

УДК: 579.861.1Lactobacillum:578.81]:616.34-052

ОТДЕЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ЛАКТОБАЦИЛЛ И УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ, ИЗОЛИРОВАННЫХ ОТ ЛИЦ С НАРУШЕНИЯМИ КИШЕЧНОЙ МИКРОБИОТЫ

Е.Ф. Завгородняя

ФБУН Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, г. Хабаровск, Российская Федерация

В работе отражены отдельные вопросы механизма действия пробиотических препаратов, в том числе и лактосодержащих, а также возможные проблемы снижения эффективности этих препаратов. Установлено, что из всех использованных в эксперименте пробиотических лактобацилл наибольшую антагонистическую активность по отношению к условно-патогенным бактериям проявлял штамм Lactobacillus 317/402. Показано, что для подбора лактосодержащего пробиотика конкретному пациенту желательно предварительно определить антагонистическую активность пробиотического штамма по отношению к УПБ этого пациента.

Ключевые слова: лактобациллы, условно-патогенные бактерии, антагонистическая активность пробиотических лактобацилл

SOME ISSUES ON PROBIOTIC LACTOBACILLI AND OPPORTUNISTIC BACTERIA INTERACTIONS THAT WERE ISOLATED FROM PEOPLE WITH GUT MICROBIOTA ABNORMALITIES

E.F. Zavgorodnyaya

FBIS Khabarovsk scientific research institute of epidemiology and microbiology of the Federal Service for surveillance on consumers rights protection and human wellbeing (Rospotrebnadzor), Khabarovsk, Russian Federation

The research paper presents isolated issues on probiotic drugs mechanism of action including medications containing lactobacilli as well as potential challenges concerning decline in efficiency of these drugs. It was specified that among all used probiotic lactobacilli in the current study Lactobacillus 317/402 strain showed the highest antagonistic activity towards opportunistic bacteria. Should be noted that in order to select a lactobacilli containing prebiotic drug it is recommended to specify the antagonistic activity of the probiotic strain against opportunistic bacteria of the current patient.

Key words: lactobacilli, opportunistic bacteria, antagonistic activity of probiotic lactobacilli

Введение

В наше время трудно найти область медицины, где бы не применялись пробиотики. Они получили широкое распространение в терапии, хирургии, педиатрии, гинекологии, дерматологии, заболеваниях желудочно-кишечного тракта, инфекционных болезнях, косметологии, космической медицине и др. Широкое использование этих препаратов во многом связано с их высокой эффективностью, отсутствием побочных эффектов и противопоказаний к применению.

Механизм действия пробиотических препаратов разнообразен. Образую в кишечнике человека защитную пленку, эти препараты препятствуют проникновению в организм патогенных и условно-патогенных бактерий (УПБ) и тем самым спасают от многих инфекционных заболеваний, осуществляя антагонистическое действие.

Пробиотики продуцируют ряд витаминов (В₁, В₂, В₆, В₁₂, РР, К, синтезируют пантотеновую и фолиевую кислоты и др.), оказывают иммуномодулирующее и иммунопротективное действие, обеспечивают противовоспалительное и антиинфекционное действие.

Пробиотические препараты способствуют повышению неспецифической резистентности макроорганизма, поэтому могут использоваться как иммуномодуляторы и адаптогены.

Они обладают пребиотическим эффектом, возможный механизм которого связан с действием погибших в верхних отделах желудочно-кишечного тракта экзогенных бактерий-пробиотиков и фер-

ментов их клеток, которые при достижении толстого кишечника становятся пищевым субстратом для собственной микрофлоры, стимулируя ее рост [6,8].

Пробиотики снижают уровень холестерина в крови, а также обладают антиканцерогенным и антирадикальным действием (особенно штамм лактобацилл 317/402) - [7].

В условиях эксперимента на животных и клеточных культурах установлено, что пробиотические микроорганизмы, в том числе и лактобациллы, предотвращают трансформацию нормальных клеток в опухолевые, оказывают антиоксидантные и антигенотоксические эффекты. Все эти препараты могут применяться как с лечебной, так и профилактической целью. В этом плане они могут быть использованы для снижения риска возникновения заболевания и повышения устойчивости организма к различным факторам риска [16].

