

# **ТЕОРИТИЧЕСКАЯ И ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ ПО ИЗУЧЕНИЮ АДДИТИВНОГО ЭФФЕКТА ПРИМЕНЕНИЯ АНТИБИОТИКОВ И ПРОБИОТИКОВ**

**Володченко В.Ф., Тимофеева А.А., Сизенцов А.Н.  
ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет»,  
г. Оренбург**

Нормальная микрофлора человека представлена разнообразными микроорганизмами, которые заселяют различные отделы желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), обитают в ротовой полости, носоглотке, мочеполовых путях, на кожных покровах. Все микроорганизмы находятся в состоянии динамического равновесия друг с другом и с макроорганизмом. Организм человека обеспечивает микрофлору питательными веществами, необходимыми для ее жизнедеятельности, а микрофлора синтезирует биологически активные вещества, которые не образуются в организме человека, и защищает его от внедрения патогенных микроорганизмов.

Такое явление как нарушение подвижного равновесия микрофлоры, в норме заселяющей нестерильные полости и кожные покровы человека, носит название дисбактериоз. При дисбактериозе нормальная микрофлора не подавляет активность патогенных и гнилостных микроорганизмов; нарушаются процессы пищеварения и усвоения питательных веществ, перистальтика кишечника; ухудшается синтез витаминов; снижается иммунитет. Причины дисбактериоза разнообразны: нарушение рациона питания, длительное применение лекарственных средств (противомикробных и других), лучевая и химиотерапия, попадание в организм токсинов из окружающей среды (свинец, кадмий, ртуть и другие), стрессовые состояния, кишечные инфекции, оперативные вмешательства, заболевания ЖКТ и другие. Нарушение равновесия микрофлоры, возникшее в ротовой полости, кишечнике, половых и мочевыводящих органах, на коже проявляются соответствующими симптомами. Напротив, дисбактериоз приводит к заболеваниям ЖКТ, ротовой полости, урогенитального тракта, аллергическим болезням, повышает риск развития злокачественных новообразований [1].

Почти 80 % клеток, производящих антитела, находятся в стенке кишечника. Это идеальное место, так как большая часть возбудителей болезней попадает в организм через желудочно-кишечный тракт с пищей. Половина возбудителей болезней уничтожается в желудке, остальные проникают в тонкий кишечник с множеством лимфофоликул прямо под слизистой. Эти скопления клеток поглощают чужеродные, опасные для организма инфекционные вещества (антигены). С помощью этих антигенов они побуждают различные белые кровяные тельца нашей иммунной системы к активации, благодаря этому и возникает неспецифические и специфические защитные иммунные реакции [2].

С тех пор, как было открыто свойство различных микробных культур подавлять рост других микроорганизмов и особенно патогенных, виднейшие

естествоиспытатели работали над проблемой практического использования явления антагонизма микробов (Л. Пастер, И. И. Мечников, Н. Ф. Гамалея и другие). Широкое признание и отражение в трудах многих биологов и врачей нашли идеи И. И. Мечникова, предложившего использовать для борьбы с инфекцией, преждевременным старением и другими недугами штаммы живых микробов-антагонистов. На современном этапе, в области медицинской микробиологии, такую целенаправленную коррекцию нарушенных биохимических и физиологических процессов за счет введения нужных бактерий-сапрофитов, продуцирующих биологически активные вещества (БАВ), предлагается назвать «микробной сапрофитной фармакотерапией».

В настоящее время большое внимание уделяется изучению механизмов действия штаммов микроорганизмов, входящих в состав пробиотических препаратов. К таким микроорганизмам относятся симбионты кишечного тракта: лактобациллы, бифидобактерии и нерезидентные сапрофиты, в том числе спорообразующие бациллы [3].

Пробиотики – это живые микроорганизмы и вещества микробного происхождения, оказывающие при естественном пути введения положительный эффект через регуляцию микрофлоры кишечника [4].

Пробиотики по своему составу являются гетерогенной группой лекарственных средств. При их классификации учитывается видовая принадлежность и количество штаммов содержащихся бактерий.

