

УДК 616.34-008.87:615.015.4

ИЗМЕНЕНИЕ СОСТАВА ПРИСТЕНОЧНОЙ МИКРОФЛОРЫ КАК ПОКАЗАТЕЛЬ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ЛЕЧЕБНЫХ ПРЕПАРАТОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ДИСБИОЗЕ**Гатаулшин А.Г., Блинкова* Л.П., Михайлова НА., Елкина СИ., Гайдеров А.А., Калина Н.Г., Горобец О.Б.
НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАМН, Москва, Россия*****Блинкова Лариса Петровна, b.larus@mail.ru**

В настоящее время основные принципы антибиотикотерапии (раннее применение препаратов широкого спектра и их длительное применение) подвергаются пересмотру в связи с негативным (дисбиотическим) воздействием антибактериальных препаратов на аутохтонную микрофлору человека, ответственную за колонизационную резистентность кишечника (бифидо- и лактобактерии). Одним из экспериментальных методов создания дисбиоза является селективная деколонизация [1, 2]. При этом избирательно подавляется рост условно патогенных аэробных микроорганизмов, играющих главную роль в появлении эндогенных инфекций ЖКТ, но сохраняющих беспоровую анаэробную бифидо- и лактомикрофлору [3, 4]. С этой целью используют две группы селективно деконтаминирующих антибиотиков, наиболее активных в отношении условно патогенных грамотрицательных бактерий:

1. аминогликозиды как мало адсорбируемые в кишечнике (0 - 2% связывания с белками, период полувыведения из организма 2 - 2,5 часа);
2. фторхинолоны - ципрофлоксацин, ломефлоксацин (40% связывания с белками, период полувыведения из организма 3-7 часов).

Данная экспериментальная модель позволяет получить необходимую информацию по оценке эффективности пробиотических препаратов для коррекции дисбиозов.

Материалы и методы

Изучение действия цифрана, аналога препарата «Бактиспорин» и БАД «Спирулина ВЭЛ» на пристеночную индигенную микрофлору проводили на беспородных белых мышах массой 12-14 г. Для исследования на микрофлору асептически брали 2 дотированных участка толстой кишки (10 мм), освобожденных от фекалий. Биоптат помещали в 4,5 мл холодного сывороточного бульона. С целью суспендирования микробов взятый образец выдерживали в холодильнике 1 час. Высевы осуществляли, используя сывороточный или кровяной агар, а также различные дифференциально-диагностические среды, позволяющие проводить диагностику микроорганизма до рода. При необходимости проводили дополнительное определение физиолого-биохимических свойств.

Цифран (из группы фторхинолонов) вводили перорально в количестве 1,5 мг/мышь в объеме 0,5 мл в течение 5 дней. *V.subtilis* вводили мышам перорально в дозах 500 млн и 1 млрд в объеме 0,5 мл в течение 3-х дней. «Спирулину ВЭЛ» вводили в дозах 1 и 10 мг в объеме 0,5 мл. Для каждой экспериментальной группы в 3-х экспериментах использованы по 30 мышей.

Контролем служили интактные мыши. Статистическую обработку результатов проводили, определяя среднее арифметическое (\bar{X}) и его ошибку (m) [5].

Результаты и обсуждение

При изучении содержания пристеночной микрофлоры в толстой кишке беспородных белых мышей были получены следующие результаты.

Как видно из таблицы 1, общее количество пристеночных микроорганизмов в биоптатах толстой кишки, помещавшихся в обогащенную белками среду, в пересчете на 1 см кишки, при введении препаратов составляло 3 - 6 x 10⁹ КОЕ/мл, за исключением группы мышей, получивших 1 мг спирулины. Аналогичное стимулирующее воздействие биомассы или культуральной жидкости спирулины в отношении некоторых микроорганизмов было выявлено нами ранее в опытах *in vitro* [6, 7].

Соотношение *lac*⁺ и *lac*⁻ энтеробактерий в образцах колебалось в зависимости от введенного препарата. Так, под действием цифрана произошло 22-кратное снижение количества *lac*⁻ энтеробактерий по сравнению с контролем. В то же время количество *lac*⁺ бактерий уменьшилось только в 2 раза. Необходимо заметить, что соотношение *lac*⁺ и *lac*⁻ бактерий в кишечнике интактных мышей было 1:2,5. Под действием цифрана оно стало 4:1.

