

## ЗАМЕСТИТЕЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ ПРОБИОТИКОВ: МИФ ИЛИ РЕАЛЬНОСТЬ

Чичерин И.Ю.<sup>1</sup>, Дармов И.В.<sup>2</sup>, Погорельский И.П.<sup>2</sup>, Лундовских И.А.<sup>2</sup>, Гаврилов К.Е.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ООО «МедСтар», Сергиев Посад, Россия (141300, Сергиев Посад, ул. Вознесенская, 55), e-mail: rpatron@mail.ru

<sup>2</sup> ФГБОУ ВПО «Вятский государственный университет», Киров, Россия (610000, Киров, ул. Московская, 36), e-mail: kaf\_mb@vyatsu.ru

### SUBSTITUTION EFFECT OF PROBIOTICS: MYTH OR REALITY

I.Yu. Chicherin<sup>1</sup>, I.V. Darmov<sup>2</sup>, I.P. Pogorelsky<sup>2</sup>, I.A. Lundovskikh<sup>2</sup>, K.E. Gavrilov<sup>2</sup>

<sup>1</sup> LLC «MedStar», Sergiev Posad, Russia (Voznesenskaya st., 55, Sergiev Posad, Russia, 141300), e-mail: rpatron@mail.ru,

<sup>2</sup> Vyatka State University, Kirov, Russia (Moskovskaya st., 36, Kirov, Russia, 610000), e-mail: kaf\_mb@vyatsu.ru

#### РЕЗЮМЕ

Приведены результаты экспериментального изучения приживаемости пробиотических микроорганизмов – гомологичных бифидобактерий и лактобактерий в кишечнике экспериментальных конвенциональных белых мышей с антибиотико-ассоциированным дисбактериозом. В экспериментах использовали культуры бифидобактерий и лактобактерий, выделенные от мышей линии BALB/c, на основе которых были получены устойчивые к рифампицину (Rif<sup>r</sup>) спонтанные мутанты. Приживаемость полученных спонтанных мутантов бифидобактерий и лактобактерий изучена на конвенциональных белых мышцах, в том числе и с антибиотико-ассоциированным дисбактериозом.

Экспериментально установлено, что рифампициноустойчивые мутанты гомопrobiотических бифидобактерий и лактобактерий сохранили видовую принадлежность и наследственно закрепленный признак антибиотико-резистентности. Введенные перорально конвенциональным белым мышам, в том числе с антибиотико-ассоциированным дисбактериозом, Rif<sup>r</sup>-мутанты гомопrobiотических бифидобактерий и лактобактерий не приживаются в кишечнике животных и элиминируются соответственно к 3 и 5 суткам после прекращения перорального введения животным.

Представленные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что при дисбактериозах следует стимулировать восстановление собственной микрофлоры кишечника, а не полагаться только на заместительное действие поступающих извне в кишечник пробиотических микроорганизмов, которые с неизбежностью отторгаются эволюционно сложившейся кишечной микрофлорой.

**Ключевые слова:** гомопrobiотические микроорганизмы, приживаемость в кишечнике, антибиотико-ассоциированный дисбактериоз, элиминация микроорганизмов.

#### ВВЕДЕНИЕ

Поддержание нормального биоценоза человеческого организма, в частности численности и функциональной активности микрофлоры в различных отделах пищеварительного тракта, всецело зависит от нормального фи-

#### SUMMARY

Results of the experimental study of survival rate of probiotic microorganisms – homologous bifidobacteria and lactobacilli – in the intestines of the conventional experimental white mice with antibiotic-associated dysbiosis are presented. Isolated from mice of BALB/c line cultures of bifidobacteria and lactobacilli, based on which the resistant to rifampicin (Rif<sup>r</sup>) spontaneous mutants were obtained, were used in the experiments. The survival rate of spontaneous mutants of bifidobacteria and lactobacilli were studied on the conventional white mice, including those with antibiotic-associated dysbiosis.

It is experimentally found, that the rifampicin-resistant mutants of homoprobiotic bifidobacteria and lactobacilli retained the species identity and hereditarily fixed sign of antibiotic resistance. Administered orally to conventional white mice, including those with antibiotic-associated dysbiosis, Rif<sup>r</sup>-mutants of homoprobiotic bifidobacteria and lactobacilli do not survive in the intestines of animals and are eliminated to 3 and 5 days respectively after the termination of their oral administration to animals.

The experimental data indicate that at dysbacteriosis should stimulate the restoration of one's own intestinal microflora and not rely only on the substitution effect of coming from outside the intestine probiotic microorganisms, which are inevitably rejected by evolutionarily established intestinal microflora.

**Key words:** homoprobiotic microorganisms, survival in the intestine, antibiotic-associated dysbiosis, elimination of microorganisms.

зиологического состояния организма [1, 2]. При этом транзиторные нарушения микробиоценоза кишечника относят к дисбактериальным реакциям, а выраженные и стойкие изменения количественного и качественного состава микроорганизмов – к дисбактериозам [1-4].

