

Для цитирования: И.Ю. Чичерин, И.П. Погорельский, И.В. Дармов, И.А. Лундовских, К.Е. Гаврилов. **Выживаемость бифидобактерий и лактобактерий в условиях *in vitro* в желудочном соке и дуоденальном содержимом людей** // Медицинский альманах. – 2012. - № 1(20). – С. 57-59.

Выживаемость бифидобактерий и лактобактерий в условиях *in vitro* в желудочном соке и дуоденальном содержимом людей

И.Ю. Чичерин¹, И.В. Дармов², И.П. Погорельский², И.А. Лундовских², К.Е. Гаврилов²

¹ООО «Медстар», ²ФГБОУ ВПО «Вятский государственный университет», г. Киров

РЕЗЮМЕ.

Цель исследования. Оценка выживаемости бифидобактерий и лактобактерий в условиях *in vitro* в желудочном соке и дуоденальном содержимом.

Материалы и методы. В экспериментах использовали пробиотические микроорганизмы в составе коммерческих препаратов Бифидумбактерин и Лактобактерин. Изучение выживаемости бифидобактерий и лактобактерий проводили в условиях *in vitro* в желудочном соке и дуоденальном содержимом, полученных от пациентов в клинической лаборатории.

Результаты. Установлено значительное снижение, особенно в случае бифидобактерий, числа жизнеспособных пробиотических микроорганизмов после инкубации в желудочном соке и дуоденальном содержимом. Наиболее существенное уменьшение числа жизнеспособных бифидобактерий и лактобактерий происходит в желудочном соке.

Заключение. При выборе пробиотиков для коррекции дисбиотических нарушений в кишечнике предпочтение следует отдавать препаратам, созданным на основе кислотоустойчивых штаммов микроорганизмов, сочетая их применение с пребиотическими препаратами.

Ключевые слова: пробиотические микроорганизмы, желудочный сок, дуоденальное содержимое, выживаемость микроорганизмов.

RESUME

Purpose of the study. Assessment of survival of bifidobacteria and lactobacilli under the conditions in vitro in the gastric juice and duodenal contents.

Materials and methods. Probiotic microorganisms from commercial preparations Bifidumbacterin and Lactobacterin were used in the experiments. The study of survival of bifidobacteria and lactobacilli was carried out under the in vitro conditions in the gastric juice and duodenal contents obtained from patients in the clinical laboratory.

Results. Significant reduction in the number of viable probiotic microorganisms, especially in the case of bifidobacteria, was established after incubation in gastric juice and duodenal contents. The most significant decrease in the number of viable bifidobacteria and lactobacilli occurs in gastric juice.

Conclusion. When choosing a probiotic for the correction of dysbiotic violations in the intestine preference should be given for preparations that is created on the basis of acid-resistant strains of microorganisms, combining them with the use of prebiotic preparations.

Key words: probiotic microorganisms, gastric juice, duodenal contents, survival of microorganisms.

Введение

Одним из существенных вопросов, стоящих перед клиницистами, является вопрос о том, как сохранить нормальный биоценоз человеческого организма, а при необходимости – корректировать его изменения [1-6].

Микроорганизмы, заселяя различные биотопы человеческого организма, являются своеобразным биогенным фактором, определяющим здоровье или болезнь [1-8]. Синдромом, сопутствующим многим заболеваниям, является дисбактериоз, ставший актуальной проблемой медицины [2, 3, 9].

Среди современных средств коррекции дисбиотических нарушений микрофлоры кишечника пробиотики все еще занимают одно из ведущих мест. В то же время в связи с расширением показаний для их назначения все чаще публикуются данные о том, что положительный эффект пробиотиков в лечении дисбактериоза носит временный характер.

Одной из главных причин низкой эффективности пробиотикотерапии многими авторами считается чужеродность для человека входящих в их состав микроорганизмов [2, 3, 8]. Высокая видовая специфичность аутохтонной микрофлоры кишечника пациентов не оставляет шансов пробиотическим микроорганизмам на приживание, особенно если учесть снижение численности популяции последних в результате преодоления защитных барьеров желудочно-кишечного тракта.