B.subtilis в дозе 500x10⁶ клеток/мышь выравнивал их количественно, а в дозе 1x10⁹ клеток соотношение стало как при введении цифрана (5:1).

Спирулина в количестве 1 мг вызвала существенное количественное изменение микроорганизмов. Численность *lac*⁺ и *lac*⁻ микроорганизмов составила 10:1. Однако увеличение дозы спирулины резко снизило уровень *lac*⁺ энтеробактерий (более чем в 200 раз). Аналогичное влияние таких же доз комплекса метаболитов спирулины было также выявлено *in vitro* в отношении *E.coli*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* [6].

Интересные данные получены для *Pseudomonas* и *Enterococcus*. Например, в толстой кишке при введении мышам цифрана и *B.subtilis* обнаружен *Pseudomonas*, соответственно на уровне 10³ и 10⁴, при отсутствии этого микроба в контроле. В тех же группах наблюдалось увеличение энтерококков до уровня 10²-10³. Количество клеток *Candida* выявлено только в контроле (0,8x10² КОЕ/мл).

Изучение количества стафилококковой микрофлоры выявило разницу в воздействии препаратов на *S.aureus* и другие *Staphylococcus spp.* Наибольшая численность стафилококков отмечена у мышей в контрольной группе.

Под действием цифрана соотношение *Staphylococcus aureus* : *Staphylococcus spp* в контроле (7:1) изменилось до 1:6. *B.subtilis* в дозе 500x 10⁶ клеток/мышь, не вызывая снижения количества *S.aureus* по сравнению с контролем, почти на 1 порядок (8,3 раза) уменьшил уровень других стафилококков (соотношение видов стафилококков при этом стало 1:6). Увеличение введенной дозы *B.subtilis* до 1 млрд резко снизило численность всех стафилококков. Колоний *S.aureus* не выявлено, а КОЕ/мл других стафилококков снизилось в 6,25 раза, составляя соотношение (0:80). Прием спирулины (доза 1 и 10 мг/мл) несколько увеличил численность золотистого стафилококка по сравнению с контролем (10:1 и 7:1, соответственно).

Необходимо отметить, что уровень лактобактерий отмечен в пределах 10⁴ КОЕ/мл, а бифидобактерий - в пределах 10² -10³ КОЕ/мл.

По-видимому, для проведения коррекции микрофлоры при дисбиозе кишечника следует учитывать особенности действия введенного препарата не только на конкретный микроорганизм, но и на его соотношение с другой микрофлорой, в том числе, того же рода.

Литература

1. Van der Waaij D., Verhoef J. (ed). New criteria for antimicrobial therapy: maintenance of digestive tract colonization resistance. Excerpta Medica. Amsterdam-Oxford, 1979, p. 43-53.
2. Van der Waaij D. Colonization resistance of the digestive tract mechanism and clinical consequences. Die Nahrung, 1987, 31: 507-517.
3. Edhmd C, Nord C.E. Effect of quinolones on intestinal ecology. Drugs, 1999, 58(2), 65-70.

4. Edhmd C, Beyer G., Hiemer-Bau M., Ziege S., Lode H., Nord C.E. Comparative effects of moxif oxacin and clarithromycin on normal intestinal microflora. Scand. J. Infect. Dis., 2000, 32(1)^ 81-85.

5. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. М., Медгиз, 1962. 179 с.

6. Горобец О.Б. Изучение пищевых добавок из водорослей в питательных средах. Автореф. канд. мед. наук М, 2000, 24 с.

7. Блинкова Л.П., Горобец О.Б., Батуро АП. Биологическая активность спирулины. Ж. микробиол. 2001, 2:114-118.

Реферат

ИЗМЕНЕНИЕ СОСТАВА ПРИСТЕНОЧНОЙ МИКРОФЛОРЫ КАК ПОКАЗАТЕЛЬ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ЛЕЧЕБНЫХ ПРЕПАРАТОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ДИСБИОЗЕ

В работе приведены результаты изучения влияния спирулины и ципрофлоксацина на размножение микроорганизмов. Показано, что спирулина в количестве 1 мг вызвала существенное количественное изменение микроорганизмов. Численность lac⁺ и lac⁻ микроорганизмов составила 10:1. Однако увеличение дозы спирулины резко снизило уровень lac⁺ энтеробактерий (более чем в 200 раз). Аналогичное влияние таких же доз комплекса метаболитов спирулины было также выявлено *in vitro* в отношении *E.coli*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*. Для проведения коррекции микрофлоры при дисбиозе кишечника следует учитывать особенности действия введенного препарата не только на конкретный микроорганизм, но и на его соотношение с другой микрофлорой, в том числе, того же рода.

