

Колонизация кишечника бактериями *Lactobacillus casei* подвида *casei* I-1572 CNCM (*L. Casei DG*) у здоровых добровольцев и стерильных мышей

Л. ДРАГО – Э. ДЕ ВЕККИ – М. ВАЛЛИ – Л. НИКОЛА – А. ЛОМБАРДИ – М.Р. ДЖИСМОНДО

Микробиологическая лаборатория, больница Луиджи Сакко, Миланский университет, Милан.

Адрес для переписки: Л. Драго, микробиологическая лаборатория, больница Луиджи Сакко, Виа Дж.Б. Грасси 74, 20157, Милан.

Тел.: 0239042589. Факс: 0238210204. Эл. почта: microbio@mailserver.unimi.it

Резюме

Исследовали выведение с калом после перорального применения *Lactobacillus casei* подвида *casei* I-1572 CNCM (*L. casei* DG), недавно предложенного в качестве пробиотического штамма. Штамм давали 12 здоровым добровольцам в течение 7 дней в виде водорастворимого препарата в суточной дозе $8,5 \times 10^9$ КОЕ. Образцы кала собирали до, во время и после введения. Штамм был идентифицирован по характерной морфологии колоний и биохимической структуре. *L. casei* DG был обнаружен в кале всех добровольцев в течение периода лечения и через 7 дней после введения последней дозы. Штамм был также обнаружен у 8 из 12 добровольцев через 14 дней после введения. Никакого действия на общее количество фекальных лактобацилл не наблюдалось. Аналогичные результаты были получены при проведении параллельных исследований на животных – стерильных мышках. Исследование показало, что *L. casei* DG способен оставаться в кишечнике в течение периода, превышающего одну неделю после прекращения приема.

ВВЕДЕНИЕ

Пробиотиками называются живые микроорганизмы, которые при приеме их внутрь в определенном количестве могут способствовать нормализации микрофлоры кишечника, оказывая общее благоприятное воздействие на здоровье^{1,2}. Под определение пробиотиков подпадают, в некотором смысле, и микроорганизмы, относящиеся к родам *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, а также некоторые дрожжи (*Saccharomyces*). Среди перечисленных микроорганизмов наибольший интерес вызывают лактобактерии, что обусловлено их пробиотическими свойствами. Тем не менее, не все лактобактерии обладают свойствами, достаточными для их использования в качестве пробиотиков, и даже различные штаммы бактерий одного вида сильно отличаются между собой.

Ввиду значительного развития, которое получило исследование новых пробиотиков в последние годы, на международном уровне был предложен ряд отличительных характеристик, которыми должен обладать пробиотик, чтобы считаться таковым. Среди них особое значение отдается человеческому происхождению, способности противостоять кислотности желудочного сока и действию желчи, высокому прилипанию к кишечному эпителию, выживаемости, хотя бы в течение короткого отрезка времени, при прохождении через желудочно-кишечный тракт³. Непременным условием является сохранение жизнеспособности при прохождении через гастродуоденальный тракт, в котором неблагоприятные условия, и прежде всего низкий уровень pH, обуславливают пробиотические свойства кишечных молочных ферментов. Преодоление этого начального барьера, по общему мнению, является признаком отличительным свойством некоторых молочных ферментов.

В последние годы в источниках отмечается растущее число исследований, направленных на определение получения молочных ферментов в кале после их приема в течение определенного времени⁴⁻¹⁴. Некоторые из них приводят только данные о микробиологической обсемененности кала, без какого-либо разделения лактобактерий на «эндогенные» и полученные в ходе исследования, другие не указывают время сохранения бактерий в кишечнике после окончания лечения¹²⁻¹⁴. На самом деле таким свойством обладают лишь немногие молочные и пробиотические ферменты. В этой связи следует отметить, что одним из микроорганизмов, обладающих таким качеством, является *Lactobacillus rhamnosus* GC, которая, согласно нескольким источникам, выделяется в кале в течение 4-7 дней после прекращения лечения⁷⁻¹⁰.

Lactobacillus casei subsp. *casei* I-1572 CNCM (*L. casei* DG) – это лактобактерия человеческого происхождения, выделяемая из кала ребенка. Ввиду того, что ее качества *in vitro* удовлетворяют требованиям, предъявляемым к пробиотикам, в ходе настоящего исследования оценивалась ее способность к прохождению и к колонизации желудочно-кишечного тракта, а также наличие в кале *L. casei* DG после ее приема у здоровых добровольцев и животных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Употребление L. casei DG у человека.

