

Адгезия *Lactobacillus plantarum* P 17630 в форме капсул с жидким гелем по сравнению с таковой бацилл дедерлейна в форме таблеток к клеткам вагинального эпителия*

А. Бонетти¹, Л. Морелли², Е. Кампоминози², Е. Ганора³, Ф. Сфорца³

¹Научно-исследовательская лаборатория Продже Фарм, Черано (Новара),

²Институт микробиологии Католического университета Сакро Куоре, Пьяченца,

³Научно-исследовательская лаборатория Флеминг Рисерч, Новара, Италия

Обоснование. Для оценки *in vitro* способности к адгезии двух бактерий к клеткам вагинального эпителия (КВЭ) проведено сравнение продукта А (препарата Гинолакт), содержащего *Lactobacillus plantarum* (*L. plantarum*) P 17630 в форме капсул с жидким гелем**, и продукта В, содержащего бациллу Додерлейна, в настоящее время отнесенную к классу *L. gasseri*, в форме вагинальных таблеток, которые в течение многих лет представлены на рынках Италии.

Методы. Сравнительный анализ двух представленных на рынке препаратов проведен после открытого контролируемого исследования. Образцы КВЭ отбирали в лабораторных условиях; тесты на адгезию проводили в Институте микробиологии Католического университета Сакро Куоре в Пьяченце. Исследования проводили на интактных КВЭ, отмытых и отобранных у 20 пациентов, у которых диагностирован бактериальный вагинит и/или вагиноз. Одну капсулу или таблетку, растворенную в изотоническом растворе NaCl, смешивали с суспензией КВЭ. Адгезию молочнокислых бактерий с КВЭ вычисляли с помощью оптического микроскопа и подсчета количества колониеобразующих единиц (КОЕ) после посева на чашках Петри. Кроме того, оценивали тип адгезии.

Результаты. Способность к адгезии продукта А (препарата Гинолакт), содержащего *L. plantarum* P 17630, оказалась больше, чем продукта В. В культуре продукта А (Гинолакт), посеянного на чашках Петри, обнаружено 10^6 – 10^8 КОЕ в пробе, продукта В – 10^2 – 10^4 КОЕ. В основном *L. plantarum* P 17630 прикреплялся к отдельным клеткам, *L. gasseri* при адгезии образовывал малые цепи.

Выводы. Продукт А (Гинолакт) обладает большей способностью к адгезии к КВЭ, чем продукт В. Отмечено более прочное прикрепление к КВЭ *L. plantarum* P 17630. Результаты исследования позволяют предположить, что *in vivo* продукт А (Гинолакт) с большей вероятностью может обеспечить колонизацию, а значит, лучшую защиту среды влагалища от возбудителей инфекции.

Ключевые слова: молочнокислые бактерии, влагалище, адгезия клеток, эпителиальные клетки.

При всестороннем изучении среды влагалища у здоровых женщин установлено, что в данной экосистеме преобладают молочнокислые бактерии, которые играют важную роль в формировании и поддержании микрофлоры в ее нормальном состоянии [1, 2].

Молочнокислые бактерии конкурируют с другими микроорганизмами за адгезию к клеткам эпителия и продукцию противомикробных соединений [3].

Исследователи, описывая клиническое значение этой популяции бактерий, доказывают, что между отсутствием или уменьшением численности молочнокислых бактерий и тяжестью инфекций половых путей существует прямая зависимость [4–6].

Молочнокислые бактерии широко используют для восстановления нормальной флоры половых путей, а также профилактики, лечения и терапии некоторых заболеваний половых органов [7–14].

