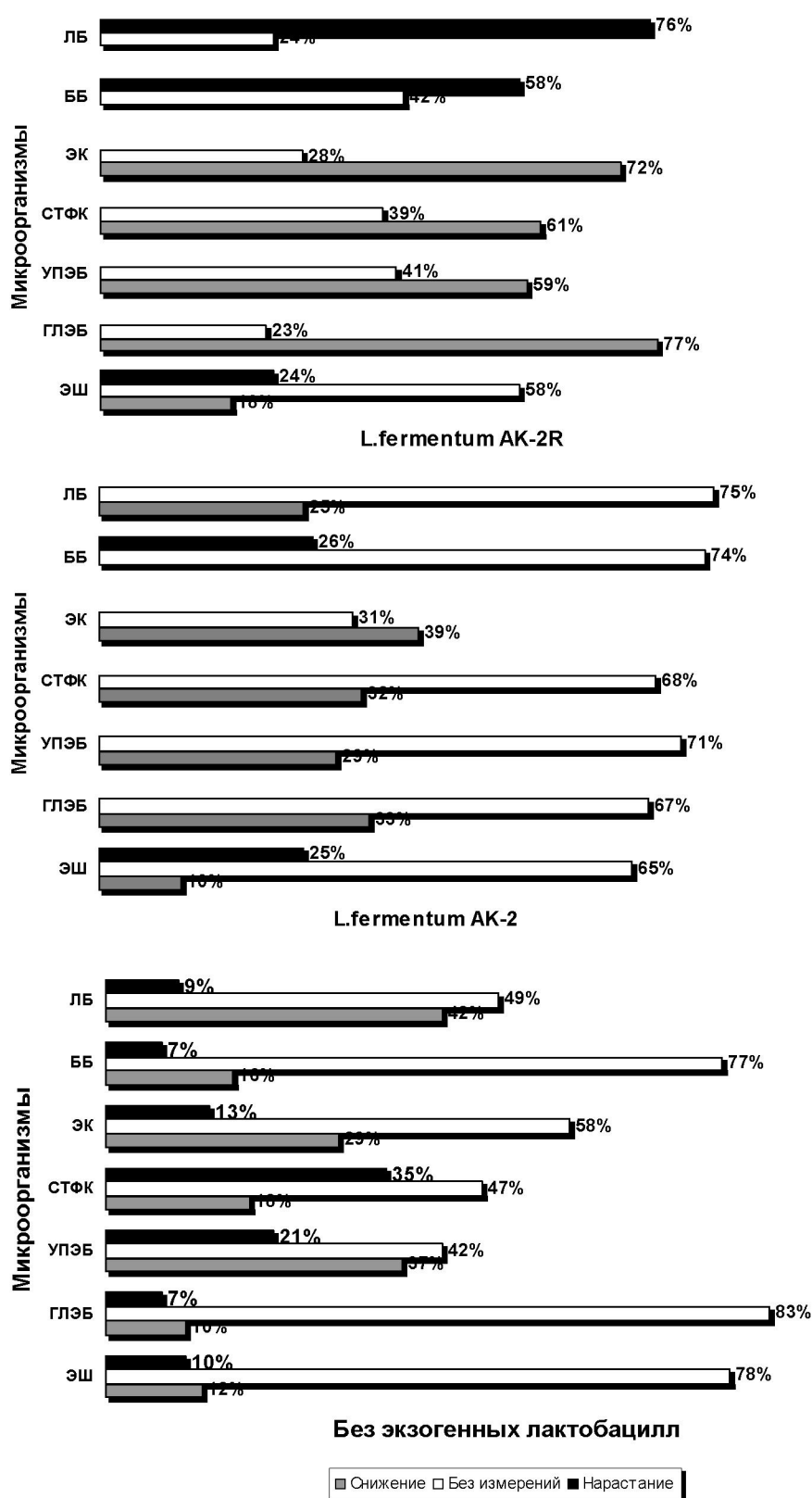


Рис. 1. Влияние введения свободных клеток *L. fermentum AK-2* и *L. fermentum AK-2 R* на популяционный уровень представителей кишечной микрофлоры у крыс с ципрофлоксацин-индуцированным дисбактериозом. Обозначения: ЛБ - лактобактерии; ББ - бифидобактерии; ЭК - энтерококки; СТФК - стафилококк; УПЭБ - условно-патогенные энтеробактерии; ГЛЭБ - гемолизующие энтеробактерии; ЭШ - эшерихии