Для коррекции и восстановления численности и качественного состава кишечной микрофлоры на протяжении довольно длительного времени особое место отводится пробиотикам – живым микроорганизмам и веществам микробного происхождения, оказывающим при естественном способе введения благоприятные эффекты на физиологические функции, биохимические и поведенческие реакции организма через оптимизацию его микробиологического статуса [1-4].

Одним из основных механизмов действия пробиотиков является заместительная терапия [5], предназначенная для восполнения сниженного уровня соответствующего микроорганизма. По определению Большого медицинского словаря, под заместительным действием понимают введение в организм вещества, естественная выработка которого понижена или прекращена [6].

Таким образом, для того, чтобы заместительная терапия могла реализоваться, необходимо выполнение, как минимум, двух условий. Во-первых, пробиотические микроорганизмы должны достигнуть толстой кишки в жизнеспособном состоянии в количестве, достаточном для преодоления колонизационной резистентности слизистой оболочки кишечника. Во-вторых, они должны прижиться в пристеночном слое (био пленке) и стать составной частью микробиоценоза кишечника.

Бесспорно, что интегративным показателем реализации двух вышеперечисленных условий, т.е. существования заместительной терапии как таковой, должно быть бактериовыделение с калом соответствующего пробиотического микроорганизма после окончания курса пробиотикотерапии.

Представленные в научных публикациях данные свидетельствуют о необходимости и целесообразности включения пробиотиков в схемы лечения большинства заболеваний [7]. Однако, и до настоящего времени не удается решить проблему коррекции дисбиотических нарушений кишечной микрофлоры [1-3].

Более того, в исследованиях Ю.А. Малахова [8] указано на несоответствие между сложившимся мнением об эффективности пробиотиков и всё увеличивающимся распространением дисбактериозов. Положительный эффект пробиотикотерапии даже при длительном применении носит транзиторный характер или полностью отсутствует [3]. Увеличивается количество публикаций о побочных эффектах пробиотикотерапии при назначении больших доз пробиотиков [9]. Отмечается отсутствие убедительных сведений о положительном действии пробиотиков на организм здорового человека [10] и недостаточную изученность механизмов благоприятного влияния пробиотических микроорганизмов [11].

На возможные причины недостаточной эффективности пробиотической коррекции дисбиозов указано в диссертации Н.А. Глушановой [12]. Среди многих причин, приводящих к неприживаемости пробиотиков и их отторжению, автор цитируемой работы отмечает гетерологичность пробиотических бактерий для организма нового хозяина, которая может быть связана с видовыми различиями первичного и нового хозяина пробиотика.

В экспериментах на животных со всей очевидностью установлено, что введение животным микроорганизмов от другого вида животных (гетеропробиотика) приводило к снижению адгезивного потенциала и колонизирующей способности гетеропробиотического микроорганизма, увеличению колонизационной резистентности слизистой кишечника, что приводило к транзиторному характеру взаимодействия вводимого гетеропробиотика с организмом нового хозяина [13]. Существует мнение, подкрепленное эксперименталь-

ными данными, согласно которому пробиотические микроорганизмы должны быть выделены из организма тех видов животных и человека, для которых они будут предназначены [14, 15].

С учетом приведенных данных, а также результатов исследований В.М. Коршунова и др. [16], показавших эффективность аутоштаммов бактерий при химиотерапевтическом дисбактериозе, представляется целесообразным проведение исследования, связанного с выделением гомологичных бифидобактерий и лактобактерий и оценкой их приживаемости в кишечнике экспериментальных животных.

## Цель исследования

Цель настоящего исследования – изучение приживаемости пробиотических микроорганизмов – гомологичных бифидобактерий и лактобактерий в кишечнике экспериментальных белых мышей с антибиотико-ассоциированным дисбактериозом.

## Материалы и методы исследования

В экспериментах использовали культуры бифидобактерий и лактобактерий, выделенные из экскрементов мышей линии BALB/c – лабораторной линии домашних мышей, традиционно используемых в исследованиях по иммунологии и в онкологии [17]. Чистые культуры бифидобактерий и лактобактерий выделяли на плотных питательных средах рекомендованного состава [18, 19] в чашках Петри после инкубации в микроаэрофильных условиях с использованием системы для анаэробного культивирования (анаэро стат) Anaerobic system Mark III-LE003 (HiMedia Laboratories Pvt.». LTD, Mumbai, Индия) с пакетами газогенераторными HiAnaero Gas Pacet.

Количество живых микроорганизмов в суспензиях определяли высевом соответствующих десятикратных серийных разведений исследуемых суспензий на плотные питательные среды в чашках Петри и подсчетом выросших колоний по истечении времени инкубирования.

