

ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ ПРОФИЛАКТИКИ, ЛЕЧЕНИЯ И КОРРЕКЦИИ ДИСБИОТИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ КИШЕЧНОЙ МИКРОФЛОРЫ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ПСЕВДОТУБЕРКУЛЕЗЕ

И.Ю. Чичерин¹, И.П. Погорельский², И.А. Лундовских², И.В. Дармов²,
И.В. Маракулин²

¹ Научное общество «Микробиота», Сергиев Посад

² Вятский государственный университет, Киров

Assessing the possibility of prevention, treatment and correction of the intestinal microflora dysbiotic disorders in experimental pseudotuberculosis

I.Yu. Chicherin¹, I.P. Pogorelsky², I.A. Lundovskikh², I.A. Darmov², I.V. Marakulin²

¹ Scientific society «Microbiota», Sergiev Posad

² Vyatka State University, Kirov

Резюме. Изучена возможность предотвращения развития псевдотуберкулеза и коррекции дисбиотических нарушений кишечной микрофлоры у конвенциональных белых мышей пребиотиком «Стимбифид» и экзометаболитами надосадовой жидкости нативных культур пробиотических бифидобактерий и лактобактерий, обладающих пребиотическим действием.

Конвенциональных белых мышей инфицировали перорально культурой псевдотуберкулезного микроба и оценивали развитие инфекционного процесса. Пребиотик «Стимбифид» и надосадовая жидкость нативной культуры лактобактерий, введенные животным перорально, как и введенный внутримышечно гентамицин, полностью купировали развитие инфекционного процесса. В отличие от антибиотика гентамицина, пребиотик «Стимбифид» и надосадовая жидкость нативной культуры лактобактерий, введенные перорально, предотвратили развитие дисбактериоза кишечника у животных.

Ключевые слова: псевдотуберкулез, белые мыши, дисбактериоз, пребиотик, пробиотик, экзометаболиты.

Abstract. The possibility was studied of preventing the development of pseudotuberculosis and correcting the dysbiotic disorders of the intestinal microflora in conventional white mice with prebiotic «Stimbifid» and exometabolites in supernatant fluids of native cultures of probiotic bifidobacteria and lactobacilli, which have prebiotic effect.

Conventional white mice were infected orally with pseudotuberculosis microbe culture and the development of infection was evaluated. Prebiotic «Stimbifid» and supernatant fluid of lactobacilli native culture, administered to animals orally, as injected intramuscular gentamicin, completely stopped the infection development. In contrast to the antibiotic gentamicin prebiotic «Stimbifid» and supernatant fluid of lactobacilli native culture, administered orally, prevented the development of the intestinal dysbiosis in animals.

Key words: pseudotuberculosis, white mice, dysbacteriosis, prebiotic, probiotic, exometabolites.

Введение

Клинические наблюдения и экспериментальные исследования свидетельствуют о том, что у многих жителей России, в том числе и у детей, имеет место выраженный дисбаланс нормальной микрофлоры кишечника [1–3]. Транзиторные нарушения микробиоценоза кишечника относят к дисбактериальным реакциям, а выраженные и стойкие изменения количественного и качественного состава микроорганизмов — к дисбактериозам [1–5]. Дисбактериоз кишечника сопровождается различными заболеваниями, в том числе и инфекционные, и характеризуется изменением состава нормальной микрофлоры, транслокацией ее различных видов в другие биотопы организма и их избыточным ростом [6, 7].

К числу инфекционных заболеваний, при которых возникают выраженные дисбиотические изменения в кишечной микрофлоре, относится псевдотуберкулез — острая зоонозная бактериальная инфекционная болезнь, вызываемая микроорганизмами *Yersinia pseudotuberculosis* [8–10]. Для болезни характерны фекально-оральный механизм передачи возбудителя, полиморфизм клинических проявлений, поражения желудочно-кишечного тракта и суставов, кожные высыпания, интоксикация, лихорадка, склонность к рецидивам, обострениям, хронизации [8–10].

Летальность при септической форме псевдотуберкулеза может достигать 25–50%. Основным резервуаром и источником возбудителя являются мышевидные грызуны, как дикие, так и обитаю-

щие вблизи человека (синантропные). Факторами передачи являются овощи, корнеплоды, которые могут быть обсеменены иерсиниями уже на полях (при хранении в овощехранилищах обсемененность иерсиниями резко возрастает). Неудивительно, что вспышки псевдотуберкулеза чаще всего бывают связаны с употреблением салатов из сырой капусты или моркови.

Проблема псевдотуберкулеза уже на протяжении многих лет привлекает пристальное внимание специалистов в области инфектологии, а также клиницистов, что связано, в первую очередь, с разработкой средств экстренной и специфической профилактики и лечения заболевания [11–13]. Внедрение в клиническую практику новых антибактериальных препаратов и разработка эффективной вакцины потребовали проведения исследований с использованием экспериментальных моделей псевдотуберкулезной инфекции. Это позволило проследить судьбу возбудителя *Y. pseudotuberculosis* при энтеральном пути поступления в чувствительный организм.