Лактобактерия, содержащаяся в пакетиках по 100 мг, принималась 12 внешне здоровыми добровольцами (7 женщин и 5 мужчин возраста от 25 до 40) в течение 7 дней. Препарат в форме гранул, содержащий $8,5 \times 10^9$ КОЕ лактобактерий, принимался на голодный желудок утром, растворенный в воде. Всем добровольцам было рекомендовано не принимать антибиотики в период употребления препарата и соблюдать максимально однородный пищевой режим в течение всего периода исследования. Кроме того, добровольцам были выданы календари эксперимента и средства для сбора и хранения кала.

Определение содержания *L. casei* DG в образцах кала.

Образцы кала были получены перед исследованием (время 0), а также на 3, 5, 7, 14 и 21 день после начала приема. Образцы были немедленно заморожены и помещены на хранение при температуре -80°C до анализа. подсчет микроорганизмов в кале проводился в течение 1 месяца после сбора образцов.

Содержание *L. casei* DG и молочных бактерий в образцах кала определялось, после разведения образца, путем посева на пластинах с благоприятной средой МРС (Becton Dickinson, Cockeysville, доктор медицины, США) и инкубации в течение 48 часов при температуре 37°C в атмосфере, обогащенной CO_2 (10 %). Предел чувствительности метода составлял 1×10^2 КОЕ/г кала. В качестве молочных бактерий учитывались все микроорганизмы, способные расти в среде МРС, которые при микроскопическом анализе были определены как стрептококки и грамположительные бактерии. Колонии *L. casei* DG были отобраны и идентифицированы на основе типичного морфологического аспекта (большие белые пастообразные колонии), отличающегося от других молочных бактерий, а также на основе биохимических характеристик, определенных с помощью системы API 50 CHL (Bio Merieux sa, L'Etrole, Франция).

Употребление L. casei DG у стерильных животных

Лактобактерии вводились каждое утро в течение 7 дней 15 самцам мышей С3Н возрастом 5 недель, с помощью зонда.

Каждой мышке вводилось 10 мкл физиологического раствора, содержащего 10^9 КОЕ лактобактерий. Животные, содержащиеся в изоляторах группами по 3 особи в одной клетке, имели свободный доступ к воде и пище, прошедшим стерилизацию.

Оценка содержания *L. casei* DG в образцах кала

Репрезентативные образцы кала каждой клетки были получены перед исследованием (время 0) и на 3, 5, 7, 14 и 21 день после начала приема препарата. Образцы были немедленно заморожены и помещены на хранение при температуре -80°C до анализа. подсчет микроорганизмов в кале проводился в течение 1 месяца после сбора образцов способом, описанным выше.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Выделение в образцах кала и колонизация кишечника у человека

Ни у одного участника не наблюдалось нежелательных побочных явлений в период проведения исследования. В начале эксперимента (время 0) *L. casei* DG не выделялся в образцах кала ни одного участника. Все образцы кала показывали положительный результат на наличие *L. casei* DG на 3, 5, 7 день (в период употребления) и на 14 день (через 7 дней после последнего приема препарата), о чем свидетельствует *таблица 1*. Бактерии *L. casei* DG были выявлены не только в период употребления и сразу после окончания употребления препарата, но у 8 участников даже на двадцатый день (через 14 дней после последнего приема).

В период употребления препарата было установлено прогрессирующее увеличение концентрации бактерий *L. casei* DG в образцах кала до 7-го дня, после чего наблюдалось ее уменьшение в зависимости от времени, прошедшего после прекращения приема препарата. Однако концентрации оставались все еще значительными, прежде всего через семь дней после прекращения приема препарата.

Употребление бактерий *L. casei* DG не оказывало большого влияния на содержание молочных бактерий в образцах кала (3.65×10^6 КОЕ/г в нулевое время и 4.9×10^6 КОЕ/г на 21 день).

Выделение в образцах кала и колонизация кишечника у стерильных мышей

L. casei DG обнаружен в образцах кала всех использованных животных в течение всего периода употребления препарата (*Таблица 2*). Впоследствии наблюдалось прогрессирующее уменьшение количества *L. casei* DG, более ускоренное, чем у человека, и через 2 недели после прекращения приема препарата бактерии в образцах кала отсутствовали. В любом случае, через неделю после приема образцы кала все еще давали положительный результат на наличие *L. casei* DG.

ОБСУЖДЕНИЕ

Микрофлора кишечника у человека выполняет настолько важную роль в плане метаболизма, питания, создания иммунитета и защиты организма, что может считаться «органом», равным по размерам селезенке или почке, но состоящим из клеток, значительно различающихся между собой с точки зрения классификации и метаболизма¹⁵. Понятие пробиотика основано на гипотезе, что введение особых видов бактерий, полезных для исполнения указанных выше функций, способных развиваться и заселять кишечник, может благоприятно воздействовать на общее состояние органа и, следовательно, на здоровье.

