

THE PECULIARITIES OF TETRACHLORMETHANE AND SODIUM NITRITE INFLUENCE IN ALBINO RATS WITH DIFFERENT HYPOXIA RESISTANCE

K.A. Posokhova, I.Yu. Berezna, I.M. Klishch, O.M. Oleshchuk

Abstract. In experiments on albino rats with different hypoxia resistance it was determined that under the influence of CCl_4 a greater level of liver damage was higher in the animals with low hypoxia resistance. When tetrachlormethane was combined with sodium nitrite ($1/6 \text{ LD}_{50}/\text{kg}$) the 100 % death level of animals with low hypoxia resistance, 50 % - with medium resistance and survival of all and none with high resistance were observed. The administration of sodium nitrite to CCl_4 affected animals with high and medium resistance toward hypoxia causes a suppression of peroxidation processes of lipids and a considerable increase of the activity of superoxid-dismutase in the liver.

Key words: hypoxia resistance, tetrachlormethane, sodium nitrite.

I.Ya.Horbachevsky Ternopil state medical academy (Ternopil)

УДК: 615.28

І.Й.Сидорчук, Г.Д.Коваль

АНТАГОНІСТИЧНА АКТИВНІСТЬ БІФІФОРМА

Кафедра клінічної імунології, алергології
та ендокринології (зав. – проф. І.Й.Сидорчук)
Буковинської державної медичної академії

Резюме. Бактеріальний препарат біфіформ фірми Ferrosan (Данія) антагоністично активний стосовно патогенних та умовно патогенних ентеробактерій (*E.coli*, *E.coli* Нly⁺, ентеропатогенних і ентеротоксигенних ешерихій, цитробактера, клебсіел) та стафілококів. Біфіформ за сумісного культивування призводить до значного зниження популяційного рівня ентеробактерій та стафілококів. Збільшення періоду сумісного культивування антагоністів та тест-штамів призводить до пригнічення популяційного рівня тест-штамів. Біфіформ не має антифунгісстатичної активності, а в період перших 3 діб стимулює ріст та розмноження *S.albicans*.

Ключові слова: біфіформ, антагонізм, ентеробактерії, стафілококи, дріжджо-подібні гриби роду *Candida*.

Вступ. Проблема ефективного лікування дисбіотичних станів людини створює відсутність необхідних спеціалістів у державі. Нормобіоценоз – надзвичайно складна екологічна система, яку слід розглядати як своєрідний екстракорпоральний орган людини. Ось чому проблемами лікування дисбіотичних станів повинні займатися клінічний мікробіолог та клінічний імунолог, оскільки дисбіози супроводжуються порушенням факторів та механізмів неспецифічного та специфічного імунного протиінфекційного захисту [5,6].

Клінічний мікробіолог, працюючи безпосередньо з пацієнтом, повинен об'єднувати у своїй діяльності діагностичний та лікувальний процеси, у тому числі визначення не тільки мікробіологічного та імунного статусів, а також знання антагоністичної активності (антимікробної дії) пробіотики стосовно штамів

мікроорганізмів, що циркулюють у даній місцевості та мати розроблену тактику імунореабілітації хворого [3].

Основу лікування кишкового дисбактеріозу складає бактеріотерапія. Існуючі бактерійні препарати можна розділити на 5 груп:

1. Класичні монокомпонентні еубіотики: коли-, лакто- і біфідумбактерин.
2. Самоелімінуючі антагоністи – бактисубтіл, споробактерін та інші.
3. Полікомпонентні еубіотики – біфіформ, лінекс, біфілонг та ін.
4. Комбіновані еубіотики – біфідумбактерин-форте, кипацид.
5. Рекомбінантні еубіотики [1,2,4].

Особливе місце посідають полікомпонентні бактерійні препарати, серед яких, на нашу думку, важливе значення має біфіформ, що надійшов до вітчизняного ринку з вересня 1998 року. Його антагоністична активність до місцевих клінічних варіантів мікроорганізмів шлунково-кишкового тракту, які формують кишковий дисбактеріоз, не встановлена. Тому перед клінічним застосуванням необхідно вивчити антагоністичну активність препарату щодо музейних та клінічних штамів патогенних та умовно патогенних мікроорганізмів.