Кроме того, отмечена потенциальная роль молочнокислых бактерий в предупреждении размножения патогенных микроорганизмов, вызывающих инфекции мочеполовой системы [15]. Бактериальные характеристики при отборе штаммов для использования пробиотиков в терапии инфекций половых путей впервые определены G. Reid [16], впоследствии описаны N.W. McLean [17]. Одним из основных критериев является адгезия к эпителию мочевых путей [18], на чем основаны адгезивные тесты *in vitro*, которые проводятся для оценки свойств пробиотических веществ. Методы *in vitro* широко используют при изучении адгезии микроорганизмов к клеткам эпителия человека, а эксфолиативные клетки применяют для тестирования адгезии к клеткам вагинального эпителия (КВЭ) [19, 20].

В настоящем исследовании проведено сравнение адгезии к КВЭ двух разных активных ингредиентов. Один продукт А (Гинолакт, содержащий *L. plantarum* P 17630) представлен в форме капсулы с жидким гелем; второй, продукт В (содержащий бациллы Дедерлейна, которые в настоящее время относят к классу *Lactobacillus gasseri*), выпускается в форме таблеток и уже в течение нескольких лет представлен на рынке Италии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ Выделение КВЭ

Исследование проведено сотрудниками научно-исследовательской лаборатории Флеминг Руссерг, Новара, Италия, после осуществления открытого контролируемого исследования у 20 пациентов. После разъяснений на добровольной основе получено письменное согласие обследованных на использование биологического материала, отобранного во время клинического исследования. Материалы собирали в любом случае, даже если они не предназначались для целей настоящего исследования. Критериями включения в исследование были репродуктивный возраст (от 23 до 50 лет, в среднем 36 лет), менструальный период менструального цикла; в исследование не включали пациентов, которым проводили анти-

бактериальную терапию во время осуществления теста или влагалитный душ, содержащий сурфактанты или детергенты менее чем за 24 ч до отбора материала.

Материал собирали с использованием вагинальных тампонов. Одну часть материала отбирали для стандартного клинического тестирования (мазок по Папаниколау, цитологическое исследование для выявления патогенных микроорганизмов).

Цитологические исследования проводили в соответствии с общепринятыми методами:

- *Trichomonas vaginalis*: материал, суспендированный в 1 мл раствора натрия хлорида, исследовали под оптическим микроскопом;
- *Candida albicans*: материал высевали на сабуро-декстрозный агар (Биолайф) с хлорамфениколом, инкубировали при температуре 25 °С в течение 48 ч. Культуры идентифицировали с исследованием «Mycotube» (фирмы «Бектон-Диккинсон»);
- *Neisseria gonorrhoea* и *Gardnerella vaginalis*: материал засеивали на обогащенный «шоколадный» агар (Биолайф) и агар на основе овечьей крови (Биолайф), инкубировали при температуре 37 °С в течение 48 ч в 5% CO₂. Культуры идентифицировали с использованием системы «BBL-Crystal N-H» (фирмы «Бектон-Диккинсон»);
- *Staphylococcus aureus* и *Staphylococcus epidermidis*: материал высевали на маннитол-солевой агар на основе овечьей крови и инкубировали при температуре 37 °С в течение 48 ч. Культуры идентифицировали с помощью системы «Slidex-Staph» («Bio Merieux») и дисков с новобиоцином и лизостатином;
- *Enterobacteriaceae* (*Enterobacter spp.*, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.*) *Enterococcus* и *Pseudomonas spp.*: материал высевали на агар Вюрца (Биолайф), хромогенный агар на основе овечьей мочи (Биолайф) и инкубировали при температуре 37 °С в течение 48 ч. Культуры идентифицировали с помощью системы «BBL-Crystal E» (фирмы «Бектон-Диккинсон»). Другую часть материала использовали для целей настоящего исследования. Материал суспендировали в пробирке, содержащей 5 мл минимальной эссенциальной среды Игла (МЭС) (клеточная культура Sigma – M 2279), затем центрифугировали со скоростью 1000 об./мин, чтобы отделить КВЭ от эндогенных микроорганизмов. Путем поколачивания удаляли супернатант. Клетки отмывали и повторно суспендировали в 1 мл МЭС Игла. Обычные молочнокислые бактерии или патогенные микроорганизмы не сохраняли адгезию к КВЭ или суспензии КВЭ, которую использовали в исследовании.

