

УДК 612.32:57.29

ЖИТТЄЗДАТНІСТЬ ТА АДГЕЗИВНІ ВЛАСТИВОСТІ ПРОБІОТИЧНИХ ШТАМІВ МІКРОБІВ, ЩО ВХОДЯТЬ ДО СКЛАДУ ЛІОФІЛІЗОВАНИХ КОМЕРЦІЙНИХ ПРОБІОТИКІВ, ВИКОРИСТОВУЄМИХ В ПРАКТИЦІ

Солонина Н.Л.

ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім.І.І.Мечникова НАМН України»

З метою збільшення строку зберігання більшість пробіотиків випускаються в ліофілізованій формі. Однак, незважаючи на те, що ліофілізація є одним з найбільш м'яких режимів консервування живої мікрофлори, ступінь інактивації клітин пробіотичних бактерій теж досить висока. Клітини, що вижили, перебувають деякий час у стані анабіозу, в значній мірі вони ослаблені, у зв'язку із чим активація їх досить тривала, досягає за звичай 8-10 і більше годин навіть при оптимумі умов культивування, які можна забезпечити лише в лабораторії. В травному тракті людини за невеликий проміжок часу більша частина пробіотичних клітин елімінується з організму природним шляхом, навіть ще не встигнувши активізуватися. Особливо чітко неефективність ліофілізованих пробіотиків проявляється при призначенні їх дітям раннього віку, у яких швидкість просування їжі в кишківнику набагато вища, ніж у дорослих, а також у дорослих хворих з діарейним синдромом. Тому виробництво пробіотиків у ліофілізованій формі більшою мірою пов'язане з комерційними інтересами фірм-виробників, чим із забезпеченням високої ефективності препаратів [1,2].

В організмі людини екзогенна мікрофлора для збереження своєї життєдіяльності завше протистоїть численним несприятливим умовам, що формуються як системою колонізаційної резистентності макроорганізму (інгібітори травного тракту, інструменти імунної системи тощо), так і активним багатовидовим співтовариством індигенної та транзитornoї мікрофлори. В результаті значна частина ліофілізованої мікрофлори, що надходить із пробіотиком *per os*, гине ще до реактивації.

На наш погляд, актуальним є дослідження життєздатності комерційних ліофілізованих пробіотиків при їх трансформації у рідинну лікарську форму.

Матеріали і методи

Дослідження пробіотичної мікрофлори проведено за рекомендаціями Коршунова В.М.

[3], Ленцнера М.А. [4], Дяченко В.Ф. та співав. [4].

Адгезивна активність досліджувалась експрес-методом [5], дещо модифікованим нами. В якості буферу використано 0,1 м фосфату натрію на ізотонічному розчині натрію хлориду. Мікроби вирощували в оптимальному (відповідному) живильному середовищі в термостаті при температурі 37 °С на протязі двох діб. Клітинним субстратом слугували формалізовані еритроцити людини 0 (1) групи Rh (+), попередньо двічі відмиті шляхом центрифугування 15 хв (1000 об/хв) буферним розчином. На цьому ж буфері готували завись еритроцитів в концентрації 1×10^8 млн клітин на мл розчину. На предметне скло наносили одну краплю буферу, в якій суспендували завідомо відкаліброваною посівною петлею завись еритроцитів та таку ж петлю мікробів (для монокультур - з однієї колонії; для мультипробіотику - усередненого осаду після попереднього центрифугування зливу при 3000 об/хв. на протязі 10 хв.) На одному предметному склі одночасно досліджувалося п'ять варіантів однієї і тієї ж проби, дані яких в подальшому усереднювались. Предметне скло з сумішшю еритроцитів та мікробів після витримки у вологій камері при температурі 37 °С на протязі 30 хв підсушували в термостаті в аналогічних умовах (~ 60 хв), фіксували на полум'ї та фарбували (за методом Грама, за Романовським-Гімзою або метиленовим синім). За допомогою світлового мікроскопу вивчали пофарбовані препарати, підраховували середній показник адгезії (СПА) - середню кількість мікробів, що адсорбувались на одному еритроциті (досліджували 25 еритроцитів в одному полі зору). Для оцінки результатів дослідження використано загальноприйнятий підступ: СПА = 0 - 0,1 - неадгезивні мікроби; СПА = 1,01 - 2,0 - низькоадгезивні; СПА = 2,01 - 4,0 - середньоадгезивні; СПА > 4,0 - високоадгезивні.

