

**А.Н. Шкопоров, Б.А. Ефимов, Е.В. Хохлова, З.А. Черная,
Е.А. Постникова, М.Д. Белкова**

ВЛИЯНИЕ ПРИЕМА ПРОБИОТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ РОДА LACTOBACILLUS И BIFIDOBACTERIUM НА СОСТАВ МИКРОФЛОРЫ КИШЕЧНИКА У ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ

В ходе ограниченных плацебо-контролируемых испытаний с участием групп здоровых добровольцев посредством бактериологических и молекулярных методов определено влияние перорального приема четырех композиций из живых пробиотических молочнокислых и бифидобактерий, перспективных в качестве добавок в различные продукты питания, на кишечную микрофлору. Одна из композиций включала штамм *Lactobacillus casei* B-1144, вторая *L. acidophilus* 593.40.3, третья *L. plantarum* B-1615, четвертая состояла из смеси штаммов *Bifidobacterium dentium* 49В, *B. animalis* 52В и *B. longum* 53В. Сравнительный анализ качественного и количественного состава кишечной микрофлоры выявил наличие тенденции к увеличению числа облигатно-анаэробных бактерий представителей нормальной микрофлоры, относящихся к родам *Bacteroides*, группам *Atopobium* и *Clostridium coccoides* и нарастание титров непатогенных кишечных палочек и лактобацилл у пациентов, получавших пробиотические композиции при отсутствии выраженных изменений микрофлоры у добровольцев, получавших плацебо.

Пробиотики, бифидобактерии, лактобациллы, микрофлора кишечника, кисломолочные продукты.

Введение

Гастроинтестинальный тракт здорового человека колонизирован несколькими сотнями видов комменсальных и условно-патогенных бактерий, количественный состав которых различается в разных отделах пищеварительной системы и зависит от возраста и диеты человека. Несмотря на то что в настоящее время детально охарактеризована лишь небольшая часть видового разнообразия кишечной микрофлоры, нет сомнений в том, что ее сбалансированный и полноценный состав критически важен для нормального функционирования пищеварительной системы и всего организма в целом. Доминирующими таксономическими группами бактерий, в норме колонизирующими интестинальный тракт человека, являются бифидобактерии, лактобактерии, бактероиды и клостридии. Исследования последних десятилетий продемонстрировали наличие у бактерий этих таксономических групп множества положительных свойств, таких как способность к продукции пищеварительных ферментов и витаминов, способность к подавлению всасывания холестерина в кишечнике, а также противовоспалительная, антиканцерогенная и иммуномодулирующая активность. Позитивное влияние бифидо- и лактобактерий на физиологическое состояние желудочно-кишечного тракта и данные об эффективности пробиотических формул, содержащих культуры бифидобактерий и лактобактерий при лечении ряда заболеваний, в сочетании с полным отсутствием, в частности у бифидобактерий, факторов патогенности объясняют неугасающий интерес исследователей к данной группе микроорганизмов.

Рациональное питание является одним из ключевых факторов, определяющих гармоничный рост, развитие, поддержание здоровья и устойчивости человека к действию инфекционных и других неблагоприятных факторов внешней среды. Особое

значение фактор питания имеет для детей. Важное место в питании людей всех возрастных групп играют коровье молоко и другие продукты, приготовленные на его основе или с его использованием. Их включение в рацион позволяет обеспечить организм дополнительным количеством высококачественного белка и жира, кальция, витамина В₂ и других нутриентов. В последнее время широкое распространение в нашей стране получили кисломолочные продукты с добавлением пробиотических бактерий (лактобациллы и бифидобактерии), которые выступают не только как носители указанных выше пищевых веществ, но и проявляют ряд других полезных физиологических, и в первую очередь пробиотических, свойств: нормализуют кишечную микрофлору и двигательную функцию кишечника, обладают иммуномодулирующей активностью. Учитывая, что современные исследования в области создания новых диетических продуктов направлены, в том числе, на поиск и изучение биологических свойств новых пробиотических штаммов бактерий, которые могли бы быть использованы с целью усиления их благотворных свойств на организм человека, целью настоящего исследования было в ходе ограниченных клинических испытаний на группах здоровых добровольцев определить влияние четырех композиций пробиотических бактерий, перспективных в качестве пищевых добавок, на качественный и количественный состав фекальной микрофлоры при курсовом пероральном приеме.

