

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЛИМФОЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ БИФИДОБАКТЕРИЙ И ЛАКТОБАКТЕРИЙ*

Ердякова А.С.¹, Чичерин И.Ю.², Лундовских И.А.¹, Погорельский И.П.¹

¹ ФГБОУ ВПО «Вятский государственный университет», Киров, Россия (610000, Киров, ул. Московская, 36), e-mail: kaf_mb@vyatsu.ru; ² ООО «МедСтар», Сергиев Посад, Россия (141300, Сергиев Посад, ул. Вознесенская, 55), e-mail: rpatron@mail.ru

EXPERIMENTAL EVALUATION OF THE LYMPHOCYTOTOXIC EFFECT OF BIFIDOBACTERIA AND LACTOBACILLI

Erdyakova A.S.¹, Chicherin I.Yu.², Lundovskikh I.A.¹, Pogorelsky I.P.¹

¹ Vyatka State University, Kirov, Russia (Moskovskaya st., 36, Kirov, Russia, 610000), e-mail: kaf_mb@vyatsu.ru

² LLC «MedStar», Sergiev Posad, Russia (Voznesenskaya st., 55, Sergiev Posad, Russia, 141306), e-mail: rpatron@mail.ru

РЕЗЮМЕ

Представлены результаты экспериментальной оценки лимфоцитотоксического действия пробиотических микроорганизмов бифидобактерий и лактобактерий, входящих в состав сертифицированных пробиотических препаратов Бифидобактерин и Лактобактерин, на лимфоциты морских свинок. В экспериментах использовали регидрированные культуры бифидобактерий и лактобактерий. Выделение фракции лимфоцитов из крови морских свинок для постановки лимфоцитотоксического теста проводили согласно санитарным правилам СП 3.3.2.561-96. Выраженность повреждения лимфоцитов оценивали в баллах и путем подсчета цитотоксического индекса. Результаты экспериментов свидетельствуют о подверженности лимфоцитов морских свинок цитолизу под воздействием больших доз пробиотических микроорганизмов бифидобактерий и лактобактерий, превышающих суточные дозы, рекомендованные инструкциями по медицинскому применению сертифицированных пробиотических препаратов Бифидобактерин и Лактобактерин, что выводит реакцию лимфоцитов за пределы физиологической нормы.

С учетом полученных результатов, при заместительной терапии нежелательно рекомендовать пациентам с дисбиотическими нарушениями микрофлоры кишечника повышать суточные дозы пробиотиков для достижения выраженного пробиотического эффекта.

Ключевые слова: пробиотики, бифидобактерии, лактобактерии, лимфоциты, лимфоцитотоксический тест, морские свинки.

ВВЕДЕНИЕ

Развивая идею И.И. Мечникова о том, что нормальная микрофлора не является оптимальной и может быть как полезной, так и вредной, В.М. Бондаренко и В.Г. Петровская относят представителей нормальной

SUMMARY

Results of the experimental evaluation of the lymphocytotoxic effect of probiotic microorganisms bifidobacteria and lactobacilli, are part of the certified probiotic preparations Bifidumbacterin and Lactobacterin, on lymphocytes of guinea pigs are presented. Rehydrated cultures of bifidobacteria and lactobacilli were used in the experiments. Isolation of the fraction of lymphocytes for lymphocytotoxic test was carried out according to the sanitary rules SP 3.3.2.561-96.

Intensity of damage to lymphocytes was assessed by counting the points and the cytotoxic index. The experimental results indicate exposure of lymphocytes of guinea pigs to cytolysis under the influence of large doses of probiotic bifidobacteria and lactobacilli, exceeding the daily doses recommended by the instructions on the medical use of the certified probiotic preparations Bifidobacterin and Lactobacterin that displays the reaction of lymphocytes beyond the physiological norm.

In view of the results obtained when substitution therapy is not desirable to recommend that patients with dysbiotic disorders in intestinal microflora increase daily doses of probiotics to achieve pronounced probiotic effects.

Keywords: probiotics, bifidobacteria, lactobacilli, lymphocytes, lymphocytotoxic test, guinea pigs.

микрофлоры к условно-патогенным микроорганизмам [3]. Обладая определенными механизмами приживления, они способны вызывать заболевание при снижении иммунитета. Именно на иммунную систему падает главная нагрузка по устранению нарушений го-

* Ссылка для цитирования: Ердякова А.С., Чичерин И.Ю., Лундовских И.А., Погорельский И.П. Экспериментальная оценка лимфоцитотоксического действия бифидобактерий и лактобактерий. Практическая медицина. - 2012. - №3(58). - С.194-196..

