

# ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ БОЛЬШИХ ДОЗ ПРОБИОТИКА БИФИДУМБАКТЕРИН И МИКРООРГАНИЗМОВ АУТОФЛОРЫ КИШЕЧНИКА НА ОРГАНИЗМ БЕЛЫХ МЫШЕЙ И ПОКАЗАТЕЛИ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА\*

Чичерин И.Ю.<sup>1</sup>, Дармов И.В.<sup>2</sup>, Богачева Н.В.<sup>2</sup>, Погорельский И.П.<sup>2</sup>, Лундовских И.А.<sup>2</sup>, Шевцов А.Н.<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

## THE EFFECT OF LARGE DOSES OF PROBIOTIC BIFIDUMBACTERIN AND MICROORGANISMS OF INTESTINAL AUTOFLORA ON THE ORGANISM OF WHITE MICE AND THE INDICES OF CELLULAR IMMUNITY

I.Yu. Chicherin<sup>1</sup>, I.V. Darmov<sup>2</sup>, N.V. Bogacheva<sup>2</sup>, I.P. Pogorelsky<sup>2</sup>, I.A. Lundovskikh<sup>2</sup>, A.N. Shevtsov<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

**Цель исследования.** Оценка влияния больших доз пробиотика Бифидумбактерин и микроорганизмов аутофлоры кишечника на организм белых мышей и показатели клеточного иммунитета

**Материалы и методы.** В экспериментах использовали коммерческий препарат Бифидумбактерин и микроорганизмы аутофлоры кишечника белых мышей, выделенные из фекалий. Субпопуляции лимфоцитов выделяли из цельной крови белых мышей, используя моноклональные антитела, меченые флуорохромами: anti-mouse CD45-PE-Cy5.5, anti-mouse CD3e-PE-Cy7, anti-mouse CD8a-APC, anti-mouse IFN gamma-FITC, anti-mouse Ly-49C/I/F/H-PE; а также антивидовые изотипические контроли: Rat IgG1 K isotype control FITC, Golden Syrian Hamster IgG isotype control PE.

**Результаты.** Установлено, что при пероральном введении белым мышам больших доз пробиотических микроорганизмов возникают патологические состояния, приводящие даже к гибели животных. Выявлены субпопуляционные сдвиги и изменения функциональной активности лимфоцитов у белых мышей, свидетельствующие об иммунобиологической перестройке в организме животных на фоне энтерального введения больших доз пробиотиков и микроорганизмов нормальной микрофлоры.

**Заключение.** Наличие у пробиотических штаммов микроорганизмов нежелательных для живого организма свойств предопределяет необходимость индивидуального выбора пробиотических препаратов, правильного подбора их курсовых и разовых доз.

**Ключевые слова:** пробиотические и индигенные микроорганизмы; белые мыши; лимфоциты; субпопуляции лимфоцитов, иммунологическая перестройка; перитонит.

### SUMMARY

**Purpose of the study.** Assessment of the effect of large doses of probiotic Bifidumbacterin and microorganisms of intestinal autoflora on the organism of white mice and the indices of cellular immunity.

**Materials and methods.** Commercial preparation Bifidumbacterin and the microorganisms of white mice intestinal autoflora isolated from the feces were used in the experiments. Subpopulations of lymphocytes were isolated from whole blood of white mice, using monoclonal antibodies labeled with fluorochromes: anti-mouse CD45-PE-Cy5.5, anti-mouse CD3e-PE-Cy7, anti-mouse CD8a-APC, anti-mouse IFN gamma-FITC, anti-mouse Ly-49C/I/F/H-PE; as well as antispecies isotype control: Rat IgG1 K isotype control FITC, Golden Syrian Hamster IgG isotype control PE.

**Results.** It is found that after oral administration of large doses of probiotic microorganisms to white mice pathological conditions appear, leading even to the death of the animals. Subpopulation shifts and changes in the functional activity of lymphocytes are detected, indicating an immunological reorganization in animals against a background of the enteral administration of large doses of probiotics and microorganisms of normal microflora.

**Conclusion.** The presence of undesirable for living organisms properties of the probiotic microbial strains determines the need for individual choice of probiotic preparations, the proper selection of course and single doses.

**Key words:** probiotic and indigenus microorganisms, white mice; lymphocytes, subpopulations of lymphocytes; immunological reorganization; peritonitis

\* Ссылка для цитирования: Чичерин И.Ю., Дармов И.В., Богачева Н.В., Погорельский И.П., Лундовских И.А., Шевцов А.Н. Исследование влияния больших доз пробиотика Бифидумбактерин и микроорганизмов аутофлоры кишечника на организм белых мышей и показатели клеточного иммунитета. Медицинский Советник Поволжья. - 2013. - №1. - С. 85-90.