Мета дослідження. Вивчити вплив полікомпонентного бактерійного препарату біфіформ фірми Ferrosan (Данія) на популяційний рівень патогенних та умовно патогенних ентеробактерій, стафілококів та дріжджоподібних грибів роду *Candida*, а також встановити антагоністичну дію препарату на клінічні штамів мікроорганізмів.

Матеріал та методи. Полікомпонентний бактерійний препарат біфіформ випускається в капсулах, кожна капсула містить не менше 10^7 *Bifidobacterium longum* та *Enterococcus faecium*, що є активним компонентом бактерійного препарату. Останній містить також глюкозу, стеарат магнію, тальк і діоксид титану. На відміну від інших бактерійних препаратів капсула біфіформа не руйнується в шлунку, і починає розчинятися наприкінці клубової та товстої кишок.

Антагоністичну активність біфіформа стосовно музейних та клінічних штамів вивчали методом сумісного культивування у середовищі Блаурока. У роботі використовували однодобові культури мікроба-антагоніста, ентеробактерій, стафілококів та кандид. Бактеріологічним та мікологічним методами визначали кількість життєздатних (колонійутворювальних) клітин мікроба-антагоніста та тест-штамів у оптимальних живильних середовищах.

У пробірки (4,5мл) засівали 1,2 мільярда мікробних клітин в 1мл (1,2млрд/мл - $11,3 \pm 0,07$ Ig КУО/мл) *B. longum* та *E. faecium* і таку ж кількість тест-штаму. Через 1-7 діб сумісної інкубації із пробірок відбирали по 1мл інкубаційної суміші і виготовляли 10-кратні розведення у стерильному фізрозчині. Із всіх пробірок титраційного ряду висівали по 0,1мл на тверде живильне середовище (МПА і Сабуро) й інкубували впродовж 1-2 діб. Після відповідного періоду інкубації підраховували колонії тест-штамів. Визначали відношення кількості клітин, які дали ріст в досліді, до кількості життєздатних клітин, які дали ріст у контролі (в середовищі без мікроба-антагоніста), і виражали у відсотках. Пригнічення росту клітин тест-штаму розраховували за формулою:

$$A=100-(D \times 100/K),$$

де: D - кількість клітин тест-штаму, які дали ріст в досліді (сумісно з антагоністами);

K – кількість колоній тест-штаму, які дали ріст без антагоністів.

Результати дослідів по встановленню антимікробної активності біфіформа визначали через 24, 48, 72 і 96 год культивування, а також через 7 діб з метою виявлення періоду найбільшої антагоністичної активності антагоніста. Вивчали вплив мікроба-антагоніста на популяційний рівень, а також інгібуючу активність мікроба-антагоніста за сумісного культивування.

Результати дослідження та їх обговорення. Антагоністичну активність біфіформа визначали за впливом його на популяційний рівень тест-штамів музейних та клінічних варіантів патогенних та умовно патогенних ентеробактерій, стафілококів та дріжджоподібних грибів роду *Candida*, а також за відсотком пригнічення штамами-антагоністами росту та розмноження тест-мікробів.

Результати впливу біфіформа на популяційний рівень патогенних та умовно патогенних клінічних штамів ентеробактерій, стафілококів та кандид ілюструє таблиця 1.

Як свідчать наведені в таблиці 1 дані, вихідні показники популяційного рівня клінічних штамів мікроорганізмів, що тестувалися, були однаковими як в досліді, так і в контролі. Після сумісного культивування в середовищі Блаурока біфіформа та тест-штамів упродовж 24 год популяційний рівень стафілококів та ентеробактерій був значно нижчим популяційного рівня цих мікроорганізмів у середовищі без біфіформа.

Продовження сумісного культивування тест-штамів із мікробами-антагоністами впродовж 48 год збільшує дію антагоністів на популяційний рівень патогенних та умовно патогенних ентеробактерій (від $8,85 \pm 0,06$ до $8,97 \pm$

Таблиця 1

Вплив біфіформа на популяційний рівень патогенних та умовно патогенних ентеробактерій, стафілококів та дріжджоподібних грибів роду *Candida*