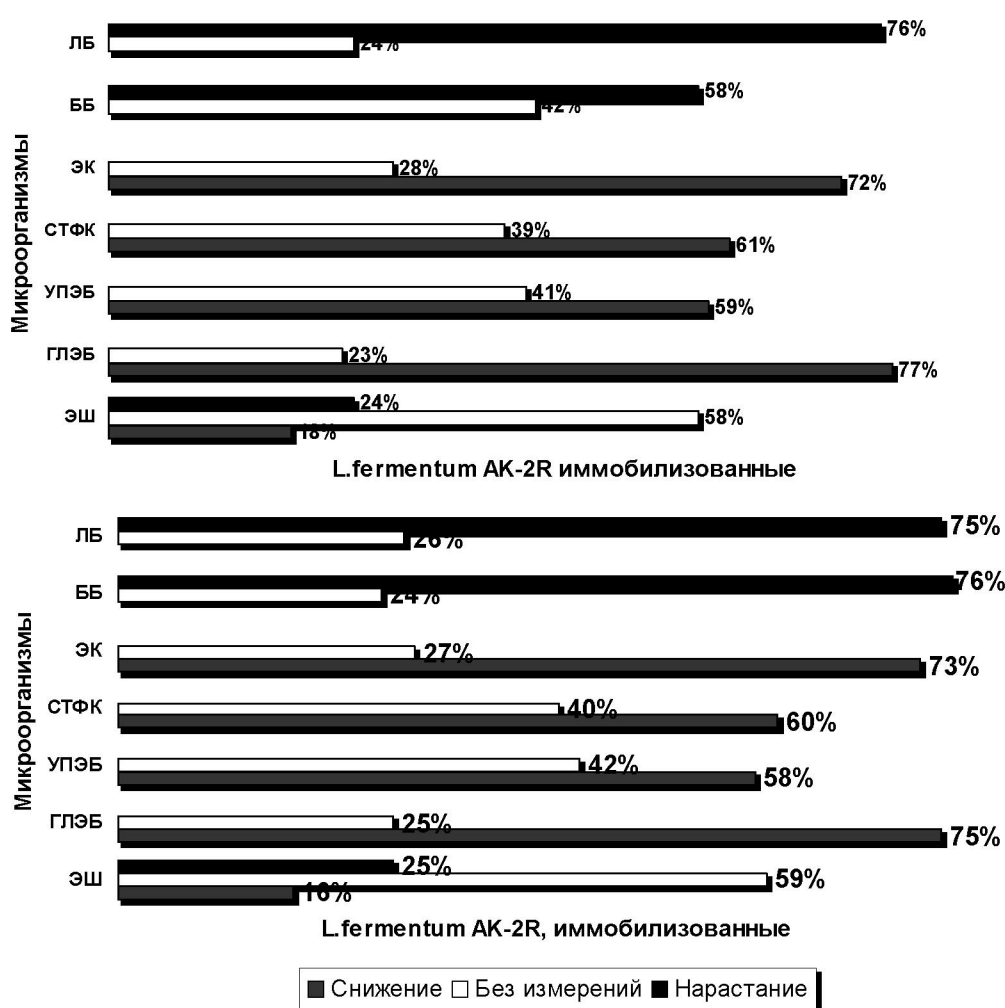


Рис. 2. Влияние введения иммобилизованных клеток *L. fermentum AK-2* и *L. fermentum AK-2 R* на популяционный уровень представителей кишечной микрофлоры у крыс с ципрофлоксацин-индуцированным дисбактериозом. Обозначены те же, что на рис. 1

ный параметр составил 38% ($p < 0,05$), для иммобилизованных штаммов (*L. fermentum AK-2R* и *L. fermentum AK-2*) – 72% и 73% ($p < 0,01$), для *L. fermentum AK-2* – 39% (без достоверных различий по сравнению с группой крыс, не получавших лактобактерии). Иными словами, прием иммобилизованных лактобацилл приводил к снижению содержания энтерококков у достоверно большего числа животных по сравнению с теми, кому вводили неиммобилизованные клетки лактобацилл.