Приготовленный материал хранили при температуре от 2 до 8 °С, затем в течение 24 ч после взятия помещали на лед и отправляли в Институт микробиологии Католического университета в Пьяченце.

Подготовка КВЭ

Адгезию молочнокислых бактерий влагалитца исследовали в 20 предварительно отмытых образцах КВЭ. К одной части материала добавляли вагинальные капсулы с жидким гелем, содержащие *L. plantarum* P 17630; к другой части – вагинальные таблетки, содержащие бациллы Дедерлейна. В настоящем исследовании использованы продукты, представленные на рынке. На этикетке продукта А (Гинолакт), выпускаемого в форме вагинальных капсул с жидким гелем, указано, что продукт содержит не менее 10⁸ КОЕ в 1 капсуле *L. plantarum* P 17630; на этикетке

продукта В, выпускаемого в форме вагинальных таблеток, указано, что продукт содержит 40 мг бацилл Дедерлейна. Продукты прошли одинаковое и параллельное тестирование на всех образцах, начиная с двух равных частей материала одних и тех же КВЭ.

Адгезию оценивали на основании анализа:

- среднего количества бактериальных клеток, прикрепленных к каждой КВЭ, обнаруженных, по меньшей мере, в 10 КВЭ в 1 пробе;
- максимального и минимального количества прикрепленных бактериальных клеток в 1 образце КВЭ, что определяли с помощью микроскопа и путем посева на чашки Петри.

Подготовка бактериальных клеток

Одна капсула с препаратом в форме жидкого геля (продукт А, Гинолакт), содержащая *L. plantarum* P 17630, как обычно, суспендирована в 40 мл раствора натрия хлорида. После полного растворения капсулы 1 мл раствора центрифугировали, полученный осадок отмывали в 1 мл МЭС (клеточная культура Sigma), после чего повторно суспендировали в 1 мл МЭС (образец 1). Таким же образом обработана таблетка (продукт В), содержащая бациллы Дедерлейна (образец 2).

Тест адгезии

Каждый образец КВЭ, суспендированный в 1 мл МЭС, разделен на две равные части по 500 мкл каждая. Одну часть смешивали с раствором, содержащим образец 1, другую – с раствором, содержащим образец 2. Смеси перемешивали с помощью ротационного миксера (гибридизационная водяная баня «Белли Дансер», Stovall Lifescience Inc.) со скоростью 100 об./мин при постоянной температуре 37 °С. Затем растворы пропускали через фильтры с диаметром пор 8 мкм (Millipore), после чего каждый фильтр промывали 1 объемом МЭС. Оставшиеся на фильтре КВЭ собраны в 500 мкл МЭС. Прилипшие бактериальные клетки подсчитывали двумя методами:

- с помощью микроскопа после окрашивания по Граму;
- путем посева на чашки Петри.

После этого образцы, содержащие *L. plantarum* P 17630, перемещали в чашки с МРС агаром (Difco) и ванкомицином (15 мкг/мл) и инкубировали при температуре 37 °С в течение 48 ч в анаэробных условиях. Образцы, содержащие бациллы Дедерлейна, перемещали в чашки с уксусным агаром Рогозы (Difco) и инкубировали при температуре 37 °С в течение 48 ч в анаэробных условиях.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Выделение КВЭ

Результаты исследований, проведенных в 20 выделенных образцах КВЭ, приведены в табл. 1.

По данным контрольной микроскопии, КВЭ не были повреждены во время отбора образцов и их транспортировки.

Тест адгезии

Результаты исследования с использованием микроскопии приведены в табл. 2; полученные путем посева на чашки Петри – в табл. 3.