Селекцию спонтанных мутантов выделенных лактобактерий и бифидобактерий проводили по отработанной методике на плотной питательной среде с рифампицином согласно рекомендациям, изложенным в работе [20], используя антибиотик рифампицин – Ферейн (ЗАО «Брынцалов-А», Россия). Стабильность признака антибиотико-резистентности оценивали, характеризуя популяционный состав мутантов пробиотических микроорганизмов по R-признаку. Электронную микроскопию бифидобактерий и лактобактерий проводили с помощью просвечивающего электронного микроскопа JEOL JEM-1200EX (Япония). Просмотр препаратов после пробоподготовки вели при ускоряющем напряжении 72 кВ.

В исследовании по изучению приживаемости выделенных рифампициностойчивых (Rif<sup>r</sup>-мутантов) бифидобактерий и лактобактерий в пищеварительном тракте животных использовали конвенциональных белых мышей, беспородных, обоего пола, массой 18-20 г, прошедших акклиматизацию в виварии. Антибиотико-ассоциированный дисбактериоз кишечника у белых мышей инициировали путем перорального введения гентамицина (продукция ОАО «Биохимик», Россия) [21].

Статистическую обработку результатов исследования проводили в соответствии с рекомендациями, изложенными в руководстве И.П. Ашмарина и А.А. Воробьева [22].

## Результаты исследования

Линия мышей-альбиносов BALB/c происходит от белых коммерческих мышей Х. Бэгга, приобретенных им в штате Огайо в 1906 г. [17]. Быстрое размножение, зрелость в возрасте 5-7 недель и ряд других характеристик

делают мышей линии BALB/c и их нелинейных потомков традиционными объектами для клинических и иммунологических исследований.

Фекальные массы линейных мышей послужили источником выделения бифидобактерий и лактобактерий – гомопробиотиков для изучения их приживаемости в организме нелинейных белых мышей. Суспендированные фекалии линейных мышей в изотоническом растворе хлорида натрия центрифугировали для осаждения фрагментов непереваренной пищи, а надосадочную жидкость использовали для посева на соответствующие плотные питательные среды и получения роста изолированных колоний.

Отобранные колонии микроорганизмов, выросших в микроаэрофильных условиях, после изучения на соответствие видовым характеристикам, присущим бифидобактериям и лактобактериям [23], использовали в дальнейшей работе, в частности для получения маркированных по признаку антибиотико-резистентности (R-признак) производных гомопробиотических бифидобактерий и лактобактерий. Наличие и сохранение наследственно закрепленного R-признака имеет существенное значение для оценки приживаемости гомопробиотических микроорганизмов в кишечнике нелинейных белых мышей и отличия их от бифидобактерий и лактобактерий аутофлоры экспериментальных животных.

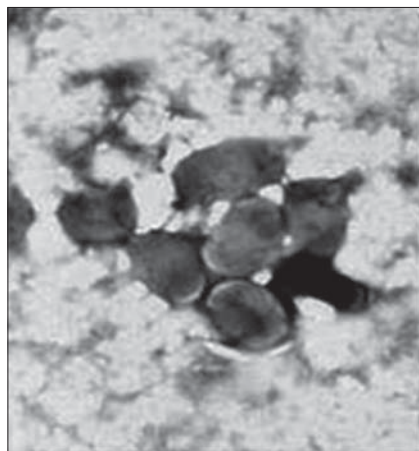
Для получения маркированных производных по R-признаку гомопробиотических микроорганизмов был выбран антибиотик рифампицин, который добавляли в плотные питательные среды в повышающихся концентрациях от  $10 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$  до  $150 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$  [20]. Посев на питательные среды, содержащие указанные концентрации рифампицина, гомопробиотических микроорганизмов

позволил отобрать спонтанные мутанты бифидобактерий и лактобактерий, устойчивые к рифампицину ( $\text{Rif}^r$ -мутанты). Уровень устойчивости спонтанных мутантов, достигнутый в результате селективного отбора на питательных средах с повышающимися концентрациями рифампицина, обеспечивал рост бактериальных клеток на поверхности плотных питательных сред, содержащих антибиотик в концентрации  $150 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$ .

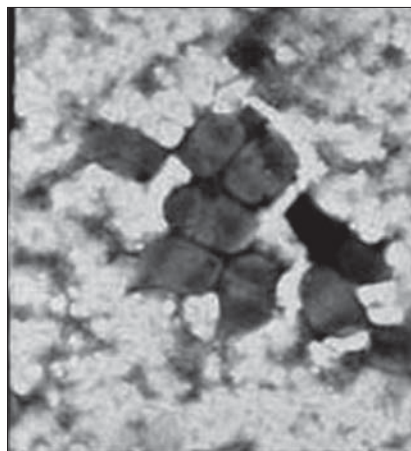
Отобранные  $\text{Rif}^r$ -мутанты бифидобактерий и лактобактерий стабильно сохраняли признак антибиотико-резистентности. Изучение популяционного состава мутантных бактерий по признаку антибиотико-резистентности на плотных питательных средах, содержащих рифампицин в концентрации  $130 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$ , свидетельствовало о сохранении ими наследственно закрепленного признака устойчивости к рифампицину ( $\text{Rif}^r$ -признака).

