

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ СОВМЕСТНОГО ПРИМЕНЕНИЯ АНТИБИОТИКОВ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ

Сизенцов А.Н.¹, Карпова Г.В.¹, Володченко В.Ф.¹, Тимофеева А.А.¹

¹ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет», Оренбург, e-mail: asizen@mail.ru

В статье представлены данные по изучению эффективности комплексного применения пробиотических препаратов на основе бактерий рода *Bacillus* с антибиотиками при лечении экспериментальной инфекции. В ходе проведенных исследований на основании подсчета КОЕ *S. enteritidis* в фекалиях экспериментальных животных установлено, что наиболее эффективным является совместное применения Ветом 2 с Цефотаксимом. На основании исследования морфологических и гематологических показателей крови было установлено, что комплексное применение антибиотиков и пробиотиков при лечении кишечной инфекции, вызванной *S. 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. Установлено стимулирующее действие исследуемых пробиотических штаммов на β -литическую и лизоцимную активность сыворотки крови. На основании гистологического исследования органов-мишеней установлено, что применение пробиотиков при лечении кишечной инфекции, вызванной *S. enteritidis*, является эффективным, так как предотвращает развитие патологических изменений.

Ключевые слова: *Bacillus*, антибиотики, Споробактерин, Бактисубтил, Ветом, сальмонеллез.

EVALUATION OF THE EFFECTIVENESS OF JOINT APPLICATION OF ANTIBIOTICS IN THE TREATMENT OF EXPERIMENTAL INFECTION

Sizentsov A.N.¹, Karpova G.V.¹, Volodchenko V.F.¹, Timofeeva A.A.¹

¹FGBOU IN "The Orenburg state university", Orenburg, e-mail: asizen@mail.ru

The article presents data on the effectiveness of the integrated use of probiotic preparations on basis of bacteria of the genus *Bacillus* with antibiotics in the treatment of experimental infection. During the carried-out researches it is established: based on the CFU count of *S. enteritidis* in the feces of experimental animals established that the most effective is the joint application Vetom 2 with Cefotaxime; on the basis of the morphological and hematological parameters of blood it was determined that a comprehensive application of antibiotics and probiotics in treatment of intestinal infections caused by *S. enteritidis*, is effective, as in all the experimental groups investigated parameters by the tenth day matter in the redistribution rules in contrast to the control group infection; the stimulating effect of the studied probiotic strains in β -lytic and lysozymal activity of blood serum; on the basis of histological examination of target organs it is established that the use of probiotics in the treatment of intestinal infections caused by *S. enteritidis* is effective as it prevents the development of pathological changes.

Keywords: *Bacillus*, antibiotics, Sporobacterin, Baktisubtil, Vetom, salmonellosis.

Сальмонеллез – кишечное зооантропонозное заболевание, вызываемое микроорганизмами рода сальмонелл, характеризующееся при манифестном течении отчетливо выраженной интоксикационной и гастроинтестинальной симптоматикой, а также возможностью развития в некоторых случаях генерализованной формы [3].

Восприимчивость к сальмонеллезной инфекции повышается при подавлении нормальной флоры кишечника. Заражающей дозой для иммунокомпетентного человека является доза 10^7 бактерий. Для развития заболевания у иммунокомпрометированных лиц инфицирующая доза может быть значительно меньшей.

Если интенсивность бактериолиза недостаточна, специфический иммунитет отсутствует, а факторы неспецифической защиты желудочно-кишечного тракта

несовершенны, сальмонеллы преодолевают эпителиальный барьер тонкой кишки и проникают в толщу тканей (в энтероциты и собственный слой слизистой оболочки кишечника), где захватываются (фагоцитируются) нейтрофилами и макрофагами. Возникает воспалительный процесс во всех отделах ЖКТ (гастроэнтероколитическая форма) [7].