Постільки вказана методика допускає варіабельність результатів експериментів в межах $\pm 15\%$ [1], в окремих випадках застосовано розгорнутий (пробірочний) метод дослідження ступеню адгезії. За вказаним методом завись мікробів готували аналогічно вище описаному. Еритроцити людини 1 групи Rh (+) використовували в нативному вигляді та фармалізовані. До пробірки вносили 0,5 мл завису суміші мікробів та еритроцитів, інкубували 30 хв при температурі 37 °С, готували препарати на обезжиреному предметному склі, підсушували при кімнатній температурі. Препарати, де застосовувались нативні еритроцити, фіксували метанолом (10 хв), фармалізовані - на полум'ї. В пофарбованих препаратах підраховували середню кількість адсорбованих мікробів на 50 еритроцитах, що приймали участь в процесі адгезії (тобто відсоток еритроцитів з прикріпленими до поверхні мікробами). Індекс адгезивності мікробів (ІАМ) - середню кількість клітин мікробів на один еритроцит, що приймає участь в процесі адгезії - підраховували за формулою:

$$IAM = CPA \times 100: K$$

Отримані цифрові дані експериментів опрацьовано статистично за використання критеріїв Стюдента та Фішера. Різницю між порівнювальними величинами вважали за вірогідну при $P < 0,05$.

Результати та обговорення

Відібрано комерційні пробіотики, що превалюють на фармацевтичному ринку України (табл. 1), та оцінено їх за критерієм життєздатності (табл. 2).

Таблиця 1.- Основні дані щодо комерційних препаратів пробіотиків (ліофілізованих), що фігурують на фармацевтичному ринку України

№ п/п	Назва комерційного препарату пробіотику	Пробіотичні штами (складові компоненти) комерційного препарату пробіотику	Кількість мікроорганізмів в 1 дозі препарату (за Інструкцією з використання)	Вихідні дані комерційного пробіотику	Термін придатності даної серії	Виробник
1.	Біоспорин (Biosporin-Biofarma)	<i>B.subtilis</i> УКМ В-5007 <i>B.licheniformis</i> УКМВ-5514	1×10^9 - 8×10^9 1×10^9 - 2×10^9	20310	04.2013	«Біофарма»
2.	Біфідумбактерин (Bifidumbacterinum siccum)	<i>B.bifidum</i> 1,791; ЛВА-3	1×10^7	180410	05.2011	«Біофарма»
3.	Біфідумбактерин-форте (Bifidumbacterinum Forte)	<i>B.bifidum</i> ЛВА-3, сорбований на кісточковому вігудлі	1×10^7	120310	04.2013	«Біофарма»
4.	Біфікол (Bificolium siccum)	<i>B.bifidum</i> 1	1×10^7	200410	05.2012	«Біофарма»
5.	Колібактерин (Colibacterium siccum)	<i>E.coli</i> М-17	1×10^6	210310	04.2011	«Біофарма»
6.	Лактобактерин (Lactobacterium siccum)	<i>L.plantarum</i> або <i>L.fermentum</i>	2×10^8	170310	04.2012	«Біофарма»
7.	Лінекс (Linex)	<i>L.acidophilus</i> ; <i>L.gasseri</i> <i>B.infantis</i> ; <i>E.faecium</i>	капсулы $1,2 \times 10^7$	ВВ7901	04.2013	Sandoz, Любляна, Словенія
8.	Наріне (Narinae)	<i>L.acidophilus</i> IN-MIA-9602	1×10^5	012520	01.2013	ТОВ «Вітамекс», Єреван
9.	Пробіфор (Probiforum)	<i>B.bifidum</i> 1	1×10^3	102110	03.2012	ЗАО «Партнер», Москва
10.	Субалін (Subalinum siccum)	<i>B.subtilis</i> УКМВ-5020	1×10^9	20310	04.2013	«Біофарма»