## ВВЕДЕНИЕ

Выдающийся русский ученый И.И. Мечников первым установил положительное влияние молочнокислых бактерий обычной простокваши, принимаемой с целью нормализации кишечной микрофлоры [1; 2]. Наряду с введением понятия ортобиоз как состояния полного и счастливого цикла жизни, И.И. Мечников ввел в оборот термин пробиозис, обозначающий улучшение здоровья человека в процессе модификации (восстановления) собственной кишечной микрофлоры [1-4].

Придавая огромное значение кишечной микрофлоре, ученый предложил ряд профилактических и гигиенических средств борьбы с «самоотравлением». По И.И. Мечникову, пробиозис является ассоциацией нескольких организмов, стимулирующих ряд жизненно важных процессов каждого из них [5], а живые микробные клетки, оказывающие положительное влияние на микробиоценоз кишечника и здоровье человека или животного, стали именоваться пробиотиком [6].

Со временем были определены критерии, которым должны соответствовать пробиотические микроорганизмы. К ним относят: апатогенность и безвредность; выживаемость в желудочно-кишечном тракте; адгезию на эпителиальных клетках кишечника с последующей колонизацией; способность к размножению, колонизации кишечника, а также персистенции; выраженную способность к стабилизации кишечной микрофлоры; сохранение жизнеспособности как в пищевых продуктах, так и в фармакопейных лиофилизированных препаратах [7].

Указанным критериям соответствуют микроорганизмы нормальной кишечной микрофлоры, в первую очередь лактобактерии, бифидобактерии, кишечная палочка [8; 9]. Эти и другие бактериальные виды, взаимодействующие друг с другом и с организмом хозяина, претерпели отбор в процессе эволюции. Многообразие видового состава кишечной микрофлоры и ее взаимодействие со сложно организованной структурой внутренней поверхности слизистой оболочки кишечника, имеющей важное значение для пищеварения, явились основанием объединения микроорганизмов и кишечной стенки в единый микробно-тканевой комплекс [10; 11].

К заслугам И.И. Мечникова следует отнести и то, что воздавая должное эволюционно сложившимся симбиотическим ассоциациям, составляющим нормальную микрофлору человека и животных, он обосновал положение о том, что состав нормальной микрофлоры не всегда является оптимальным, и в ряде случаев представители нормальной микрофлоры могут оказывать определенное вредное воздействие на организм [1-4; 12; 13].

О нежелательных последствиях приема пробиотических микроорганизмов представлена информация в работе В.М. Бондаренко и В.Г. Петровской [14]. В частности авторы считают, что на современном этапе изучения дисбактериозов и в целом инфекционного процесса накоплено достаточно данных, свидетельствующих о способности представителей нормальной микрофлоры, обладающих определенными механизмами приживления, вызывать заболевание при снижении иммунитета [14].

В связи с этим, по мнению авторов цитируемой работы [14], их можно отнести к условно-патогенным микроорганизмам, способным при снижении естественной резистентности макроорганизма вызывать заболевания, характеризующиеся отсутствием нозологической специфичности. Так, бифидобактерии причастны к развитию бактериемии у новорожденных и инициации гнойно-воспалительных процессов.

В.М. Бондаренко и В.Г. Петровская [14] приводят данные О. Balint, А. Hudac, А. Bakytova, наблюдавших острый менингит, обусловленный *Bifidobacterium adolescentis*. Настороженность у клиницистов вызывают данные о  $\beta$ -глюкозидазной активности бифидобактерий, которая при изменении диеты человека способствует развитию опухоли толстой кишки. Приведен перечень клинических изолятов лактобактерий (*Lactobacillus casei ssp. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. lactis*, *L. fermentum*, *L. acidophilus*, *L. salivarius* и др.), являющихся этиологическими агентами различных патологических состояний, часто локальных: кариеса, гнойно-воспалительных процессов, эндокардитов, септицемии, пневмонии, менингита, локальных и генерализованных уроинфекций [14]. Представители нормальной микрофлоры как патогенные агенты вызывают развитие артритов и других заболеваний, относимых к аутоиммунным.

С.Р. Резник с соавторами [15] в эксперименте на мышках, которым вводили пробиотик на основе *Bacillus subtilis* и *B. licheniformis* (доза микроорганизмов  $2,5 \cdot 10^7$  КОЕ), отмечают существенное повышение уровня серологического ответа на последующее введение сальмонелл. Отмечено стимулирующее влияние на клетки мононуклеарной фагоцитарной системы животных биоспорина и субалина [16; 17]. Предполагается, что метаболиты некоторых бактерий, находящихся в кишечнике, адсорбируются на его слизистой, вызывая серологический ответ макроорганизма путем простой или индуцируемой молекулярной мимикрии.