Мікроорганізми	К-ть штамів	Контроль (без бакпрепарату)	Дослід (з бакпрепаратом)	P
1	2	3	4	5
Вихідний популяційний рівень				
<i>S.aureus</i> ATC25923	1	11,17±0,02	11,22±0,02	>0,05
<i>S.aureus</i> (антибіотикорезистентні)	7	11,09±0,03	11,08±0,02	>0,05
<i>E.coli</i> K12	1	10,13±0,05	10,12±0,03	>0,05
<i>E.coli</i> Hly ⁺	3	10,10±0,05	10,09±0,03	>0,05
<i>E.coli</i> O55:K59	3	10,07±0,05	10,10±0,04	>0,05
<i>C.freundii</i>	2	10,03±0,03	10,10±0,05	>0,05
<i>K.pneumoniae</i>	3	10,09±0,04	9,95±0,05	>0,05
<i>C.albicans</i> 7	1	6,97±0,04	6,97±0,03	>0,05
<i>C.albicans</i>	5	6,93±0,05	7,00±0,05	>0,05
Через 24 год				
<i>S.aureus</i> ATC25923	1	13,15±0,09	11,08±0,04	<0,001
<i>S.aureus</i> (антибіотикорезистентні)	7	13,17±0,10	11,08±0,04	<0,001
<i>E.coli</i> K12	1	14,11±0,04	10,99±0,04	<0,001
<i>E.coli</i> Hly ⁺	3	14,03±0,05	10,89±0,05	<0,001
<i>E.coli</i> O55:K59	3	14,07±0,04	10,76±0,07	<0,001
<i>C.freundii</i>	2	14,12±0,05	10,66±0,07	<0,001
<i>K.pneumoniae</i>	3	14,10±0,04	11,05±0,03	<0,001
<i>C.albicans</i> 7	1	8,10±0,06	8,09±0,05	>0,05
<i>C.albicans</i>	5	8,07±0,05	8,09±0,06	>0,05

Продовження таблиці 1

1	2	3	4	5
Через 48 год				
S.aureus ATC25923	1	14,14±0,04	11,19±0,04	<0,001
S.aureus (антибіотикорезистентні)	7	14,09±0,05	11,13±0,02	<0,001
E.coli K12	1	15,23±0,03	8,89±0,03	<0,001
E.coli Hly ⁺	3	15,18±0,04	8,89±0,06	<0,001
E.coli O55:K59	3	15,24±0,04	8,85±0,06	<0,001
C.freundii	2	15,19±0,03	8,93±0,03	<0,001
K.pneumoniae	3	15,17±0,03	8,97±0,05	<0,001
C.albicans 7	1	8,95±0,10	10,10±0,06	<0,01
C.albicans	5	8,93±0,06	10,17±0,07	<0,01
Через 72 год				
S.aureus ATC25923	1	13,20±0,07	9,03±0,08	<0,001
S.aureus (антибіотикорезистентні)	7	13,14±0,08	8,82±0,07	<0,001
E.coli K12	1	15,23±0,04	9,23±0,03	<0,001
E.coli Hly ⁺	3	15,23±0,03	9,22±0,02	<0,001
E.coli O55:K59	3	15,27±0,07	9,24±0,03	<0,001
C.freundii	2	15,21±0,03	9,22±0,02	<0,001
K.pneumoniae	3	15,25±0,03	9,12±0,03	<0,001
C.albicans 7	1	10,24±0,02	9,95±0,07	<0,05
C.albicans	5	10,25±0,05	9,91±0,07	<0,05
Через 96 год				
S.aureus ATC25923	1	12,13±0,06	7,85±0,07	<0,001
S.aureus (антибіотикорезистентні)	7	12,03±0,07	7,72±0,09	<0,001
E.coli K12	1	14,18±0,02	7,93±0,04	<0,001
E.coli Hly ⁺	3	14,07±0,03	7,93±0,03	<0,001
E.coli O55:K59	3	14,19±0,03	7,97±0,04	<0,001
C.freundii	2	14,17±0,03	8,02±0,04	<0,001
K.pneumoniae	3	14,03±0,03	8,10±0,04	<0,001
C.albicans 7	1	11,02±0,08	10,98±0,12	<0,05
C.albicans	5	11,04±0,09	11,03±0,10	<0,05
Через 7 днів				
S.aureus ATC25923	1	11,89±0,07	7,14±0,03	<0,001
S.aureus (антибіотикорезистентні)	7	12,01±0,08	7,09±0,04	<0,001
E.coli K12	1	16,08±0,04	8,93±0,04	<0,001
E.coli Hly ⁺	3	16,11±0,05	9,03±0,03	<0,001
E.coli O55:K59	3	16,09±0,04	9,13±0,04	<0,001
C.freundii	2	16,07±0,05	9,17±0,03	<0,001
K.pneumoniae	3	16,10±0,05	9,22±0,03	<0,001
C.albicans 7	1	11,89±0,06	11,15±0,04	<0,01
C.albicans	5	12,01±0,07	11,12±0,06	<0,01