В выполненных нами исследованиях впервые экспериментально установлено значительное снижение бифидобактерий и лактобактерий, являющихся основой сертифицированных пробиотиков Бифидумбактерин и Лактобактерин, при их инкубации *in vitro* в модельных средах, имитирующих пищеварение в желудке и кишечнике человека [10].

В этой связи представлялось актуальным, сохранив преемственность, изучить выживаемость тех же бифидобактерий и лактобактерий, входящих в состав коммерческих препаратов, которые назначаются в течение нескольких десятилетий лечащим врачом пациентам, страдающим дисбактериозом, в экспериментах *in vitro*, но теперь уже в биологических средах, полученных непосредственно от пациентов.

Цель настоящего исследования – оценка выживаемости бифидобактерий и лактобактерий в условиях *in vitro* в желудочном соке и дуоденальном содержимом.

Материалы и методы

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

Для оценки выживаемости бифидобактерий и лактобактерий в биологических средах использовали желудочный сок и содержимое двенадцатиперстной кишки, полученные от пациентов в клинической лаборатории. Выделенные из биологических сред после инкубации в них бифидобактерии и лактобактерии выращивали на плотных питательных средах рекомендованного состава [11, 12].

Выращивание пробиотических микроорганизмов в микроаэрофильных условиях осуществляли при температуре 37°C с использованием системы для анаэробного культивирования (анаэрогат) Anaerobic system Marc III – LE003 (Hi Media Laboratories Pvt. Ltd, Мумбаи, Индия) с пакетами газогенераторными Hi Anaero Gas Pacet.

Общее количество микробных клеток в одной дозе препарата определяли подсчетом в камере Горяева (модель 851, НПО «Красногвардеец»).

Количество живых микроорганизмов в препаратах пробиотиков и в биологических средах (желудочном соке и дуоденальном содержимом) по истечении времени инкубирования определяли высевом соответствующих десятикратных серийных разведений исследуемых суспензий микроорганизмов на плотные питательные среды в чашках Петри и подсчетом выросших колоний.

Статистическую обработку результатов исследований проводили в соответствии с рекомендациями, изложенными в руководстве И.П. Ашмарина и А.А. Воробьева [13].

Результаты исследования

Эксперименты по изучению выживаемости пробиотических микроорганизмов бифидобактерий и лактобактерий проводили по видоизмененной методике, описанной в работе [10]. Суть экспериментов состоит в инкубации пробиотических микроорганизмов последовательно в желудочном соке и в дуоденальном содержимом в течение среднего времени пребывания смешанной пищи соответственно в желудке и кишечнике с последующим определением числа выживших микроорганизмов.

Согласно видоизмененной методике, определяли количество жизнеспособных бактерий в одной дозе препарата (КОЕ ×мл⁻¹) в начале

эксперимента (0 час), через 4 часа инкубации в желудочном соке и через 12 часов инкубации в дуоденальном содержимом.

Инокуляцию пробиотических микроорганизмов после их регидратации в количестве одной суточной дозы осуществляли в свежесобранные от пациентов желудочный сок и дуоденальное содержимое, подвергнутые предварительному центрифугированию (3000 g × 5 минут) для осаждения и последующего удаления остатков плотных компонентов пищи.

После инкубирования в желудочном соке и дуоденальном содержимом микроорганизмов производили посев суспензии на плотные питательные среды в чашках Петри для определения количества выросших колоний, их морфологических и видовых характеристик. По морфологии колоний, питательным потребностям, биохимическим характеристикам выросшие микроорганизмы сохранили видовые свойства, присущие бактериям *B. bifidum* 1 и *L. plantarum* SP-A3. Результаты определения выживаемости пробиотических микроорганизмов представлены в таблицах 1 и 2.