Эти и другие данные, как подчеркивают В.М. Бондаренко и В.Г. Петровская [14], указывают на необходимость соблюдения правила микроэкологической адекватности при назначении препаратов пробиотиков. Очевидно, что под микроэкологической адекватностью понимается оптимальное соотношение представителей микробного сообщества кишечника. При его нарушении, в частности при резком возрастании численности популяции бифидобактерий в кишечнике, отмечается рост активности ряда ферментов в фекалиях ( $\beta$ -глюкозидазы,  $\beta$ -глюкуронидазы, азоредуктаза) [14], которые при высоких значениях рН среды способны трансформировать прокарциногены в кишечнике в карциногены со всеми вытекающими из этого последствиями.

В наших экспериментах по сравнительному изучению биологических характеристик бифидобактерий и лактобактерий с использованием лимфоцитотоксического теста подтверждена необходимость соблюдения соответствия микроэкологической адекватности [18]. Так, было показано, что увеличение концентрации пробиотических микроорганизмов в реакционной смеси с лимфоцитами морских свинок, 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, контактировавших с пробиотическими микроорганизмами, выходящей за пределы физиологической нормы.

С учетом вышеизложенного, очевидна необходимость дальнейших исследований, связанных с возможным влиянием пробиотических микроорганизмов (сертифицированных и выделенных из состава аутофлоры кишечника) и их метаболитов после адгезии и колонизации слизистой микрофлоры на состояние организма хозяина в целом, а также на состояние иммунитета.

Выбор микроорганизмов аутофлоры кишечника белых мышей в качестве объекта сравнения обусловлен имеющимися данными [19], согласно которым пробиотические микроорганизмы должны быть изолированы из организма тех видов животных и человека, кому они будут предназначаться.

### Цель исследования

Цель исследования состоит в оценке влияния больших доз пробиотика Бифидобактерин и микроорганизмов аутофлоры кишечника на организм белых мышей и показатели клеточного иммунитета.

### Материалы и методы исследования

В экспериментах использовали коммерческий препарат Бифидумбактерин, созданный на основе *Bifidobacterium bifidum* № 1 (№ 791) в ФГУП «НПО Микроген», Россия (серия 315-6), а также микроорганизмы собственной кишечной микрофлоры экспериментальных белых мышей.

Для выращивания бифидобактерий и представителей нормальной микрофлоры, выделенных из фекалий экспериментальных животных, использовали плотные питательные среды рекомендованного состава [20; 21], а также агар Хоттингера и Эндо. Выращивание микроорганизмов в микроаэрофильных условиях проводили при температуре 37 °С с использованием системы для анаэробного культивирования (анаэроостат) Anaerobic system MarkIII – LE003 (Hi Media Laboratories Pvt. Ltd, Мумбаи, Индия) с пакетами газогенераторными Hi Anaero Gas Pacet.

Бифидобактерии, содержащиеся в составе пробиотика Бифидумбактерин, вводили животным per os, начиная с суточной дозы, определенной инструкцией по медицинскому применению препарата [21], с учетом переводного коэффициента на единицу поверхности тела. Суспензии микроорганизмов собственной нормальной микрофлоры также вводили животным per os в той же дозировке, что и бифидобактерии.

Кровь у животных отбирали из ретроульбарного сплетения в пробирку с гепарином (ОАО «Синтез Курган», Россия) из расчета 25 ЕД на 1 мл крови до и через 3 недели после окончания перорального введения бифидобактерий и микроорганизмов нормальной микрофлоры. Использовали гепарин 5000 ЕД·мл<sup>-1</sup>. Кровь с гепарином хранили не более 2 часов при температуре 6–8 °С.

Для выделения из образцов крови популяций (субпопуляций) лимфоцитов использовали моноклональные антитела (МА), меченные флуорохромами («Beckman Coulter», США): anti-mouse CD45-PE-Cy5.5, anti-mouse CD3e-PE-Cy7, anti-mouse CD8a-APC, anti-mouse IFN gamma-FITC, anti-mouse Ly-49C/I/F/H-PE; для определения границ неспецифического связывания – антивидовые изотипические контроли: Rat IgG1 K isotype control FITC, Golden Syrian Hamster IgG isotype control PE. Пермибиализацию лейкоцитов проводили с помощью IntraPrepTM («Beckman Coulter», США); для промывки клеточной суспензии использовали фосфатно-солевой буферный раствор.

Для корректного исключения из зоны анализа всех частиц, которые не соответствовали по размерам и гранулярности живым лимфоцитам, вводили необходимые логические ограничения в гистограммы распределения частиц по боковому светорассеянию и CD45-FITC (SS/CD45-FITC), а также боковому светорассеянию и витальному красителю 7-AAD (SS/7-AAD).