0,05 Іg КУО/мл проти 14,03±0,05 – 14,12±0,05 Іg КУО/мл у контролі). У цей період встановлено також значно нижчий популяційний рівень у музейних та клінічних антибіотикорезистентних штамів умовно патогенних стафілококів (11,13±0,02 – 11,19±0,04 Іg КУО/мл проти 14,09±0,05 – 14,14±0,04 Іg КУО/мл у контролі).

Через 24 год сумісного культивування біфіформа і кандид популяційний

рівень останніх повністю відповідав такому показнику в контролі, а вже через 48 год популяційний рівень кандид у досліді значно перевищував відповідний показник у контролі ($10,20 \pm 0,06 - 11,17 \pm 0,07$ lg КУО/мл проти $8,93 \pm 0,09 - 8,95 \pm 0,10$ lg КУО/мл в контролі). Тобто, коли біфіформ в ентеробактерій та стафілококів гальмує, то у дріжджоподібних грибів роду *Candida* біфіформ стимулює їх популяційний рівень через 48 год інкубації.

Сумісне культивування біфіформа і тест-штамів упродовж 72 год показало, що антагоністична активність стосовно умовно патогенних стафілококів дещо вища, ніж до умовно патогенних ентеробактерій. У цей період проявляється незначна інгібуюча дія біфіформа на кандиди.

Через чотири доби сумісного культивування біфіформа і патогенних та умовно патогенних штамів встановлено значне зниження популяційного рівня як музейних, так і клінічних штамів ентеробактерій і стафілококів. Популяційний рівень дріжджоподібних грибів роду *Candida* за таких умов не змінюється і відповідає контролю.

Така тенденція пригнічення популяційного рівня патогенних та умовно патогенних ентеробактерій і стафілококів зберігається впродовж семи діб. Характерним є те, що через сім діб сумісного культивування біфіформа з кандидами популяційний рівень останніх починає знижуватись (рис. 1).

Таким чином, популяційний рівень музейних та клінічних штамів стафілокока в середовищі Блаурока через 24 год інкубування зростає з $11,09 \pm 0,03$ до $13,17 \pm 0,10$ lg КУО/мл, через 48 год – до $14,09 \pm 0,05$ lg КУО/мл, через 72 год він знижується до $13,14 \pm 0,08$ lg КУО/мл, через чотири доби – до $12,03 \pm 0,07$ lg КУО/мл і через сім діб – до $12,01 \pm 0,08$ lg КУО/мл. Популяційний рівень вищезазначених культур у цьому ж середовищі і за наявності біфіформа значно нижчий – упродовж 48 год популяційний рівень стафілококів не змінюється, а далі знижується впродовж всіх днів спостереження (рис. 1).

Популяційний рівень патогенних та умовно патогенних ентеробактерій на середовищі без біфіформа характеризується різким зростанням упродовж трьох діб; через чотири доби він незначно зменшується, а потім знову зростає (рис. 1). Наявність біфіформу в середовищі зменшує різке зростання популяційного рівня, через три доби він значно знижується і далі продовжує поступово зменшуватися впродовж семи діб (рис. 1).

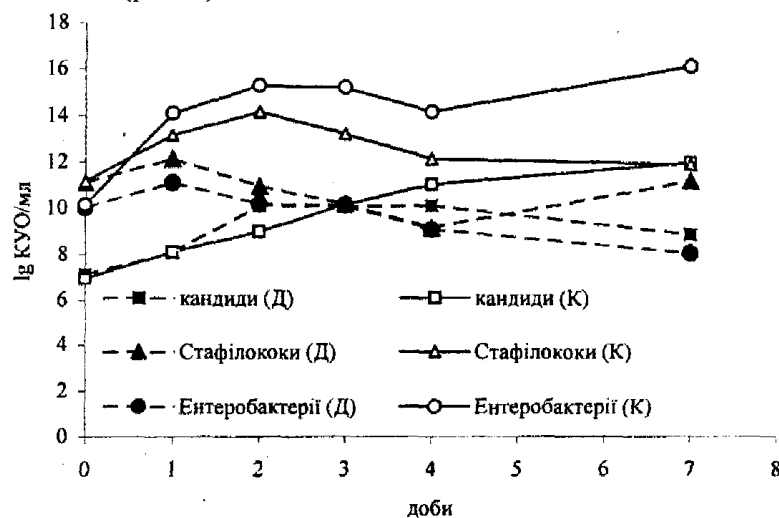


Рис. 1. Зміна росту бактерійних культур за сумісного культивування з бактисубтілом.