Антагонистическая активность лактобацилл, в том числе пробиотических, изучалась рядом исследователей [1,2,3,9,12,15]. Эта тематика стала особенно актуальной при разработке, испытаниях и применении новых препаратов на основе лактобацилл [4,5,6,9,14].

Механизм антагонистического действия лактосодержащих пробиотиков связан со многими факторами: конкуренцией за рецепторы, образованием вместе с другими представителями нормальной микрофлоры кишечника защитной биопленки, обладающей выраженной устойчивостью к действию патогенных и УПБ. Лактобациллы вместе с бифидобактериями и другими представителями нормальной микрофлоры, благодаря антагонистической активности, выполняют в микробиоценозах человека колонизационную функцию. Для проявления антагонистического действия лактобацилл очень важно их селективное преобладание в микробиоте, а также способность вырабатывать молочную кислоту, перекись водорода, лизоцим, бактериоцины, микроцины и др. Так, установлено, что большинство изученных штаммов лактобацилл продуцируют микроцины с широким спектром антагонистического действия в отношении как патогенных, так и УПБ. Кроме того, среди них есть штаммы, устойчивые к физиологическим концентрациям соляной кислоты желудочного сока, в связи с чем они могут быть использованы для создания новых лактосодержащих пробиотиков [13].

В настоящее время все больше исследователей считают, что в лечебной практике антибиотикотерапия обязательно должна сочетаться с использованием препаратов, нормализующих микрофлору и сводящих до минимума неблагоприятное воздействие антибиотиков, что способствует лучшему эффекту лечения основного заболевания, снижает частоту обострений и т.д. [6,8]

Многие исследователи полагают, что имеющиеся на отечественном и мировом рынке традиционные пробиотики являются лишь первым поколением средств коррекции микробиологических нарушений. В настоящее время проводятся работы по созданию безмикробных микробиологических средств (структурные компоненты, а также сигнальные и метаболические молекулы пробиотических штаммов), имеющих значительное преимущество перед традиционными пробиотиками [16]. Усилились исследования по изучению антагонистических свойств новых штаммов лактобацилл [7,9,14].

В организме человека на приживаемость и активность пробиотического штамма влияют многие факторы. При этом именно ассоциативные штаммы биоценоза определяют как возможность, так и степень выраженности продукции антимикробных веществ активными штаммами. Новые факты свидетельствуют о том, что пробиотические штаммы могут вступать с патогенными и УПБ человека в сложные взаимоотношения, что и определяет лечебный эффект препарата [10].

Некоторые исследователи при выборе лактосодержащего пробиотика, помимо вышеизложенного, предлагают в комплексе мероприятий изучать антагонистическую активность пробиотика к собственным лактобациллам, а также условно-патогенной микрофлоре человека [11].

Мы считаем, что на сегодняшний день для практических микробиологических лабораторий едва ли приемлемо изучение всего спектра взаимоотношений штамма-пробиотика и микрофлоры хозяина, однако определение степени антагонистической активности пробиотика к УПБ весьма важно.

В последние годы многие практикующие врачи стали отмечать снижение эффективности от применения лактосодержащего пробиотика Лактобактерин [4,5]. Мы предположили, что кроме нарушения сроков хранения или температурного режима при транспортировке препарата, одной из возможных причин этого явления может быть снижение антагонистической активности штамма-пробиотика по отношению к УПБ, циркулирующим у лиц с дисбиотическими нарушениями кишечника.