Таблиця 2 -Кількість життєздатних клітин пробіотичних штамів мікробів, що входять до складу комерційних препаратів пробіотиків (усереднені дані дослідів в п'яти повторностях)

№ п/п	Назва комерційного препарату пробіотику	Кількість життєздатних клітин в 1 дозі пробіотику (за інструкцією)	Фактична кількість життєздатних клітин в 1 дозі пробіотику	P
1.	Біоспорин	$1-8 \times 10^9$	$4,34 \times 10^9$	
2.	Біфідумбактерин	1×10^7	$0,75 \times 10^7$	
3.	Біфідумбактерин-форте	1×10^7	$4,39 \times 10^7$	
4.	Біфікол	1×10^7	$1,16 \times 10^7$	
5.	Колібактерин	6×10^9	$0,63 \times 10^7$	< 0,01
6.	Лактобактерин	2×10^9	$2,71 \times 10^9$	
7.	Лінекс	$1,2 \times 10^7$	$0,89 \times 10^7$	
8.	Наріне	1×10^7	$1,81 \times 10^6$	< 0,01
9.	Пробіфор	5×10^6	$2,93 \times 10^3$	< 0,01
10.	Субалін	1×10^9	$1,38 \times 10^7$	<0,01

Візуальна оцінка результатів дослідження, наданих в табл. 2, свідчить за суттєві розходження за критерієм життєздатності між заявленою в Інструкції з використання кількістю пробіотичних мікробів в одній дозі комерційного препарату пробіотику та їх фактичною кількістю. Навіть з врахуванням методичного підступу з виведенням ліофілізованих на виробництві мікробів з анабіотичного стану в оптимальних умовах (2 доби витримки розведеного фізіологічним розчином кухонної солі пробіотику в термостаті при температурі 37 °С) кількісний склад колібактерину, наріне, субаліну та особливо широко розрекламованого в Україні закордонного пробіфору не відповідав заданому за Інструкцією з використання. Суттєвим (але в межах одного і того ж розведення) розбігом між заявленими та фактичними даними характеризується і біфідумбактерин-форте серії 343102. Слід також відзначити, що результати мікроскопічного дослідження наріне, субаліну та пробіфору не узгоджуються з результатами прямого висіву на щільне живильне середовище - в мі-

кроскопічних препаратах поле зору майже завше усяє густо мікробними клітинами відповідної морфології, прояв же колоній на живильному середовищі лише поодинокий. Можливо мова йде не тільки за уповільнений вихід пробіотичного штаму з стану анабіозу, що вже само по собі ставить під сумнів клінічну ефективність пробіотику (адже за 24 - 48 годин більшість популяції пробіотичного мікробу з високою долею вірогідності загине в верхньому відділку травного тракту), а і за недотримання технологічного циклу на стадії ліофілізації. Не виключено також порушення і умов транспортування та збереження вказаних пробіотичних препаратів.

Проведені дослідження навели на думку додатково означити ступінь адгезивності виведених з анабіотичного стану мікробів, які являють собою основу пробіотичного препарату. Для пробіотиків, що включають декілька пробіотичних штамів, адгезивність оцінено в сукупності за показниками СПА та УІМ (табл. 3).

