

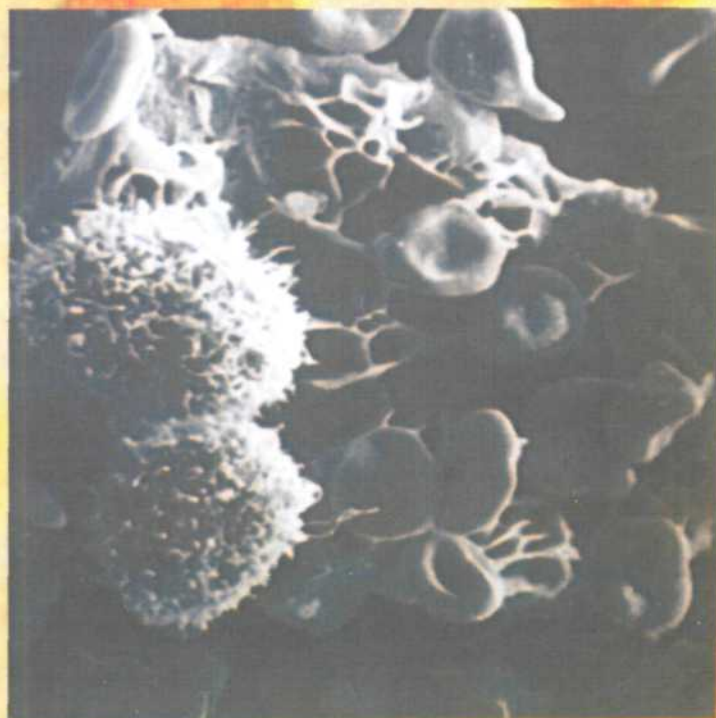
Міністерство охорони здоров'я України
Луганський державний медичний університет

**ЗАГАЛЬНА ПАТОЛОГІЯ
ТА
ПАТОЛОГІЧНА ФІЗІОЛОГІЯ**

**НАУКОВО-ТЕОРЕТИЧНИЙ
ЖУРНАЛ**

Том 5, № 4, 2010

м. Луганськ



ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

УДК 616.345-008.87:615.33-019

© Голяр О.І., Сидорчук І.Й., 2010.

ВПЛИВ «БІФІФОРМ ДИТЯЧОГО ПОРОШКУ № 21» НА ВІДНОВЛЕННЯ МІКРОБІОТИ ТОВСТОЇ КИШКИ БІЛИХ ЩУРІВ, ЯКІ ОТРИМУВАЛИ ПЕРОРАЛЬНО ПРОТЯГОМ 5-ТИ ДНІВ МАКСИМАЛЬНУ (50,0 МГ/КГ) ТЕРАПЕВТИЧНУ ДОЗУ ТЕТРАЦИКЛІНУ ГІДРОХЛОРИД

Голяр О.І., Сидорчук І.Й.

*Буковинський державний медичний університет, м. Чернівці.***Ключові слова:** нормальна мікрофлора, товста кишка, «Біфіформ дитячого порошку №21».

Вступ: В останні роки увагу науковців і практичних лікарів все більше привертають проблеми пов'язані з побічним впливом антибіотиків на організм людини та тварин. Антибактеріальні препарати, являючись потужним лікарським засобом для етіотропної терапії багатьох інфекційних та інших захворювань бактеріальної етіології, при масивному застосуванні призводять до суттєвих порушень у природному мікробному ценозі організму людини і тварин [1,2,5,7].

Нормальна мікрофлора (мікробіота) розглядається як своєрідна екстракорпоральна система макроорганізму, яка виконує, або регулює багаточисельні функції. Революційний скачок у вивченні ролі нормальної мікрофлори прийшов після розробки і впровадження в практику мікробіологічних досліджень сучасної техніки (анаеростати та ін.) культивування облигатно-анаеробних мікроорганізмів, гнотобіологічних тварин, а також моделей з експериментально відтвореною селективною або тотальною деконтамінацією тварин від мікроорганізмів за допомогою різноманітних антимікробних агентів [6,9,10]. Характерною особливістю всіх видів бактерій, які виділяються при клінічно виражених дисбактеріозах, є їх полівалентна (множинна) стійкість до більшості антибіотиків, що використовуються у лікувальних закладах [3,4,8]. Перераховане вище засвідчує про необхідність пошуків засобів та заходів, направлених на відновлення (нормалізацію) якісного та кількіс-

ного складу мікрофлори любого біотопу після етіотропної антибіотикотерапії.