Объект и методы исследования

Пробиотические штаммы бактерий

В ходе ранее проведенных исследований по результатам *in vitro* тестов были отобраны три штамма бифидобактерий и три штамма лактобацилл, различающиеся наилучшим сочетанием характеристик, включая: устойчивость к желчи, экстремальным

Таблица 1

Состав групп добровольцев, включенных в исследование

Группа	Получаемый препарат	Численность группы	Средний возраст	Половой состав (М/Ж)
A	Плацебо	14	37,8±10,1	0/14
B	«AiVi» серия Lb 3.30	24	41,0±11,1	7/17
C	«AiVi» серия Lb 3.10	26	37,5±11,3	11/15
D	«AiVi» серия B 6.10	20	35,9±12,9	5/15
E	«AiVi» серия Lb 3.20	14	36,0±8,8	4/10

значениям pH, адгезивность к эпителию кишечника, а также выраженную антагонистическую активность по отношению к условно-патогенным бактериям. На основе этих штаммов были созданы четыре композиции штаммов пробиотических бактерий следующего состава:

1) культура бактериальная пробиотическая «AiVi» серия Lb 3.10 (*Lactobacillus casei* B-1144);

2) культура бактериальная пробиотическая «AiVi» серия Lb 3.20 (*Lactobacillus acidophilus* 593.40.3);

3) культура бактериальная пробиотическая «AiVi» серия Lb 3.30 (*Lactobacillus plantarum* B-1615);

4) культура бактериальная пробиотическая «AiVi» серия B 6.10 (*Bifidobacterium dentium* 49B 40 % от общего содержания бактерий, *Bifidobacterium animalis* 52B 30 %, *Bifidobacterium longum* 53B 30 %).

Пациенты

Исследование проводилось двойным слепым плацебо-контролируемым методом с ноября 2012 года по март 2013 года на базе ООО «Зеленые Линии». В состав испытуемых входили 98 добровольцев, считающих себя здоровыми. Из них 94 были сотрудниками ООО «Зеленые Линии». Возраст испытуемых был от 19 до 66 лет (средний возраст 37,9±11,1 года), 27 из них были мужчинами, а 71 – женщинами. Перед началом исследования испытуемые прошли клинический осмотр у врача-гастроэнтеролога, включавший в себя опрос, изучение анамнеза, физикальное обследование. Критериями включения в исследование были: возраст от 18 до 70 лет, отсутствие заболеваний желудочно-кишечного тракта в остром периоде, отсутствие индивидуальных противопоказаний к приему живых молочнокислых культур. Критериями исключения были: заболевания желудочно-кишечного тракта в остром периоде (в т.ч. воспалительные и опухолевые заболевания, болезнь Крона, неспецифический язвенный колит, кишечные инфекции, состояния после перенесенных операций, прием антибиотиков, пробиотиков, гормональных препаратов непосредственно перед началом исследования. Все испытуемые случайным образом были распределены на пять неравных групп (А-Е) (табл. 1). Добровольцы, отобранные для проведения исследования, на протяжении 30 дней самостоятельно принимали препараты живых лиофильно высушенных культур молочнокислых бактерий (15 приемов через день в дозе $5 \cdot 10^{10}$ живых бактерий), заполняли дневники самочувствия, включая отметку о возникших побочных эффектах. Из 98 человек, включенных в исследование и прошедших первичный осмотр и бактериологическое исследование, 71 предоставил образцы кала для повторного исследования.

До и после приема препаратов проводили бактериологическое и молекулярно-генетическое исследование микрофлоры кишечника.

Бактериологическое исследование фекалий

Материалом для исследования служили фекалии, которые испытуемые сами собирали стерильным шпателем и помещали в стерильный транспортный контейнер. В бактериологической лаборатории из исследуемого материала готовили серийные десятикратные разведения в физиологическом растворе и высевали аликвоты на селективные питательные среды [1].