Из представленных в таблицах 1 и 2 данных следует, что под влиянием желудочного сока и содержимого двенадцатиперстной кишки пациентов М., К., Б. происходит значительное снижение числа жизнеспособных клеток, особенно в случае бифидобактерий.

В желудочном соке пациента С. с пониженной кислотностью также происходит уменьшение численности жизнеспособных бифидобактерий и лактобактерий, как и в дуоденальном содержимом. Однако это снижение не столь катастрофично для популяций пробиотических микроорганизмов, что в последующем может содействовать приживлению бифидобактерий и лактобактерий в кишечнике и проявлению пробиотического эффекта.

Обсуждение

У многих жителей России, в том числе и у детей, имеет место выраженный дисбаланс нормальной микрофлоры кишечника [2-5, 8, 9]. По мнению ряда авторов [2, 3, 5, 8], выбор терапии при дисбактериозах должен быть корректным и направленным на то звено нарушенной регуляции, которое утратило возможность самовосстановления. Именно нормальная микрофлора кишечника требует применения эффективных средств и методов, способствующих ее самовосстановлению.

С целью регуляции, профилактики и коррекции кишечного микробиоценоза используют пробиотики, пребиотики, синбиотики, микробные метаболиты. Относительно использования пробиотиков нужно отметить следующее. Их эффективность хорошо известна, однако она часто носит транзиторный характер [2, 3, 5, 8].

Исходя из этого, современные принципы лечебной коррекции нормальной кишечной микрофлоры базируются как на использовании пребиотиков в постоянном режиме, так и сочетанного их курсового приема с пробиотиками для лечения и профилактики нарушений микробиоценоза кишечника.

Бактериологические исследования по изучению выживаемости бифидобактерий и лактобактерий в модельных средах в условиях *in vitro*, имитирующих пищеварение в желудке и кишечнике человека [10], подтвердили факт гибели значительной части пробиотических микроорганизмов.

Снижение численности популяции микроорганизмов пробиотиков ниже критической и невозможность занять экологическую нишу в кишечнике больного определяют необходимость стимуляции собственной кишечной микрофлоры, что лежит в основе концепции пребиотической терапии, во главу угла которой поставлено стимулирующее влияние преимущественно на популяции бифидобактерий и лактобактерий [14-17].

Настоящими исследованиями, результаты которых представлены в таблицах 1, 2, выполненными также *in vitro*, но с заменой модельных сред на желудочный сок и содержимое двенадцатиперстной кишки пациентов, проходивших обследование в поликлинике, подтверждены данные, приведенные в работе [10], о негативном воздействии на жизнеспособность пробиотических микроорганизмов секретов желудка и двенадцатиперстной кишки.

При этом особо следует отметить более высокую чувствительность бифидобактерий: после пребывания в кислой среде желудочного сока и последующей инкубации в щелочной среде дуоденального содержимого жизнеспособными остаются десятки микробных клеток в сравнении с их исходным количеством, равным $(1,1 - 1,3) \times 10^7$ КОЕ \times мл⁻¹.

С большой долей вероятности можно утверждать, что кислотность желудочного сока относится к разряду критических факторов в отношении пробиотических микроорганизмов. Об этом свидетельствуют результаты бактериологического изучения жизнеспособности бифидобактерий и лактобактерий в желудочном соке пациента С.: при значении рН, равном 7,6, выживаемость исследуемых пробиотических микроорганизмов снижается лишь на порядок, в то время как при рН 1,5-1,6 жизнеспособность микроорганизмов катастрофически снижается. Хотя в последующем при инкубации в дуоденальном содержимом пациента С. и происходит дальнейшее снижение числа жизнеспособных бифидобактерий и лактобактерий, но и в этом случае их количество примерно на четыре порядка больше, чем в случае инкубации в дуоденальном содержимом, полученном от пациентов М., К., Б.