В частности, была охарактеризована в опытах на белых мышах и морских свинках инвазия иерсиний и связанная с ней генерализация псевдотуберкулезной инфекции [10]. Весь период от адгезии иерсиний к отдельным эпителиоцитам, в основном над куполами пейеровых бляшек, до начала диссеминации возбудителя соответствует инкубационному периоду, продолжительность которого варьирует в пределах 3–21 дней [10, 14].

С использованием экспериментальной модели псевдотуберкулезной инфекции у обезьян *Papio hamadryas* изучены клинические проявления и ряд микробиологических и иммунологических аспектов псевдотуберкулеза, вызванного пероральным заражением животных, определены величины среднелетальных доз для них, а также для белых мышей и морских свинок [11].

Важно отметить, что из крови и легких погибших обезьян иерсинии не были выделены ни в одном случае. В то же время из содержимого кишечника, из лимфоузлов илеоцекальной области и из печени на среде Серова были выделены бактерии *Y. pseudotuberculosis*. Рассчитанное значение LD_{50} возбудителя псевдотуберкулеза для обезьян сопоставимо с величиной минимальной инфицирующей дозы ($0,9 \cdot 10^9$ микробов), прием которой внутрь вызывал заболевание в известном эксперименте по самозаражению В.А. Знаменского [15].

Данные, полученные с использованием экспериментальных моделей псевдотуберкулезной инфекции, однозначно свидетельствуют о том, что при естественном (энтеральном) пути проникновения иерсиний псевдотуберкулеза в чувствительный организм важнейшим этапом инфекционного процесса является взаимодействие возбудителя

со слизистой оболочкой кишечника. Начиная с адгезии иерсиний к отдельным эпителиоцитам в илеоцекальном отделе кишечника с последующей колонизацией поверхности эпителия, происходит вытеснение собственной кишечной микрофлоры у инфицированных животных псевдотуберкулезным микробом, инвазия и размножение в отдельных макрофагах и, наконец, образование сплошных биопленок на поверхностном эпителии и в криптах илеоцекального отдела, а также в начале ободочной кишки [10, 16].

Колонизацию бактерий *Y. pseudotuberculosis* на слизистой оболочке тонкой кишки рассматривают как первую фазу инфекционного процесса при псевдотуберкулезе. В дальнейшем экспрессия ряда факторов патогенности возбудителя, детерминируемых хромосомными и плазмидными генами, придает псевдотуберкулезному микробу способность проникать в органы и ткани, противостоять факторам неспецифической резистентности, размножаться вплоть до летальных популяций, вызывать гибель клеток чувствительного организма [9–12].

Следовательно, от колонизационной резистентности слизистой оболочки кишечника человека или животного зависит приживание или элиминация возбудителя псевдотуберкулеза. Сама же колонизационная резистентность, в свою очередь, связана с биологическими свойствами иерсиний псевдотуберкулеза и индигенных представителей кишечной микрофлоры, которые определяют характер взаимоотношений между ними, в частности, бионесовместимость [10, 17]. Сохранив колонизационную резистентность, создав индигенной микрофлоре с помощью современных препаратов микробиологическое преимущество, можно будет, по-видимому, еще на ранней стадии псевдотуберкулезной инфекции предотвратить адгезию, инвазию и колонизацию слизистой кишечника возбудителем *Y. pseudotuberculosis*.

Цель исследования — изучение возможности предотвращения развития псевдотуберкулезной инфекции и коррекции дисбиотических нарушений кишечной микрофлоры у конвенциональных белых мышей пребиотиком «Стимбифид» и экзометаболитами бифидобактерий и лактобактерий, обладающих пребиотическим действием.

Материалы и методы

В экспериментах по моделированию псевдотуберкулезной инфекции на конвенциональных белых мышах использовали кальцийзависимый штамм 147 *Yersinia pseudotuberculosis* I серотипа, содержащий плазмиду с молекулярной массой 47 МД. Штамм выделен от больного с выраженными симптомами острого инфекционного заболевания.

Величина LD_{50} для белых мышей при пероральном способе введения составляет $8,5 \cdot 10^4$ живых микробов [11].

В работе использовали:

- пребиотический препарат «Стимбифид» (серия 030910 ТУ 9330-002-50168265-05 с изм. № 1, произведен ООО «В-МИН» (ООО «МедСтар», Россия). Препарат создан на основе фруктоолиго- и фруктополисахаридов, содержит премикс витаминно-минеральный «Immunity» и вспомогательные вещества (натрия бикарбонат, лактоза, кальция стеарат). Лечебная и профилактическая эффективность пребиотика «Стимбифид» подтверждена клиническими испытаниями [18];
- пробиотик «Бифидумбактерин» (серия 315/6, произведен ФГУП «НПО «Микроген», Россия);
- пробиотик «Лактобактерин» (серия 15/6, произведен ФГУП «НПО «Микроген», Россия).

Выращивание штамма *Y. pseudotuberculosis* 147 с учетом его психрофильности [9, 14] проводили при температуре 4 °С.

Результаты и обсуждение

В выполненных нами ранее исследованиях, результаты которых представлены в работе [22], было показано, что надосадочная жидкость, освобожденная центрифугированием нативных культур от клеток гомопробiotических лактобактерий и бифидобактерий, оказывает наиболее существенное положительное влияние на восстановление нарушений микробиоценоза кишечника у конвенциональных белых мышей с экспериментальным антибиотико-ассоциированным дисбактериозом.