Для выделения микроорганизмов применяли следующие питательные среды: *Bifidobacterium* - агар (Himedia) – для бифидобактерий, *Staphylococcus* агар # 110 (Himedia) – для стафилококков, *Enterococcus* агар (Serva, США) – для энтерококков, *Sabouraud Dextrose* агар (Serva, США) с добавлением хлорамфеникола (400 мг/л) – для дрожжеподобных грибов рода *Candida*. Микроорганизмы семейства *Enterobacteriaceae* и некоторые другие грамотрицательные палочковидные бактерии (*Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Acinetobacter*) выделяли на среде *Endo* агар (Serva, США), *Salmonella Shigella* Агар (Himedia) и *Brain Heart Infusion* агар (Serva, США). Чашки Петри с посевами инкубировали при 37 °С в течение 48 часов. Для культивирования чашек с посевами бифидобактерий использовали микроанэростаты (Oxoid, Англия), заполненные газовой смесью (85 % N₂, 5 % CO₂, 10 % H₂). Предварительную идентификацию изолятов энтеробактерий проводили при помощи высева бактерий на среду Клиглера (Serva, США). Окончательную видовую идентификацию проводили с использованием панели биохимических тестов API 20E (Biomerieux). На чашках с сердечно-мозговым агаром также определяли рост аэробных бацилл *Bacillus* sp., к которым относили грамположительные спорообразующие крупные палочки с β-гемолизом, способные к росту в аэробных условиях.

Молекулярно-генетическое исследование фекалий

Суммарную бактериальную ДНК выделяли из 0,1 мл суспензии фекалий в физиологическом растворе в разведении 10¹ раз. Экстракцию ДНК проводили с использованием набора «К-Сорб» (Синтол) в соответствии с инструкцией производителя. Выделенную ДНК хранили при –20 °С до проведения ПЦР.

Постановку реакций ПЦР в режиме реального времени осуществляли с использованием готовых 2,5х ПЦР-смесей («Синтол»), содержащих интеркалирующий краситель EvaGreen и блокирующие антитела к Taq-полимеразе для создания эффекта «горячего старта». В реакционные смеси объемом 15 мкл добавляли 2 мкл препарата ДНК (предварительно разведенного в 100 раз в деионизированной

воде) и группоспецифичные олигонуклеотидные праймеры до финальной концентрации 0,2 мкМ. ПЦР проводили в приборе С1000 (Bio-Rad) с оптическим модулем CFX96 с использованием следующей программы: 1) первичная денатурация и активация полимеразы –95 °С, 5 мин 2) денатурация –94 °С, 20 с; 3) отжиг праймеров – 50–55 °С, 20 с; 4) элонгация – 72 °С, 30 с. Длительность программы составляла 35 циклов. Флуоресценция в пробирках детектировалась в режиме реального времени на канале FAM (возбуждение 492 нм, эмиссия 520 нм). Значения пороговых циклов определяли автоматически прибором.

Верификация продуктов ПЦР осуществлялась при помощи записи кривых плавления от 65 до 95 °С с инкрементом 0,5 °С и временем инкубации на каждом шаге 5 с. Построение калибровочных кривых выполняли тем же методом с использованием в качестве матрицы для ПЦР серийных десятикратных разведений рекомбинантных плазмидных ДНК, которые содержат клонированные участки генов 16S рРНК, полученных из бактерий – представителей соответствующих групп. Определение концентрации исходных неразведенных плазмидных ДНК проводили методом абсорбционной спектрофотометрии на длине волны 260 нм. Расчет числа копий бактериальных генов 16S рРНК в исследуемых образцах проводили с использованием программы LibreOffice Calc.