Стабильное сохранение мутантными бактериями довольно высокого уровня устойчивости к рифампицину имеет важное практическое значение, поскольку, как показали предварительные исследования, представители кишечной микрофлоры практически не растут в микроаэрофильных условиях на плотных питательных средах с рифампицином при его содержании в среде выращивания  $110 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$ . Разница в уровнях устойчивости к рифампицину позволяет уверенно отличать гомопробиотические бифидобактерии и лактобактерии от микроорганизмов тех же биологических видов, но являющихся представителями нормальной микрофлоры кишечника нелинейных белых мышей.

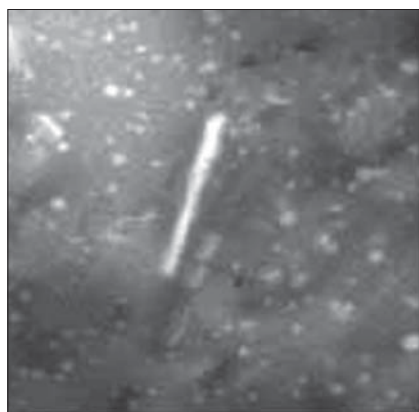
Мутантные  $\text{Rif}^r$ -бактерии, как и исходные бифидобактерии и лактобактерии, выделенные из фекалий линейных мышей BALB/c, являются грамположительными



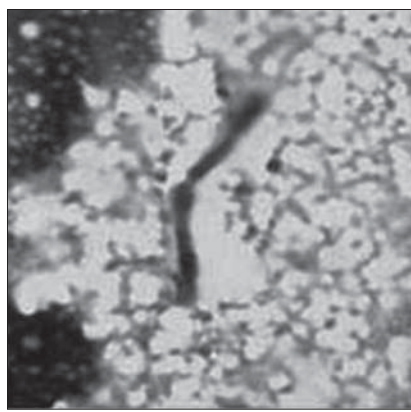
1



2



3



4

Рисунок – Электронно-микроскопическая картина клеток исходных бифидобактерий (1,  $\times 10000$ );  $\text{Rif}^r$ -мутантов бифидобактерий (2,  $\times 10000$ ); исходных лактобактерий (3,  $\times 8000$ );  $\text{Rif}^r$ -мутантов лактобактерий (4,  $\times 8000$ )

и имеют все видовые характеристики, свойственные бифидобактериям и лактобактериям. Они сохранили способность к росту на богатых питательных средах в микроаэрофильных условиях. Размеры и форма микробных клеток соответствуют таковым, приведенным в руководстве Берджи [23]. Электронно-микроскопическая картина выделенных пробиотических микроорганизмов и их Rif<sup>r</sup>-мутантов приведена на рисунке.

В экспериментах по изучению приживаемости Rif<sup>r</sup>-мутантов гомопробиотических бифидобактерий и лактобактерий в кишечнике нелинейных белых мышей использовали культуры микроорганизмов, выросших на плотных питательных средах в микроаэрофильных условиях при температуре 37 °С в течение 72 часов. Суспензии бактерий на изотоническом растворе хлорида натрия вводили двум группам животных перорально с помощью туберкулинового шприца с иглой и оливой на ее конце для предупреждения травматизации слизистой ротоглотки.

Одна группа белых мышей в количестве 20 особей была контрольной, а вторая, также в количестве 20 особей, — опытной, в которую были включены животные с антибиотико-ассоцированным дисбактериозом, вызванным пероральным введением антибиотика гентамицина дважды в сутки по 3 мг на одно введение [21]. Продолжительность введения гентамицина белым мышам — 7 суток.

Важно отметить, что введение Rif<sup>r</sup>-мутантных бифидобактерий и лактобактерий животным с антибиотико-ассоцированным дисбактериозом начинали через 5 суток после прекращения перорального введения гентамицина с целью выведения антибиотика и уменьшения его количества в кишечном содержимом ниже минимальной подавляющей концентрации.

Суточная доза вводимых Rif<sup>r</sup> бифидобактерий составила по 130 тыс. бактерий в 2 приема, а Rif<sup>r</sup> лактобактерий — 26 млн. бактерий в 2 приема, исходя из инструкций по медицинскому применению препаратов Бифидумбакте-рина сухого и Лактобактерина сухого для взрослых людей с учетом соотношения доз для белых мышей в перерасчете на единицу поверхности тела.

Особо следует подчеркнуть, что аутофлора кишечника белых мышей с антибиотико-ассоцированным дисбактериозом оставалась чувствительной к рифампицину и не росла на плотной питательной среде с рифампицином в концентрации 110 мкг • мл<sup>-1</sup> в микроаэрофильных условиях.