Указанные результаты дали основание заключить, что основной вклад в эффективность пробиотических препаратов вносят продукты жизнедеятельности микроорганизмов — экзометаболиты. С учетом полученных результатов, а также клинико-экспериментальных данных об эффективности пребиотика «Стимбифид» в коррекции микрoэкологических нарушений в кишечнике, были поставлены специальные эксперименты по оценке возможности использования пребиотического влияния на микрофлору кишечника конвенциональных белых мышей, противостоящую адгезии, колонизации и инвазии иерсиний псевдотуберкулеза.

В этой связи все подопытные животные были разделены на 5 групп по 10 особей в каждой группе. Первая группа являлась контрольной: животные этой группы были инфицированы перорально культурой возбудителя псевдотуберкулеза.

Животные опытных второй и третьей групп были инфицированы перорально культурой возбудителя псевдотуберкулеза. На этих группах животных проверяли лечебное действие гентамицина, который вводили внутримышечно по 1 мг в

сутки в течение 5 дней: через 2 ч после инфицирования иерсиниями псевдотуберкулеза животных второй группы (профилактический курс) и через 24 ч после инфицирования иерсиниями псевдотуберкулеза животных третьей группы (лечебный курс).

Животные четвертой, пятой и шестой групп также являлись опытными. Животным четвертой группы вводили *per os* пребиотик «Стимбифид» в дозе 13 мг в сутки за 5 дней до инфицирования иерсиниями псевдотуберкулеза и еще в течение 5 дней после инфицирования. Животным пятой и шестой групп пребиотик «Стимбифид» в той же дозе начинали вводить через 2 ч (пятая группа животных) и через 24 ч (шестая группа животных) после инфицирования культурой возбудителя псевдотуберкулеза в течение 5 дней.

Животным двух последних — седьмой и восьмой групп, относящихся также к опытным группам, в течение 5 дней до инфицирования и 5 дней после инфицирования культурой псевдотуберкулезного микроба вводили *per os* по 0,2 мл надосадочной жидкости нативной культуры пробиотических микроорганизмов соответственно бифидобактерий и лактобактерий, содержащей микробные экзометаболиты.

Сами нативные культуры получали путем культивирования бифидобактерий и лактобактерий, изолированных из коммерческих препаратов «Бифидумбактерин» и «Лактобактерин», в жидких питательных средах при температуре 37 °С в течение 72 ч (концентрация бифидобактерий $8,6 \cdot 10^8$ КОЕ·мл⁻¹, лактобактерий — $2,8 \cdot 10^9$ КОЕ·мл⁻¹). Введение надосадочной жидкости животным *per os* осуществляли в течение 5 дней до инфицирования и 5 дней после инфицирования иерсиниями псевдотуберкулеза.

Заражающая доза возбудителя псевдотуберкулеза для животных всех восьми групп составила 10 LD_{50} (~850000 КОЕ), что обеспечивало гарантированное развитие инфекционного процесса при пероральном введении бактериальной взвеси [11, 13].

Результаты экспериментов представлены в таблице. Из представленных данных видно, что животные контрольной группы в результате инфицирования возбудителем псевдотуберкулеза погибли в сроки от 5 до 13 суток от начала инфицирования. От всех павших животных была выделена чистая культура иерсиний псевдотуберкулеза, что является свидетельством генерализации инфекционного процесса. Бактериологическое изучение фекалий позволило установить, что на селективной плотной питательной среде был выявлен обильный рост иерсиний псевдотуберкулеза, соответствующий $8,6 \cdot 10^7$ – $1,2 \cdot 10^8$ КОЕ·г⁻¹, при снижении общего количества нормальной кишечной микрофлоры в

Таблица

Протективная эффективность пребиотика «Стимбифид» и экзометаболитов бифидобактерий и лактобактерий при пероральном заражении белых мышей возбудителем псевдотуберкулеза ($\bar{X} \pm t_{95}$, n=10)