По данным микроскопии установлено, что штаммы адгезируются по-разному. *L. plantarum* P 17630 прилипал к отдельным КВЭ (рис. 1), *L. gasseri* – путем формирования коротких цепей (рис. 2). Разные методы адгезии наблюдали и в питательной среде, что характерно для этих штаммов.

ЗАРУБЕЖНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Таблица 1

Микроорганизмы, обнаруженные в образцах КВЭ

Обнаруженные микроорганизмы	Пациенты в возрасте, лет																			
	7	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
	42	42	41	37	28	34	23	35	38	49	39	30	23	50	34	44	39	33	26	31
Trichomonas vaginalis	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Candida albicans	--	--	+	--	--	--	--	--	--	--	--	--	+	--	--	--	--	--	+	--
Neisseria gonorrhoeae	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Gardnerella vaginalis	--	+	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Staphylococcus aureus	--	--	--	+	--	--	--	--	--	--	+	--	--	--	--	--	--	+	--	--
Staphylococcus epidermidis	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Escherichia coli	+	--	--	--	--	--	--	+	+	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Klebsiella spp.	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Proteus spp.	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Pseudomonas spp.	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Enterococcus	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Таблица 2

Лактобациллы, адгезированные к КВЭ (подсчет с помощью микроскопа)

Образцы	<i>L. plantarum</i> P 17630				Бациллы Дедерлейна			
	Количество КВЭ	Количество прилипших лактобактерий			Количество КВЭ	Количество прилипших лактобактерий		
		мини-мальное	макси-мальное	среднее (M±m)		мини-мальное	макси-мальное	среднее (M±m)
1	12	11	25	16±4,007	12	4	17	10±3,840
2	11	6	18	11±3,753	12	0	12	6±3,593
3	10	6	20	12±4,238	11	0	9	4±3,593
4	13	4	18	9±4,111	13	0	11	4±3,517
5	10	9	28	17±6,447	11	3	19	11±4,863
6	12	12	41	24±8,457	12	8	32	17±6,675
7	12	10	40	22±8,036	12	4	25	11±5,923
8	11	5	21	10±4,379	10	0	19	10±5,890
9	11	6	25	11±5,373	12	0	12	5±4,179
10	12	9	22	15±4,052	11	2	18	10±5,534
11	11	12	20	12±4,093	10	0	12	5±3,801
12	12	7	31	19±5,187	12	3	21	10±4,924
13	10	13	19	11±3,2	10	0	11	10±3,465
14	12	10	39	22±7,872	12	5	25	12±5,112
15	11	12	35	19±7,401	11	3	19	11±5,468
16	11	12	49	27±10,048	11	9	26	17±5,01
17	12	8	28	15±5,580	12	7	20	12±3,699
18	12	0	18	8±4,710	12	0	13	5±3,677
19	10	2	19	9±5,147	10	0	13	6±4,636
20	11	5	18	12±4,37	11	4	9	11±4,802
Всего КВЭ	225				227			
M±m				15±7,948				9±6,215

Молочнокислые бактерии, прикрепленные к КВЭ (оценка путем посева на чашки Петри)

