

УДК 579.8

Е. А. Брагин, И. П. Погорельский, С. Н. Янов

ОЦЕНКА ВЫЖИВАЕМОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ В СОСТАВЕ КОММЕРЧЕСКИХ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

Представленные результаты изучения выживаемости микроорганизмов в составе современных отечественных и зарубежных средств коррекции нарушений кишечного микробиоценоза в условиях *in vitro*, имитирующих пищеварения в желудке и кишечнике человека. В экспериментах использовали готовые формы пробиотиков, синбиотиков и мультипробиотик во флаконах и капсулах. Лиофилизированные препараты регидратировали изотоническим раствором хлорида натрия. Изучение выживаемости микроорганизмов пробиотиков проводили на модели *in vitro* имитирующий условия пищеварения в желудочно-кишечном тракте людей. Установлена крайне низкая выживаемость бактерий в составе пробиотических препаратов в пределах сроков годности. Сделан вывод о необходимости предварительного изучения характера взаимоотношения микроорганизмов пробиотиков с индигенной микробиотой пациента при выборе средств коррекции дисбиотических нарушений кишечной микробиоты. Полученные результаты следует учитывать при расчетах разовой и суточной доз пробиотических препаратов, предназначенных для коррекции нарушений микробиоценоза.

Ключевые слова: пробиотики, метабиотики, выживаемость.

Опубликованные результаты экспериментальных исследований [1] свидетельствует о том, что у пробиотиков основным действующим началом являются не сами микробные клетки, а продукты их жизнедеятельности – экзометаболиты. Эти научные данные открывают возможность совместного применения метабиотиков и пребиотиков, относящихся к новым классам современных средств коррекции нарушений микробиоценоза кишечника. Такая возможность дает основание для осторожного оптимизма и признания того, что точка невозврата в изучении пробиотиков еще не пройдена и концепция

пробиотикотерапии не будет отвергнута. Это важно в свете высказывания директора ГБУ «НИИ организации здравоохранения и медицинского менеджмента департамента здравоохранения» г. Москвы Давида Мелик-Гусейнова о появлении в аптечной сети лекарственных препаратов, относящихся к сектору бездоказательственной медицины. Они не вредные, не токсичные, но пользы от них либо очень мало, либо практически ее нет. К таким препаратам отнесены среди прочих импортные пробиотики «Бифиформ» (Дания) и «Хилак форте» (Германия): в этих препаратах нет жизнеспособных микроорганизмов. Более того, европейские медики даже не назначают эти препараты своим пациентам. В этой связи важно изучить состояние жизнеспособности бактерий в составе коммерческих препаратов, поступивших в аптечную сеть России, срок годности которых не истек (таблица 1).

Целью работы: изучение выживаемости микроорганизмов в капсульной и жидкой формах отечественных и зарубежных пробиотических препаратов.

Биоматериал для исследования был получен в стерильных условиях из капсул и флаконов с жидким содержимым. Содержимое одной капсулы (или 1 мл жидкого препарата пробиотика Биовестин-лакто или синбиотика Нормафлорин-Л) инокулировали в изотонический раствор хлорида натрия: для содержимого капсул в объеме 2мл, для жидкого синбиотика в объеме 1мл.

Выращивание бифидобактерий и лактобацилл, выделяемых из коммерческих препаратов проводили на плотных питательных средах рекомендованного состава [2], а эшерихий и других бактерий на агаре Хоттингера и Эндо. При выращивании бифидобактерий и лактобацилл в микроаэрофильных условиях использовали систему для анаэробного культивирования (анаэроостат) AnaerobicsystemMarkIII – LE003 (HiMediaLaboratoriesPvt. Ltd, Мумбаи, Индия) с патентами газогенераторными HiAnaeroGasPacet.

Количество жизнеспособных микроорганизмов в лиофилизате капсул или жидком препарате определяли высевом соответствующих десятикратных

разведений суспензий на плотные питательные среды чашках Петри и подсчета выросших колоний бактерий по истечении времени инкубирования при температуре 37 °С.