По составу выделяют следующие группы пробиотиков:

а) монопробиотики – препараты, содержащие микроорганизмы одного вида и штамма. В свою очередь они подразделяются на бифидосодержащие, колисодержащие, лактосодержащие, бациллярные и сахаромицетосодержащие препараты;

б) полипробиотики содержат бактерии одного вида, но разных штаммов. По составу они могут быть бифидосодержащими, лактосодержащими и бациллярными;

в) комбинированные пробиотики содержат микроорганизмы разных видов. Они представляют собой сочетания бифидо- и лактобактерий, бифидобактерий и апатогенных штаммов *E. coli*, бифидобактерий, лактобактерий и апатогенных энтерококков [5].

Лечебно-профилактические свойства пробиотических препаратов обусловлены высокой концентрацией бактерий, играющих существенную роль в нормализации белкового, липидного и минерального обмена организма за счет продукции большого количества различных ферментов, в том числе внеклеточных и клеточно-связанных протеиназ, полисахаридов, гликопротеинов и других биологически активных соединений. Механизмы действия пробиотиков включают поддержание колонизационной резистентности, подавление роста патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, а также регуляцию иммунной системы ЖКТ [6].

Пробиотики – это живые микроорганизмы и вещества микробного происхождения, оказывающие при естественном пути введения положительный эффект через регуляцию микрофлоры кишечника.

Чтобы быть включенными в группу пробиотиков микроорганизмы должны соответствовать следующим критериям:

а) выживать при пассаже через желудочный тракт, что предполагает их резистентность к кислоте и желчи;

б) адгезироваться на эпителиальных клетках кишечника с последующей колонизацией;

в) стабилизировать кишечную микрофлору;

г) не иметь признаков патогенности;

д) сохранять жизнеспособность, как в пищевых продуктах, так и в процессе получения фармакопейных лиофилизированных препаратов;

е) быстро размножаться, колонизируя кишечный тракт;

ж) персистировать с проявлением родовых свойств пробиотиков;

з) при совместном использовании с антибактериальными средствами в лечении кишечных инфекций или для профилактики вызванной антибиотиками диареи микроорганизмы должны обладать устойчивостью к антибиотикам.

Указанным критериям в наибольшей степени соответствует автохтонная группа содружественных микроорганизмов, включающая таких постоянных обитателей кишечной экосистемы, как лакто- и бифидобактерии, кишечная палочка [7, 8].

Современным представлением механизма положительного действия пробиотиков является их многогранность, ассоциированная с подавлением патогенных и условно-патогенных микроорганизмов за счет продукции биологически активных веществ, конкуренции за лимитируемые нутриенты и сайты адгезии на кишечной стенке, влияния на ферментативную активность желудочно-кишечного тракта и стимуляции иммунной системы организма хозяина [5].

Антагонистическое действие пробиотических бактерий связано с продукцией органических кислот, бактериоцинов и ингибиторных протеинов, в том числе термолабильных и термостабильных высоко- и низкомолекулярных антибактериальных субстанций и антибиотиков. Органические кислоты являются конечными продуктами метаболизма, которые экскретируются в окружающую среду. Это молочная, уксусная, масляная, пропионовая, изомасляная, изовалериановая, муравьиная, сукциниловая, янтарная и другие кислоты [32].

Среди биопрепаратов важное место занимает использование пробиотиков на основе бактерий рода *Bacillus*, обладающих антимикробной активностью. Бактерии рода *Bacillus* проявляют разнообразную антимикробную активность, связанную, в первую очередь, с продукцией почти 200 антибиотиков [9]. Наиболее известными их продуцентами являются *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. polymyxa*, *B. circulans*, *B. laterosporus*, *B. cereus*, *B. brevis* и другие. Продуцируемые антибиотики – это полимиксины, бацитрацин,

тиротрициновый комплекс, грамицидин С, субтилин, эдеин, микробациллин и другие. В связи с токсичностью лишь часть из них допущена к применению в клинике. Вторую обширную группу антагонистически активных веществ составляют бактериоцины.