Образцы	Lactobacillus plantarum P1 7630, КОЕ								Бацилла Дедерлейна, КОЕ							
	×10 ⁸	×10 ⁷	×10 ⁶	×10 ⁵	×10 ⁴	×10 ³	×10 ²	×10	×10 ⁸	×10 ⁷	×10 ⁶	×10 ⁵	×10 ⁴	×10 ³	×10 ²	×10
1	0	1	32	260	-	-	-	-	0	0	0	0	0	2	28	245
2	0	2	35	291	-	-	-	-	0	0	0	0	0	1	18	154
3	0	0	8	62	-	-	-	-	0	0	0	0	0	2	42	268
4	0	1	3	57	-	-	-	-	0	0	0	0	0	2	29	312
5	1	3	57	299	-	-	-	-	0	0	0	0	1	32	354	-
6	0	1	23	148	-	-	-	-	0	0	0	0	1	18	214	-
7	0	2	35	265	-	-	-	-	0	0	0	0	2	32	314	-
8	0	1	6	43	-	-	-	-	0	0	0	0	0	3	42	341
9	0	1	26	295	-	-	-	-	0	0	0	0	1	24	197	-
10	0	4	36	315	-	-	-	-	0	0	0	0	2	31	341	-
11	0	1	3	48	267	-	-	-	0	0	0	0	0	0	2	15
12	0	2	28	315	-	-	-	-	0	0	0	0	2	35	295	-
13	1	2	19	224	-	-	-	-	0	0	0	0	0	3	24	265
14	1	42	320	-	-	-	-	-	0	0	0	0	1	18	290	-
15	0	1	35	280	-	-	-	-	0	0	0	0	1	31	361	-
16	0	2	24	385	-	-	-	-	0	0	0	0	2	23	257	-
17	0	3	46	218	-	-	-	-	0	0	0	0	3	41	214	-
18	0	1	19	230	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	3	29
19	0	0	6	75	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	4	43
20	0	1	24	252	-	-	-	-	0	0	0	0	2	24	318	-

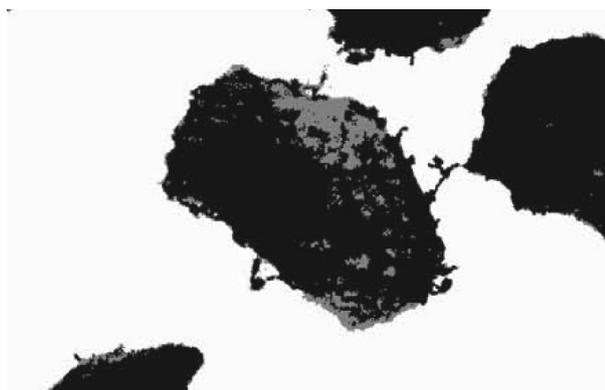


Рис. 1. Адгезия *L. plantarum* P 17630 к КВЭ



Рис. 2. Адгезия бацилл Дедерлейна к КВЭ

В первой части исследования выделены КВЭ и проведены микробиологические тесты с тем, чтобы в отобранных образцах обнаружить микроорганизмы. Во второй части исследования установлено, что клетки, содержащиеся в продукте А (препарате Гинолакт), прикреплялись к КВЭ лучше, чем содержащиеся в продукте В. Кроме того, результаты получены из готовых фармацевтических продуктов.

При проверке модели адгезии под микроскопом подтверждено, что *L. plantarum* P 17630 обладает большей способностью к адгезии, чем бациллы Дедерлейна.

Фактически некоторые клетки, обладая лучшей адгезией, крепче прикрепляются к отдельным КВЭ, чем короткие цепи, которые прикрепляются только посредством одной клетки.