Таблица 1

Жизнеспособность микроорганизмов в составе пробиотических препаратов

Порядковый номер	Название препарата (срок годности)	Вид препарата	Состав и заявленная численность живых микроорганизмов	Количество жизнеспособных микроорганизмов
1	Аципол-С, серия 010116 (87%)	Пробиотик	Живые ацидофильные бактерии, не менее 1×10^7 КОЕ в одной капсуле	10 млн (16%)
2	Бак-Сет форте, лот 109105 (79%)	Мультипробиотик	<i>L. casei</i> PXN 37, <i>L. plantarum</i> PXN 47, <i>L. rhamnosus</i> PXN 54, <i>B. bifidum</i> PXN 23, <i>B. breve</i> PXN 25, <i>B. longum</i> PXN 25, <i>L. acidophilus</i> PXN 35, <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> PXN 63, <i>Streptococcus thermophilus</i> PXN 66, <i>B. Infantis</i> PXN 27, <i>L. Delbrueckii</i> ssp. <i>Bulgaricus</i> PXN 39, <i>L. helveticus</i> PXN 45, <i>L. salvarius</i> PXN 57, <i>L. fermentum</i> PXN 44, не менее 2×10^9 КОЕ в одной капсуле	2,9 млрд (19%)
3	Бифиформ, серия 283236 (66%)	Пробиотик	В одной капсуле <i>Enterococcus faecium</i> 1×10^7 КОЕ, <i>Bifidobacterium longum</i> 1×10^7 КОЕ	10 млн (12%)
4	Биовестин лакто, свидетельство о регистрации № RU.77.99.11.003. Е. 044981. 10.11 от 31.10.2011г. (70%)	Пробиотик	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> 1×10^8 КОЕ/мл, <i>Lactobacillus plantarum</i> 1×10^8 КОЕ/мл и их продукты метаболизма	100 млн (15%)

Биологические науки

5	Линекс форте, серия FR 4472 (75%)	Пробиотики	Водной капсуле <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA 5 13,8 мг, <i>Bifidobacterium animalis ssp. Lactis</i> BB12 4,2 мг	1,3 млн
Порядковый номер	Название препарата (срок годности)	Вид препарата	Состав и заявленная численность живых микроорганизмов	Количество жизнеспособных микроорганизмов
6	Максилак, серия 8546308 (83%)	Мультипробиотик + пребиотик	Одна капсула содержит лиофилизат пробиотических бактерий $4,5 \times 10^9$ КОЕ и пребиотический компонент олигофруктозу 63 мг. Лيوфилизат бактерий: <i>L. helveticus</i> , <i>L. lactis</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. breve</i> , <i>S. thermophilus</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>B. bifidum</i>	4,5 млрд (16%)
7	Нормофлорин – Л, серия 0218 (70%)	Синбиотик	В 1 мл культуры лактобактерий <i>L. Acidophilus</i> не менее 1×10^9 КОЕ, продукты метаболизма бактерий	1 млрд (20%)
8	Примадофилус, серия 20050416 (79%)	Пробиотик	В одной капсуле $2,9 \times 10^9$ КОЕ лиофилизированных бактерий <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i>	2,9 млрд (22%)
9	Рио Флора, серия EF 0497 (63%)	Мультипробиотик + пребиотик	В одной капсуле не менее 5×10^8 КОЕ/г пробиотических микроорганизмов: <i>B. Bifidum</i> W 23, <i>B. Lactis</i> W 51, <i>L. Acidophilus</i> W 37, <i>L. Paracasei</i> W 20, <i>L. Plantarum</i> W 62, <i>L. Rhamnosus</i> W 71, <i>L. Salvarius</i> W 24 с включением пребиотических компонентов – инулина, фруктоолигосахаридов	500 млн (16%)
10	Энтерол, серия 1615 (86%)	Пробиотики	В одной капсуле 250 мг лиофилизированных сахарометов <i>Saccharomyces boulardii</i>	3,9 млрд (22%)

Результаты определений приведены в таблице. Как следует из представленных данных, выживаемость бактерий крайне низка (не превышает 22%). С учетом того, что выживаемость пробиотических микроорганизмов в

желудочно-кишечном тракте экспериментальных животных составляет менее 0,0001% от их исходной численности при пероральном поступлении [4], рассчитывать на пробиотическую эффективность таких препаратов не приходится.

В диссертации Глушановой Н. А. [3], со ссылкой на опубликованные результаты других авторов [5, 6] указывается, что пробиотик может реализовать свои потенциальные свойства в том случае, если он поступает в кишечник в активном жизнеспособном состоянии в виде жидкой культуры или в виде кисломолочного продукта.

Имеются данные о том, что лиофилизированные в составе пробиотических препаратов микроорганизмы плохо приживаются в кишечнике, а по своей активности значительно уступают пробиотическим микроорганизмам, входящих в состав молочнокислых продуктов [7].

Сравнительное изучение свойств микроорганизмов в составе лиофилизированных пробиотических препаратов выявило деструкцию клеточной стенки микроорганизмов в результате лиофилизации, что сказывается на более медленной их адаптации в кишечнике и удаление лаг-фаз [2, 12]. Как следует из опубликованных данных [13], повреждению клеточной стенки пробиотических микроорганизмов способствует лиофилизация микробных клеток и, в частности, замена культуральной жидкости на специальную среду высушивания.