Комплексная оценка влияния введенных экзогенных лактобактерий на состояние кишечной микрофлоры показана на рис. 3.

После введения пробиотических лактобацилл не зафиксировано ухудшений в составе кишечной микрофлоры, тогда как у 65% крыс, не получавших лактобактерии, это произошло. Тенден-

ция к восстановлению микробиоценоза обнаруживалась у 73% животных, получавших иммобилизованные клетки *L. fermentum AK-2*, у 89% крыс, получавших штамм *L. fermentum AK-2R*, и только у 55% – свободные клетки бактерий-пробиотиков. Спонтанно это произошло лишь у 13% крыс. Таким образом, введение экзогенных лактобактерий способствовало нарастанию содержания бифидофлоры и лактофлоры и элиминации из кишечника экспериментальных животных гемолитических эшерихий, условно-патогенных энтеробактерий, стафилококков, энтерококков. Наилучший эффект в нормализации микробиоценоза наблюдался в группах, получавших иммобилизованные клетки лактобактерий.

Анализ микробных карт, составленных по результатам экспериментов, в которых свободные и иммобилизованные клетки лактобацилл

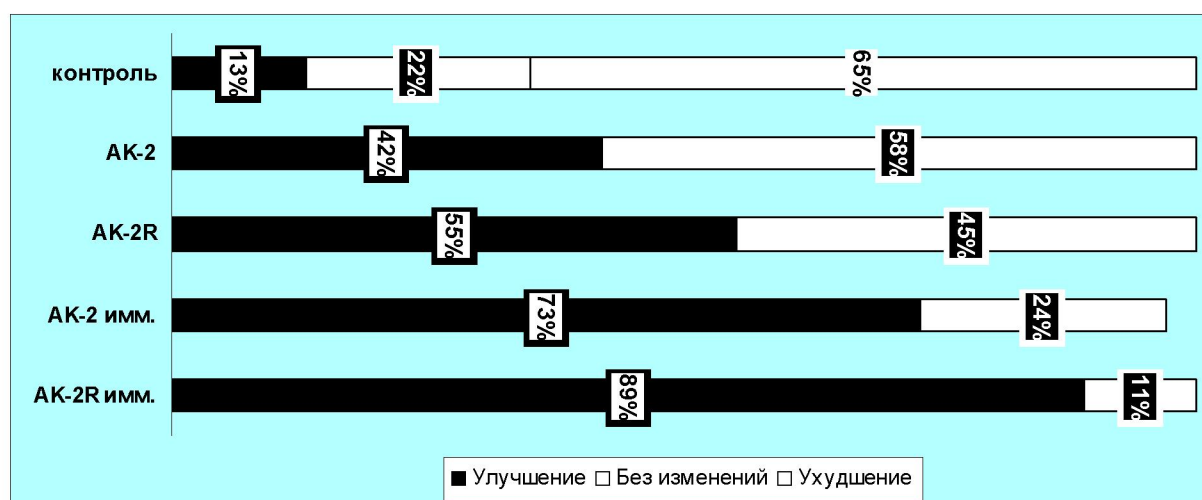


Рис. 3. Изменения в составе кишечной микрофлоры у крыс с ципрофлоксацин-индуцированным дисбактериозом после введения свободных и иммобилизованных клеток *L. fermentum* AK-2 и *L. fermentum* AK-2 R

вводились опытному животному одновременно с антибиотиком, показал, что эффективность восстановления кишечной микрофлоры в присутствии экзогенных лактобактерий зависит от антибиотикочувствительности вводимого штамма (табл. 2).