При проведении работы применяли одноканальные микропипеточные дозаторы с переменным объемом на

10 мкл, 200 мкл, 5000 мкл («Eppendorf», Германия), пробирки для проточной цитометрии («Beckman Coulter», США).

Перемешивание клеток крови и моноклональных антител в процессе пробоподготовки осуществляли на вортексе («ELMI», Латвия). Определение относительного уровня содержания в крови анализируемых субпопуляций лимфоцитов (в процентах) проводили на проточном цитофлуориметре Navios («Beckman Coulter», США).

Подсчет абсолютного количества лейкоцитов проводили в камере Горяева на световом микроскопе Микмед-2 (ОАО «Ломо», Россия), выражая полученные результаты в единицах измерения – количество клеток · 10<sup>9</sup> л<sup>-1</sup>, относительное значение – в процентах.

В работе использовали прошедших акклиматизацию белых мышей массой 18–20 г беспородных, обоего пола.

Обработку результатов экспериментов проводили согласно рекомендациям, изложенным в руководстве [23].

### Результаты исследования

Белые мыши, использованные в работе, были разделены на две группы по 13 особей в каждой. До начала введения пробиотических микроорганизмов у подопытных животных осуществляли забор крови для определения фоновых значений показателей клеточного иммунитета. Далее, животным первой группы перорально вводили 2 раза в сутки бифидобактерии пробиотического препарата Бифидумбактерин, начиная с дозы 1,3 · 10<sup>5</sup> микробов, соответствующей одной дозе для человека с учетом переводного коэффициента на единицу поверхности тела, увеличивая вводимую дозу бифидобактерий каждые 5 дней соответственно в 5, 10 и 100 раз.

Животным второй группы вводили перорально суспензию микроорганизмов индивидуальной микрофлоры, выделенных из фекалий и выращенных на плотных питательных средах. Вводимая доза бактерий индивидуальной микрофлоры составляла двукратно в сутки по 1,3 · 10<sup>5</sup> микробов с постепенным увеличением в 5, 10 и 100 раз. Наблюдение за животными, помещенными для содержания в индивидуальные кюветы с крышками, велось в течение всего срока экспериментов, включая 10 дней после последнего введения пробиотических микроорганизмов.

Следует отметить, что микроорганизмы, выделенные из фекалий животных второй группы на соответствующих плотных питательных средах, образовывали консорциум, состоящий в основном из бифидобактерий, лактобактерий и эшерихий. У отдельных животных были идентифицированы среди выделенных микробов золотистый стафилококк, энтерококк, протеи, неферментирующие грамтрицательные палочки и в двух случаях – бациллы.

Таким образом, животным первой группы перорально вводили монокультуру лиофилизированных бифидобактерий в повышающихся концентрациях, а животным вто-

рой группы – суспензии индивидуальных живых бактерий, выделенных из кишечного содержимого каждого подопытного животного.

В ходе наблюдения за животными отмечено, что в то время, как животные второй группы в течение всего периода наблюдений оставались активными, подвижными, с чистой шерстью и хорошо поедали корм, жи-

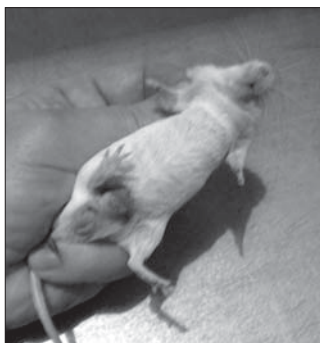


Рисунок – Внешний вид животного с локальным участком выпадения шерсти на коже брюшной стенки