Результаты и их обсуждение

Клинический статус испытуемых до начала и по окончании приема препарата

Обследование добровольцев из группы А показало, что индекс массы тела (ИМТ) у них в среднем составлял 25,5±4,2 (верхняя граница нормы), 35,7 % из них имеют вредные привычки (курение, алкоголь), 57 % были здоровы на момент обследования. Обследование добровольцев из группы В показало, что ИМТ у них в среднем составляет 25,8±4,6, 37,5 % имеют вредные привычки, 83,3 % были клинически здоровы на момент исследования. Добровольцы из группы С имели средний ИМТ, равный 26,3±3,9. Из них 11,5 % имели вредные привычки, а 80,8 % были признаны клинически здоровыми. В группе D среднее значение ИМТ составило 23,1±4,6. О вредных привычках сообщили 20 % обследуемых, 90 % человек были клинически здоровы. В группе E среднее значение ИМТ составило 24,0±5,1. Пятьдесят процентов пациентов этой группы имели вредные привычки. На первичном осмотре 93 % пациентов этой группы были признаны здоровыми.

Результаты бактериологического и молекулярно-генетического исследования кала до начала и по окончании приема пробиотиков

Оценка количественного содержания ДНК бактерий — представителей доминирующих таксономических групп кишечной микробиоты проводилась методом ПЦР в режиме реального времени. Для детекции были использованы шесть пар праймеров, специфичных к генам 16S рРНК следующих таксономических и внетаксономических групп бактерий, в норме доминирующих в кишечной микробиоте у че-

ловека: род *Bacteroides*, род *Prevotella*, внетаксономическая группа *Clostridium leptum* (включает роды *Clostridium*, *Faecalibacterium*, *Eubacterium*, *Ruminococcus*, *Subdoligranulum*) [2], внетаксономическая группа *Clostridium coccooides* (включает роды *Butyrivibrio*, *Clostridium*, *Coprococcus*, *Dorea*, *Eubacterium*, *Lachnospira*, *Roseburia*) [3] род *Lactobacillus*, группа *Atopobium* (включает роды *Atopobium*, *Collinsella*, *Eggerthella*, *Coriobacterium*) [4].

Анализ результатов ПЦР в реальном времени показал, что уровни шести доминирующих групп кишечных бактерий достаточно стабильны. Частота встречаемости этих групп микроорганизмов составила 100 % во всех группах пациентов. Количественный уровень микроорганизмов группы *C. leptum* колебался в диапазоне от 8,95 до 11,22 log геномэкв/г. Для группы *C. coccooides* диапазон концентраций простирался от 9,71 до 11,68 log геномэкв/г. Концентрации ДНК грамотрицательных неспорообразующих анаэробов родов *Bacteroides* и *Prevotella* находились в диапазоне от 9,36 до 11,73 и от 8,24 до 11,97 log геномэкв/г соответственно. Интересно, что для представителей рода *Prevotella* было характерно распределение концентраций с двумя максимумами (9,5 и 11,5 log геномэкв/г), на основании чего возможно сгруппировать всех пациентов в две четко разделенные группы с высоким и низким содержанием *Prevotella*. Эти данные согласуются с недавно выдвинутой концепцией «энтеротипов» [5], в соответствии с которой «энтеротип» II характеризуется высоким уровнем превотелл, а «энтеротипы» I и III – низким. Концентрации рода *Lactobacillus* и группы *Atopobium* варьировали от 8,59 до 11,09 и от 7,58 до 10,19 log геномэкв/г соответственно.

Различия количественных уровней как между группами пациентов, так и внутри групп до приема препаратов были минимальны.

Межгрупповое сравнение средних количеств бактериальных ДНК методом однофакторного дисперсионного анализа не выявило статистически значимых различий между пятью группами как до, так и после курса пробиотиков. В то же время использование парного критерия Стьюдента для внутригрупповых сравнений (до и после приема препарата) выявило:

1) в группе В – небольшое статистически значимое увеличение численности групп *Clostridium coccooides* (с 10,77±0,27 до 11,01±0,31 log геномэкв/г, p<0,05), *Bacteroides* (с 10,37±0,42 до 10,77±0,42 log геномэкв/г, p<0,01), *Lactobacillus* (с 9,84±0,44 до 10,21±0,41 log геномэкв/г, p<0,01), *Atopobium* (с 8,91±0,44 до 9,18±0,38 log геномэкв/г, p<0,01);