Антагоністичну активність бактерійного препарату визначали також за відсотком пригнічення (інгібування) росту та розмноження культури тест-штаму. Результати вивчення антагоністичної активності біфіформа (асоціації *B. longum* і *E. faecium*) стосовно патогенних та умовно патогенних ентеробактерій, стафілококів і кандид наведено в таблиці 2.

Таблиця 2

Антагоністична активність біфіформа стосовно патогенних та умовно патогенних ентеробактерій, стафілококів та дріжджоподібних грибів роду *Candida* (в%)

Мікроорганізми	К-ть шта-мів	Процент пригнічення росту тест-штамів через				
		24 год	48 год	3 доби	4 доби	7 діб
<i>S. aureus</i> ATC 25923	1	15,26±0,28	20,91±0,18	31,86±0,20	35,24±0,63	39,95±0,30
<i>S. aureus</i> (антибіотикорезистентні)	7	15,79±0,34	31,33±0,19	33,20±0,51	36,34±0,43	40,37±0,12
<i>E. coli</i> K12	1	22,06±0,05	41,63±0,26	39,00±0,19	50,44±0,27	55,52±0,05
<i>E. coli</i> Hly ⁺	3	22,60±0,02	43,10±0,01	42,00±0,04	51,07±0,12	55,38±0,09
<i>E. coli</i> O55:K59	3	21,91±0,02	40,46±0,09	39,52±0,20	51,15±0,04	55,32±0,08
<i>C. freundii</i>	2	24,49±0,24	41,34±0,10	39,46±0,08	43,38±0,13	42,98±0,10
<i>K. pneumoniae</i>	3	21,70±0,07	41,13±0,09	40,14±0,38	42,84±0,13	42,68±0,07
<i>C. albicans</i> 7	1	0,62±0,01	12,82±0,11 ^x	4,85±0,04	0	11,17±0,05
<i>C. albicans</i>	5	0	13,57±1,18 ^x	3,23±0,50	0	6,50±0,22

Примітка: 0 – антагоністична дія відсутня;
^x – стимуляція росту культури пробіотиками.

За даними таблиці 2, асоціації *B. longum* і *E. faecium* за одночасного культивування в оптимальному середовищі для всіх асоціантів (*B. longum*, *E. faecium*, *S. aureus* або ж ентеробактерії) через 24 год інкубування гальмується ріст та розмноження стафілококів на 15,26±0,28 – 15,79±0,34%, а патогенних та умовно патогенних ентеробактерій – на 21,70±0,07 – 24,49±0,24%. Асоціація біфідобактерій та ентерокока не пригнічує ріст та розмноження кандид через 24 год.

Подовження строків сумісного інкубування антагоністів та тест-штамів до 2-ї та 3-ї доби сприяє посиленню антимікробної дії тільки на патогенні та умовно патогенні ентеробактерії (39,00±0,19% - 43,10±0,01%) і стафілококи (20,91±0,18% - 33,20±0,51%).

Через 48 год мікроби-антагоністи стимулюють ріст та розмноження кандид на 12,82±0,11% - 13,57±1,18%, а через 72 год вони вже частково пригнічують ріст кандид – на 3,23±0,50% - 4,85±0,04%.

Сумісне культивування біфіформа і тест-штамів тривалістю чотири-сім діб сприяє посиленню антимікробної дії мікробів-антагоністів стосовно патогенних та умовно патогенних ентеробактерій (42,84±0,13% - 53,52±0,25%) та стафілококів (35,24±0,63% - 40,37±0,12%). Упродовж чотирьох діб мікроби-антагоністи не проявляють антагоністичної активності стосовно кандид, лише через сім діб вони проявляють антифунгіостатичну дію (6,50±0,22% - 11,17±0,05%).