Таблица

Содержание в крови белых мышей популяций (субпопуляций) лимфоцитов						
Определяемый показатель	Уровень содержания в крови относительных и абсолютных значений популяций (субпопуляций) лимфоцитов ( $X \pm I_{95}$ )					
	Фон (n=10)		Группа 1 (n=11)		Группа 2 (n=13)	
	Относительное значение показателя, процент	Абсолютное значение показателя, клеток $\cdot 10^9 \cdot \text{л}^{-1}$	Относительное значение показателя, процент	Абсолютное значение показателя, клеток $\cdot 10^9 \cdot \text{л}^{-1}$	Относительное значение показателя, процент	Абсолютное значение показателя, клеток $\cdot 10^9 \cdot \text{л}^{-1}$
Лейкоциты ( $CD_{45}$ )	95,0-100,0	8,000 $\pm$ 0,9	95,0-100,0	10,475 $\pm$ 2,429	95,0-100,0	9,825 $\pm$ 1,666
Лимфоциты	59,9 $\pm$ 6,9	4,792 $\pm$ 0,565	62,3 $\pm$ 8,0	6,404 $\pm$ 0,874	57,6 $\pm$ 5,6	5,600 $\pm$ 0,548
$CD_3^+$	54,6 $\pm$ 5,5	2,616 $\pm$ 0,526	50,2 $\pm$ 7,4	3,257 $\pm$ 0,870	55,7 $\pm$ 5,3	3,100 $\pm$ 0,194
$CD_8^+$	22,6 $\pm$ 2,3	0,591 $\pm$ 0,087	27,0 $\pm$ 2,4	0,882 $\pm$ 0,266	35,5 $\pm$ 7,5	1,094 $\pm$ 0,183
$CD_4^+$	77,4 $\pm$ 2,3	2,025 $\pm$ 0,516	73,0 $\pm$ 2,4	2,375 $\pm$ 0,626	64,5 $\pm$ 7,5	2,006 $\pm$ 0,315
$NK^+$	0,8 $\pm$ 0,3	0,040 $\pm$ 0,011	0,5 $\pm$ 0,1	0,030 $\pm$ 0,010	0,7 $\pm$ 0,3	0,041 $\pm$ 0,021
$CD_4^+IFN-\gamma^+$	2,1 $\pm$ 0,3	0,043 $\pm$ 0,013	7,9 $\pm$ 2,9	0,196 $\pm$ 0,111	6,6 $\pm$ 2,4	0,130 $\pm$ 0,047
$CD_8^+IFN-\gamma^+$	13,6 $\pm$ 2,6	0,080 $\pm$ 0,021	11,9 $\pm$ 2,6	0,107 $\pm$ 0,042	8,5 $\pm$ 2,8	0,091 $\pm$ 0,026
$NK^+IFN-\gamma^+$	5,6 $\pm$ 2,6	0,002 $\pm$ 0,001	6,4 $\pm$ 4,1	0,004 $\pm$ 0,005	2,4 $\pm$ 1,6	0,001 $\pm$ 0,001

Примечание. – Обозначения используемых показателей:  $CD_{45}$  – маркер общего лейкоцитарного антигена;  $CD_3^+$  – маркер Т-лимфоцитов;  $CD_8^+$  – маркер Т-лимфоцитов цитотоксических;  $CD_4^+$  – общий маркер Т-лимфоцитов хелперов;  $NK^+$  – маркер NK лимфоцитов;  $CD_4^+IFN-\gamma^+$  – общий маркер Т-лимфоцитов хелперов, продуцирующих  $IFN-\gamma^+$ ;  $CD_8^+IFN-\gamma^+$  – маркер Т-лимфоцитов цитотоксических, продуцирующих  $IFN-\gamma^+$ ;  $NK^+IFN-\gamma^+$  – маркер NK лимфоцитов, продуцирующих  $IFN-\gamma^+$

вотные первой группы, получавшие монокультуру регидратированных бифидобактерий в повышающихся дозах, испытывали явный дискомфорт: животные внешне были неопрятными, малоактивными, плохо поедали корм.

Более того, две из 13 белых мышей пали при введении бифидобактерий в дозе, в 10 раз превышающей суточную дозу. На вскрытии у павших животных были выявлены манифестные признаки перитонита. У оставшихся 11 животных на коже появились локальные участки выпадения шерсти (рисунок 1).

Через 10 дней после окончания перорального введения подопытным животным первой и второй групп соответственно суспензий регидратированных бифидобактерий и индивидуальных микроорганизмов нормальной микрофлоры, у них вновь отбирали кровь для определения уровня показателей клеточного иммунитета.

С целью изучения влияния пробиотических микроорганизмов на иммунную систему белых мышей с использованием метода проточной цитофлуориметрии был проанализирован уровень содержания в крови отдельных популяций (субпопуляций) лимфоцитов, таких как  $CD_4^+$ -Т-лимфоцитов хелперов, являющихся помощниками в реализации клеточного (Th1-лимфоциты) и гуморального (Th2-лимфоциты) иммунитета;  $CD_8^+$ -Т-лимфоцитов супрессоров (цитотоксических), принимающих участие в регуляции функции Т-хелперов и исполняющих роль киллеров в отношении интрацеллюлярных патогенов;  $NK^+$ -натуральных киллеров, основной функцией которых в организме является реализация противоопухолевого и противовирусного иммунитета. Кроме того, была оценена продукция соответствующими клетками интерферона  $\gamma$  ( $IFN-\gamma^+$ ), являющегося цитокином, стимулирующим дифференцировку Т-лимфоцитов хелперов в направлении Th1-клеток воспаления, а также участвующих в противоопухолевом и противовирусном иммунитете.

Результаты оценки уровня содержания в крови белых мышей популяций (субпопуляций) лимфоцитов, а также уровень продукции данными клетками  $\gamma$ -интерферона, представлены в таблице.