Сделанный нами ранее вывод о необходимости выработки индивидуального подхода при назначении пробиотического препарата конкретному пациенту [10], подкрепленный результатами настоящих исследований, предполагает, с одной стороны, назначение пациенту пробиотиков на основе бактериальных штаммов, способных преодолевать кислотно-щелочной барьер желудочно-кишечного тракта и приживаться в нем, а с другой стороны, создание и применение индивидуальных пробиотиков на основе аутоштаммов или их ассоциаций.

В то же время, с учетом результатов бактериологического обследования пациентов и клинико-лабораторных исследований эффективности современных препаратов в коррекции дисбиотических нарушений желудочно-кишечного тракта [2-8, 14-18] весьма важно осуществлять своевременную и эффективную коррекцию этих нарушений.

Необходимо применять индивидуально подобранные пробиотики в сочетании с современными пребиотическими препаратами, зарекомендовавшими себя с наилучшей стороны с точки зрения восстановления собственной микрофлоры кишечника.

Выводы

1. Изучена выживаемость бифидобактерий и лактобактерий, составляющих основу сертифицированных пробиотических препаратов

Бифидумбактерин и Лактобактерин, в условиях *in vitro* в желудочном соке и дуоденальном содержимом людей.

2. Установлено, что за время инкубирования бифидобактерий и лактобактерий в желудочном соке и дуоденальном содержимом, равном среднему времени пребывания смешанной пищи в пищеварительном тракте человека, происходит значительное сокращение количества жизнеспособных пробиотических микроорганизмов, вплоть до единичных клеток в случае бифидобактерий.

3. Более высокая сохраняемость жизнеспособности бифидобактерий и лактобактерий в случае их инкубирования в желудочном соке пациента с пониженной кислотностью свидетельствует о том, кислотность желудочного сока относится к числу критических факторов, негативно влияющих на жизнеспособность пробиотических микроорганизмов.

Литература

1. Елизаветина Г.А., Ардатская М.Д., Минушкин О.Н. Хронические заболевания кишечника. Современный взгляд на экологию, патогенез, диагностику и лечение (обзор). Клинический вестник 1998; 2: 22–25.

2. Минушкин О.Н., Ардатская М.Д., Дубинин А.В. Дисбактериоз кишечника: современные аспекты изучения проблемы, принципы диагностики и лечения. Обзор. Терапевтический архив 2001; 2: 67–72.

3. Ардатская М.Д., Минушкин О.Н., Дисбактериоз кишечника: эволюция взглядов. Современные принципы диагностики и фармакологической коррекции. Consilium nudicum Приложение Гастроэнтерология 2006; 2: 4–18.

4. Мескина Е.Р., Феклисова Л.В., Амерханова А.М., Пожалостина Л.В. Эффективность коррекции нарушения микробиоценоза толстой кишки у детей с учетом его возрастных особенностей. Сборник матер. науч.-практ. конф. педиатров России «Фармакология и диетология в педиатрии». 2007. Москва; 2007.

5. 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.

6. Минушкин О.Н., Ардатская М.Д., Чичерин И.Ю. Фруктоолиго – и фруктополисахариды в коррекции и профилактике нарушений микробиоценоза кишечника у больных бронхолегочной патологии, получающих антибактериальную терапию. Эксп клин гастроэнтерол 2011; 3: 79–89.

7. Guarner F., Malagelada J.R. Gut flora in health and disease. Lancet 2003; 361: 512–519.

8. Ардатская М.Д. Клиническое значение короткоцепочечных жирных кислот при патологии желудочно-кишечного тракта. Дис. ... д-ра мед. наук. М; 2003.

9. Воробьев А.А., Абрамов Н.А., Бондаренко В.М., Шендеров Б.А. Дисбактериозы - актуальная проблема медицины. Вестн РАМН 1997; 3: 4–7.