2) в группе С – увеличение численности тех же бактериальных групп (*Clostridium coccooides* с 10,72±0,24 до 10,94±0,40 log геномэкв/г, p<0,01, *Bacteroides* с 10,53±0,42 до 11,04±0,48 log геномэкв/г, p<0,01, *Lactobacillus* с 9,75±0,40 до 9,99±0,41 log геномэкв/г, p<0,01, *Atopobium* с 8,77±0,44 до 8,93±0,44 log геномэкв/г, p<0,05);

3) в группе D – увеличение численности *Bacteroides* (с 10,35±0,47 до 11,03±0,26 log геномэкв/г, p<0,01);

4) в группе Е – увеличение численности *Clostridium coccooides* (с $10,76 \pm 0,24$ до $10,99 \pm 0,38$ log геномэкв/г, $p < 0,05$), *Bacteroides* (с $10,53 \pm 0,30$ до $10,87 \pm 0,31$ log геномэкв/г, $p < 0,05$);

5) в контрольной группе А статистически значимых изменений после курса препарата плацебо выявлено не было.

Целью бактериологического исследования было определение качественного состава и количественного уровня бактерий кишечной микробиоты, относящихся к менее многочисленным, но легкокультивируемым группам: роду *Bifidobacterium*, семейству *Enterobacteriaceae*, родам *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus*, а также к роду дрожжеподобных грибов рода *Candida*.

Наибольшая частота встречаемости и количественные уровни были характерны для рода *Bifidobacterium* (частота встречаемости от 78,6 до 100 %, при средних уровнях 6,3–10,85 log КОЕ/г). На втором месте по частоте встречаемости и уровню представленности были лактозопозитивные (типичные) кишечные палочки (78,6–100 % при уровнях 4,0–9,46 log КОЕ/г). Несколько меньшие концентрационные уровни были характерны для рода *Enterococcus* (частота выявления 66,7–100 % при уровнях 3,95–9,32 log КОЕ/г). Реже и в более низких концентрациях высевались атипичные лактозонегативные кишечные палочки, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter freundii*, *Staphylococcus aureus*, коагулазонегативные стафилококки, бациллы (*Bacillus sp.*), дрожжеподобные (*Candida sp.*) и плесневые грибы. В единичных случаях детектировались также представители родов *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Morganella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Vibrio*. Однако частоты их встречаемости не подлежат статистическому анализу.

В то же время была обнаружена тенденция к росту частоты встречаемости лактозопозитивных кишечных палочек в группе Е, сокращению встречаемости атипичных кишечных палочек в группе С, снижению частоты встречаемости клебсиелл во всех группах кроме контрольной и снижению частоты встречаемости коагулазонегативных стафилококков в группе Е.

Помимо этого с использованием парного критерия Стьюдента был зарегистрирован рост концентраций лактозопозитивных *E. coli* в группе С после

курса препарата (с $7,08 \pm 1,15$ до $7,84 \pm 0,88$ КОЕ/г, $p < 0,05$).

Таким образом, статистический анализ данных о качественном и количественном составе кишечной микрофлоры у испытуемых показал наличие тенденции к увеличению числа облигатно-анаэробных бактерий, относящихся к роду *Bacteroides*, группам *Atopobium* и *Clostridium coccooides* у пациентов, получавших препараты на основе культур лактобацилл (группы В, С, Е). В группах В и С выявлено статистически достоверное нарастание количества *Lactobacillus*. Также в группе С выявлен рост концентрации лактозопозитивных кишечных палочек после окончания курса препарата. В группе D обнаружено значимое увеличение числа бактерий рода *Bacteroides*.

Выводы

Курсовой прием пробиотических культур приготовленных на базе использованных в работе живых штаммов лактобацилл и бифидобактерий (1 месяц, через день, в дозе $5 \cdot 10^{10}$ живых бактерий), не приводит к изменению клинического статуса здоровых добровольцев и добровольцев с хроническими заболеваниями ЖКТ и заболеваниями других систем в стадии ремиссии.