Содержание общего количества фекальной микрофлоры, а также бифидобактерий и лактобактерий аутофлоры и антибиотико-резистентных мутантов гомопробиотических бифидобактерий и лактобактерий контролировали высевом суспензий фекальных масс, полученных от животных опытной и контрольных групп, на соответствующие плотные питательные среды и подсчетом выросших колоний.

Общее содержание микроорганизмов кишечной микрофлоры и отдельных ее представителей у белых мышей опытной и контрольной групп представлено в таблице 1.

Как следует из представленных данных, у белых мышей опытной группы, получавших гентамицин, к 7 дню эксперимента выявлено снижение как общего количества микроорганизмов фекальной микрофлоры, так и бифидобактерий, лактобактерий и эшерихий в среднем на 4 порядка. У животных контрольной группы, находившихся на обычном пищевом рационе дисбиотических изменений микрофлоры кишечника не выявлено.

Для проведения последующих экспериментов обе группы животных, опытная и контрольная, были разделены на две подгруппы. Животным одной подгруппы вводили гомопробиотические Rif<sup>r</sup>-мутанты бифидобактерий, а животным второй группы — Rif<sup>r</sup>-мутанты лактобактерий. Отбор фекалий у белых мышей опытной и контрольной групп осуществляли ежедневно на протяжении всего срока экспериментов, составившего 14 суток, и еще 5 суток после прекращения введения мутантных бактерий. Отобранные фекалии суспендировали в изотоническом растворе хлорида натрия, суспензии центрифугировали для осаждения непереваренных остатков пищи, отбирали надосадочную жидкость, которую высеивали на поверхность плотной питательной среды в чашках Петри, содержащей 120 мкг • мл<sup>-1</sup> рифампицина.

Таблица 1.

Динамика концентрации микроорганизмов в кишечном содержимом белых мышей с экспериментальным антибиотико-ассоцированным дисбактериозом ( $\bar{X} \pm I_{95}$ , n=20)					
Группа животных	Микроорганизмы	Содержание живых бактерий в 1 г фекалий на ... сутки эксперимента, КОЕ • г <sup>-1</sup>			
		Начало эксперимента	2	5	7
Опытная группа белых мышей, получавших гентамицин	Общее количество	(6,9±0,4) • 10 <sup>9</sup>	(7,3±0,5) • 10 <sup>6</sup>	(4,1±0,4) • 10 <sup>5</sup>	(1,1±0,4) • 10 <sup>5</sup>
	Бифидобактерии	(5,6±0,5) • 10 <sup>6</sup>	(2,6±0,4) • 10 <sup>4</sup>	(1,7±0,4) • 10 <sup>3</sup>	(1,3±0,5) • 10 <sup>2</sup>
	Лактобактерии	(2,8±0,6) • 10 <sup>8</sup>	(1,8±0,5) • 10 <sup>6</sup>	(1,8±0,5) • 10 <sup>5</sup>	(1,3±0,6) • 10 <sup>4</sup>
	Эшерихии	(2,1±0,5) • 10 <sup>4</sup>	(2,1±0,6) • 10 <sup>3</sup>	(1,6±0,6) • 10 <sup>2</sup>	(1,3±0,5) • 10 <sup>1</sup>
Контрольная группа белых мышей	Общее количество	(7,0±0,5) • 10 <sup>9</sup>	(6,5±0,7) • 10 <sup>9</sup>	(6,9±0,7) • 10 <sup>9</sup>	(6,4±0,5) • 10 <sup>9</sup>
	Бифидобактерии	(5,7±0,6) • 10 <sup>6</sup>	(5,9±0,8) • 10 <sup>9</sup>	(5,4±0,6) • 10 <sup>6</sup>	(5,1±0,6) • 10 <sup>6</sup>
	Лактобактерии	(2,7±0,5) • 10 <sup>8</sup>	(2,8±0,6) • 10 <sup>8</sup>	(2,6±0,4) • 10 <sup>8</sup>	(2,9±0,7) • 10 <sup>8</sup>
	Эшерихии	(1,8±0,6) • 10 <sup>4</sup>	(2,1±0,7) • 10 <sup>4</sup>	(2,4±0,5) • 10 <sup>4</sup>	(2,1±0,7) • 10 <sup>4</sup>

Таблица 2.

Содержание Rif <sup>r</sup> -микроорганизмов в кишечном содержимом белых мышей с экспериментальным антибиотико-ассоцированным дисбактериозом ( $\bar{X} \pm I_{95}$ , n=10)												
Группа животных	Микроорганизмы	Содержание живых бактерий в 1 г фекалий на ... сутки эксперимента, КОЕ • г <sup>-1</sup>										
		1	2	4	7	10	12	14	15	16	17	22
Опытная группа белых мышей, получавших гентамицин	Бифидобактерии	0	136±4	165±15	210±18	220±19	190±10	186±12	90±10	35±5	13±7	0
	Лактобактерии	0	145±16	210±20	396±20	410±21	320±25	290±18	130±12	86±6	20±6	0
Контрольная группа белых мышей	Бифидобактерии	0	110±10	145±12	139±10	86±7	75±8	71±9	35±5	16±6	0	0
	Лактобактерии	0	196±12	198±14	369±25	295±15	215±12	160±13	46±8	17±8	0	0

После инкубации чашек Петри с посевом суспензий фекальных масс в течение 72 часов в микроаэрофильных условиях при температуре 37 °С определяли число выросших колоний для пересчета количества жизнеспособных бактерий на 1 г фекалий белых мышей. Результаты бактериологического изучения фекалий животных представлены в таблице 2.