Бактерии рода *Bacillus* продуцируют антибиотики с различным механизмом антибактериального действия. Их условно можно разделить на 4 основных класса:

а) циклические олигопептиды, такие как бацитрацин, ингибирующие синтез клеточной стенки;

б) линейные или циклические олигопептиды, такие как грамицидин и полимиксин, действующие на мембранные функции;

в) основные пептиды, такие как эдеины, ингибирующие образование комплекса инициации на малой субъединице рибосом;

г) аминоглюкозидные антибиотики – бутирозин, действующие на функцию рибосом. Последний вызывает особый интерес, поскольку он является первым антибиотиком аминоглюкозидной природы, продуцируемый микроорганизмами порядка *Eubacteriales*. Бутирозин отличается широким спектром антибактериального действия и малой токсичностью, что создает перспективу для его использования. Большой интерес вызывают исследования, посвященные изучению спектра и механизмов антибиотического действия бациллярных антибиотиков на клетки микроорганизмов и формированию устойчивости к ним. В них большое внимание отводится структуре антибиотика. Например, входящий в состав биоспорина штамм *B. subtilis* 3 одновременно образует два пептида с молекулярной массой от 400 до 600 и от 1500 до 1800 дальтон, спектры антибиотического действия которых существенно различаются между собой. Благодаря тому, что эти пептиды сходны по базовой структуре, но отличаются по концевым группировкам, антибиотическое действие их оказывается разнообразным, а формирование устойчивых вариантов замедленным [10].

При попадании бактерий в ЖКТ они живут в нём не более 30 дней, после чего выводятся естественным путём. В желудке бактерии этого вида не погибают, поскольку в споровом виде обладают высокой устойчивостью к воздействию желудочного сока. Во рту, тонком и толстом отделе кишечника они трансформируются в вегетативную форму, размножаются и продуцируют в окружающую среду биологически активные вещества, под воздействием которых подавляется рост и развитие гнилостной, патогенной и условно-патогенной микрофлоры, восстанавливается численность популяций лакто- и бифидобактерий, кишечной палочки и других микроорганизмов, составляющих нормофлору ЖКТ и обеспечивающих его оптимальное функционирование. Способность подавлять рост и развитие сторонней для ЖКТ микрофлоры бактерии этих видов реализуют преимущественно за счёт способности нарабатывать полиеновые антибиотики – бацитрацины и лихениформины. Подавление реализуется путем прямого антагонизма относительно инфекционных агентов и опосредованно через оптимизацию

функционирования иммунитета человека и животных. Зарегистрировано наличие прямого антагонизма относительно большей части представителей инфекционных микроорганизмов человека и животных: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella sp.*, *Salmonella eholeraesuis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Candida albicans*, *Klebsiella pneumonia*, *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella sonnei*, *Enterobacter agglomerans* [11].

Кроме прямого антагонизма относительно патогенной, условно-патогенной и гнилостной микрофлоры бактерии *B. subtilis* и *B. licheniformis* обладают способностью оптимизировать функции иммунной системы человека и животных. Этот эффект реализуется в результате их взаимодействия с микробным сообществом в ЖКТ, иммунными органеллами в тонком отделе ЖКТ и иммунными клетками в крови человека и животных. Нами установлено, что в споровом виде микроорганизмы этих видов способны проникать через стенки ЖКТ и попадать в кровоток. Опыты, выполненные на животных, говорят о том, что при непосредственном введении указанных выше штаммов внутривенно реализуется мощный иммунный отклик, стимулируется функциональная активность гуморального и клеточного звена иммунитета. При этом температура тела животного остаётся неизменной.

Кроме того, бактерии *B. subtilis* и *B. licheniformis* являются природными индукторами интерферонов, то есть активно стимулируют в организме образование собственных эндогенных интерферонов ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - и других типов). Этот путь более естественен, чем введение искусственных интерферонов любым способом, и соответствует природному. Например, на попадание вирусов здоровый организм отвечает образованием интерферонов и как бы запрещает последующее развитие инфекции. Способ введения интерферона и стимуляции выработки эндогенных интерферонов, основанный на введении в организм указанных выше микроорганизмов, позволяет обеспечить пролонгированное воздействие на организм интерферонов и, как следствие, добиться положительного эффекта при лечении и профилактике широкого спектра различных болезней [12, 13].