Порядковый номер	Группа животных	Заражающая доза, КОЕ	Количество животных, особей		Сроки гибели, сутки \bar{X} ($X_{min}-X_{max}$)	Содержание живых бактерий в 1 г фекалий на ... сутки эксперимента, КОЕ $\times 10^7$		
			взяты в опыт	павших от псевдотуберкулеза		выделенные микроорганизмы	начало эксперимента	21 (или в день гибели)
1	Контрольная	10 LD ₅₀ (850000)	10	10	8,8 (5–13)	Общее количество	(6,0 \pm 0,7) $\times 10^9$	(1,6 \pm 0,6) $\times 10^4$
2	Лечение гентамицином через 2 ч после заражения в течение 5 дней		10	0	–	Бифидобактерии	(6,5 \pm 0,6) $\times 10^6$	(1,1 \pm 0,4) $\times 10^2$
						Лактобактерии	(2,8 \pm 0,6) $\times 10^8$	(1,3 \pm 0,5) $\times 10^2$
						Эшерихии	(1,6 \pm 0,5) $\times 10^4$	(1,1 \pm 0,3) $\times 10^1$
						Общее количество	(6,1 \pm 0,6) $\times 10^9$	(2,0 \pm 0,7) $\times 10^6$
3	Лечение гентамицином через 24 ч после заражения в течение 5 дней		10	0	–	Бифидобактерии	(6,0 \pm 0,4) $\times 10^6$	(7,5 \pm 0,6) $\times 10^4$
						Лактобактерии	(1,8 \pm 0,5) $\times 10^8$	(8,2 \pm 0,6) $\times 10^4$
						Эшерихии	(1,6 \pm 0,4) $\times 10^4$	(1,4 \pm 0,5) $\times 10^3$
						Общее количество	(6,2 \pm 0,5) $\times 10^9$	(2,4 \pm 0,6) $\times 10^6$
4	Введение регос пребиотика «Стимбифид» за 5 дней до заражения и в течение 5 дней после заражения		10	0	–	Бифидобактерии	(6,3 \pm 0,7) $\times 10^6$	(6,9 \pm 0,5) $\times 10^4$
						Лактобактерии	(1,9 \pm 0,6) $\times 10^8$	(7,6 \pm 0,7) $\times 10^4$
						Эшерихии	(1,5 \pm 0,5) $\times 10^4$	(1,5 \pm 0,6) $\times 10^3$
						Общее количество	(6,2 \pm 0,6) $\times 10^9$	(8,6 \pm 0,5) $\times 10^9$
5	Введение регос пребиотика «Стимбифид» через 2 ч после заражения в течение 5 дней		10	0	–	Бифидобактерии	(6,0 \pm 0,5) $\times 10^6$	(6,2 \pm 0,6) $\times 10^7$
						Лактобактерии	(2,0 \pm 0,6) $\times 10^8$	(4,8 \pm 0,7) $\times 10^8$
						Эшерихии	(1,7 \pm 0,6) $\times 10^4$	(4,0 \pm 0,6) $\times 10^4$
						Общее количество	(6,1 \pm 0,8) $\times 10^9$	(5,8 \pm 0,6) $\times 10^9$
6	Введение регос пребиотика «Стимбифид» через 24 ч после заражения в течение 5 дней	10 LD ₅₀ (850000)	10	0	–	Бифидобактерии	(6,3 \pm 0,7) $\times 10^6$	(5,1 \pm 0,7) $\times 10^7$
						Лактобактерии	(2,5 \pm 0,7) $\times 10^8$	(4,0 \pm 0,5) $\times 10^8$
						Эшерихии	(1,7 \pm 0,6) $\times 10^4$	(3,9 \pm 0,7) $\times 10^4$
						Общее количество	(5,6 \pm 0,6) $\times 10^9$	(4,0 \pm 0,5) $\times 10^9$
						Бифидобактерии	(6,0 \pm 0,5) $\times 10^6$	(4,3 \pm 0,6) $\times 10^7$
						Лактобактерии	(2,6 \pm 0,5) $\times 10^8$	(4,1 \pm 0,5) $\times 10^8$
						Эшерихии	(1,9 \pm 0,7) $\times 10^4$	(3,2 \pm 0,8) $\times 10^4$

Окончание таблицы

Порядковый номер	Группа животных	Заражающая доза, КОЕ	Количество животных, особей		Сроки гибели, сутки X (Xmin-Xmax)	Содержание живых бактерий в 1 г фекалий на ... сутки эксперимента, КОЕ $\times 10^4$		
			взятых в опыт	павших от псевдотуберкулеза		выделенные микроорганизмы	начало эксперимента	21 (или в день гибели)
7	Введение per os надосадоочной жидкости нативной культуры бифидобактерий за 5 дней до заражения и в течение 5 дней после заражения		10	4	6,3 (4 – 9)	Общее количество	$(6,1 \pm 0,6) \times 10^9$	$(1,6 \pm 0,5) \times 10^5$
						Бифидобактерии	$(6,2 \pm 0,7) \times 10^6$	$(1,3 \pm 0,4) \times 10^4$
						Лактобактерии	$(3,0 \pm 0,5) \times 10^8$	$(1,8 \pm 0,6) \times 10^4$
						Эшерихии	$(1,9 \pm 0,7) \times 10^4$	$(1,2 \pm 0,5) \times 10^2$
8	Введение per os надосадоочной жидкости нативной культуры лактобактерий за 5 дней до заражения и в течение 5 дней после заражения		10	0	–	Общее количество	$(6,5 \pm 0,5) \times 10^9$	$(1,0 \pm 0,4) \times 10^1$
						Бифидобактерии	$(6,4 \pm 0,6) \times 10^6$	$(8,1 \pm 0,6) \times 10^9$
						Лактобактерии	$(2,8 \pm 0,7) \times 10^8$	$(6,8 \pm 0,7) \times 10^7$
						Эшерихии	$(2,0 \pm 0,5) \times 10^4$	$(5,3 \pm 0,6) \times 10^8$
								$(1,5 \pm 0,5) \times 10^4$

В таблице приведены результаты определения содержания живых бактерий, выделенных из кишечного содержимого погибших животных в группе 1 (контроль); в группе 7 (опыт); в числителе – содержание живых бактерий на 21-е сутки эксперимента, в знаменателе – на день гибели. От всех павших в опыте животных из внутренних органов была выделена чистая культура возбудителя псевдотуберкулеза

$3,7 \cdot 10^5$ раз, бифидобактерий – в $5,9 \cdot 10^4$ раз, лактобактерий – в $2,2 \cdot 10^6$ раз, эшерихий – в $1,4 \cdot 10^3$ раз.