Мета: Встановити експериментальним шляхом ефективність відновлення мікробіоти порожнини та приєпітеліальної біологічної плівки слизової оболонки товстої кишки при щоденному приміненні пробіотика «Біфіформ дитячого порошку №21» перорально протягом 10 днів.

Матеріал і методи дослідження: Дослідження проведені на 20-ти експериментальних безпородних білих щурах, з масою тіла від 220 до 240 г. Всім тваринам протягом 5-ти днів щоденно металевим зондом вводили безпосередньо у шлунок 50 мг/кг (максимальну терапевтичну дозу) тетрацикліну гідрохлорид з метою створення експериментальної моделі антибіотикового дисбіозу / дисбактеріозу. Після завершення введення тетрацикліну 10 тварин забивали на шостий день. Іншим 10 тваринам вводили металевим зондом розведений фізіологічним розчином «Біфіформ дитячий порошок №21» з метою деконтамінації патогенних та умовно патогенних мікроорганізмів та корекції автохтонних облигатних для даного біотопу мікроорганізмів.

«Біфіформ дитячого порошку №21» містить *Bifidobacterium lactis* ВВ - 12 (10^9 КУО) та *Lactobacillus rhamnosus* gg (10^9 КУО) у кожному пакетику. Вміст пакетика розчиняли у 2 мл стерильного фізрозчину кімнатної температури і відразу вводили 1мл металевим зондом один раз на день протягом 10 днів. Крім того порошок

містить тіаміну нітрат (0,40 мг) та піридоксину гідрохлорид (0,50 мг). Цей комплексний препарат використовується у дітей з 6 місяців і старших. Препарат випускає фірма Ферросан (Данія). Він нормалізує мікрофлору кишечника та покращує стан імунітету пацієнтів.

Тварин основної групи, що одержували «Біфіформ дитячого порошку №21», після заверше́ння введення пробіотика на 11-й день забивали і для дослідження у стерильних умовах забирали 1-2 см товстої кишки, таким чином, як і в попередній серії досліджень (контроль). Із одержаних кусочків товстої кишки стерильним пінцетом видавлювали (вичавлювали) вміст, поміщали його на стерильний вощений папір, зважували і готували з нього розведення 1 : 10 (10^{-1}).

Експериментальна робота проводилась із дотриманням положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986) та Постанови Першого Національного Конгресу з біоетики (Київ, 2001). У стерильних умовах стерильними ножицями розрізали товсту кишку по довжині і стерильним шпателем видаляли вміст із внутрішньої стінки кишки. Отриманий кусочок товстої кишки промивали у стерильній проточній воді протягом 2 – 3 хв до повного змивання вмісту (візуально). Потім цей кусочок стінки товстої кишки промивали у чашці Петрі із стерильним фізрозчином 7 разів. Кусочок зважували на стерильному вощеному папері. Після цього зважений кусочок стінки товстої кишки гомогенізували у 10-кратному об'ємі стерильного фізіологічного розчину натрію хлориду, одержуючи розведення 1:10 (10^{-1}). Із розведеного вмісту товстої кишки (10^{-1}) та із гомогенату стінки товстої кишки (10^{-1}) готували 2 ряди послідовних серійних титраційних рядів розведених стерильним фізрозчином від 10^{-2} до 10^{-9} вмісту та стінки товстої кишки. Із кожної пробірки титраційного ряду

як вмісту, так і тканини стінки товстої кишки відбирали стерильною мікропіпеткою 0,1 мл зависі і здійснювали посів шпателем на сектори оптимального для кожного виду або родини поживного середовища. Посіви аеробних і факультативно анаеробних бактерій інкубували у термостаті (37°C) протягом 24 - 48 год. Облігатні анаеробні бактерії вирощували у стаціонарному анаеростаті «CO² – incubator T – 125» (ASSAB Medicin AB, Швеція) протягом 5-7 діб, інколи до 14 діб.