Для того, чтобы пробиотик мог действовать в микрофлоре кишечника, важно, чтобы он сохранил свою жизнеспособность и возможность размножения в желудочно-кишечном тракте¹⁶. Для возможности заселения кишечника лактобактериями они должны пережить прохождение через желудок и двенадцатиперстную кишку и закрепиться на эпителии, выстилающем кишечник.

Из мест колонизации лактобактерии перемещаются затем в нижнюю часть пищеварительного аппарата: лактобактерии, неспособные к заселению эпителия кишечника, не смогут остаться в желудочно-кишечном тракте¹⁷. Ввиду того, что совокупность бактерий, выделяемых в образцах кала, отражает состав бактериальной флоры, населяющей дистальный отдел кишечника, исследование, направленное на оценку микрофлоры кишечника, предусматривает только анализ образцов кала^{4, 12}.

Использование стерильных животных позволяет обеспечить идеальную систему для оценки некоторых свойств микроорганизма, таких как, например, способность к заселению эпителий кишечника. В такой модели взаимодействие микроорганизмов исключено благодаря отсутствию эндогенной флоры, таким образом, инокулированный в носитель микроорганизм находится в оптимальных условиях для обнаружения своей способности к прохождению через желудочно-кишечный тракт¹⁷.

Таблица 1 – Выделение лактобактерий (КОЕ/г образца кала) у здоровых добровольцев, получавших бактерии *L.casei* I-1572CNCM в течение 7 дней

Содержание <i>L.casei</i> I-1572 CNCM и молочных бактерий в образцах кала по дням:												
	0	<i>L. casei</i> DG	3	<i>L. casei</i> DG	5	<i>L. casei</i> DG	7	<i>L. casei</i> DG	14	<i>L. casei</i> DG	21	<i>L. casei</i> DG
	Молочные бактерии		Молочные бактерии		Молочные бактерии		Молочные бактерии		Молочные бактерии		Молочные бактерии	
среднее	3.65x10 ⁸	н.опр.	4.52x10 ⁸	1.15x10 ⁵	4.91x10 ⁸	1.19x10 ⁶	5.61x10 ⁸	2.29x10 ⁶	5.3x10 ⁸	1.10x10 ⁶	4.9x10 ⁸	3.0x10 ⁴
диапазон	1.2x10 ⁶ 1.1.x10 ⁹	н.опр.	1.9x10 ⁷ 1.0x10 ⁹	4.0x10 ⁴ 2.0x10 ⁵	5.2x10 ⁷ 2.6x10 ⁹	2.1x10 ⁵ 3.0x10 ⁶	4.2x10 ⁷ 4.6x10 ⁹	5.1x10 ⁵ 5.0x10 ⁶	1.4x10 ⁷ 3.1x10 ⁹	2.2x10 ⁴ 2.0x10 ⁶	6.3x10 ⁷ 1.1x10 ⁹	н.опр. 5x10 ⁴

Таблица 2 – Выделение лактобактерий (КОЕ/г образца кала) у стерильных мышей, получавших бактерии *L.casei* I-1572CNCM в течение 7 дней

Содержание <i>L.casei</i> I-1572 CNCM и молочных бактерий в образцах кала по дням:						
	0	3	5	7	14	21
	<i>L. casei</i> DG	<i>L. casei</i> DG	<i>L. casei</i> DG	<i>L. casei</i> DG	<i>L. casei</i> DG	<i>L. casei</i> DG
среднее	н.опр.	1.05x10 ⁶	9.19x10 ⁵	1.49x10 ⁵	2.10x10 ³	н.опр.
диапазон	н.опр.	4.9x10 ⁵ – 2.1x10 ⁶	7.1x10 ⁴ – 1.1x10 ⁶	6.4x10 ⁴ – 7.1x10 ⁵	н.опр. – 6.2x10 ³	н.опр.

Данные, полученные в ходе настоящего исследования у стерильных мышей, представляют крайний интерес, так как указывают на то, что бактерии *L. casei* DG способны противостоять действию желудочного сока и желчи, достигая дистальной части кишечника в жизнеспособном состоянии и оставаясь в кишечнике в течение нескольких дней после прекращения введения препарата. Эти данные выше, чем результаты, полученные другими авторами в ходе введения *Lactobacillus salivarius* UCC118 мышам. Этот микроорганизм выделяется в образцах кала животных до трех дней после последнего приема препарата¹¹. Несмотря на то, что стерильные животные представляют собой идеальную модель для изучения колонизации, такие исследования редки. В этой связи важно подчеркнуть, что имеющиеся данные не позволяют провести сравнение между различными использованными микроорганизмами, некоторые из которых незаслуженно считаются пробиотиками.