Цель исследования

В связи с вышеизложенным мы поставили перед собой цель – изучить антагонистическую активность и степень ее выраженности трех пробиотических штаммов из группы лактосодержащих препаратов по отношению к УПБ, выделенным от жителей г. Хабаровска, для определения целесообразности их лечебного или профилактического применения. Выбор этих препаратов был связан с тем, что в соответствии с литературными данными [9,12], именно они должны оказывать выраженное антагонистическое действие на *S.aureus* и *Klebsiella pneumoniae*, которые наиболее часто изолируются у лиц с дисбиотическими нарушениями кишечника, особенно у детей. Кроме того, значительный процент циркуляции фагорезистентных штаммов среди этих микроорганизмов ограничивает возможности широкого использования для лечения и профилактики соответствующих бактериофагов. Поэтому во-

прос об антагонистической активности лактосодержащих пробиотиков по отношению к местным штаммам УПБ является актуальным.

Материалы и методы исследования

В работе были использованы три штамма пробиотических лактобацилл: (*Lactobacillus plantarum* – Лактобактерин, «Микроген», Пермь; *Lactobacillus* 317/402 – «Наринэ», ООО «Фермент, Петрово-Дальнее; *Lactobacillus acidophilus* -Аципол, ЗАО «ЛЕККО»).

Исследования были проведены на штаммах УПБ, изолированных из проб фекалий лиц с дисбиотическими нарушениями кишечника, обращавшихся в ФБУН «Институт эпидемиологии и микробиологии» Роспотребнадзора г. Хабаровска для микробиологической диагностики. В их число входили 470 штаммов, в том числе 103 штамма *Klebsiella pneumoniae*, 81 – *Klebsiella oxytoca*, 89 – *S.aureus*, 43 – *E.coli* (гем+), 78 – *E.coli* (лак-), 41 – *Citrobacter* spp., 17 – *Enterobacter* spp. и 18 – *Proteus* spp.

Антагонистическая активность пробиотических штаммов определялась методом отсроченного антагонизма с использованием двухслойного агара: нижний слой составляла среда MRS (Hi Media, Индия), на поверхность которого засеивали штрихом суточную или двухсуточную культуру необходимого для опыта штамма пробиотических лактобацилл и инкубировали при 37° 24 часа в условиях аэробноаэробно (штамм *L.plantarum*) и при такой же температуре, но при микроаэрофильных условиях (штаммы *L.317/402* и *L.acidophilus*) – 48 час. После этого на нижний слой наслаивали расплавленный и остуженный 1,3% МПА, на поверхность которого после застывания и подсушивания перпендикулярно росту лактобацилл штрихом засеивали взятые в опыт УПБ. Учет проводили спустя 24 часа инкубации при 37° в обычном режиме. Учитывали размер зоны задержки роста УПБ от края роста пробиотических лактобацилл. При этом штаммы пробиотических лактобацилл считались высокоактивными при зоне задержки роста УПБ 20 – 25 мм и выше, умеренно активными – при зоне 15 -20 мм и слабо активными – при зоне менее 15 мм

Статистический анализ проводился по обычным методикам с использованием *t* –критерия Стьюдента.

Результаты

Анализ результатов антагонистического действия *L.plantarum* на УПБ установил, что этот штамм проявлял наиболее высокую активность к *Enterobacter* spp, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter* spp. и *Klebsiella pneumoniae* (29,4; 27,2; 26,8 и 23,3% соответственно). В среднем высокий уровень антагонистической активности у этого штамма наблюдался по отношению к 21,7% УПБ.

Средний уровень антагонистического действия наиболее часто встречался по отношению к роду *Proteus*, *S.aureus* и *E.coli* (гем+) - 50,0; 35,9 и 32,5% соответственно. В среднем показатель распространенности УПБ, к которым пробиотик проявлял среднее антагонистическое воздействие составил 28,9%.

Слабое антагонистическое действие наиболее часто регистрировалось по отношению к *E.coli* (лак -) - 60,2%, а в среднем показатель слабого антагонистического действия в группе УПБ составил 49,4%.

Таким образом, выявлен широкий разброс показателей выраженности антагонистической активности пробиотического штамма *L.plantarum* с преобладанием низкой степени по отношению к УПБ и наиболее часто изолируемым от лиц с дисбиотическими нарушениями кишечника ($p < 0,001$).