В наших экспериментах в качестве объектов исследования использовались чистые культуры микроорганизмов: *Bacillus subtilis* 534 (из биопрепарата «Спوروبактерин»), *Bacillus cereus* IP 5832 (из биопрепарата «Бактисубтил»), а также были получены отдельные чистые культуры *Bacillus subtilis* 3 и *Bacillus licheniformis* 31, входящие в состав «Биоспорин».

Для оценки эффективности применения пробиотических препаратов в комплексе с антибиотиками нами был проведен эксперимент на модели животных. Эксперимент выполнялся с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации и в соответствии с требованиями правил проведения работ с использованием экспериментальных животных. В качестве биологического тест-объекта использовали белых половозрелых крыс массой от 180 до 200 грамм. Длительность эксперимента составила 10 дней. В

соответствии с поставленными задачами животные разбивались на 14 групп [14].

Были сформированы контрольные группы:

- общий контроль, где был обычный рацион и условия содержания;
- группа, в которой оценивали действие пробиотиков (биоспорин, в состав которого входят (*B. subtilis*+*B. licheniformis*), споробактерин (*B. subtilis*), бактисубтилл (*B. cereus*) на лабораторных крыс;
- группа, в которой оценивали действие лабораторной инфекции на организм животных без проведения лечения.

В опытных группах сравнивалась эффективность лечения инфекции антибиотиками, а также комплексное использование антибиотиков и пробиотиков.

Убой животных проводился в количестве трех голов на каждой точке исследований для определения эффективности применения исследуемых препаратов. В качестве точек исследования были установлены следующие сроки: фоновое исследование перед применением препаратов, на пятый и на десятый день после начала эксперимента. Заражение лабораторных животных проводилось однократно перорально по 0,2 мл смыва суточной агаровой культуры возбудителя сальмонеллеза *Salmonella enteritidis*, содержащей  $1,5 \cdot 10^6$  микробных тел. Введение пробиотиков и антибиотиков проводилось в соответствии с анатацией к препарату. Введение препаратов в опытных группах проводилось через 12 часов с момента заражения, утром задавались антибиотики, вечером пробиотики.

От исследуемых лабораторных животных брались кровь на биохимический, морфологический анализ и определение лизоцимной и бета-литической активности [15]; экскременты для выделения бацилл и сальмонелл, органы-мишени (кишечник и селезенка) на гистологическое исследование [14].

В наших исследованиях в качестве объектов для изучения были выбраны штаммы бактерий, входящих в состав пробиотических препаратов «Споробактерин», «Бактисубтил», «Биоспорин».

Проведенные исследования позволили сделать следующие выводы:

1) установлена родовая устойчивость бактерий рода *Bacillus* к цефтазидиму, азтреонаму, колистину и видовая устойчивость *B. cereus* к пенициллину, *B. subtilis* 534 к хлорамфениколу; *B. licheniformis* 31 и *B. subtilis* 3 к цефотаксиму.

2) в отношении сальмонеллезной инфекции оказалось эффективным совместное применение *B. subtilis* 534 с пенициллином, а также *B. licheniformis* 31 и *B. subtilis* 3 с цефотаксимом, по отношению к *S. aureus*, *B. cereus* с пенициллином;

4) установлено, что на основании подсчета КОЕ *Salmonella enteritidis* при исследовании экскрементов от экспериментальных животных установлено, что наиболее эффективным является совместное применения биоспорина с цефотаксимом;

5) на основании исследования морфологических и гематологических показателей крови было установлено, что комплексное применение антибиотиков и пробиотиков при лечении кишечной инфекции, вызванной *Salmonella enteritidis*, является эффективным, так как во всех опытных группах исследуемые показатели к десятому дню имеют значения в пределах нормы в отличие от контрольной группы заражения;

6) установлено стимулирующее действие исследуемых пробиотических штаммов на  $\beta$ -литическую и лизоцимную активность сыворотки крови;

7) на основании гистологического исследования органов мишеней установлено, что применение пробиотиков при лечении кишечной инфекции вызванной *Salmonella enteritidis* является эффективным, так как предотвращает развитие патологических изменений.