меостаза, вызванных бактериальным антигенным воздействием.

Известно, что положительный эффект пробиотиков, сконструированных зачастую на основе микроорганизмов, выделенных из нормальной кишечной микрофлоры, даже при длительном применении носит транзиторный характер, а порой и полностью отсутствует [1, 4]. В то же время в инструкциях по медицинскому применению сертифицированных препаратов Бифидумбактерин и Лактобактерин есть рекомендации по увеличению доз принимаемых препаратов в 5 раз с профилактической целью и в 5-10 раз при воспалительных заболеваниях.

С учетом изложенного, представляется целесообразным изучить влияние пробиотических микроорганизмов бифидобактерий и лактобактерий на иммунную систему в эксперименте с использованием лимфоцитотоксического теста. Данный тест [5, 6, 9] с небольшими вариациями используется как в научных исследованиях, так и при оценке иммунобиологической безопасности вакцин.

Цель исследования

Цель исследования состоит в экспериментальной оценке лимфоцитотоксического действия бифидобактерий и лактобактерий на лимфоциты морских свинок с использованием лимфоцитотоксического теста.

Материалы и методы исследования

В экспериментах использовали пробиотические микроорганизмы, входящие в состав коммерческих препаратов Бифидумбактерин (серия 315-6, производство ФГУП «НПО «Микроген», Россия), Лактобактерин (серия 15/6 производство ФГУП «НПО «Микроген», Россия).

Согласно инструкции по медицинскому применению, препарат Бифидумбактерин сухой создан на основе бифидобактерий *B. bifidum* 1, а препарат Лактобактерин сухой – на основе лактобактерий *L. plantarum* SP-A3. В одной дозе лиофилизата препарата Бифидумбактерин содержится не менее $1 \cdot 10^7$ живых бифидобактерий, а в одной дозе лиофилизата препарата Лактобактерин – не менее $2 \cdot 10^9$ живых лактобактерий.

В работе использовали: гепарин 5000 ЕД \cdot мл⁻¹, ОАО «Синтез Курган», Россия; фиколл, ПанЭКО, Россия; верографин, Спофа: Фарм-Группа, Чехия; трипановый синий, ДИА-М, Россия.

Выделение фракции лимфоцитов для постановки лимфоцитотоксического теста проводили согласно санитарным правилам СП 3.3.2.561-96 [5]. Для выделения фракции лимфоцитов использовали кровь прошедших акклиматизацию морских свинок массой 250-300 г, беспородных, обоего пола.

Выраженность повреждения лимфоцитов оценивали в баллах (таблица 1) и путем подсчета цитотоксического индекса (ЦТИ) по приведенной ниже формуле [5].

Таблица 1

Выраженность повреждения лимфоцитов [6]		
Число погибших клеток, процент	Балл	Результат
0-10	1	Отрицательный
11-20	2	Сомнительный
21-50	4	Слабо положительный
51-80	6	Положительный
81-100	8	Резко положительный

$$\text{ЦТИ} = 100 \% \cdot \frac{\text{погибших клеток в опыте} - \% \text{ погибших клеток в контроле}}{100 - \% \text{ погибших клеток в контроле}}$$

При постановке лимфоцитотоксического теста были использованы регидратированные культуры бифидобактерий и лактобактерий. Постановку лимфоцитотоксического теста осуществляли в полистироловых планшетах. В лунки панели планшета вносили 0,1 мл взвеси лимфоцитов, в которой предварительно определяли их концентрацию, составившую $4 \cdot 10^6$ кл \cdot мл⁻¹, а также процент нежизнеспособных лимфоцитов при окраске трипановым синим. В последующем в лунки, содержащие суспензии лимфоцитов, вносили по 0,1 мл суспензии бифидобактерий и лактобактерий в соответствующих концентрациях.

Планшеты с заполненными лунками инкубировали в термостате при температуре 37 °С в течение 30 минут. По окончании инкубации в каждую лунку планшета добавляли рабочий раствор трипанового синего. Через 20-30 секунд взвесь из лунки помещали в счетную камеру Горяева для определения количества погибших лимфоцитов.

Выбор доз пробиотических микроорганизмов был осуществлен на основании предварительного изучения их иммуномодулирующего действия при продолжительном (2 недели) пероральном поступлении в организме морских свинок в тесте спонтанного розеткообразования с эритроцитами барана (Е-РОК) [9, 10].

Обработку результатов исследования проводили согласно рекомендациям, изложенным в руководстве И.П. Ашмарина и А.А. Воробьева [2].