Учитывая, что лактобактериям присуща определенная хозяйская специфичность и, следовательно, будущее применение у человека, необходимо, чтобы пробиотик проходил проверку на способность к сохранению жизнеспособности и к заселению кишечника человека.

Данные, полученные в отношении бактерий *L. casei* DG после получения их здоровыми добровольцами, крайне важны, так как указывают не только на способность изучаемого вида противостоять воздействию неблагоприятной среды желудка и кишечника, но и задерживаться на две недели в кишечном тракте. При сравнении с данными источников обнаруживается способность *L. casei* DG к заселению кишечника, сравнимая, если не превосходящая аналогичную способность других лактобактерий⁹⁻¹¹.

Данные последнего анализа исследования позволяют утверждать, что *L. casei* DG, помимо наличия пробиотических свойств *in vitro*, в состоянии сохранять жизнеспособность и заселять кишечник здоровых добровольцев.

БИБЛИОГРАФИЯ

- ¹ Holzapfel WH, Haberer P, Snel J, Schillinger U, Huis in't Veld JH. Overview of gut flora and probiotics. *Int J Food Microbiol* 1998; 4L: 85-101.
- ² Fuller R. Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol* 1989; 66: 365-78.
- ³ Guarner F, Schaafsma GJ. Probiotics. *Int J Food Microbiol* 1998; 39: 237-8.
- ⁴ Tannock GW, Munro K, Harnsen HJM, Welling GW, Smart J, Gopal PK. Analysis of the fecal microflora of human subjects consuming a probiotic product containing *Lactobacillus rhamnosus* DR20. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66: 2578-88.
- ⁵ Jacobsen CN, Rosenfeldt Nielsen V, Hayford AE, *et al.* Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by *in vitro* techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 4949-56.
- ⁶ Shinoda T, Kusuda D, Ishida Y, *et al.* Survival of *Lactobacillus helveticus* strain CP53 in the human gastrointestinal tract. *Lett Appl Microbiol* 2001; 32: 108-13.
- ⁷ Alander M, Satoraki R, Korpela R, *et al.* Persistence of colonization of human colonic mucosa by a probiotic strain, *obacillus rhamnosus* GG, after oral consumption. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 351-4.
- ⁸ Yuki N, Watanabe K, Mike A, *et al.* Survival of a probiotic *Lactobacillus* strain Shirota, in the gastrointestinal tract: selective isolation from faeces and identification using monoclonal antibodies. *Int J Food Microbiol* 1999; 48: 51-57.
- ⁹ Saxelin M, Pessi T, Salminen S. Fecal recovery following oral administration of *Lactobacillus* strain GG (ATCC 53103) in gelatin capsules to healthy volunteers. *Int J Food Microbiol* 1995; 25: 199-203.
- ¹⁰ Goldin BR, Gorbach SL, Saxelin M, Barakat S, Gualtieri L, Salminen S. Survival of *Lactobacillus* species (strain GG) in human gastrointestinal tract. *Dig Dis Sci* 1992; 37: 121-8.
- ¹¹ Dunne C, Murphy L, Flynn S. Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. *Antonie van Leeuwenhoek* 1999; 76: 279-92.
- ¹² Guerin-Danan C, Chabanet C, Pedone C, *et al.* Milk fermented with yogurt cultures and *Lactobacillus casei* compared with yogurt and gelled milk: influence on intestinal microflora in healthy infants. *Am J Nutr* 1998; 67:111-7.
- ¹³ Venturi A, Gionchetti P, Rizzello F, *et al.* Impact on the composition of the faecal flora by a new probiotic preparation: preliminary data on maintenance treatment of patients with ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 1999; 13:1103-8.
- ¹⁴ Gionchetti P, Rizzello F, Venturi A, *et al.* Oral bacteriotherapy as maintenance treatment in patients with chronic pouchitis: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 2000; 119:305-9.
- ¹⁵ Cummings JH, Macfarlane GT. Colonic microflora: nutrition and health. *Nutrition* 1997; 13: 476-8.
- ¹⁶ Fuller R, Gibson GR. Modification of the intestinal microflora using probiotics and prebiotics. *Scand J Gastroenterol* 1997; 32 (Suppl): 28-31.
- ¹⁷ Tannock GW, Szyliet O, Duval Y, Raibaud P. Colonization of tissues surfaces in the gastrointestinal tract of gnotobiotic animals by *Lactobacillus* strains. *Can J Microbiol* 1982; 28: 1196-8.