Данные бактериологического исследования фекалий павших животных свидетельствуют о преобладании бактерий псевдотуберкулеза в кишечном содержимом при одновременном резком снижении как общего количества собственной кишечной микрофлоры, так и отдельных ее представителей – бифидобактерий, лактобактерий и эшерихий, что характерно для глубоких дисбиотических изменений в микробном сообществе кишечного содержимого подопытных животных.

В седьмой опытной группе также зафиксирована гибель 4 из 10 инфицированных возбудителем псевдотуберкулеза животных на 4–9-е сутки от начала инфицирования. От всех четырех павших животных, как и от животных контрольной группы, была выделена чистая культура псевдотуберкулезного микроба. При бактериологическом исследовании фекалий от павших животных выявлены, как и в случае павших животных контрольной группы, глубокие дисбиотические изменения кишечной микрофлоры.

У выживших после инфицирования псевдотуберкулезным микробом животных седьмой опытной группы в фекалиях псевдотуберкулезный микроб выявлен не был, однако были выявлены явные количественные изменения кишечной микрофлоры. Так, общее количество микробов в 1 г фекалий снизилось в $3,8 \cdot 10^4$ раз, бифидобактерий – в $3,4 \cdot 10^2$ раз, лактобактерий – в $1,3 \cdot 10^4$ раз, эшерихий – в $1,2 \cdot 10^2$ раз. Полученные результаты бактериологического изучения фекалий павших и выживших после инфицирования животных седьмой группы позволяют констатировать наличие определенной протективной эффективности вводимой животным перорально надосадочной жидкости нативной культуры бифидобактерий штамма *B. bifidum* 1.

Внутримышечное введение инфицированным возбудителем псевдотуберкулеза животным гентамицина как при профилактическом, так и при лечебном курсе (вторая и третья группа животных) полностью предотвратило развитие инфекционного процесса. При этом в фекалиях выживших животных было выявлено довольно существенное снижение как общего содержания нормальной кишечной микрофлоры (в $3,0 \cdot 10^4$ и $2,5 \cdot 10^3$ раз у животных второй и третьей групп соответственно), так и бифидобактерий, лактобактерий и эшерихий.

Пребиотик «Стимбифид», вводимый перорально в соответствующих дозах как до инфицирования белых мышей иерсиниями псевдотуберкулеза (четвертая группа животных) так и после инфицирования (пятая и шестая группы животных) с последующим пролонгированием перорального вве-

дения пребиотика «Стимбифид» в течение 5 дней, полностью предотвратил размножение псевдотуберкулезного микроба в организме инфицированных животных и, соответственно, их гибель.

Важно при этом отметить, что при бактериологическом исследовании фекалий животных не было обнаружено дисбиотических изменений микрофлоры кишечника, а количество бифидобактерий даже возросло.

Надосадочная жидкость нативной культуры лактобактерий штамма *L. plantarum* 8P-A3, вводимая белым мышам 8 группы *per os* за 5 дней до заражения и еще в течение 5 дней после заражения культурой *Y. pseudotuberculosis* 147, обеспечила купирование инфекционного процесса, предотвращение гибели животных и развитие дисбактериоза кишечника.

По данным Г.П. Сомова и соавт. [9], для манифестной формы псевдотуберкулеза характерно многообразие симптомов, что является свидетельством вовлечения в патологический процесс различных органов и систем уже в первые дни заболевания. Поражения пищеварительного тракта часто являются ведущими признаками болезни, которые отмечаются практически у половины больных [23].

Одним из важнейших этапов псевдотуберкулеза как инфекционного заболевания является колонизация слизистых оболочек [9, 10, 16]. При этом весьма характерно для псевдотуберкулезного микроба то, что его внеорганизменные популяции обладают адгезивными и инвазивными свойствами. Скорость реализации инвазивного потенциала возбудителя псевдотуберкулеза играет определяющую роль при взаимодействии с организмом хозяина, а в дальнейшем – в проникновении через слизистые оболочки во внутреннюю среду чувствительного организма [9, 16].

Таким образом, предотвращение колонизации слизистых оболочек желудочно-кишечного тракта чувствительного организма бактериями псевдотуберкулезного микроба будет во многом способствовать недопущению быстрого его проникновения в кровяное русло и в последующем диссеминации во внутренние органы. Поэтому исход болезни во многом может зависеть от этой первой стадии инфекционного процесса [9].

При пероральном пути поступления возбудителя, естественном для псевдотуберкулеза, довольно быстро развивается генерализация инфекции, что подтверждено выделением из крови врача В.А. Знаменского культуры псевдотуберкулезного микроба в опыте по самозаражению [15]. Конкуренция возбудителя псевдотуберкулеза с микробами естественной микрофлоры кишечника с неизбежностью приводит к развитию выраженного дисбактериоза.