Только присутствие в организме устойчивого к ципрофлоксацину штамма лактобактерий оказывало выраженное влияние на восстановление микрофлоры кишечника уже в процессе антибактериальной терапии. Параллельное введение вместе с ципрофлоксацином устойчивых

Таблица 2. Состав микрофлоры кишечника у крыс после одномоментного введения ципрофлоксацина и лактобактерий

Группы животных	Количество микроорганизмов в фекалиях, lg КОЕ/г					
	Бифидобактерии	Лактобактерии	Эшерихии	Условно-патогенные энтеробактерии	Энтерококки	Стафилококки
1 день						
Сip	8,4 ± 0,3	7,4 ± 0,6	7,4 ± 0,5	2,3 ± 0,1	3,2 ± 0,2	5,6 ± 0,5
Сip+AK-2R	9,3 ± 0,7	7,8 ± 0,5	7,0 ± 0,3	3,0 ± 0,2	4,1 ± 0,3	5,2 ± 0,4
Сip+AK-2R ИМ	8,7 ± 0,6	7,6 ± 0,4	6,9 ± 0,3	2,1 ± 0,1	3,4 ± 0,3	4,9 ± 0,4
Сip+AK-2	8,5 ± 0,3	7,0 ± 0,3	7,5 ± 0,5	2,0 ± 0,3	3,0 ± 0,1	4,7 ± 0,5
Сip+AK-2 ИМ	8,0 ± 0,3	6,8 ± 0,3	6,9 ± 0,5	1,3 ± 0,2	2,1 ± 0,1	3,9 ± 0,4
5 день						
Сip	6,4 ± 0,5	5,3 ± 0,4	5,2 ± 0,6	4,3 ± 0,2	3,2 ± 0,3	4,0 ± 0,4
Сip+AK-2R	7,4 ± 0,4	5,8 ± 0,3	6,2 ± 0,4	3,9 ± 0,2	3,6 ± 0,2	5,5 ± 0,4
Сip+AK-2R ИМ	8,5 ± 0,4	6,7 ± 0,3	7,0 ± 0,4	3,2 ± 0,1	3,7 ± 0,2	5,2 ± 0,3
Сip+AK-2	6,8 ± 0,7	5,6 ± 0,4	5,8 ± 0,4	4,0 ± 0,3	3,8 ± 0,3	5,6 ± 0,4
Сip+AK-2 ИМ	7,2 ± 0,3	6,8 ± 0,3	6,9 ± 0,5	3,1 ± 0,3	4,0 ± 0,1	5,1 ± 0,5
12 день						
Сip	5,2 ± 0,3	4,2 ± 0,3	5,0 ± 0,4	5,4 ± 0,3	5,2 ± 0,1	6,5 ± 0,3
Сip+AK-2R	8,5 ± 0,3	6,7 ± 0,2	7,0 ± 0,3	3,2 ± 0,1	3,4 ± 0,2	5,0 ± 0,3
Сip+AK-2R ИМ	9,0 ± 0,4	7,5 ± 0,4	7,8 ± 0,2	2,8 ± 0,4	3,5 ± 0,3	4,2 ± 0,2
Сip+AK-2	6,3 ± 0,4	5,8 ± 0,2	6,2 ± 0,5	4,5 ± 0,2	3,4 ± 0,2	5,3 ± 0,1
Сip+AK-2 ИМ	6,9 ± 0,3	6,4 ± 0,3	7,5 ± 0,5	3,0 ± 0,3	3,6 ± 0,1	4,7 ± 0,5

Примечание. Сip-ципрофлоксацин; AK-2R -резистентный к ципрофлоксацину штамм, производный от *L.fermentum* AK-2; ИМ – штамм, иммобилизованный на активированном угле.