Для развития манифестных форм болезни обязательно проникновение в ЖКТ не только токсинов сальмонелл, но и живых возбудителей. Массивное поступление живых бактерий (при алиментарном пути заражения) сопровождается разрушением их в верхних отделах ЖКТ (в желудке и преимущественно в кишечнике), в результате чего высвобождается большое количество эндотоксина, который, всасываясь в кровь, обуславливает возникновение эндотоксического синдрома, определяющего клиническую картину начального периода заболевания. Сальмонеллы, попадая с током крови в различные органы и ткани, размножаются с формированием септических очагов поражения (септическая форма) [6].

Токсины сальмонелл вызывают активацию синтеза простагландинов и циклических нуклеотидов, что приводит к резкому усилению секреции жидкости и ионов калия и натрия в просвет желудочно-кишечного тракта. Развивается диарея с последующими нарушениями водно-электролитного баланса. Общая реакция организма на эндотоксины характеризуется нарушением функционально-адаптивных процессов во многих органах и системах [4; 5].

В связи со снижением эффективности антибиотиков и химиопрепаратов, а также невысокой эффективностью действия пробиотиков в настоящее время чрезвычайно актуальным является сочетанное применение антибиотических и пробиотических препаратов.

Исходя из выше перечисленного перед нами была поставлена следующая цель исследования: определение эффективности совместного применения пробиотиков на основе бактерий рода *Bacillus* с антибиотиками при экспериментальной инфекции.

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 граммов. Длительность эксперимента составила 10 дней. В соответствии с поставленными задачами животные разбивались на 14 групп по 9 животных в каждой группе.

Были сформированы группы лабораторных животных: К₀ - обычный рацион; К₁ - заражение *S. enteritidis*; К₂ - Ветом 2; К₃ - Споробактерин; К₄ - Бактисубтил; О₁ - заражение + Хлорамфеникол; О₂ - заражение + Цефотаксим; О₃ - заражение + Пенициллин; О₄ - заражение

+ Ветом 2; O₅ - заражение + Споробактерин; O₆ - заражение + Бактисубтил; O₇ - заражение + Ветом 2 + Цефотаксим; O₈ - заражение + Споробактерин + Хлорамфеникол; O₉ - заражение + Бактисубтил + пенициллин.

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 $1,5 \times 10^6$ микробных клеток. Введение пробиотиков и антибиотиков проводилось в соответствии с аннотацией к препарату. Введение препаратов в опытных группах проводилось через 12 часов с момента заражения, утром задавались антибиотики, вечером пробиотики.

От исследуемых лабораторных животных брали кровь на морфологический анализ и определение лизоцимной и β-литической активности; экскременты для выделения бацилл и сальмонелл, органы-мишени (кишечник и селезенка) на гистологическое исследование.

Для определения влияния комплексного применения антибиотиков и пробиотиков на основе бактерий рода *Bacillus* на течение сальмонеллезной инфекции *in vivo* нами использовались следующие методы: определение колониеобразующих единиц из фекалий экспериментальных животных *Bacillus* и *S. enteritidis*; методы общего морфологического и биохимического анализа крови [2]; гистологический метод исследования органов и тканей лабораторных крыс [1].

Для выделения *Bacillus* из экскрементов применялась среда МПА. Предварительно исследуемый материал подвергался термической обработке путем кипячения в течение 10 минут при 100 °С. Для выделения *Salmonella enteritidis* использовалась среда ВСА. Данные представлены в таблицах 1 и 2.

Таблица 1

Результаты подсчета колониеобразующих единиц *Bacillus*
в экскрементах лабораторных животных, КОЕ

Исследуемые группы	Сроки исследования (2-10 день исследования от начала эксперимента)								
	2	3	4	5	6	7	8	9	10
K ₂	30	50	100	170	220	240	260	310	380
K ₃	24	31	67	82	131	157	204	260	301
K ₄	21	42	56	78	64	119	147	181	210
O ₄	31	44	74	107	138	202	240	290	320
O ₅	19	33	51	84	120	165	201	231	270
O ₆	17	34	42	57	91	110	136	181	201
O ₇	22	32	41	87	101	119	131	153	172
O ₈	18	25	39	43	62	94	118	131	141

O ₉	15	29	39	54	74	83	91	102	136
----------------	----	----	----	----	----	----	----	-----	-----

Из таблицы 1 видно, что наибольшее КОЕ *Bacillus* отмечалось в контрольных группах, где применялся Ветом 2 и Споробактерин, а также в группе O₄, где производилось заражение и задавался Ветом 2.