Результаты исследования

В предварительных опытах изучения иммуномодулирующего действия пробиотических микроорганизмов бифидобактерий и лактобактерий было установлено, что их пероральное введение морским свинкам в дозах $1 \cdot 10^4$ и $1 \cdot 10^5$ бактерий не вызвало достоверного усиления розеткообразования в опыте в сравнении с контролем (количество Т-розеток в опыте соответственно вводимым дозам бактерий – 25,5 % и 27,1 % против 27,0 % в контроле).

С учетом результатов теста спонтанного розеткообразования для постановки лимфоцитотоксического теста были определены следующие дозы бактерий (КОЕ в 1 мл суспензии): для бифидобактерий – $1 \cdot 10^5$; $2,6 \cdot 10^6$; $1,3 \cdot 10^7$; $2,6 \cdot 10^7$; $2,6 \cdot 10^8$; для лактобактерий – $1 \cdot 10^5$; $5,3 \cdot 10^8$; $2,6 \cdot 10^9$; $5,3 \cdot 10^9$; $5,3 \cdot 10^{10}$. Дозы бифидобактерий $2,6 \cdot 10^6$ КОЕ и лактобактерий $5,3 \cdot 10^8$ КОЕ являются суточными дозами для морских свинок и использованы нами в качестве контролей.

Оценочные показатели лимфоцитотоксического теста с бифидобактериями и лактобактериями представлены в таблицах 2 и 3. Данные, представленные в таблицах 2 и 3, свидетельствуют о подверженности лимфоцитов морских свинок цитолиту под воздействием больших доз пробиотических бактерий, превышающих суточные дозы, рекомендованные инструкциями по медицинскому применению пробиотических препаратов. Некоторое увеличение числа погибших лимфоцитов наблюдается при их инкубировании с бифидобактериями и лактобактериями в рекомендованных суточных дозах (соответственно, 11 % и 19 %, при ЦТИ 4,5 и 13,1).

Обсуждение результатов

С расширением спектра используемых в клинической практике пробиотических препаратов стали появляться сведения о том, что принципы современного подхода к заместительной терапии, состоящие в применении больших доз пробиотиков длительными курсами (в течение 3-6 месяцев), могут быть причиной недоста-

точной эффективности лечения дисбиотических состояний и возникновения побочных эффектов применения пробиотиков [4].

Таблица 2

Результаты лимфоцитотоксического теста с бифидобактериями					
Определяемый показатель	Антилимфоцитарная активность бифидобактерий из бактериальных суспензий в концентрациях...КОЕ • мл ⁻¹ , (X±I ₉₅)				
	1·10 ⁵	2·10 ⁶	1,3·10 ⁷	2,6·10 ⁷	2,6·10 ⁸
Число погибших лимфоцитов, процент	7±2	11±3	20±5	69±8	98±10
ЦТИ	0,21	4,5	14,2	66,7	97,8

Примечание – Оценочный балл для концентрации 1·10⁵ – 1 (результат отрицательный), для концентрации 2·10⁶ – 2 (результат сомнительный), для концентрации 1,3·10⁷ – 2 (результат сомнительный), для концентрации 2,6·10⁷ – 6 (результат положительный), для концентрации 2,6·10⁸ – 8 (результат резко положительный)

Таблица 3

Результаты лимфоцитотоксического теста с лактобактериями					
Определяемый показатель	Антилимфоцитарная активность лактобактерий из бактериальных суспензий в концентрациях ... КОЕ • мл ⁻¹ , (X±I ₉₅)				
	1·10 ⁵	5,3·10 ⁸	2,6·10 ⁹	5,3·10 ⁹	5,3·10 ¹⁰
Число погибших лимфоцитов, процент	8±3	19±6	51±8	85±9	99±10
ЦТИ	1,3	13,1	47,4	83,9	98,9

Примечание – Оценочный балл для концентрации 1·10⁵ – 1 (результат отрицательный), для концентрации 5,3·10⁸ – 2 (результат сомнительный), для концентрации 2,6·10⁹ – 6 (результат положительный), для концентрации 5,3·10⁹ – 8 (результат резко положительный), для концентрации 5,3·10¹⁰ – 8 (результат резко положительный)

Неудачи заместительной терапии пробиотиками, по данным А.И. Хавкина и Н.С. Жихаревой [8], обусловлены недостаточной изученностью механизмов взаимодействия пробиотических микроорганизмов и индигенной микрофлоры с иммунной системой хозяина. Парентеральное введение большого количества микроорганизмов приводит к развитию макрофагальной реакции, что особенно выражено на начальном этапе процесса иммунизации.

Однако, длительное использование высоких доз пробиотических микроорганизмов приводит к истощению адаптационных резервов организма хозяина [7] и снижению (или отсутствию) эффективности пробиотикотерапии при длительных курсах [4].