#### Список литературы

1. Jin, L. Z. Probiotics in poultry: modes of action / L. Z. Jin, Y. W. Ho, N. Abdullah, S. Jalaludin // *Worlds Poultry Sc.* – 2003. – V. 53 – P. 351-367.

2. Mohan, B. Effect of probiotic supplementation on growth, nitrogen utilization and serum cholesterol in broilers / B. Mohan // *British Poultry Science.* – 2001. – V. 3. – P. 396-401.

3. Мелентьев, А. И. Применение бацилл-антагонистов против грибов, разрушающих сырую древесину / А. И. Мелентьев, П. Хелисто, Л. Ю. Кузьмина, Н. Ф. Галимзянова, Г. Э. Актуганов, Т. Корпела // *Микробиология.* – 2006. – № 1. – С. 70-75.

4. Бондаренко, В. М. Микрoэкологические изменения кишечника и их коррекция с помощью лечебно-профилактических препаратов / В. М. Бондаренко, Н. М. Грачева, Т. В. Мацулевич, А. А. Воробьев // *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колонопроктологии.* – 2003. – № 20. – С. 66-76.

5. Бондаренко, В. М. Дисбиозы и препараты с пробиотической функцией / В. М. Бондаренко, А. А. Воробьев // *Микробиология.* – 2004. – № 1. – С. 84-92.

6. Шендеров, Б. А. Медико-физиологическое обоснование создания композиций синбиотиков для различных возрастных групп населения / Б. А. Шендеров // *Материалы научно-практической конференции «Новые пробиотические препараты в комплексной терапии больных с дисбактериозом кишечника».* – Москва. – 2003. – С.6-8.

7. Gibson, G. R. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics / G. R. Gibson, M. B. Roberfroid // *Clinical Nutrition.* – 2000. – V. 125. – № 4 – P. 1401-1412.

8. Fuller, R. Probiotics and prebiotics: microflora management for improved gut health / R. Fuller, G. R. Gibson // *Clinical Microbiology and Infection.* – 1998. – V. 4. – P. 477-480.

9. Collins, M. D. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut / M. D. Collins, G. R. Gibson // *Clinical Nutrition*. – 1999. – V. 69. – № 5. – P. 1052-1057.
10. Осипова, И. Г. Споровые пробиотики / И. Г. Осипова, Н. А. Михайлова, И. Б. Сорокулова, Е. А. Васильева, А. А. Гайдеров // *Журнал микробиология*. – 2003. – № 3. – С. 113-119.
11. Новик, Г. И. Биологическая активность микроорганизмов-пробиотиков / Г. И. Мелентьев, А. А. Самарцев, Н. И. Астапович, М. А. Каврус, А. Н. Михалюк // *Микробиология*. – 2006. – № 2. – С. 187-194.
12. Jin, L. Z. Influence of dried *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus* cultures on intestinal microflora and performance in broilers / L. Z. Jin, Y. W. Ho // *Asian-Australasian Journal of Animal Science*. – 2001. – V. 9. – P. 397-404.
13. Reid, G. Probiotics to Prevent the Need For, and Augment the Use Of, Antibiotics / G. Reid // *Infectione dis Microbiologie* – 2006. – V. 17. – № 5. – P. 291-295.
14. Абрамова Л.Л. Морфологическое обоснование эффективности применения пробиотических препаратов при лечении сальмонеллеза крыс / Абрамова Л.Л., Сизенцов А.Н., Шеботина Н.В. // [Известия Оренбургского государственного аграрного университета](#). 2011. Т. 1. № 29-1. С. 192-195.
15. Абрамова Л.Л. Оценка эффективности применения пробиотических препаратов при лечении сальмонеллеза на основании исследования показателей крови / Абрамова Л.Л., Сизенцов А.Н., Шеботина Н.В. // [Известия Оренбургского государственного аграрного университета](#). 2011. Т. 2. № 30-1. С. 249-253.