Бактериологическое и молекулярно-генетическое исследование фекалий выявило тенденцию к количественным сдвигам в кишечной микрофлоре испытуемых в группах В (рост числа бактериоидов, грамположительных анаэробных симбионтов), С (рост числа грамположительных и грамотрицательных анаэробных симбионтов, непатогенных кишечных палочек), D (рост числа бактериоидов) и Е (рост числа анаэробов). В то же время в контрольной группе (А) существенных изменений в составе микрофлоры выявлено не было.

Выявлены позитивные изменения в составе «полезной» (пробиотической) флоры у пациентов, получавших опытные закваски. Так, в группах В и С, получавших *Lactobacillus plantarum* В-1615 и *Lactobacillus casei* В-1144, выявлено значимое нарастание численности кишечных лактобацилл.

Проанализированные бактериальные пробиотические культуры могут быть рекомендованы для создания на их основе продуктов функционального назначения.

Список литературы

1. Биргер, М.О. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования / М.О. Биргер. – 3-е изд., перераб. и доп. – М.: Медицина, 1982.
2. Development of 16S rRNA-gene-targeted group-specific primers for the detection and identification of predominant bacteria in human feces / T. Matsuk, K. Watanabe, J. Fujimoto et al. // Appl Environ Microbiol. – 2002. – № 68. – P. 5445–5451.
3. Use of 16S rRNA gene-targeted group-specific primers for real-time PCR analysis of predominant bacteria in human feces / T. Matsuk, K. Watanabe, J. Fujimoto et al. // Appl Environ Microbiol. – 2004. – № 70. – P. 7220–7228.
4. Quantitative analysis of diverse Lactobacillus species present in advanced dental caries / R. Byun, M.A. Nadkarni, K.L. Chhour et al. // J Clin. Microbiol. – 2004. – № 42. – P. 3128–3136.
5. Enterotypes of the human gut microbiome / M. Arumugam, J. Raes, E. Pelletier et al. // Nature. – 2011. – № 473. – P. 174–180.

ГБОУ ВПО Российский национальный исследовательский
медицинский университет им. Н. И. Пирогова,
117997, Россия, г. Москва, ул. Островитянова, 1.

ФГБОУ ВПО Московский государственный
университет пищевых производств,
125080, Россия, г. Москва, Волоколамское шоссе, 11

SUMMARY

**A.N. Shkoporov, B.A. Efimov, E.V. Khokhlova, Z.A. Chernaia,
E.A. Postnikova, M.D. Belkova**

EFFECT OF PROBIOTIC *BIFIDOBACTERIUM* AND *LACTOBACILLUS* CULTURES ON INTESTINAL MICROBIOTA COMPOSITION IN HEALTHY ADULTS

A limited placebo-controlled study was conducted to assess the effect of *per os* intake of four dairy starter cultures composed of probiotic lactic acid bacteria and bifidobacterium on the intestinal microbiota of healthy volunteers. The four starter cultures included: (a) *Lactobacillus casei* B-1144, (b) *L. acidophilus* 593.40.3, (c) *L. plantarum* B-1615, and (d) a mixture of *Bifidobacterium dentium* 49B, *B. animalis* 52B and *B. longum* 53B. The comparison of intestinal microbiota in groups of volunteers receiving probiotic cultures against that in the group of volunteers receiving placebo revealed a number of quantitative changes. These included higher levels of obligate anaerobic bacteria belonging to the genus of *Bacteroides*, *Atopobium*, and *Clostridium coccooides* groups. In addition some of the starter cultures induced higher levels of lactobacilli and non-pathogenic *E. coli*. No statistically significant changes were observed in the group of volunteers receiving placebo.

Probiotics, bifidobacteria, lactobacilli, intestinal microbiota, dairy products.

N.I. Pirogov Russian National Research,
Medical University, Moscow 117997, Ostrovitjanova str., 1

Moscow State University of Food Production,
Moscow, 125080, Volokolamsk highway, 11

Дата поступления: 04.12.2013