Таблиця 3 -Ступінь прояву в сукупності адгезивних властивостей мікробів, що входять до складу комерційних пробіотичних препаратів

№ п/п	Назва пробіотику	Показники адгезії, M±m	
		СПА	ІАМ
1.	Біоспорин	$3,61 \pm 0,09$	$3,8 \pm 0,07$
2.	Біфідумбактерин	$3,84 \pm 0,07$	$5,15 \pm 0,04$
3.	Біфідумбактерин-форте	$1,9 \pm 0,04$	$2,01 \pm 0,03$

4.	Біфікол	3,92±0,05	4,43±0,03
5.	Колібактерин	1,6±0,01	1,8±0,01
6.	Лактобактерин	4,07±0,06	4,22±0,09
7.	Лінекс	3,03±0,03	2,71±0,06
8.	Наріне	1,08±0,01	1,26±0,01
9.	Пробіфор	0,57±0,01	0,62±0,01
10.	Субалін	1,41±0,06	1,96±0,05

За показниками адгезії високоадгезивними виявились культури мікробів пробіотиків біфідумбактерину, біфіколу та лактобактерину, середньоадгезивними - біоспорин, низькоадгезивними - субалін, лінекс, колібактерин та біфідумбактерин-форте, неадгезивними - наріне та пробіфор. Звертає на себе увагу низька адгезивність біфідумбактерину-форте, адже задумка при його створенні імобілізувати мікроби на сорбенті (кісточкове активоване вугілля) якраз і була направлена на підвищення адгезивних властивостей.

За даними досліджень означено різний прояв життєздатності у комерційних ліофілізованих пробіотиків в стадії реактивації в оптимальних умовах. Суттєве зниження життєздатних клітин означено у колібактерину, наріне, пробіфору та субаліну. З масиву досліджених пробіотиків за показником адгезії на еритроцитах високу активність проявили біфідумбактерин, біфікол та лактобактерин, середньоадгезивними виявився біоспорин, низькоадгезивними - субалін, лінекс та біфідумбактерин-форте, неадгезивними - наріне та пробіфор. Слід підкреслити, що адгезивність пробіотичних культур щодо епітеліоцитів кишечника нами не досліджувалась.

Результати виконаних експериментів свідчать за різну життєздатність та адгезивну активність штамів пробіотиків, що широко використовуються в гуманній та ветеринарній медицині на території України. Вказане повинні враховувати виробники пробіотиків і клініцисти при дозуванні пробіотичних препаратів з метою корекції дисбіозів різних екологічних ніш.

Referenses

1. Lukjanova, E.M. Perspective of probiotic use in pediatrics [Text] / Lukjanova E.M., Antinkin Yu. G., Janovskii D.S., Dyment G.S. // Collected tezis of satellite symposium. – Kiev, 2008. - P. 4-21.
2. Janovskii, D.S. Microflora and humans health [Text] / Janovskii D.S., Dyment G.S. – Kiev: "Chervona ruta", 2008. – P. 552 c.
3. Korshunov, V.M. Characteristic of biological preparations for correction of intestine microflora [Text] / Korshunov V.M. // ЖМЕІ. – 2000. – № 4. – P. 86-91.

4. Lentsner, M.A. Lactoflora and colonization resistance [Text] / Lentsner M.A. // Antibiotic and medical biotechnology. – 1987. – Т. XXXII. - №3. – P. 177-177.

5. Khuviage Djoma Methodological and methodical approaches for qualitative and quantitative determination of live probiotic bacteria in lyophilized commercial preparations [Text] / Khuviage Djoma // Topical problems of hygiene, ecology, epidemiology and state sanitary surveillance. – Poltava, 2008. – P. 65-67.

6. Laboratory diagnostics of pyoinflammatory diseases, caused by nonspore-forming anaerobic bacteria : guideline [Text] / V.F. Diachenko, S.V. Birukova [et al.]. – Kharkiv, 2000. – 35 p.

УДК 612.32:57.29

ЖИТТЄЗДАТНІСТЬ ТА АДГЕЗИВНІ ВЛАСТИВОСТІ ПРОБІОТИЧНИХ ШТАМІВ МІКРОБІВ, ЩО ВХОДЯТЬ ДО СКЛАДУ ЛІОФІЛІЗОВАНИХ КОМЕРЦІЙНИХ ПРОБІОТИКІВ, ВИКОРИСТОВУЄМИХ В ПРАКТИЦІ Солонина Н.Л.