Таблица 2

Результаты подсчета колониеобразующих единиц *Salmonella enteritidis* в экскрементах лабораторных животных, КОЕ

Исследуемые группы	Сроки исследования (2-10 день исследования от начала эксперимента)								
	2	3	4	5	6	7	8	9	10
K ₁	31	43	57	87	96	150	212	261	286
O ₁	19	36	41	28	13	0	0	0	0
O ₂	28	37	48	31	22	8	0	0	0
O ₃	26	34	51	42	19	10	0	0	0
O ₄	23	29	49	33	18	7	0	0	0
O ₅	24	37	45	39	26	11	0	0	0
O ₆	22	29	44	51	31	22	9	0	0
O ₇	27	31	37	26	12	0	0	0	0
O ₈	25	33	42	29	23	14	0	0	0
O ₉	24	35	45	37	20	7	0	0	0

Наибольшее КОЕ наблюдается в контрольной группе, где проводилось только заражение. Что касается остальных групп, то КОЕ на 2-й и 3-й день во всех группах оставалось примерно одинаковое, а затем происходил подъем КОЕ в группе O₁ (Споробактерин+заражение). К шестому, седьмому, восьмому, девятому дню показатели КОЕ в опытных группах уменьшаются по сравнению с контрольными значениями (K₁).

Для гистологического исследования производили отбор образцов тонкого отдела кишечника и селезенки. Обработка гистоматериала, получение и окрашивание гистопрепаратов производили по традиционной методике.

В тонком кишечнике производились следующие замеры: диаметр гемокапилляров крипт и ворсинок, высота ворсинок, диаметр энтероцитов ворсинок, диаметр ядер энтероцитов ворсинок, диаметр крипт, диаметр энтероцитов крипт, диаметр ядер энтероцитов крипт. Полученные данные изменяются достоверно внутри группы относительно фонового значения [1].

В группах O₄, O₅, O₆ патологические изменения в слизистой оболочке минимальны, сосудистая реакция сводится к полнокровию ее сосудов. Подслизистая основа слизистой оболочки инфильтрируется лимфоцитами, скопление которых происходит преимущественно вокруг сосудов. Строение ворсинок и крипт в норме.

В группах O₁, O₂ местами наблюдались отёк и кровоизлияния, повышенная секреция эпителия крипт, массовое слущивание эпителия, который скапливается в расширениях желез

вместе со слизью и лейкоцитами. Местами наблюдается вакуолизация энтероцитов крипт. Ворсинки имеют характерное для нормы строение. В группе O₃ изменения в слизистой минимальны. Сосудистая реакция сводится к полнокровию сосудов поверхностных слоёв слизистой оболочки, чаще в области ворсинок. В группе O₇ изменения в слизистой минимальны. Признаки патологии отсутствовали. Целостность ворсинок сохранена. Крипты удлинённой формы без признаков отечности. Микрососуды имеют нормальные структуры и степень наполненности. В группе O₈, O₉ изменения в слизистой минимальны. Признаки патологии отсутствовали, имелся небольшой отёк стромы. Крипты незначительно расширены. Ворсинки имели нормальные размеры.

На пятый день исследования в группе K₁ на всем протяжении слизистой оболочки кишечника выражены: гиперемия, кровоизлияния и периваскулярные отеки. Хорошо просматривались лимфоидные образования в подслизистом слое, в которых имеются точечные кровоизлияния и периваскулярные отеки [1].

В группах K₂, K₃, K₄ признаки патологии отсутствовали. Сосудистая реакция сводится к полнокровию сосудов поверхностных слоев слизистой оболочки. Сохраняется целостность ворсинок, в которых хорошо развита соединительнотканная основа и микрососуды.