Как следует из данных, представленных в таблице, у животных первой и второй групп выявлено достоверное увеличение в крови  $CD_4^+IFN-\gamma^+$ -лимфоцитов по сравне-

нию с фоновым значением. В то же время в крови животных второй группы отмечена явная тенденция к увеличению  $CD_8^+$ -лимфоцитов, снижению  $CD_4^+$ -лимфоцитов и  $NK^+IFN-\gamma^+$ -лимфоцитов в сравнении с фоновыми значениями.

### Обсуждение полученных результатов

Как известно, пробиотики наряду с вакцинами, иммуноглобулинами, интерферонами, цитокинами, сыворотками, бактериофагами, аллергенами, диагностическими препаратами, иммуномодуляторами бактериального происхождения и на основе экстрактов органов и тканей относятся к медицинским иммунобиологическим препаратам. Они предназначены для специфической профилактики, диагностики и лечения инфекционных, паразитарных болезней и аллергических состояний.

Пробиотики, в частности, являются довольно распространенными препаратами, предназначенными для нормализации нарушений микробиоценоза кишечника. Однако, их положительный эффект даже при длительном применении носит транзитный характер, а порой и полностью отсутствует [24; 25].

Тем не менее, в инструкциях по медицинскому применению, в частности препаратов Бифидумбактерин и Лактобактерин, есть рекомендации по увеличению дозы принимаемого препарата в 5 раз с профилактической целью и в 5-10 раз при воспалительных заболеваниях. Только в инструкции по медицинскому применению пробиотического препарата Лактобактерин при отсутствии положительного эффекта от его применения на протяжении двух недель предписывается в такой ситуации проведение повторного исследования микрофлоры желудочно-кишечного тракта и коррекция ее другими препаратами в зависимости от полученного результата [26].

Но как отразится увеличение дозы принимаемого пробиотического препарата в 5, 10 или даже в 100 раз на состоянии пациента? Возможны ли какие-то нежелательные последствия в этом случае?

Представленные во введении настоящей работы обобщенные данные по клинко-лабораторным исследованиям дают основание утвердительно ответить на поставленные вопросы. В опубликованной научной статье А.А. Воробьева и В.М. Бондаренко [27] прямо засвидетельствовано, что «...представители нормальной микро-

флоры, даже такие «апатогенные», как бифидобактерии и лактобациллы, способны вызвать разнообразные формы локальных и генерализованных инфекций в основном у лиц с вторичными иммунодефицитами».

При этом, как указано в работе [14], в ряде случаев обнаруживается общность бактериальных генов и генов главного комплекса гистосовместимости у человека. Антитела, образующиеся к бактериальному компоненту, перекрестно реагируют с белками клеток кишечника, что ведет к увеличению проницаемости слизистой, нарушению ее барьерной функции в отношении различных молекул и токсинов.

Представленные в настоящей работе результаты свидетельствуют о том, что пероральное введение животным первой группы монокультуры регидратированных бифидобактерий пробиотика Бифидобактерин в повышающихся концентрациях неблагоприятно сказалось на общем состоянии подопытных белых мышей, две особи из которых пали вследствие развития перитонита.

Однако, у оставшихся в живых белых мышей по отношению и абсолютному уровню содержания в крови статистически достоверно выявлена продукция Т-лимфоцитами хелперами и НК-клетками  $\gamma$ -интерферона (соответственно лимфоциты с фенотипом  $CD_4^+IFN-\gamma$  и  $NK^+INF-\gamma$ ). Данный факт свидетельствует о направленности иммунного ответа преимущественно по клеточному пути развития, стимуляции противомикробной активности макрофагов и, возможно, противоопухолевого иммунитета при введении животным монокультуры регидратированных бифидобактерий пробиотика Бифидумбактерина.

Животные второй группы, которым перорально вводили повышающиеся концентрации микроорганизмов собственной индигенной микрофлоры кишечника, вполне удовлетворительно перенесли данную бактериальную и антигенную нагрузку, которая также сопровождалась достоверным по сравнению с фоновым значением ростом относительного и абсолютного количества Т ( $CD_4^+IFN-\gamma^+$ )-лимфоцитов хелперов, продуцирующих  $\gamma$ -интерферон.

Одновременно, у животных второй группы в ходе исследования выявлено снижение относительного уровня содержания в крови  $CD_4^+$ -лимфоцитов хелперов и повышение цитотоксических  $CD_8^+$ -лимфоцитов супрессоров. Вполне вероятно, что под влиянием перорально вводимых микроорганизмов индивидуальной индигенной микрофлоры, среди которых присутствовали и условно-патогенные микроорганизмы, такие как золотистый стафилококк, энтерококк, протей и другие, был нарушен баланс в консорциуме микроорганизмов кишечной микрофлоры в сторону увеличения популяции условно-патогенных бактерий. Вследствие избыточной антигенной стимуляции иммунной системы со стороны условно-патогенной микрофлоры и ответной реакции с ее стороны, направленной на восстановление гомеостаза в микробиоценозе кишечника, развилось состояние иммуносупрессии.