Представленные в таблице результаты это подтверждают: бактериологическое изучение кишечного содержимого белых мышей, погибших в результате перорального инфицирования возбудителем псевдотуберкулеза, выявило обильное накопление бактерий *Y. pseudotuberculosis* при значительном снижении общего количества кишечной микрофлоры и отдельных ее представителей.

Гентамицин, вводимый внутримышечно инфицированным животным второй и третьей групп в режиме профилактического и лечебного курса, полностью купировал развитие псевдотуберкулеза. Тем не менее, на 21-е сутки эксперимента при бактериологическом изучении фекалий подопытных животных было выявлено значительное снижение общего содержания кишечной микрофлоры и таких ее представителей, как бифидобактерий, лактобактерий и эшерихий. Из фекалий выживших животных ни разу не был выделен псевдотуберкулезный микроб, что свидетельствует в пользу отсутствия генерализации инфекции при лечении инфицированных животных гентамицином.

Пребиотик «Стимбифид» не является антибактериальным препаратом, как гентамицин, но тоже предотвращает генерализацию псевдотуберкулезной инфекции как при профилактическом курсе (четвертая и пятая группы животных), так и при лечебном курсе (шестая группа животных). С учетом различия механизмов антибактериального действия, можно предположить, что в случае пребиотика «Стимбифид» имеет место многонаправленность действия пребиотика на псевдотуберкулезный микроб [17, 24], в частности, создание приоритетных условий для размножения индигенных бифидобактерий, а также лактобактерий и эшерихий; угнетение роста патогенной микрофлоры и вытеснение ее из организма; повышенная скорость восстановления индивидуальной микрофлоры кишечника; стабилизация барьерных свойств слизистой оболочки кишечника; выраженное влияние на иммунную систему и повышение фагоцитарной активности клеток печени, способствующей защите ее от инфекционного агента [24].

Эти и, возможно, другие составляющие антибактериальной активности пребиотика «Стимбифид» в отношении возбудителя псевдотуберкулеза повысили колонизационную резистентность слизистой оболочки кишечника подопытных животных и предотвратили адгезию и колонизацию иерсиний псевдотуберкулеза, разрушение барьеров слизистой оболочки кишечника, проникновение в кровяное русло и диссеминацию по всему организму. Важно при этом отметить сохранение микробиологического статуса собственной кишечной микрофлоры у животных опытных групп, получавших пер ос пребиотик «Стимбифид».

Весьма интересен результат, полученный при инфицировании псевдотуберкулезным микробом белых мышей восьмой опытной группы, которым перорально вводили в течение 5 дней до и после инфицирования надосадочную жидкость нативной культуры лактобактерий штамма *L. plantarum* 8P-A3. Как и в случае введения инфицированным животным пребиотика «Стимбифид», выявлен защитный эффект от перорального введения надосадочной жидкости нативной культуры лактобактерий: ни одно из инфицированных возбудителем псевдотуберкулеза животных не погибло и, кроме того, у них не развился дисбактериоз кишечника.

Несколько иначе развивался инфекционный процесс в седьмой группе животных, инфицированных бактериями *Y. pseudotuberculosis* 147. Несмотря на пероральное введение животным надосадочной жидкости нативной культуры бифидобактерий штамма *B. bifidum* 1 до и после заражения возбудителем псевдотуберкулеза, была зафиксирована гибель 4 из 10 подопытных животных, что является свидетельством генерализации у них инфекционного процесса. От погибших животных была выделена чистая культура псевдотуберкулезного микроба при одновременном развитии выраженных дисбиотических изменений в микробном сообществе кишечника. Бактериологическое изучение фекалий 6 выживших животных седьмой опытной группы не выявило бактерий псевдотуберкулеза, однако снижение общего количества кишечной микрофлоры, равно как и бифидобактерий, лактобактерий и эшерихий, свидетельствует в пользу имевшего место выраженного дисбактериоза кишечника.

Впервые выявленный на экспериментальных животных протективный эффект пребиотика «Стимбифид», предотвращающий развитие генерализованной псевдотуберкулезной инфекции, а также аналогичные эффекты экзометаболитов надосадочной жидкости нативных культур лактобактерий *L. plantarum* 8P-A3 и в меньшей степени бифидобактерий *B. bifidum* 1, были вполне ожидаемы.

В выполненных нами ранее исследованиях [25] с использованием конвенциональных белых мышей с экспериментальным антибиотико-ассоциированным дисбактериозом впервые было установлено, что основной вклад в эффективность пробиотических препаратов вносят продукты жизнедеятельности пробиотических микроорганизмов — экзометаболиты, а микробные клетки, их продуцирующие, не участвуют в восстановлении микробиоценоза кишечника.

Таким образом, представленные экспериментальные данные свидетельствуют о высокой эффективности полученных из нативных культур пробиотических микроорганизмов экзометаболи-

тов надосадочной жидкости, обладающих, как и пребиотик «Стимбифид», способностью предотвращать развитие инфекционного процесса в кишечнике бактериями псевдотуберкулеза. Общим в их механизме действия является селективная стимуляция роста и функциональной активности индигенной микрофлоры, а в случае использования экзосометаболитов — возможное дополнительное наличие в их составе антимикробных веществ (антибиотиков, бактериоцинов и других низкомолекулярных биоактивных субстанций [26]).