В опытных группах O₄ изменения в слизистой оболочке кишечника минимальны. Сосудистая реакция сводится к полнокровию сосудов (венул) в области основания ворсинок. Сосуды паретически расширены, с тромбами. Ворсинки сохраняют нормальную структуру, численность бокаловидных энтероцитов в эпителии также в пределах нормы.

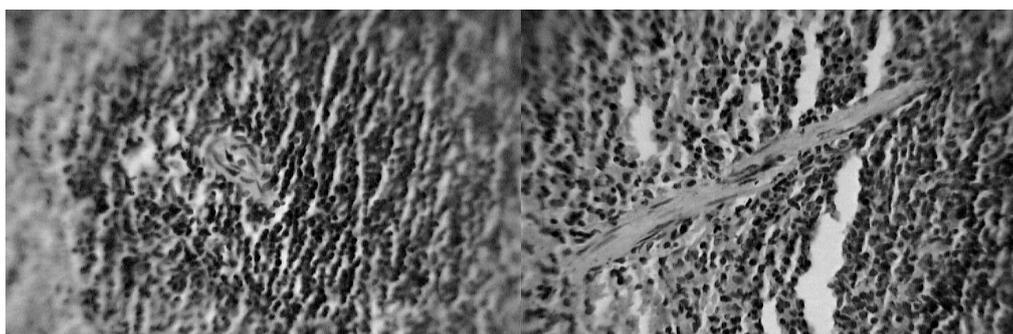
На финальном этапе исследования в опытных группах O₁, O₂ на всем протяжении слизистой оболочки выражены: отёки, кровоизлияния, гиперемия, поверхностный некроз и изъязвления слизистой оболочки. Лимфоидные образования слизистой хорошо выражены, полнокровны, имеют набухший вид. В области крипт повышенная секреция, слущивание эпителия.

В группах O₇, O₈, O₉ изменения в слизистой оболочке минимальны. Сосудистая реакция сводится к полнокровию сосудов (венул) поверхностных слоев слизистой оболочки, чаще в области ворсинок. Последние имеют правильную структуру, все виды энтероцитов без признаков патологии. Крипты правильно удлинённой формы, имеют просветы. Признаков отёчности не наблюдается.

В группе K₀ изменений не происходило. В группе K₁ на всем протяжении слизистой оболочки кишечника отёк, кровоизлияния, гиперемия, поверхностный некроз и изъязвления слизистой оболочки. Лимфоидные образования слизистой хорошо выражены, имеют набухший вид, полнокровные сосуды, имеются точечные кровоизлияния. Ворсинки укороченные, основа их истончена. Регистрировалась массовая вакуолизация эпителия

ворсинок и лизис мембран энтероцитов крипт. Наблюдалась слабая базофилия и выраженная вакуолизация энтероцитов крипт. В комплексе ворсинка-крипта нарушена регенерация эпителия.

На всех сроках исследования во всех исследуемых группах изменения в гистологии селезенки не были выявлены (рисунок А, Б). Во всех случаях селезенка полнокровна на всем поле препарата.



А

Б

Селезенка (окрашивание гематоксилином):

А – тельце Мальпиги, Б – мышечная трабекула; увеличение в 600 раз

В селезенке проводились замеры (табл. 3): диаметра мальпигиевых телец, отношении красной пульпы к белой, диаметр трабекулы, диаметр эксцентричной артерии, толщина капсулы. Значения изменяются достоверно внутри группы относительно фонового значения.

При экспериментально созданной лабораторной инфекции, в частности сальмонеллезе, патоморфологические изменения в слизистой оболочке кишечника крыс эффективно снимает применение пробиотика биоспорина и его сочетания с антибиотиком цефотаксимом. Менее эффективно снимает применение пробиотика споробактерина и его сочетания с хлорамфениколом. Наименьший эффект оказывает применение пробиотика бактисубтила и его сочетания с пенициллином.