к нему лактобактерий показало, что такой прием позволяет добиться снижения степени контаминации толстого кишечника энтеробактериями или даже препятствует ей при пероральном введении экспериментальным животным этого антибиотика в дозах, близких к терапевтическим. Популяционный уровень бифидобактерий и лактобактерий не снижается, поэтому совместное применение антибиотиков и устойчивых к ним лактобактерий позволяет не допустить развития антибиотикоопосредованного дисбактериоза.

Использование иммобилизованных клеток лактобактерий приводит к повышению эффективности данного процесса. Это может быть связано с тем, что интенсивное развитие внесенных на носителе пробиотических штаммов, протекающее по типу репродуктивных циклов, обеспечивает ускоренное заселение кишечника вводимыми лактобациллами и ускоряет отклик макроорганизма [8, 9]. Кроме того, что иммобилизованный препарат активно колонизирует слизистую оболочку кишечника за счет создания высокой локальной концентрации бактерий, он еще и обладает лучшей сохранностью при прохождении по желудочно-кишечному тракту [10].

Таким образом, большая эффективность иммобилизованных лактобактерий подтверждена и в экспериментах по их использованию как средства профилактики химиотерапевтических дисбактериозов кишечника.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Бондаренко В.М., Шахмарданов М.З.* Шигеллез: теория и практика. М., 2002. С. 170-172.
2. *Михайлова Т.Л., Калининская Т.Ю., Румянцев В.Г.* Биопрепараты и пищевые добавки в коррекции дисбактериоза // Рос. журн. гастроэнтерол, гепатол, колопроктол. 1999. Т.9, № 3. С.67-70.
3. *Rolfe R.D.* The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health // J.Nutr. 2000. Vol. 130. P.396-402.

4. *Серов В.Н., Ильенко Л.Н., Суджан Е.В., Бондаренко В.М.* Лечение и профилактика дисбактериоза кишечника бифидумпрепаратами // Новые лекарственные препараты. 1996. № 1. С.3-9.

5. *Сидоренко С.В.* Ципрофлоксацин в лечении кишечных инфекций бактериальной этиологии // Антибиотики и химиотерапия. 1997. № 6. С.26-33.

6. *Пинегин Б.В., Коршунов В.М., Гладько И.А., Иванова Н.П., Гончарова Г.И.* Совместное использование антибиотиков и антибиотикоустойчивых бифидобактерий при лечении острых кишечных инфекций // ЖМЭИ. 1983. №5. С.28-32.

7. *Бондаренко В.М., Грачева Н.М., Мацулевич Т.В.* Дисбактериозы кишечника у взрослых. КМК Scientific Press: М., 2003. 220 с.

8. *Григорьев А.В., Бондаренко В.М., Абрамов Н.А. и др.* Разработка и клиническая оценка пробиотика «Бифидумбактерин форте» // Журн. микробиол. 1997. № 3. С. 92-95.

9. *Феклисова Л.В., Григорьев А.З., Новохионова В.Л. и др.* Биологический препарат Бифидумбактерин форте для лечения и коррекции биоценоза кишечника у детей и взрослых // Сб. научных трудов МНИИЭМ им. Габричевского. 1998. С.123-126.

10. *Бондаренко В.М.* Актуальные вопросы бифидопробиотики и терапии // Новые лекарственные препараты. 1995. № 10. С.9-11.

Резюме

Тәжірибелік дисбактериоз үлгісінде ішек микрофлорасы жағдайының кешенді бағалануы жүргізілді. Белсенді көмірдегі иммобилиденген пробиотиктер ішектегі микроэкологиялық тепе-теңдікті тиімді қалпына келтіреді. Тәжірибелік жануарларда ципрофлоксацинді және оған тұрақты лактобацилла штамдарына сәйкес енгізу кезінде ішек дисбактериозының алдын алу мүмкіндігі бекітіледі.

Summary

On model of an experimental dysbacteriosis the complex estimation of a condition of intestinal microflora is lead. Immobilized the activated corner probiotics effectively restore microecological balance of intestines. The opportunity of preventive maintenance of a dysbacteriosis of intestines at experimental animals is established at joint introduction ciprofloxacin and steady against it of strains of lactobacilli.