Таким чином, біфіформ є ефективний бактеріальний препарат для пригнічення розвитку та розмноження тільки грампозитивних коків (стафілококів, зокрема антибіотикостійких варіантів) та грамнегативних ентеробактерій (патогенних та умовно патогенних ешерихій, цитробактера, клебсіел). Він практично не гальмує ріст та розмноження кандид упродовж 1-ї доби, а через 48 год проявляє стимулювальну дію щодо росту та розмноження. Все це свідчення того, що біфіформ ефективний препарат у випадку раціонального використання. Його можна використовувати у всіх випадках кишкового дисбактеріозу, де провідними є зміни з боку автохтонних факультативних умовно патогенних ентеробактерій (у тому числі їх патогенних видів), а також різних видів стафілококів.

Біфіформ недоцільно використовувати для лікування кишкового дисбактеріозу, де провідним є зростання популяційного рівня дріжджоподібних грибів роду *Candida*. В цьому випадку біфіформ упродовж двох-чотирьох діб не тільки не проявляє антагоністичного впливу на кандиди, а навіть стимулює їх ріст та розмноження, що за одночасного пригнічення популяційного рівня грампозитивних і грамнегативних бактерій може сприяти значному зростанню популяційного рівня кандид. Кандидозний дисбіоз швидко переходить в кандидамікоз шлунково-кишкового тракту, з яким вести боротьбу значно важче, ніж з дисбактеріозом, а мікокандидозний дисбіоз нерідко призводить до летальних наслідків.

Висновки.

1. Біфіформ (асоціація *B. longum* і *E. faecium*) має виражену антагоністичну активність стосовно грамнегативних (патогенних та умовно патогенних ентеробактерій) та грампозитивних (умовно патогенних стафілококів) бактерій, яка проявляється вже через 24 години сумісного культивування в оптимальному живильному середовищі і постійно зростає впродовж семи діб.

2. Бактерійний препарат за сумісного культивування вже через 24 години призводить до значного зниження популяційного рівня патогенних та умовно патогенних клінічних штамів ентеробактерій та стафілококів.

3. Біфіформ упродовж 3-х діб сумісного культивування з кандидами сприяє зростанню їх популяційного рівня, а через чотири доби він не впливає на цей рівень. Лише через сім діб сумісного культивування біфіформ проявляє незначну антагоністичну активність стосовно кандид. Отже біфіформ не можна використовувати для лікування кандидозного дисбіозу або кандидамікозного коліту.

Література. 1. Долгушин И.И., Огошкова И.А., Русанова Н.Н. Микробиоценоз кишечника и иммунный статус у детей раннего возраста, больных тяжелыми формами острой пневмонии, после применения различных схем терапии//Журн. микробиол.- 1998.-№3.-С.69-73. 2. Карпушина Т.И., Горюшиц Э.С., Чиненкова А.Н., Перевалов А.Я. Повышение эффективности терапевтического действия пробиотиков//Журн. микробиол.-1998.-№2.-С.104-107. 3. Крылов В.П., Орлов В.Г., Малышева Т.В. Принципы комбинированной терапии кишечного дисбактериоза//Журн. микробиол.-1998.-№4.-С.64-66. 4. Осипова И.П., Сорокулова И.Б., Терешкина Н.В., Григорьева Л.В. Изучение безопасности бактерий рода *Bacillus*, составляющих основу некоторых пробиотиков// Журн. микробиол.-1998.-№6.-С.68-70. 5. Самсигина Г.А. Линекс в лечении и профилактике нарушений биоценоза кишечника у детей//Международный мед. журнал.-1998.-№6.-С.623-524. 6. Шендеров Б.А. Нормальная микрофлора и ее роль в поддержании здоровья человека//Рос.журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии.-1998.-№1.-С.61-65.

ANTAGONISTIC ACTIVITY OF BIFIFORM

I.Y.Sydorchuk , I.D.Koval

Abstract. The bacterial agent Biform of Ferrosan Company (Denmark) manifests antagonistic activity in respect to pathogenic and opportunistic enterobacteria (*E.coli*, *E.coli* Hly⁺, enteropathogenic and enteropathogenic *escherichiae citrobacter*, *klebsiellae*) and staphylococci. The prolongation of the period of joint culturing of antagonists and test-strains results in an increased suppression of the population level of test-strains. Biform does not display antifungistatic activity and stimulates the growth and propagation of *C.albicans*.

Key words: biform, antagonism, enterobacteria, staphylococci, yeasty fungi of the *Candida* type.

Bukovinian State Medical Academy (Chernivtsi)