10. Дармов И.В., Чичерин И.Ю., Погорельский И.П., Лундовских И.А. Выживаемость микроорганизмов пробиотиков в условиях *in vitro*, имитирующих процесс пищеварения у человека. Эксп клин гастроэнтерол 2011; 3: 6–11.

11. Иванов В.П., Бойцов А.Г., Коваленко А.Д., Ластовка О.Н., Нилова Е.А. Совершенствование методов диагностики дисбактериоза толстого кишечника. Информационное письмо. СПб: ФГУ «Центр госсанэпиднадзора»; 2002; 31 с.

12. Лихачева А.Ю., Бондаренко В.М., Соколова К.Я. Современное состояние вопроса таксономии бактерий рода *Lactobacillus*. Журн микробиол 1992; 9-10: 74–78.

13. Ашмарин И.П. Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л: Медгиз; 1962; 280 с.

14. Андреева И.В. Когда следует назначить пробиотики? Клин микробиол антимикроб химиотер 2011; 13 (3): 279–282.

15. Rowland I.R., Tanaka R. The effects of transgalactosylated oligosaccharides on gut flora metabolism in rats associated with a human faecal microflora. J Appl Bacteriol 1993; 74: 667–674.

16. Simmering R., Blaut M. Pro- and prebiotics – the tasty guardian angels? Appl Microbiol Biotechnol 2001; 55: 19–28.

17. Gibson G.R., Probert H.M., Van Loo J.A.E., Roberfroid M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Updating the concept of prebiotics. *Nutr Res Rev* 2004; 17: 257–259.

18. Захаренко С.М., Фоминых Ю.А., Мехтиев С.Н. Инфекции, микробиота кишечника человека и метаболический синдром. Эффект фармакотерапия *Гастроэнтерология* 2011; 3: 14–20.

Таблица 1. Выживаемость бифидобактерий пробиотического препарата Бифидумбактерин в желудочном соке и дуоденальном содержимом людей (n=5)

Пациент	рН желудочного сока, ед. рН	рН дуоденального содержимого, ед. рН	Общее количество бактерий в одной дозе препарата, определенное в камере Горяева	Содержание живых бактерий в пробе на ... час эксперимента, КОЕ×мл ⁻¹ ($\bar{X} \pm I_{95}$)		
				0	4	12
М.	1,5	8,2	1,4×10 ⁷	(1,2±0,5) ×10 ⁷	502±35	45±7
К.	1,6	8,4		(1,1±0,4) ×10 ⁷	386±25	28±3
Б.	1,6	8,8		(1,3±0,6) ×10 ⁷	236±10	20±4
С.	7,7	8,0		(1,4±0,4) ×10 ⁷	(7,6±0,5) ×10 ⁷	(8,3±0,7) ×10 ⁵
Примечание. Здесь и в таблице 2 «n» - количество повторных определений содержания живых бактерий в пробах от каждого пациента						

Таблица 2. Выживаемость лактобактерий пробиотического препарата
Лактобактерин в желудочном соке и дуоденальном содержимом
людей (n=5)

Пациент	рН желудочного сока, ед. рН	рН дуоде- нального содержи- мого, ед. рН	Общее количество бактерий в одной дозе препарата, определен- ное в камере Горяева	Содержание живых бактерий в пробе на ... час эксперимента, КОЕ×мл ⁻¹ ($\bar{X} \pm I_{95}$)		
				0	4	12
М.	1,5	8,2	3,9×10 ⁹	(3,4±0,6)×10 ⁹	(3,5±0,7)×10 ⁴	(2,4±0,5)×10 ⁵
К.	1,6	8,4		(3,2±0,6)×10 ⁹	(3,6±0,6) ×10 ⁵	(3,6±0,6)×10 ⁵
Б.	1,6	8,8		(3,4±0,5)×10 ⁹	(2,1±0,5) ×10 ⁵	(1,8±0,4)×10 ²
С.	7,7	8,0		(3,5±0,6)×10 ⁹	(2,4±0,6)×10 ⁸	(2,6±0,5)×10 ⁶