Після цього підраховували однопові колонії, з яких отримували чисті культури анаеробних, аеробних та факультативно анаеробних бактерій. Чисті культури ідентифікували за морфологічними, тинкторіальними, культуральними та біохімічними властивостями (Хоулд Дж., Криг Н., Снит Н., и др., 1997). Враховуючи те, що число бактерій на одиницю маси (грам) сягає мільйонів, для зручності викладу матеріалу і статистичного опрацювання використовували десятковий логарифм кількісного показника ($\lg \text{КУО/г}$).

Одержані цифрові результати опрацьовані відомими методами математико-статистичного аналізу з використанням критерію t при нормальному розподіленні величин, що аналізуються. Різницю між порівнювальними величинами вважали вірогідною при $P \leq 0,05$.

Одержані результати та їх обговорення. Як вказувалось у попередніх роботах (Голяр О.І., Сидорчук І.Й., 2009), максимальна терапевтична доза тетрацикліну гідрохлориду призводить до стерилізуючого ефекту. Тому важливим є після завершення «антибіотикотерапії» відразу проводити пробіотикотерапію - введення у травний тракт біфідобактерій та лактобактерій, які першими елімінують із порожнини товстої кишки.

Результати вивчення зміни мікрофлори порожнини товстої кишки під впливом «Біфіформу дитячого порошку № 21» наведені в таблиці 1.

Таблиця 1. Вплив «Біфіформу дитячого порошку №21» на відновлення мікробіоти порожнини товстої кишки білих щурів, які отримували протягом 5-ти днів 50 мг/кг тетрацикліну гідроклорид

Мікроорганізми	Після введення антибіотика (n=10)			Через 10 днів самовідновлення (n=5)			P
	Популяційний рівень в lg КУО/г (M±m)	Індекс постійності (%)	Коефіцієнт кількісного домінування	Популяційний рівень в lg КУО/г (M±t)	Індекс постійності (%)	Коефіцієнт кількісного домінування	
I. Анаеробні бактерії.							
Біфідобактерії	0	-	-	9,13±0,34	100,0	140,7	-
Лактобактерії	0	-	-	8,85±0,26	100,0	136,4	-
Еубактерії	5,72±0,15	40,0	43,6	7,09±0,28	60,0	65,5	<0,01
Бактероїди	6,57±0,50	80,0	100,1	6,65±0,40	100,0	102,5	<0,05
Пептострептококи	0	-	-	5,63±0,16	70,0	60,7	-
Пептокок	5,79±0,16	40,0	44,1	5,01±0,17	20,0	15,4	<0,05
Клостридії	5,79±0,16	40,0	44,1	4,80±0,30	20,0	14,8	<0,05
II. Аеробні та факультативно анаеробні бактерії.							
Кишкова паличка	5,02±0,35	60,0	57,4	8,19±0,16	100,0	126,2	<0,01
E.coli Нly+	5,11±0,34	50,0	48,7	0	-	-	-
Клебсієли	4,65±0,21	50,0	44,3	0	-	-	-
Ервінії	0	-	-	3,75±0,20	40,0	23,1	-
Протеї	3,33±0,31	30,0	19,0	33,3±0,30	60,0	30,8	>0,03
Ентерококи	0	-	-	9,01±0,26	70,0	97,2	-
Сінна паличка	0	-	-	8,89±0,11	30,0	41,1	-

Максимальна терапевтична доза (50 мг/кг) тетрацикліну протягом 5 днів щоденного використання призводить до елімінації автохтонних облигатних фізіологічно корисних анаеробних біфідобактерій, лактобактерій та аеробних ентерококів. Залишаються персистувати анаеробні бактероїди, еубактерії, пептокок та клостридії, а також патогенні (ентеротоксигенні ешерихії) та умовно патогенні (кишкова паличка, клебсієли, протеї) ентеробактерії у помірному та низькому популяційному рівні. Характерним у цей період є те, що всі виявлені анаеробні та аеробні і факультативно анаеробні бактерії мають низькі аналітичні індекси та коефіцієнти (індекс постійності та коефіцієнт кількісного домінування), що засвідчує про їх мінімальну роль у мікробіоценозі порожнини товстої кишки.