Из представленных данных следует, что в первые сутки после начала введения животным Rif<sup>r</sup>-бифидобактерий и Rif<sup>r</sup>-лактобактерий в фекалиях антибиотико-резистентных бактерий выявлено не было. Они появились на вторые сутки и выявлялись в фекалиях на протяжении 14 суток, пока соответствующие Rif<sup>r</sup>-бактерии поступали в организм животных опытной и контрольной групп. В то же время необходимо отметить незначительное в сравнении с вводимыми суточными дозами бифидобактериями и лактобактериями их выделение с фекалиями из организма белых мышей.

Важно подчеркнуть и то, что выделение гомопробиотических Rif<sup>r</sup>-микроорганизмов из кишечника белых мышей контрольной группы полностью прекратилось на 3 сутки после прекращения их перорального введения, в то время как прекращение выделения указанных микроорганизмов из фекалий животных с антибиотико-ассоциированным дисбактериозом (белых мышей опытной группы) наступило лишь на 5 сутки.

Полученные результаты однозначно свидетельствуют о том, что гомопробиотические бифидобактерии и лактобактерии, поступающие в организм белых мышей в физиологически активном состоянии, не приживаются в кишечнике экспериментальных животных как с нормальной микрофлорой, так и с дисбиотическими изменениями кишечной микрофлоры.

### Обсуждение полученных результатов

Приживаемость в пристеночном слое (биопленке) и входение в состав микробиоценоза кишечника пробиотических микроорганизмов является одним из условий реализации потенциальных возможностей заместительной терапии. Б.Б. Пинегин с соавторами [24] приживаемость пробиотических микроорганизмов напрямую связывают с их способностью к приживлению на эпителиоцитах нового хозяина.

Ранее проведенные нами исследования [25] убедительно показали, что гетеропробиотические лактобактерии и бифидобактерии, выделенные от человека и составляющие основу пробиотиков Лактобактерин и Бифидумбактерин соответственно, не приживаются в организме экспериментальных животных – белых мышей и морских свинок.

Поскольку часть исследователей считает, что в качестве пробиотических необходимо использовать микроорганизмы, изолированные из кишечного содержимого тех видов животных, для которых они будут предназначены, и относящиеся к фенотипической группе, доминирующей в кишечнике конкретного вида животных, для проведения исследования по изучению приживаемости бифидобактерий и лактобактерий в кишечнике экспериментальных белых мышей были получены из фекалий мышей-альбиносов линии BALB/c чистые гомопробиотические культуры бифидобактерий и лактобактерий.

Ввиду того, что в фекалиях экспериментальных белых мышей невозможно различить и идентифицировать бифидобактерии и лактобактерии собственной микрофлоры от аналогичных микроорганизмов, поступающих перорально, были получены спонтанные антибиотико-резистентные мутанты гомопробиотических микроорганизмов, устойчивые к рифампицину при его содержании

в питательной среде 150 мкг • мл<sup>-1</sup>. Представители нормальной кишечной микрофлоры, выделяемые из кишечника экспериментальных животных, не способны расти на питательных средах, содержащих 110 мкг • мл<sup>-1</sup>.

Следовательно, маркерный признак гомопробиотических микроорганизмов – устойчивость к рифампицину (Rif<sup>r</sup>-признак) обеспечивает возможность проследить их судьбу в кишечнике экспериментальных животных по выделению на селективных плотных питательных средах с рифампицином, на которых бифидобактерии и лактобактерии нормальной микрофлоры не растут и не формируют колоний.

Приживаемость гомопробиотических устойчивых к рифампицину бифидобактерий и лактобактерий, сохранивших свою видовую принадлежность, в кишечнике экспериментальных мышей была оценена на двух группах животных: опытной с экспериментальным антибиотико-ассоциированным дисбактериозом и контрольной, в которую вошли лабораторные белые мыши, содержащиеся на обычном пищевом рационе.

Таким образом, в первом случае перорально вводимые исследуемые гомопробиотические микроорганизмы попадали в пищеварительный тракт белых мышей с выраженными микробиологическими нарушениями кишечной микрофлоры, а во втором – в условия обычного микробиоценоза кишечника здоровых нелинейных белых мышей.

Как показали результаты исследования, в обоих случаях приживления экзогенно поступивших гомопробиотических бифидобактерий и лактобактерий в кишечнике экспериментальных животных не происходило: их элиминация из кишечника животных контрольной группы происходила к 3 суткам после прекращения перорального введения, а в опытной группе – к 5 суткам.