Таблица 3

Толщина капсулы селезенки лабораторных крыс, нанометры

Исследуемые группы	Сроки исследования		
	Фоновое	Через 5 суток	Через 10 суток
Толщина капсулы			
К ₀	28,33±0,621	28,36±0,639*	28,87±1,007***
К ₁	22,08±1,496	20,08±0,964	19,50±0,625*
К ₂	21,45±1,739	20,70±1,950**	19,37±0,934
К ₃	23,25±1,332	23,11±1,516	24,59±1,964**
К ₄	27,82±1,465	27,90±0,822	30,25±0,478
О ₁	27,98±1,463	27,68±0,899	20,94±0,780*

O ₂	27,10±1,393	21,87±1,109**	23,78±1,569***
O ₃	25,60±1,164	20,89±0,796	26,66±1,393*
O ₄	27,54±0,658	26,15±1,104*	18,69±0,457
O ₅	27,16±1,111	26,50±0,832	20,08±0,575**
O ₆	25,67±1,678	22,70±1,652	20,35±0,400*
O ₇	23,15±1,334	23,13±1,142*	20,64±0,615
O ₈	25,07±1,675	27,02±1,865	22,32±1,251**
O ₉	27,44±1,783	26,78±0,839*	21,30±0,561**
* P < 0,050; ** P < 0,010; *** P < 0,001.			

В ходе проведенных исследований крови было установлено, что наиболее значимые и достоверные изменения отмечаются со стороны таких морфологических и гематологических показателей, как лимфоциты, моноциты, лейкоциты, эритроциты [2].

На десятый день только в группе К₁ регистрировалось превышение физиологических значений уровня лейкоцитов, данный показатель по отношению к фоновому исследованию был выше на 65,56%, а в группах O₃, O₄, O₆, O₉ в пределах верхней границы нормы.

СОЭ к десятому дню исследования превышала значения физиологической нормы и фоновые значения в группах К₁, O₂, O₄, O₅, O₆ на 104,58, 85,77, 45,57, 92,39, 108,23% соответственно. СОЭ в группах O₁, O₃, O₇, O₈, O₉ снижается и до пределов верхней границы физиологической нормы [2].

Применение пробиотических препаратов способствует активации показателей неспецифической резистентности, таких как лизоцим и β-лизин. Вскоре после приема исследуемых пробиотических препаратов начинают выделяться биологически активные вещества и функционировать системы микробных клеток, оказывающие как прямое действие на патогенные и условно патогенные микроорганизмы, так и опосредованное – путем активации специфических и неспецифических систем защиты макроорганизма [2].

В ходе проведенных исследований на основании подсчета КОЕ *S. enteritidis* в фекалиях экспериментальных животных установлено, что наиболее эффективным является совместное применения Ветом 2 с Цефотаксимом; на основании исследования морфологических и гематологических показателей крови было установлено, что комплексное применение антибиотиков и пробиотиков при лечении кишечной инфекции, вызванной *S. 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; установлено стимулирующее действие исследуемых пробиотических штаммов на β-литическую и лизоцимную активность сыворотки крови; на основании гистологического исследования органов мишеней установлено, что применение

пробиотиков при лечении кишечной инфекции, вызванной *S. enteritidis*, является эффективным, так как предотвращает развитие патологических изменений.

Список литературы

1. 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.
2. 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.
3. Бойченко М.Н. Сальмонеллез: распространение возбудителя в организме // Журнал микробиологии и эпидемиологии. – 2000. – № 5. – С. 9-13.
4. Anderson D. The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen radical generated DNA damage in human lymphocytes in the comet assay / D. Anderson, B.T. Phillips, P. Schemere // Environ. and Mol. Mutagenes. – 2001. – V. 23. – P. 2-8.
5. Bannet E.V. Toxins Salmonella. – peptides of the “middlemolecules” group / E.V. Bannet, D. Chia // Analytical biochemie. – 1999. – V. 86. – P. 271-278.
6. Schimuzu T. A method for the detection of Medium – sized molecules / T. Schimuzu, R. Kondo // Anch. Biochem. – 1998. – V. 206. – P. 271-276.
7. Webster D.M. Antibody – antigen interactions // Curr. Opinion struct. Biol. – 2002. – № 1. – P. 123-129.