При використанні біфіформу протягом 10 днів при введенні його щоденно перорально виявляються у високому популяційному рівні фізіологічно корисні анаеробні автохтонні облигатні біфідобактерії та лактобактерії, а також аеробні ентерококи і до 10 дня досягають високої

концентрації у вмісті порожнини товстої кишки всіх експериментальних тварин. Ці мікроорганізми стають константними та домінуючими у порожнині товстої кишки. Крім цього, виявляються пептострептококи та транзиторні сінні палички. При цьому знижується популяційний рівень та аналітичні показники умовно патогенного пептокока. На фоні таких змін із порожнини товстої кишки елімують патогенні (ентеротоксигенні ешерихії) та умовно патогенні клебсієли. Крім того, зростає популяційний рівень на 24,0 % еубактерій та кишкової палички - на 63,1 %.

Таким чином, «Біфіформ дитячого порошку №21» при його пероральному введенні призводить до деконтамінації із порожнини товстої кишки патогенних та умовно патогенних ентеробактерій у всіх експериментальних тварин, а в деяких тварин елімують пептокок, клостридії. На такому фоні порожнина товстої кишки заселяється автохтонними облигатними анаеробними біфідобактеріями, лактобактеріями, бактероїдами та факультативними анаеробами (кишковою паличкою), у більшості тварин персистують еубактерії,

пептострептококи та ентерококи. У частини тварин появляються транзиторні грампозитивні спорові бактерії (*B. subtilis*).

Колонізаційну резистентність будь-якого біотопу травного тракту (ТТ) формує мікрофлора приєпітеліальної біологічної плівки слизової оболонки товстої кишки. Вона є основним джерелом нормофлори вмісту порожнини товстої кишки. Мікрофлора приєпітеліальної біоплів-

ки являється найбільш стабільною популяцією і відіграє суттєву роль у збереженні здоров'я організму хазяїна.

Тому наступним етапом з вивчення впливу біфіформу на мікрофлору товстої кишки було встановлення якісного та кількісного складу мікрофлори, яка формує колонізаційну резистентність приєпітеліальної біоплівки слизової оболонки товстої кишки. Результати цих досліджень наведені в таблиці 2.

Таблиця 2. Вплив «Біфіформу дитячого порошку №21» на відновлення мікробіоти приєпітеліальної біологічної плівки слизової оболонки товстої кишки білих щурів, які попередньо отримували протягом 5-ти днів 50,0 мг/кг тетрацикліну підхлорид

Мікроорганізми	Після введення антибіотика (n=10)			Через 10 днів самовідновлення (n=5)			P
	Популяційний рівень в lg КУО/г (M±m)	Індекс постійності (%)	Коефіцієнт кількісного домінування	Популяційний рівень в lg КУО/г (M±m)	Індекс постійності (%)	Коефіцієнт кількісного домінування	
I. Анаеробні бактерії.							
Біфідобактерії	0	-	-	5,85±0,21	100,0	128,3	-
Лактобактерії	0	-	-	5,17±0,31	100,0	113,4	-
Еубактерії	0	-	-	3,83±0,17	50,0	42,0	-
Бактероїди	3,48±0,21	60,0	60,5	5,04±0,29	100,0	110,5	<0,01
Пептострептококи	0	-	-	3,40±0,17	30,0	29,6	-
Пептокок	4,96±0,15	40,0	43,5	0	-	-	-
Клостридії	3,66±0,10	30,0	31,8	0	-	-	-
II. Аеробні та факультативно анаеробні бактерії.							
Кишкова паличка	0	-	-	3,83±0,23	100,0	84,0	-
Протеї	0	-	-	3,00	10,0	6,6	-
Клебсієли	3,40±0,17	30,0	29,6	0	-	-	-
Ервінії	3,30	10,0	9,6	0	-	-	-
Ентерококи	0	-	-	4,77±0,12	40,0	41,8	-

В результаті перорального використання тетрацикліну у максимальній терапевтичній дозі протягом 5 днів в приєпітеліальній біоплівці залишаються персистувати у мінімальних кількостях бактероїди, пептокок, клостридії та умовно патогенні ентеробактерії (клебсієли та ервінії). Елімінували фізіологічно корисні автохтонні облігатні біфідобактерії, лактобактерії, еубактерії, пептострептококи, а також факультативно анаеробні кишкові палички та ентерококи.