Результаты, полученные на животных контрольной группы, вполне согласуются с данными A. Lidbeck et al [10], показавших в эксперименте на здоровых людях, что при нормальном физиологическом уровне лактобацилл невозможно его повысить сверх нормы путем введения пробиотических лактобацилл.

Созвучны результатам, полученным в настоящем исследовании, опубликованные данные работы [13], согласно которым, пероральное введение живых лактобацилл в организм конвенциональных мышей приводит к их рестрикции в кишечном тракте, в то время как у безмикробных мышей живые лактобациллы не разрушаются и колонизируют слизистые.

Действительно, введенные перорально гомопробиотические бифидобактерии и лактобактерии животным опытной группы с дисбиотическими изменениями состава кишечной микрофлоры численно превосходят бактерии того же вида в содержимом кишечника животных контрольной группы, однако, и они к 5 дню после прекращения поступления извне в пищеварительный тракт элиминируются вследствие антагонизма с резидентной микрофлорой.

Вероятно, экологическая и функциональная маргинальность пробиотических микроорганизмов [26], видовая, тканевая и индивидуальная специфичность, в том числе и гомопробиотических микроорганизмов, и их несовместимость с резидентной микрофлорой нового хозяина объясняют невозможность изменения уже сформировавшейся микрофлоры кишечника вследствие неприживления пробиотических микроорганизмов при пероральном их поступлении [10].

Еще в 2003 г. E. Lebenthal и Y. Lebenthal [27] в научной статье под символическим названием «Пробиотики: концепция лечебного применения, ожидающая своего

признания» констатировали, что «... без рационально спланированных клинических испытаний трудно пропагандировать идею лечения пробиотиками. На сегодняшний день, — утверждали авторы, — имеется превосходная идея профилактического и лечебного применения пробиотиков, истинную конструктивность которой, однако, еще предстоит доказать».

Такие рационально спланированные клинические испытания проведены [2-4, 28]. Результатом испытаний стала разработка научного подхода, согласно которому, выбор терапии дисбиотических нарушений должен быть корректным и направлен на то звено нарушенной регуляции, которое утратило возможность самовосстановления.

Таким образом, вывод клиницистов о корректности выбора терапии дисбиотических нарушений экспериментально подтвержден результатами настоящего исследования по оценке приживаемости гомопробиотических микроорганизмов в кишечнике конвенциональных белых мышей, в том числе особей с антибиотико-ассоциированным дисбактериозом.

Представленные результаты ставят под сомнение существующий принцип заместительного действия пробиотикотерапии на основе живых микроорганизмов, что, безусловно, имеет важное практическое значение для реализации положений концепции пребиотической терапии, связанной с необходимостью поддержания и восстановления собственной микрофлоры кишечника, а не с попыткой его заселения «хорошими», но «чужими» для него микроорганизмами.

## Выводы

1. С использованием разработанной универсальной методики получены маркированные гомопробиотические бифидобактерии и лактобактерии, выделенные из фекалий линейных мышей BALB/c, стабильно наследующие признак устойчивости к рифампицину и сохраняющие видовые характеристики;

2. Изучена приживаемость гомопробиотических маркированных бифидобактерий и лактобактерий в кишечнике конвенциональных белых мышей, в том числе белых мышей с антибиотико-ассоциированным дисбактериозом;

3. Установлено, что гомопробиотические бифидобактерии и лактобактерии, находящиеся в физиологически активном состоянии и вводимые перорально конвенциональным белым мышам, в том числе с антибиотико-ассоциированным дисбактериозом, не приживаются в кишечнике нового хозяина и элиминируются соответственно к 3 и 5 суткам после прекращения их перорального введения.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Воробьев А.А., Абрамов Н.А., Бондаренко В.М., Шендеров Б.А. Дисбактериоз — актуальная проблема медицины. Вестн РАМН 1997; (3): 4-7.
2. Минушкин О.Н., Ардатская М.Д., Зверков И.В., Чичерин И.Ю. Дисбактериоз кишечника (понятие, диагностика, принципы лечебной коррекции). Современные возможности пребиотической терапии: учебно-методическое пособие для врачей и курсантов циклов усовершенствования врачей. М: ФГУ «Учебно-научный медицинский центр» Управления делами Президента Российской Федерации; 2010; 50 с.
3. Ардатская М.Д. Дисбактериоз кишечника: понятие, диагностика, принципы лечебной коррекции. Consilium medicum 2008; 10 (8): 86-92.
4. Ардатская М.Д., Чичерин И.Ю., Стражев С.В., Минушкин О.Н. Эффективность фруктоолиго- и фруктополисахаридов в коррекции и профилактике нарушений микробиоценоза кишечника. Кремлевская медицина. Клинический вестник 2011; (3): 59-66.