Следовательно, на сегодняшний день появилось достаточно оснований считать необходимым и возможным развитие уникальных технологий выделения из бесклеточных фильтратов или супернатантов биологически активных экзосометаболитов, перспективных для создания на их основе не только высокоэффективных средств коррекции нарушений кишечной микрофлоры, но и, возможно, нового класса лекарственных препаратов, предназначенных для лечения и профилактики заболеваний желудочно-кишечного тракта инфекционной природы.

Становление и развитие данных технологий напрямую будет связано с поиском и выделением штаммов-продуцентов биологически активных экзосометаболитов и их всесторонним изучением, конструированием недорогих питательных сред и подбором условий для выращивания штаммов-продуцентов, разработкой высокоэффективных изоляционных методов, позволяющих выделять микробные экзосометаболиты в количествах, достаточных для создания на их основе биологически активных химических соединений с целью проведения лабораторных и клинических испытаний.

Выводы

1. В экспериментах на конвенциональных белых мышах изучена возможность предотвращения развития псевдотуберкулеза и дисбиотических изменений в кишечнике при пероральном введении животным бактерий штамма *Y. pseudotuberculosis* 147 путем повышения колонизационной резистентности слизистой оболочки кишечника.

2. Получены нативные культуры пробиотических бифидобактерий и лактобактерий (жидкие пробиотические комплексы) с концентрацией $8,6 \cdot 10^8$ КОЕ·мл⁻¹ и $2,8 \cdot 10^9$ КОЕ·мл⁻¹ соответственно, использованные с пребиотиком «Стимбифид» для сравнительной оценки антибактериальной активности против псевдотуберкулезного микроба как самих нативных культур, так и надосадочных жидкостей, освобожденных центрифугированием от клеток бифидобактерий и лактобактерий, а также для оценки возможности предотвращения развития дисбактериоза кишечника.

3. Впервые в прямых опытах на конвенциональных белых мышах установлена протективная эффективность пребиотика «Стимбифид» и надосадочной жидкости нативной культуры пробиотических лактобактерий *L. plantarum* 8P-A3, содержащей микробные экзосометаболиты, при пероральном заражении подопытных животных возбудителем псевдотуберкулеза *Y. pseudotuberculosis* 147 в дозе 10LD₅₀. У выживших животных на 21-е сутки эксперимента при бактериологическом изучении фекалий не обнаружено дисбиотических нарушений желудочно-кишечного тракта.

4. Повышение колонизационной резистентности слизистой оболочки кишечника конвенциональных белых мышей под влиянием пребиотика «Стимбифид» и микробных экзосометаболитов, содержащихся в надосадочной жидкости нативной культуры пробиотических лактобактерий *L. plantarum* 8P-A3, является научной основой нового подхода в лечении заболеваний желудочно-кишечного тракта инфекционной природы, основывающегося на избирательном стимулирующем влиянии на рост и активацию метаболической активности индигенной кишечной микрофлоры.

Литература

1. Воробьев, А.А. Дисбактериозы — актуальная проблема медицины / А.А. Воробьев [и др.] // Вестн. РАМН. — 1997. — № 3. — С. 4–7.
2. Бондаренко, В.М. Микроэкологические изменения кишечника и их коррекция с помощью лечебно-профилактических препаратов / В.М. Бондаренко [и др.] // Журн. гастроэнтерол. гепатол. колопрокт. — 2003. — № 4, приложение 20. — С. 66–76.
3. Воробьев, А.А. Микроэкологические нарушения при клинической патологии и их коррекция бифидосодержащими пробиотиками / А.А. Воробьев, В.М. Бондаренко, Е.А. Лыкова // Вестн. РАМН. — 2004. — № 2. — С. 13–17.
4. Ардатская, М.Д. Дисбактериоз кишечника: понятие, диагностика, принципы лечебной коррекции / М.Д. Ардатская // Consilium ruedicum. — 2008. — № 10 (8). — С. 86–92.
5. Ардатская, М.Д. Эффективность фруктоолиго- и фруктополисахаридов в коррекции и профилактике нарушений микробиоценоза кишечника / М.Д. Ардатская [и др.] // Крелевская медицина. Клинический вестник. — 2011. — № 3. — С. 59–66.
6. Грачева, Н.М. Фруктоолигосахариды и фруктополисахариды в комплексном лечении больных желудочно-кишечными заболеваниями с явлениями дисбактериоза кишечника / Н.М. Грачева [и др.] // Инф. болезни. — 2010. — № 8 (1). — С. 107–111.
7. Чичерин, И.Ю. Исследование влияния больших доз пробиотика Бифидумбактерин и микроорганизмов аутофлоры кишечника на организм белых мышей и показатели клеточного иммунитета / И.Ю. Чичерин [и др.]. — <http://gastroportal.ru/files/mikroflora.pdf>
8. Ющук, Н.Д. Иерсиниозы / Н.Д. Ющук, Ю.Я. Венгеров // Лекции по инфекционным болезням. В 2 томах. — 2-е изд., перераб. и доп. — М.: ВУНМЦ, 1999. — Т. 1. — 454 с.
9. Сомов, Г.П. Псевдотуберкулез / Г.П. Сомов [и др.]. — 2-е изд., перераб. и доп. — М.: Медицина, 2001. — 256 с.