Из представленных в таблицах 2 и 3 данных следует, что при регламентированной суточной дозировке пробиотиков реакция лимфоцитов морских свинок находится в допустимых пределах, не позволяющих считать эту реакцию патологической. Увеличение концентрации пробиотических микроорганизмов в реакционной смеси с лимфоцитами, превосходящей суточную дозу в 5, 10 и 100 раз, сопровождается прогрессирующим увеличением числа погибших лимфоцитов и ростом значений цитотоксических индексов.

Балльная оценка числа погибших лимфоцитов позволяет считать результаты лимфоцитотоксического теста

как положительные и резко положительные (особенно в случае с лактобактериями), а саму реакцию лимфоцитов, контактирующих с большими дозами пробиотических микроорганизмов, выходящую за пределы физиологической нормы. При этом нарушение целостности клеточных мембран лимфоцитов является неспецифическим. Тем не менее, взаимодействие интактных лимфоцитов с тестируемыми пробиотическими микроорганизмами сопровождается образованием каналов в мембранах лимфоцитов, по которым краситель трипановый синий проникает внутрь лимфоцитов и окрашивает их [6]. Жизнеспособные с интактной мембраной лимфоциты красителем не окрашиваются.

Заключение

Экспериментальное изучение в опытах *in vitro* взаимоотношений лимфоцитов крови морских свинок с бифидобактериями и лактобактериями сертифицированных пробиотических препаратов, взятых в дозах, превышающих рекомендованные инструкциями по медицинскому применению, с балльной оценкой гибели лимфоцитов и определением лимфоцитотоксического индекса свидетельствует о нецелесообразности повышения суточных доз пробиотических препаратов при их пероральном применении с целью увеличения возможного пробиотического эффекта заместительной терапии.

ЛИТЕРАТУРА

- Ардатская М.Д. Клиническое значение короткоцепочечных жирных кислот при патологии желудочно-кишечного тракта: дис... д-ра мед. наук. – М.: Учебно-научный центр Медицинского центра Управления делами Президента Российской Федерации, 2003. – 299 с.
- Ашмарин И.П. Статистические методы в микробиологических исследованиях / И.П. Ашмарин, А.А. Воробьев. – Л.: Медгиз, 1962. – 280 с.
- Бондаренко В.М. Ранние этапы развития инфекционного процесса и двойственная роль нормальной микрофлоры / В.М. Бондаренко, В.Г. Петровская // Вестник РАМН. – 1997. – № 3 – С. 7–10.
- Воеводин Д.А. Роль дисбактериоза в формировании хронической инфекционной патологии у детей // Д.А. Воеводин, Т.Н. Розанова, М.А. Стенина и др. // Журн. микробиол. – 2001. – № 6. – С. 88–93.
- Государственные испытания и регистрация новых медицинских иммунобиологических препаратов: Санитарные правила СП 3.3.2.561-96: утв. Постановлением Госкомсанэпиднадзора России 31.10.1996 г., № 33: введ. в действие 31.10.1996. – М.: Информационно-издательский центр Госкомсанэпиднадзора России, 1996. – 120 с.
- Лимфоцитотоксический тест. – <http://medbiol.ru/medbiol/allerg/0019c14a.htm>. (дата обращения: 17.02.2012).
- Панин А.Н. Принципы и перспективы применения эубиотиков в животноводстве / А.Н. Панин, Н.И. Малик // Пробиотики и пробиотические продукты в профилактике и лечении наиболее распространенных заболеваний человека: тезисы докл. Всерос. конф. с междунар. участием (Москва, 21–23 апреля 1999 г.). – Москва, 1999. – С. 22–23.
- Хавкин А.И. Коррекция дисбиотических изменений кишечника у детей на современном этапе / А.И. Хавкин, Н.С. Жихарева // Русский мед. журн. – 2004. – Т. 12, № 16. – С. 960–963.
- Экспериментальное обоснование ПДК микроорганизмов – продуцентов и содержащих их готовых форм препаратов в объектах производственной и окружающей среды: методические указания: утв. Начальником Главного санитарно-профилактического Управления Минздрава СССР 11.06.1991 г., № 5789/1-91. – М.: Информационно-издательский центр Госкомсанэпиднадзора России, 1993. – 20 с.
- Hopfer H. The importance of cell-mediated immunity in course and severity of autoimmune anti-glomerular basement membrane disease in mice / H. Hopfer, R. Maron, U. Butzmann, U. Helmchen et al. // FASEB Journal. – 2003. – Vol. 17. – P. 860–868.