Полученные результаты дают основание полагать, что главными причинами низкой эффективности пробиотиков являются чужеродность для человека входящих в их состав микроорганизмов, высокая видовая, индивидуальная и анатомическая специфичность, а также низкая жизнеспособность в составе пробиотических препаратов и низкая выживаемость при транзите по желудочно-кишечному тракту. Таким образом наши данные подтверждают данные ряда исследователей [2,12,13], согласно которым

выращенные искусственно, пробиотические микроорганизмы являются гетерологичными и отторгаются вследствие биологической несовместимости.

Однако гастроэнтерологи не исключают пробиотики из арсенала средств лечения и профилактики дисбиозов. Более того в комплексной терапии острых кишечных инфекций для своевременной и эффективной коррекции дисбиотических нарушений особое место отводится сочетанному использованию пробиотических и пребиотических препаратов, а также метабиотиков, для получения которых используются пробиотические микроорганизмы [8, 11].

Пробиотические микроорганизмы на протяжении нескольких десятилетий являются основными средствами коррекции дисбиозов. Однако их эффективность неоднозначна, а иногда отсутствует. Причиной этого является низкое содержание жизнеспособности бактерий в составе препаратов, а также значительная гибель бактерий в желудочно-кишечном тракте. Данное обстоятельство следует учитывать при лечении дисбиозов различного генеза.

Список литературы

1. Бондаренко В. М. Микробиологическая диагностика дисбактериоза кишечника: метод. рек. / В. М. Бондаренко, В. Г. Лиходед. М.: ГУ НИИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи РАМН, 2007. 70 с.
2. Состав и биологическая активность экзометаболитов *Escherichia coli* M-17 / Т. Я. Вахитов [и др.] // Журнал микробиологии. 2003. С. 20–5.
3. Глушанова Н. А. Экспериментальное обоснование новых подходов к коррекции микробиоценоза кишечника: дис. ... д-ра мед. наук. М.: Моск. науч.-исслед. ин-т эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского, 2006. 260 с.
4. Выживаемость микроорганизмов пробиотиков в желудочно-кишечном тракте экспериментальных животных / И. В. Дармов [и др.] // Журнал инфектологии. 2012. Т. 4 (1). С. 68–74.
5. Ефимов Б. А. Дисбактериозы кишечника и их коррекция кисломолочными продуктами, приготовленными с использованием индигенных микроорганизмов: автореф. дис. ... канд. мед. наук. М.: 1993. 24 с.

6. *Петров Л. Н.* Витафлор. Бактерийный препарат нового поколения для лечения и профилактики дисбактериозов. СПб.: С.-Петербург. торгово-промышленная палата, 2003. 68 с.
7. *Суворов А. Н.* Дисбактериоз с позиций современной медицинской микробиологии // Актуальные проблемы дисбактериозов: тез. докл. науч. конф. Барнаул, 1997. С. 3–8.
8. *Токарева Н.* Коррекция и профилактика дисбактериоза // Эффективная фармакотерапия. Гастроэнтерология. 2011. № 3. С. 77–85.
9. *Чичерин И. Ю.* Аутопробиотикотерапия / И. Ю. Чичерин, И. П. Погорельский, И. А. Лундовских // Журнал Инфектологии. 2013. Т. 5. № 5. С. 43–54.
10. Нужны ли коммерческим пробиотикам микробные клетки? / И. Ю. Чичерин [и др.] // Журн. международной медицины. Гастроэнтерология. 2014. № 1 (6). С. 12–18.
11. *Чичерин И. Ю.* Эволюция пробиотиков: историческая оценка и перспектива / И. Ю. Чичерин, И. П. Погорельский, И. А. Лундовских // Дневник казанской медицинской школы. 2015. № I (VII). С. 42–51.
12. Inoculum-dependent division lag of *Bacillus* cultures and its relation to an endogenous factors («schizokinen») / С. E. Lankford, V. R. Walker, V. B. Reeves et al // J. Bacteriol. 1966. 57(3). P. 620–626.
13. *Larkin M.* Probiotics strain for credibility // Lancet. 1999. Vol. 354, I. 9193. P. 1884, 1p, 1bw. Item Number: 2542351.

БРАГИН Евгений Анатольевич – бакалавр кафедры микробиологии, Вятский государственный университет. 610000, г. Киров, ул. Московская, 36.

E-mail: mazaxaker9595@mail.ru

ЯНОВ Сергей Николаевич – доктор биологических наук, профессор кафедры микробиологии, Вятский государственный университет. 610000, г. Киров, ул. Московская, 36.

E-mail: biologiavgu@yandex.ru

ПОГОРЕЛЬСКИЙ Иван Петрович – доктор медицинских наук, профессор кафедры микробиологии, Вятский государственный университет. 610000, г. Киров, ул. Московская, 36.

E-mail: ipogorelsky@yandex.ru