Використання «Біфіформу дитячого порошку № 21» призводить до елімінації умовно патогенних (клебсієл, ервіній) ентеробактерій, пептокока і клостридій. З'являються автохтонні облігатні біфідобактерії, лактобактерії, бактероїди та ки-

шкова паличка в приєпітеліальній біоплівці слизової оболонки товстої кишки у всіх експериментальних тварин і вони, за індексом постійності, коефіцієнтом кількісного домінування займають провідне положення у мікробіоценозі приєпітеліальної біоплівки слизової оболонки товстої кишки. У частини експериментальних тварин у приєпітеліальній біоплівці слизової оболонки товстої кишки появляються автохтонні факультативні еубактерії, пептострептококи та ентерококи. Крім того, зростає на 14,9% кількість бактероїдів.

Таким чином, використання протягом 10 днів з метою деконтамінації умовно патогенних не властивих для даного біотопу бактерій «Біфіформ дитячого по-

рошку №21» призводить до елімінації із приєпітеліальної біологічної плівки слизової оболонки товстої кишки умовно патогенних ентеробактерій, пептокока та заселення цього біотопу (приєпітеліальної біологічної плівки слизової оболонки товстої кишки) автохтонними фізіологічно корисними біфідобактеріями, лактобактеріями, бактероїдами та кишковими паличками у всіх експериментальних тварин, а у частини білих щурів - еубактеріями, пептострептококами та ентерококами.

Висновки: 1) «Біфіформ дитячого порошку №21» при його пероральному використанні протягом 10 днів в експериментальних тварин з дисбактеріозом / дисбіозом призводить, у більшості випадків, до нормалізації мікрофлори вмісту порожнини товстої кишки за рахунок деконтамінації із порожнини товстої кишки патогенних та умовно патогенних ентеробактерій, бактерій родів *Peptococcus*, *Clostridium*, а також заселення порожнини

товстої кишки автохтонними облигатними анаеробними та факультативно анаеробними бактеріями родів (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Escherichia*, *Enterococcus*) та іншими бактеріями. 2) Цей препарат відновлює колонізаційну резистентність слизової оболонки товстої кишки за рахунок заселення приєпітеліальної біологічної плівки слизової оболонки товстої кишки автохтонними облигатними бактеріями родів *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Escherichia*, *Enterococcus* у всіх експериментальних тварин, а також у частини білих щурів - бактеріями родів *Eubacterium*, *Peptostreptococcus*, *Enterococcus* та іншими мікроорганізмами.

Перспективи подальших досліджень заключаються у необхідності проведення вивчення ефективності бактеріотерапії біфіформом дисбактеріозу мікрофлори тонкої кишки.

ЛІТЕРАТУРА:

1. Смолянская А.З. Дисбактериозы - инфекционные процессы смешанной этиологии // Антибиотики и микроэкология человека и животных. - М.: НИИ антибиотиков. - 1988. - с. 32-35.
2. Бредихина Н.А. Современные подходы к лечению и профилактике дисбактериоза / Н.А. Бредихина, С.Д. Митрохин, А.А. Орловский // Рос. гастроэнтерол. журнал. - 1998. - №2. - С. 18-27.
2. Колициногенная активность кишечной микрофлоры как показатель дисбиотического состояния желудочно-кишечного тракта / О.В. Бухарин, А.В. Вальшев, О.Е. Челпаченко (и др.) // Журн. микробиологии. - 2002. - № 4. - С. 55-57.
3. Костюк О.П. Сучасні уявлення про вплив лактобактерій на імунну систему організму людини / О.П. Костюк, Л.І. Чернишова, А.П. Волоха // Фізіологічний журнал. - 1997. - № 3-4. - С. 106-115.
4. Лыкова Е.А. Дисбактериоз кишечника при антибактериальной терапии и перспективы лечения антибиотикорезистентными пробиотиками / Е.А. Лыкова // Антибиотики и химиотерапия. - 2001. - №3. - С. 21-25.
5. Модуляция иммуногенеза пробиотиками в эксперименте / [Заболотный Д.И., Мельников О.Ф., Заболотная Д.Д., Шинкаренко Л.Н.] // Имунология і алергологія. - 2006. - № 2. - С. 19-20.
6. Митрохин С.Д. Дисбактериоз: современные представления. Диагностика. Возможности лечения / С.Д. Митрохин // Антибиотики и химиотерапия. - 2004. - Т.49, № 7. - С. 22-33.
7. Назаретян В. Оценка эффективности различных способов фармакотерапии дисбактериоза / В. Назаретян, И. Плаксина, В. Настенко // Педиатрия. - 2004. - № 3. - С. 105-106.
8. Нарушение микробной экологии человека, их причины, следствия и способы восстановления физиологической нормы / В.В. Бережной, Д.С. Янковский, С.А. Крамарев [и др.] // Здоровье женщины. - 2004. - №2 (18). - С. 170-178.
9. Самсыгина Г.А. Особенности становления биоценоза кишечника и кишечный дисбактериоз / Г.А. Самсыгина // Лечащий врач. - 2003. - № 5: Пер. с англ. - С. 52-57.

Голяр О.И., Сидорчук И.И. Влияние « Бифиформа детского порошка № 21» на обновление микрофлоры толстой кишки белых крыс, которые получали перорально на протяжении 5-ти дней максимальную (50,0 мг/кг) терапевтическую дозу тетрациклина гидрохлорида // Загальна патологія та патологічна фізіологія. - 2010. - Т. 5, №4. - С. 5-Ю.

«Бифиформ детского порошка № 21» при его пероральном применении на протяжении 10 дней в экспериментальных животных с дисбактериозом / дисбіозом приводит, в большинстве случаев, к нормализации

микрофлоры содержимого полости толстой кишки за счет деконтаминации из полости толстой кишки патогенных и условно патогенных энтеробактерий, бактерий родов *Peptococcus*, *Clostridium*, а также заселения полости толстой кишки автохтонными облигатными анаэробными, факультативно анаэробными бактериями родов (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Escherichia*, *Enterococcus*) и другими бактериями.

Этот препарат обновляет колонизационную резистентность слизистой оболочки толстой кишки за счет заселения прилипательной биологической пленки слизистой оболочки толстой кишки автохтонными облигатными бактериями рода *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Escherichia*, *Enterococcus* у всех экспериментальных животных, а также у части белых крыс - бактериями рода *Eubacterium*, *Peptostreptococcus*, *Enterococcus* и другими.

Ключевые слова: нормальная микрофлора, толстая кишка, «Бифиформ детского порошка №21».

Holjar O.I., Sidorchuk LI. Influence of «Baby powder Biform № 21» on the microbiota of large intestine in albino rats treated perorally with the maximal therapeutic dose of tetracycline hydrochloride (50.0 mg/kg) for 5 days // Загальна патологія та патологічна фізіологія. - 2010. - Т. 5, №4. - С. 5-Ю..

«Children powder Biform № 21» being introduced perorally for 10 days causes in most cases normalization of the microbiota of a content in the large intestine due to decontamination from the large intestine cavity pathogenic and conditionally pathogenic enterobacterici, peptococcaceae and *Clostridium*. At the same time it is observed an intestine cavity with autochthonous obligatory anaerobic and facultative anaerobic bacteriums (*bifidobacteriums*, *lactobacillus*, *bacteroides*, *bacterium colli*, *enterobacterici*, *B.subtilis*) and others.

«Biform № 21» recoves in all experimental animals intestine mucus membrane due to an increase in the biological layer of mucuse membrane autochthonous obligatory *bifidobacteriums*, *lactobacteriace*, *bacteroides* and *bacterium colli* and alsow in some albino rats - *eubacteriums*, *peptococcaceae*, *enterobacterici*, and others.

Keywords: normal microbiota, large intestine, «Children powder Biform № 21»