Таким образом, нами впервые получены экспериментальные доказательства того, что при пероральном введении экспериментальным животным больших доз пробиотических микроорганизмов могут возникать патологические состояния, приводящие даже к гибели животных.

Ряд повторных введений экспериментальным животным пробиотических микроорганизмов *per os* в виде монокультуры или в виде сочетания 4-5 видов микроорганизмов (аутофлоры, выделенной из фекалий животных) можно рассматривать как своеобразный вакцинальный процесс, сопровождающийся активацией сложной систе-

мы адаптационных механизмов, связанных со структурными, обменными и функциональными изменениями в макроорганизме [28].

В соответствии с современными представлениями о механизмах развития адаптации при любых нарушениях гомеостаза на первый план выступает мобилизация той системы, которая ответственна за адаптацию к данному фактору. Такой системой в нашем конкретном случае выступает иммунная система. При пероральном пути поступления пробиотиков и микроорганизмов нормальной микрофлоры, являющемся физиологическим путем введения антигенов и других биологически активных веществ в организм [29], доминирующую роль играет именно иммунная система, поскольку на нее падает главная нагрузка по устранению нарушений гомеостаза, вызванных антигенным воздействием [30].

Выявленные субпопуляционные сдвиги и изменения функциональной активности лимфоцитов у белых мышей в общем укладываются в рамки иммунобиологической перестройки в организме животных на фоне энтерального введения больших доз микроорганизмов пробиотиков. Однако, как это подчеркнуто в работе А.Н. Панина и Н.И. Малик [31], длительное использование высоких доз пробиотических микроорганизмов (антигена) приводит к истощению адаптационных резервов макроорганизма, возникновению побочных эффектов и снижению эффективности пробиотикотерапии при длительных курсах.

В заключение укажем, что полученные нами результаты вполне созвучны опубликованным В.М. Бондаренко и В.Г. Петровской [14] данным о наличии у пробиотических штаммов микроорганизмов нежелательных свойств, к числу которых относят повышенную метаболическую активность, способность синтезировать промежуточные биополимеры, выраженную способность к транслокации из кишечника во внутренние органы, флогогенный эффект пептидогликана.

Эти и другие свойства пробиотических микроорганизмов и микроорганизмов аутофлоры, на основе которых могут создаваться индивидуализированные пробиотические препараты, необходимо брать во внимание при решении проблемы выбора пробиотиков, правильного подбора их курсовых и разовых доз.

Необходимо также при конструировании индивидуализированных пробиотических препаратов использовать чистые культуры микроорганизмов, выделенных из консорциума кишечной микрофлоры, которые, будучи более адаптированными к организму хозяина, смогут восстанавливать исходный количественный состав нормальной микрофлоры, в том числе в сочетании с современными пребиотическими препаратами [9; 11].

## Выводы

1. Изучено влияние больших доз пробиотика Бифидумбактерин и микроорганизмов аутофлоры кишечника при пероральном введении на организм белых мышей и показателя клеточного иммунитета.

2. Установлено, что пероральное введение белым мышам больших доз пробиотика Бифидумбактерин приводит к ухудшению общего состояния животных, в частности к транслокации бактерий в брюшную полость у отдельных животных с развитием перитонита и их гибелью. У выживших животных в крови обнаружена статистически достоверная продукция Т-лимфоцитами и НК-клетками  $\gamma$ -интерферона, свидетельствующая о направленности иммунного ответа преимущественно по клеточному пути развития с одновременной стимуляцией противомикробной активности макрофагов.