10. Ющук, Н.Д. Иерсиниозы / Н.Д. Ющук [и др.]. — М.: Медицина, 2003. — 208 с.
11. Маракулин, И.В. Экспериментальная модель псевдотуберкулезной инфекции у обезьян / И.В. Маракулин [и др.] // Бюл. эксп. биол. и мед. — 1994. — № 118 (7). — С. 59—62.
12. Дармов, И.В. Профилактика экспериментальной псевдотуберкулезной инфекции с помощью иммунизации поринном из *Yersinia pseudotuberculosis* / И.В. Дармов [и др.] // Бюл. эксп. биол. и мед. — 1999. — № 127 (2). — С. 221—223.
13. Погорельский, И.П. Оценка протективной эффективности секреторных антител при экспериментальной иерсиниозной инфекции у морских свинок, иммунизированных поливалентной противоиерсиниозной вакциной / И.П. Погорельский, В.И. Дробков // Патол. физиол. и эксп. терапия. — 2009. — № 4. — С. 26—29.
14. Сазанов, Н.С. Псевдотуберкулез / Н.С. Сазанов. — Киев: Здоров'я, 1984. — 120 с.
15. Знаменский, В.А. Этиология дальневосточной скарлатиноподобной лихорадки / В.А. Знаменский, А.К. Вишняков // Журн. микробиол. — 1967. — № 2. — С. 125—130.
16. Ценева, Г.Я. Характеристика инвазивности возбудителя псевдотуберкулеза / Г.Я. Ценева [и др.] // Журн. микробиол. — 1984. — № 5. — С. 26—30.
17. Глушанова, Н.А. Взаимоотношения пробиотических и индигенных лактобацилл хозяина в условиях совместного культивирования *in vitro* / Н.А. Глушанова, Б.А. Шендеров // Журн. микробиол. — 2005. — № 2. — С. 56—61.
18. Грачева, Н.М. Сравнительная оценка клинико-лабораторной эффективности современных про- и пребиотических препаратов в коррекции дисбиотических нарушений желудочно-кишечного тракта: отчет о клинико-лабораторном исследовании / Н.М. Грачева [и др.]. — М.: Московский НИИЭМ им. Г.Н. Габричевского, 2010. — 23 с.
19. Лихачева, А.Ю. Современное состояние вопроса таксономии бактерий рода *Lactobacillus* / А.Ю. Лихачева, В.М. Бондаренко, К.Я. Соколова // Журн. микробиол. — 1992. — № 9—10. — С. 74—78.
20. Иванов, В.П. Совершенствование методов диагностики дисбактериоза толстого кишечника : информационное письмо / В.П. Иванов [и др.]. — СПб: Центр Госсанэпиднадзора, 2002. — 31 с.
21. Ашмарин, И.П. Статистические методы в микробиологических исследованиях / И.П. Ашмарин, А.А. Воробьев. — Л.: Медгиз, 1962. — 280 с.
22. Jorgensen, J.H. Susceptibility test methods: dilution and disk diffusion methods. Manual of clinical microbiology / J.H. Jorgensen, J.D. Turnidge. — Washington: 9th-ed ASM Press, 2007. — P. 1152—1172.
23. Борисова, М.А. Клиника иерсиниозов / М.А. Борисова. — Владивосток: Изд-во ДВГУ, 1991. — 197 с.
24. Грачева, Н.М. Клиническое изучение БАД Стимбифид; клинический отчет Московского НИИ микробиологии и эпидемиологии им. Г.Н. Габричевского и инфекционной клинической больницы № 1 г. Москвы / Н.М. Грачева [и др.]. — М.: Московский НИИЭМ им. Г.Н. Габричевского, 2010. — 12 с.
25. Чичерин И.Ю. Пробиотики: вектор развития / И.Ю. Чичерин [и др.] // Практическая медицина. — 2012. — № 3 (58). — С. 180—188.
26. Shenderov, B.A. Probiotic (symbiotic) languages / B.A. Shenderov // Anaerobe. — 2012. — № 17. — P. 490—495.

Авторский коллектив:

Чичерин Игорь Юрьевич — президент научного общества «Микробиота», к.м.н.; тел. 8(496) 547-53-00; e-mail: gpatron@mail.ru;

Погорельский Иван Петрович — профессор кафедры микробиологии биологического факультета Вятского государственного университета, д.м.н.; тел. (8332) 32-16-50; e-mail: ipogorelsky@inbox.ru;

Лундовских Ирина Александровна — доцент кафедры микробиологии биологического факультета Вятского государственного университета, к.х.н., доцент; тел. (8332) 32-16-50; e-mail: lundovskih@vyatsu.ru;

Дармов Илья Владимирович — заведующий кафедрой микробиологии биологического факультета Вятского государственного университета, д.м.н., профессор; тел. (8332) 32-16-50; e-mail: kaf_mb@vyatsu.ru;

Маракулин Игорь Вагимович — профессор кафедры микробиологии биологического факультета Вятского государственного университета, д.м.н.; тел. (8332) 32-16-50; e-mail: kaf_mb@vyatsu.ru.