CHANGE OF COMPOSITION OF THE MICROFLORA AS THE EFFICIENCY FACTOR OF APPLICATION OF MEDICAL DRUGS AT EXPERIMENTAL DISBIOSIS

In article results of studying of spirulina influence and ciprofloxacin on a breeding of microorganisms are resulted. It is shown, that spirulina in quantity of 1 mg has caused an essential quantitative change of microorganisms. Number lac⁺ and lac⁻ microorganisms has compounded 10:1. However the augmentation of a spirulina dose has sharply reduced a level lac⁺ enterobacteria (more than in 200 times). Similar influence of the same doses of a complex of spirulina metabolites also has been taped *in vitro* concerning *E.coli*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*. For carrying out of correction of a microflora at disbiosis an intestine it is necessary to consider features of action of the injected drug not only on a concrete microorganism, but also on its interrelation with other microflora, including, the same sort.

Таблица 1. Характеристика пристеночной микрофлоры через 3 дня после введения препарат

Группа мышей	Введенный препарат	Количество микроорганизмов (КОЕ/мл с 1 см толстой кишки, $X \pm t$)								
		Общее количество бактерий на сывороточном	Энтеро-бактерии lac+lac-	Pseudo-monas	Enterococcus	Staphylococcus (S.aureus/S.spp)	Candida	Bifidobacterium	Lactobacillus	Неидентифицированные микроорганизмы
1	Цифран 1,5 мг х 5 дней	(6,4 ±0,96) x 10 ⁹	(0,8 ±0,11) x10 ⁶ / (0,18±0,023) x10 ⁶	(1,56 ± 0,21) x 10 ³	(0,1 ± 0,011) x 10 ²	(3±0,41) x10 ² / (1,8± 0,23) x10 ³	< 1 x 10	102	(2,4±0,33) x10 ⁴	+
2	B.subtilis 5xЮ6 клеток/ 0,5 мл, 3дня	(3,2 ±0,44) x10 ⁹	(1,6 ±0,24) xЮ6/ (1,4 ±0,19) x 10 ⁶	(1,04 ± 0,11) x 10 ⁴	(0,1 ± 0,012) x10 ²	(3,7 ±0,54) x10 ² / (0,6 ±0,084) x10 ²	< 1 x10	101 -102	(1±0,11) x10 ⁴	+
3	B.subtilis 5xЮ9 клеток/ 0,5 мл, 3дня	(4,8 ±0,72) x10 ⁹	(2,4 ±0,31) xЮ6/ (0,52 ± 0,07) x10 ⁶	(2,24 ± 0,35) xЮ ⁴	(5,8 ±0,87) x10 ³	< 1 x 10 ⁷ (0,8±0,098) x10 ²	< 1 x 10	101 -102	(0,8 ±0,1) x10 ⁴	+
4	Спирулина ВЭЛ 1 мг/0,5 мл	a ±0,i3) xЮ9~ 0±0,1) *10 ¹⁰	(4,2 ±0,70) xЮ6/ (0,45 ± 0,06) x10 ⁶	< 1 x 10	< 1 x 10	(2,5 ±0,37) x10 ² / (0,24 ±0,031) x10 ²	< 1 x 10	102	0,2 ±0,12) x10 ⁴	+
5	Спирулина ВЭЛ 10 мг/0,5 мл	(4,9 ±0,75) x10 ⁹	(1,8 ±0,25) xЮ4/ (4,8 ±0,73) x10 ⁶	< 1 x 10	< 1 x 10	(3,5 ±0,50) x10 ² / (0,3 ± 0,042) x10 ²	< 1 x 10	101	0±0,11) x10 ⁴	+
6	Контроль (без препарата)	(3,0 ±0,40) x10 ⁹	(1,6 ±0,23) xЮ6/ (4,0 ±0,65) x10 ⁶	< 1 x 10	< 1 x 10	(3,5 ±0,52) x10 ³ / (5 ±0,75) x 10 ²	(0,8 ±0,12) x10 ²	102 -103	(1 ± 0,14) x10 ⁴	+