Изучение антагонистической активности и степени ее выраженности штамма *L. acidophilus* к УПБ выявило, что высокая степень активности проявлялась по отношению к 35,3% *Enterobacter* spp., 25,9% - *Klebsiella oxytoca*, 24,4% - *Citrobacter* spp., 24,3% - *Klebsiella pneumoniae*. В среднем высокий уровень антагонизма этого штамма был установлен по отношению к 22,1% УПБ. Следует отметить, что эти результаты близки к показателям, зарегистрированным у пробиотического штамма *L.plantarum*.

Средний уровень антагонистического действия у этого штамма зарегистрирован по отношению к 28,7% УПБ и фактически идентичен штамму *L.plantarum* (28,9%) – $p < 0,001$. Наиболее выражена частота распространенности такого уровня антагонизма по отношению к *Proteus* spp. – 55,6%, *E.coli* (гем+) -34,9%, *S.aureus* – 37,1 и *Citrobacter* spp. – 29,3%.

Распространенность УПБ, к которым штамм *L.acidophilus* проявлял низкую активность, составил 49,2% что также приближается к данным штамма *L.plantarum* (49,4%) с наиболее высокими уровнями у *E.coli* (лак-) – 62,9%, *Klebsiella oxytoca* - 53,1% и *E.coli* (гем+) – 48,8 %. Результаты, полученные при определении уровня антагонистической активности этого штамма лактобацилл по отношению к тем же УПБ, значительно отличались от других пробиотических штаммов, взятых в исследование. Прежде всего, это более значительные показатели распространенности штаммов УПБ, к которым лактобациллы «Наринэ» проявляли статистически значимую антагонистическую активность – 35,5%, что превышает показатели как штамма *L.plantarum* ($p < 0,001$), так и *L.acidophilus* ($p < 0,001$).

Наиболее высокую антагонистическую активность эти штаммы лактобацилл проявляли к *Klebsiella oxytoca* (50,6%), *Enterobacter* spp. (47,1%) и *Klebsiella pneumoniae* (35,9%).

Средний уровень антагонистической активности данного штамма наиболее часто регистрировался по отношению к *E.coli* (гем+) – 46,5%, *Proteus* spp. – 44,4% и *S.aureus* – 42,7%.

Низкий уровень антагонистической активности чаще всего обнаруживался по отношению к *Citrobacter* spp. (41,4%).

В общем, для штамма L.317/402, как и для двух других, также характерен значительный разброс антагонистического действия по отношению к применяемым в этой работе УПБ. Однако, слабое антагонистическое действие этот штамм проявлял к значительно меньшему числу УПБ, чем другие лактобациллы.

Указанный пробиотический штамм, как и два других, не ингибировал роста грибов рода *Candida*, которые в большинстве случаев росли в зонах действия этих лактобацилл.

Выводы

1. Установлено, что все три штамма лактобацилл, взятых в опыт, обладали различной степенью выраженности антагонистического воздействия на УПБ, циркулирующие у пациентов с дисбиотическими нарушениями кишечника.

2. Наиболее выраженное антагонистическое действие по отношению к большинству УПБ проявлял штамм L. 317/402 («Наринэ»). В связи с этим обстоятельством указанный штамм может быть рекомендован для создания на его основе или на основе его компонентов пробиотического препарата или даже метабиотика (сейчас на его основе несколько фирм в России и Армении производят биологически активные добавки).

3. У большинства штаммов УПБ выявлено преобладание слабой степени чувствительности к использованному в опыте пробиотическим лактобациллам.

4. В связи с тем, что все три штамма пробиотических лактобацилл не ингибировали роста грибов рода *Candida*, лактосодержащие пробиотики не следует включать в лечебные или профилактические схемы при наличии в биотопах пациентов этих грибов.

5. При микробиологическом исследовании проб содержимого кишечника на выявление дисбактериоза необходимо определять не только популяционный уровень лактобацилл, но также антагонистическую активность планируемого к употреблению пробиотического штамма по отношению к выделенным УПБ. В дальнейшем при ее высоком или среднем уровне следует рекомендовать этот пробиотик к применению, что должно привести к быстрой элиминации УПБ из организма и тем самым обеспечить более качественное лечение или профилактику.