5. Отраслевой стандарт «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника» (ОСТ 91599.11.0004-2003), утв. приказом № 231 МЗ РФ от 09.06.2003 г. М, 2003.
6. Терапия заместительная. Большой медицинский словарь (цитировано 22.01.12). Адрес доступа: <http://www.medsrv.ru/html/t/terapi8-zamestitel5na8.html>.
7. Воробьев А.А., Лыкова Е.А., Феклисова Л.В., Боковой А.Г., Целиканова Е.Е. Использование больших доз пробиотика бифидумбактерина форте в лечении ОРВИ у детей. Эпидем. и инф. болезни. 2004; (5): 43-46.
8. Малахов Ю.А. Пробиотики и пробиотические продукты в профилактике и лечении наиболее распространенных заболеваний человека. Материалы Всероссийской конференции с международным участием; 21-23 апреля 1999 г; М: 1999; с. 110.
9. Доронин А.Ф. Функциональное питание. М: Издательство ГРАНТЬ, 2002; 296 с.
10. Lidbeck A., Gustafson I.A., Nord C.E. Impact of Lactobacillus acidophilus supplements on the human oropharyngeal and intestinal microflora. Scan J Infect Diseases 1987; 19 (5): 531-537.
11. Бондаренко В.М., Грачева Н.М., Мацулевич Т.В., Воробьев А.А. Микробиологические изменения кишечника и их коррекция с помощью лечебно-профилактических препаратов. Журн. гастроэнтерол. гепатол. колопроктол. 2003; № 4 (приложение 20): 66-76.
12. Глушанова Н.А. Экспериментальное обоснование новых подходов к коррекции микробиоценоза кишечника: дис. д-ра мед. наук: защищена в 2006 г. М: 2006; 260 с.
13. Шендеров Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание: в 3 т. Том 1: Микрофлора человека и животных и ее функции. М: Издательство ГРАНТЬ, 1998; 288 с.
14. Куваева И.Б., Ладодо К.С. Микробиологические и иммунные нарушения у детей. М: Медицина, 1991; 240 с.
15. Шендеров Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание: в 3 т. Том 3: Пробиотики и функциональное питание. М: Издательство ГРАНТЬ, 2001; 289 с.
16. Коршунов В.М., Синицина Н.А., Гиноман Г.А., Пинегин Б.В. Коррекция микрофлоры кишечника при химиотерапевтических дисбактериозах с помощью аутоштаммов бифидобактерий и лактобактерий. Журн. микробиол. 1985; (9): 20-25.
17. Potter M. History of the BALB/c family. The BALB/c mouse: Genetic and Immunology. Cur Top Microbiol Immunol 1985; 122: 1-15.
18. Иванов В.П., Бойцов А.Г., Коваленко А.Д., Ластовка О.Н., Нилова Е.А. Совершенствование методов диагностики дисбактериоза толстого кишечника: информационное письмо. СПб: Центр госсанэпиднадзора, 2002; 31 с.
19. Лихачева А.Ю., Бондаренко В.М., Соколова К.Я. Современное состояние вопроса таксономии бактерий рода Lactobacillus. Журн. микробиол. 1992; (9-10): 74-78.
20. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. Пер. с англ. Ю.Н.Зюграфа, Т.С.Ильиной, В.Г.Никифорова. М: Мир, 1976; 436 с.
21. Дармов И.В., Чичерин И.Ю., Ердякова А.С., Погорельский И.П., Лундовских И.А. Заявка на выдачу патента РФ. Способ моделирования дисбактериоза кишечника у лабораторных животных. Заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВПО «Вятский государственный университет», № 2011149501/17 (074291); заявл. 15.12.2011.
22. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л: Медгиз, 1962; 280 с.
23. Определитель бактерий Берджи в 2 т. Т. 2. Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита. Пер. с англ. под ред. Г.А. Заварзина. М: Мир, 1997; 368 с.
24. Пинегин Б.В., Мальцев В.Н., Коршунов В.М. Дисбактериоз кишечника. М: Медицина, 1984; 144 с.
25. Дармов И.В., Чичерин И.Ю., Погорельский И.П., Лундовских И.А., Дурнев Е.А. Выживаемость микроорганизмов пробиотиков в желудочно-кишечном тракте экспериментальных животных. Журн. инфектологии. 2012; Т.4, №1, с.68-74.
26. Хильми Г.Ф. Основы биофизики биосферы. Л: Гидрометеоздат, 1966; 272 с.
27. Lebenthal E., Lebenthal Y. Пробиотики: концепция лечебного применения, ожидающая своего признания. Журн. микробиол. 2003; (4): 88-90.
28. Грачева Н.М., Ардатская М.Д., Аваков А.А., Соловьева А.И. Сравнительная оценка клинико-лабораторной эффективности современных про- и пребиотических препаратов в коррекции дисбиотических нарушений желудочно-кишечного тракта: отчет о клинико-лабораторном исследовании. М: Московский НИИЭМ им. Г.Н. Габричевского, 2010; 23 с.