Эти данные свидетельствуют, что продукт А (Гинолакт), содержащий *L. plantarum* P 17630, выпускаемый в форме капсул с жидким гелем, обеспечивает организм больного клетками, которые лучше прикрепляются к КВЭ, чем продукт В. Следовательно, *in vivo* продукт А (Гинолакт), вероятно, будет обеспечивать лучшую колонизацию и более надежную защиту среды влагалища от патогенных возбудителей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Charteris W.P., Kelly P.M., Morelli L., Collins K.J. The role and therapeutic potential of *Lactobacillus* species in female urogenital tract infection // *Microecol. Then* – 1997. – V. 26. – P. 59–96.
2. Redondo-Lopez V., Cook R.L., Sobel J.D. Emerging role of lactobacilli in the control and maintenance of the vaginal bacterial microflora // *Rev. Infect. Dis.* – 1990. – V. 12. – P. 956–072.
3. Boris S., Barbes C. Role played by lactobacilli in controlling the population of vaginal pathogens // *Microb. Infect.* – 2000. – V. 2. – P. 543–546.
4. Eschenbach D.A., Davick P.R., Williams B.L., Klebanoff S.J., Chtchlow C.M. et al. Prevalence of hydrogen peroxide-producing *Lactobacillus* species in normal women and women with bacterial vaginosis // *J. Clin. Microbiol.* – 1989. – V. 27. – P. 251–256.
5. Fredricsson B., Englund K., Nord C.E., Weintraub L. Could bacterial vaginosis be due to the competitive suppression of lactobacilli by aerobic microorganism? // *Gynecol. Obstet. Invest.* – 1992. – V. 33. – P. 119–123.
6. Gupta K., Stapleton A.E., Hooton T.M. et al. Inverse association of H₂O₂-producing lactobacilli and vaginal *Esc-herichia coli* colonization in women with recurrent urinary tract infections // *J. Infect. Dis.* – 1999. – V. 178. – P. 446–450.
7. Hallen A., Jarstrand C., Pahlson C. Treatment of bacterial vaginosis with lactobacilli // *Sex. Transm. Dis.* – 1992. – V. 19. – P. 146–148.
8. Reid G., Millsap K., Bruce A.W. Implantation of *Lactobacillus casei* var. *rhamnosus* into vagina // *Lancet.* – 1994. – V. 344. – P. 1229.
9. Chimura T., Funayama T., Murayama K., Numasaki M. Ecological treatment of bacterial vaginosis // *Jap. J. Antibiot.* – 1995. – V. 48. – P. 432–436.
10. Hawes S.E., Hillier S.L., Benedetti J. et al. Hydrogen peroxide-producing lactobacilli and acquisition of vaginal infections // *J. Infect. Dis.* – 1996. – V. 174. – P. 1058–1063.
11. Hay R.E. Recurrent bacterial vaginosis // *Dermatol. Clin.* – 1998. – V. 16. – P. 769–773.
12. Taylor-Robinson D. The future of bacterial vaginosis-related research // *Int. J. Gynaecol. Obstet.* – 1999. – V. 67, suppl. – P. 35–38.
13. Sarkisov S.E., Krymshokalova Z.S., Kafarskaia L.I., Korshunov V.M. The use of the biotherapeutic agent *Zhlemik* for correcting the microflora in bacterial vaginosis // *J. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* – 2000. – V. 1. – P. 88–90.
14. Reid G. Probiotic agents to protect the urogenital tract against infection // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2001. – V. 73, suppl. – P. 437–443.
15. Barbes C., Boris S. Potential role of lactobacilli as prophylactic agents against genital pathogens // *Aids. Patient. Care STDS.* – 1999. – V. 13. – P. 747–751.
16. Reid G., Cook R.L., Bruce A.W. Examination of strains of lactobacilli for properties that may influence bacterial interference in the urinary tract // *J. Urol.* – 1987. – V. 148. – P. 330–335.
17. McLean N.W., Rosenstein I.J. Characterisation and selection of *Lactobacillus* species to recolonise the vagina of women with recurrent bacterial vaginosis // *J. Med. Microbiol.* – 2000. – V. 49. – P. 543–552.
18. Domingue P.A., Sadhu K., Costerton J.W. et al. The human vagina: normal flora considered as an in situ tissue-associated, adherent biofilm // *Genitourin. Med.* – 1991. – V. 67. – P. 3226–3231.
19. Wood J.R., Sweet R.R.L., Catena A. et al. In vitro adherence of *Lactobacillus* species to vaginal epithelial cells // *J. Obstet. Gynecol.* – 1985. – V. 153. – P. 740–743.
20. Boris S., Suarez J.E., Vazquez F., Barbes C. Adherence of human vaginal lactobacilli to vaginal epithelial cells and interaction with uropathogens // *Infect. Immun.* – 1998. – V. 66. – P. 1985–1989.