Литература

1. Баженов Л.Г., Бондаренко В.М., Лыкова Е.А. и др. Изучение антагонистического действия лактобацилл на *Helicobacter pylori* //Журн. микробиол. -1997. -№3. – С.89-91.

2. Бухарин О.В., Семенов А.В., Черкасов С.В. Характеристика антагонистической активности пробиотических бактерий при их взаимодействии //Клин.микробиол. и антимикроб. химиотерапия.- 2010 –т. 12. -№4. - С.347-352.

3. Гончар Н.В., Березина Л.В., Тихомирова О.В. и др. Выбор пробиотика для рациональной терапии клебсиеллезной инфекции у детей //Журн.микробиол. -2009. - №2. - С.85-89.

4. Глушанова Н.А., Шендеров Б.А. Взаимоотношения пробиотических и индигенных лактобацилл хозяина в условиях совместного культивирования //Журн.микробиол. – 2005. – №2. – С.56-61.

5. Глушанова Н.А., Вербицкая Н.Б., Петров Л.Р. и др. Исследование ауто- изо- и гомоантагонизма пробиотических штаммов лактобацилл // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2005. -№6 (44).- С.138-142.

6. Дисбиоз кишечника.: Руководство по диагностике и лечению / Под.ред. Е.И. Ткаченко, А.Н. Суворова, - С.Петербург, 2009.- 276 с.

7. Карамова Н.С., Хабибулин Р.Э. Антирадикальные свойства *Lactobacillus acidophilus* N.V. Ер 317/402 in vitro. / Бюллетень Казанского технологического университета. 2013.-№14.-С.127-129 .

8. Киселев С.А., Чичерин Д.С. Пробиотики: новый подход к механизму терапевтического действия при лечении дисбактериоза кишечника //Клиническое питание. - 2007.- 31-2. С.А 44.

9. Мищенко В.А. Изучение антагонистических свойств новых штаммов лактобацилл //Молодой ученый. - 2017. -№ 16. –С.1 10-13

10. Рыбальченко О.В., Бондаренко В.М., Вербицкая Ю.Б. Проявления антагонистического действия бактериоциногенных *Lactobacillus acidophyllus* на клетки *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii* и *Proteus mirabilis* //Журн. микробиол.-2009.-№7.-С.8-11.

11. Семенов А.С. Характеристика отношений между пробиотическими и автохтонными микроорганизмами и алгоритм индивидуального подбора пробиотиков //Казанский мед. журн.- 2011, т.92, №6.-С.792-795.
12. Федорова Т.В., Васина Д.В., Бегунова А.В. и др. Антагонистическая активность молочнокислых бактерий *Lactobacillus* в отношении клинических изолятов *Klebsiella pneumoniae* // Прикладная биохимия и микробиология. - 2018. –Т.54, №3. – С.264-276.
13. Червинец Ю.В., Бондаренко В.М., Шабанова Н.А. и др. Бактериоциногенные высокоантагонистические штаммы лактобацилл //Журн. микробиол. – 2006. -№7. –С. 78-82.
14. Чижаева А.В., Дудикова Г.Н. Научный обзор: теоретические и практические аспекты конструирования пробиотических препаратов // Научное обозрение. Биологические науки. -2017. №2. – С.157-166
15. Шабанова Н.А., Гостева В.В., Клицунова Н.В. и др. Влияние метаболитов *Lactobacillus fermentum* на ультраструктуру патогенных эшерихий //Журн.микробиол.-2009.-№2.-С.3-6.
16. Шендеров Б.А. Метабиотики – новая технология профилактики заболеваний, связанных с микробиологическим дисбалансом человека // Вестник восстановительной медицины. -2017. -14(80). – С.40-49.

Сведения об авторах:

Ответственный автор: *Завгородняя Елена Федоровна* – кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории бактериальных инфекций ФБУН Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, тел. (4212)32-88-93,