В теперішній час пробіотики випускають в ліофілізованій формі для збільшення строку зберігання. Однак ступінь інактивації клітин пробіотичних бактерій досить тривала, досягає до 8-10 годин. У дорослих людей хворих на діарейний синдром, та у дітей раннього віку, швидкість просування їжі у кишківнику набагато вища і більша частина про біотичних клітин ілімінується з організму природнім шляхом. Означено життєздатність мікробів, що складають основу комерційних пробіотиків, які використовуються медиками і ветеринарами в Україні. В результаті досліджень означено різний прояв життєздатності у комерційних ліофілізованих пробіотиків в стадії реактивації в оптимальних умовах. За показниками адгезії високоадгезивними виявились культури мікробів пробіотиків біфідумбактерину, біфіколу та лактобактерину. Доведено, суттєве зниження кількості життєздатних клітин колібактерину, наріне, пробі фору та субаліну при зміні лікарської форми з ліофілізованої до рідинної. Низька адгезивність відмічена у субаліна, лінекса, біфідумбактерину-форте, наріне та пробіфору.

Ключові слова: пробіотик, життєздатність, адгезія.

УДК 612.32:57.29

ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ И АДГЕЗИВНЫЕ СПОСОБНОСТИ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ШТАМОВ МИКРООРГАНИЗМОВ, КОТОРЫЕ ВХОДЯТ В СОСТАВ ЛИОФИЛИЗИРОВАННЫХ КОМЕРЧЕСКИХ ПРОБИОТИКОВ ИСПОЛЬЗОВАННЫХ В ПРАКТИКЕ

Солонина Н.Л.

В нынешнее время пробиотики выпускаются в лиофилизованной форме для увеличения срока хранения. Однако степень инактивации клеток пробиотических бактерий длительная и достигает 8-10 часов. У взрослых людей больных на диарейный синдром и у детей раннего возраста скорость продвижения пищи намного быстрее и большая часть пробиотических клеток элиминируется из организма естественным путем. Определена жизнеспособность микробов, составляющих основу коммерческих пробиотиков, используемых медиками и ветеринарами в Украине. В результате исследований определено разное проявление жизнеспособности в коммерческих лиофилизованных пробиотиков в стадии реактивации в оптимальных условиях. По показателями адгезии выявили высокоадгезивные культуры микроорганизмов пробиотиков бифидумбактерину, бификолу и лактобактерину. Доказано существенное снижение количества жизнеспособных клеток в колибактерине, нарине, пробифоре и субалине при изменении лекарственной формы с лиофилизированной на жидкую. Низкая адгезивность отмечена субалина, линекса, бифидумбактерина-форте, нарине и пробифора.

Ключевые слова: пробиотик, жизнеспособность, адгезия.

UDC 612.32:57.29

VIABILITY AND ADHESIVE PROPERTIES OF BACTERIA PROBIOTIC STRAINS FROM THE LYOPHILIZED COMMERCIAL PROBIOTICS WHICH ARE USED IN PRACTICE

Solonina N.L.

Nowadays probiotics are produced in lyophilized form in order to prolong the shelf-life of the product. But the longitude of probiotic bacteria cells inactivation stage can last up to 8-10 hours. In adult patients with diarrhea syndrome and in infants the speed of food transport is much higher and the major part of probiotic bacteria cells is naturally eliminated from the host organism. The viability of microorganisms that compose the basis of commercial probiotics used by health professionals and veterinary surgeons in Ukraine was determined. It was shown that viability of bacteria in commercial lyophilized probiotic preparations during reactivation stage is displayed differentially. According to the adhesion parameters highly adhesive microorganism cultures in probiotics "Bifidumbacterin", "Bificol" and "lactobacterin" were found. It was proven that the quantity of viable cells decreases significantly in "Colibacterin", "Narine", "Probifor" and "Subalin" when the preparation's lyophilized form is changed into the liquid form. The low adhesion ability of microorganisms was shown for "Subalin", "Linex", "Bifidumbacterin-forte", "Narine" and "Probifor".

Key words: probiotic, viability, adhesion.