3. Пероральное введение белым мышам повышающих концентраций микроорганизмов аутофлоры кишечника не сказывается на общем состоянии животных, однако сопровождается достоверным по сравнению с фоновым значением ростом относительного и абсолютного количества Т-лимфоцитов хелперов, продуцирующих  $\gamma$ -интерферон в ответ на бактериальную и антигенную нагрузку вводимой аутофлоры кишечника.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Мечников И. Лекції з порівняльної патології запалення (читані у квітні й травні 1891 року в Пастерівському інституті). Київ: ДВОУ-МЕДВИДАВ УРСР; 1932; 260 с.
2. Шандуренко Г.В. Илья Ильич Мечников Газета Биология. Издательский дом «Первое сентября», № 23. (цитировано 15.01.12). Адрес доступа: <http://bio.1septembr.ru/view-article.php?ID=200002308>.
3. Мечников И.И. Этюды о природе человека. М: Изд-во АН СССР; 1961; 288 с.
4. Мечников И.И. Этюды оптимизма. М: Наука; 1987; 327 с.
5. Biology-Online.org (цитировано 20.01.12). Адрес доступа: <http://www.biology-online.org/dictionary/probiotics>.
6. Fuller R. Probiotics in man and animals. A review. *J Appl Bacteriol* 1989; 66 (5): 365-378.
7. Похиленко В.Д., Перельгин В.В. Пробиотики на основе спорообразующих бактерий и их безопасность. *Хим биол безопасность* 2007; № 2-3 (32-33): 20-41.
8. Gibson G.R., Roberfroid G.R. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* 1995; 125: 1401-1412.
9. Fuller R., Gibson G.R. Probiotics and prebiotics: microflora management for improved gut health. *Clin Microbiol Infect* 1998; 4: 477-480.
10. Кузнецов О.Ю. Бактериальная колония как сложное организмованное сообщество клеток. *Журн микробиол* 2005; № 2: 3-7.
11. Мишушкин 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.
12. Мечников И.И. Невосприимчивость в инфекционных болезнях. Жизнь науки. М: Наука, 1973. с. 374-384.
13. Фролов В.А. Опередивший время. М: Советская Россия, 1980; 267 с.
14. Бондаренко В.М., Петровская В.Г. Ранние этапы развития инфекционного процесса и двойственная роль нормальной микрофлоры. *Вестн РАМН* 1997; № 3: 7-10.
15. Резник С.Р., Вьюницкая В.А., Афонская С.В., Смирнов В.В. Серологический ответ макроорганизма на патогенные бактерии под влиянием пробиотика из бацилл. *Микробиол журн* 1993; 55(1): 81-83.
16. Сорокулова И.Б. Влияние пробиотиков из бацилл на функциональную активность макрофагов. *Антибиот химиотер* 1998; 43 (2): 20-23.
17. Осипова И.Г., Сорокулова И.Б., Терешкина Н.В., Григорьева Л.В. Изучение безопасности бактерий рода *Bacillus*, составляющих основу некоторых пробиотиков. *Журн микробиол* 1998; № 6: 68-70.
18. Ердякова А.С., Чичерин И.Ю., Лундовских И.А., Погорельский И.П. Лимфоцитотоксическая активность пробиотических микроорганизмов бифидобактерий и лактобактерий: выявление и характеристика. Общество, наука, инновации (НТК-2012): ежегод. открыт. всерос. науч.-техн. конф. 16-27 апреля 2012 г.: сб. материалов. Вят. гос. ун-т; отв. ред. С.Г. Литвинец. Киров; 2012. 1 электрон. опт. диск (CD-ROM) (Биологический факультет. Секция «Микробиология»).
19. Каширская Н.Ю. Значение пробиотиков и пребиотиков в регуляции кишечной микрофлоры. *Русский мед журн* 2000; 8 (13-14): 572-575.
20. 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.
21. Лихачева А.Ю., Бондаренко В.М., Соколова К.Я. Современное состояние вопроса таксономии бактерий рода *Lactobacillus*. *Журн микробиол* 1992; № 9-10: 74-78.
22. Инструкция по медицинскому применению препарата Бифидумбактерин сухой, лиофилизат для приготовления суспензии для приема внутрь и местного применения. ФГУП «НПО Микроген»: утв. Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 16.12.2005 г. № 01-11/243-05.
23. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л: Медгиз, 1962; 280 с.
24. Ардатская М.Д. Клиническое значение короткоцепочечных жирных кислот при патологии желудочно-кишечного тракта: дис. д-ра мед. наук: защищена в 2003 г. М: Учебно-научный центр Медицинского центра Управления делами Президента Российской Федерации, 2003; 299 с.
25. Амерханова А.М. Научно-производственная разработка новых препаратов-синбиотиков и клинико-лабораторная оценка их эффективности: дисс... д-ра биол. наук: защищена в 2009 г. М: Московский науч.-исслед. ин-т эпидем. и микробиол. им. Г.Н.Габричевского, 2009; 280 с.
26. Инструкция по медицинскому применению препарата Лактобактерин сухой, лиофилизат для приготовления суспензии для приема внутрь и местного применения. ФГУП «НПО Микроген»: утв. Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 14.04.2006 г. № 01-11/50-06.
27. Воробьев А.А., Бондаренко В.М. Роль микробиологии в снижении инфекционной заболеваемости. *Эпидем инф болезни*, 1997; № 5: 7-11.
28. Богачева Н.В., Дармов И.В., Борисевич И.В., Печенкин Д.В., Крючков А.В. Динамика показателей клеточного иммунитета на фоне введения чумной живой сухой вакцины. *Клин лаборат диагн*, 2009; № 8: 24-27.
29. Воробьев А.А. Физиологические пути введения антигенов и других биологически активных веществ в организм. *Иммунология*, 2002; 23 (3): 138-142.
30. 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.
31. Панин А.Н., Малик Н.И. Принципы и перспективы применения зубиотиков в животноводстве. 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. 22-23.