

УДК 616.33/.34-009/.1-085

Оригинальный отечественный пробиотик аципол: молекулярно-биологические и метаболические характеристики

Н.Ю. Ивашкина¹, С.Г. Ботина²¹Московский государственный медико-стоматологический университет,²Государственный научно-исследовательский институт «Генетика»)

Original Russian probiotic Acipol: molecular-biologic and metabolic characteristics

N.Yu. Ivashkina, S.G. Botina

Цель исследования. Изучить молекулярно-биологические и метаболические свойства препарата «Аципол» с учетом современных требований, предъявляемых к пробиотическим средствам.

Материал и методы. Для изучения качественных свойств аципола проведено исследование штаммов препарата с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) амплификации ДНК и секвенирования гена 16S РНК штаммов *L. acidophilus* NK₁, NK₂, NK₅, NK₁₂. Отсутствие мобильной геномной информации установлено при ультрацентрифугировании клеток бактерий с дальнейшим электрофоретическим разделением и визуализацией экстрахромосомной фракции в агарозном геле. Метаболические свойства штаммов аципола изучены с помощью стандартных биохимических и микробиологических методик.

Результаты. Проведенное исследование доказало видовую принадлежность штаммов *L. acidophilus* NK₁, NK₂, NK₅, NK₁₂ на генетическом уровне, установлена способность штаммов синтезировать экзополисахариды, переносить низкие значения pH и воздействие желчи, выявлены свойства лактобактерий продуцировать витамины, подавлять рост условно-патогенной микрофлоры, проявлять устойчивость к метронидазолу.

Выводы. Комплексная оценка аципола свидетельствует о его соответствии современным требованиям, предъявляемым к биопрепаратам.

Ключевые слова: аципол, биопрепараты, ПЦР, видовая принадлежность, метаболические свойства.

Aim of investigation. To study molecular-biologic and metabolic properties of agent «Acipol» with account to modern requirements to probiotic drugs.

Materials and methods. To study quality properties of Acipol investigation of strains of the agent by *polymerase chain reaction* (PCR) of DNA amplification and sequencing of 16S RNA gene of NK₁, NK₂, NK₅, NK₁₂ strains of *L. acidophilus* was carried out. At ultracentrifugation of bacterial cells with further electrophoretic separation and visualization of extrachromosomal fraction in agarose gel absence of mobile genomic information was found. Metabolic properties of Acipol strains were studied by standard biochemical and microbiologic procedures.

Results. The original study proved specific belonging of NK₁, NK₂, NK₅, NK₁₂ strains of *L. acidophilus* at genetic level, ability of strains to synthesize exopolysaccharides, to tolerate low pH values and influence of bile. Properties of lactobacilli to produce vitamins, to suppress proliferation of saprophytic microflora, as well as metronidazole-resistance properties were revealed.

Conclusions. The complex assessment of Acipol testifies to its conformity to the up-to-date requirements to biological preparations.

Key words: acipol, biological preparations, PCR, specific belonging, metabolic properties.

Одним из наиболее активно развивающихся направлений в медицине является применение пробиотических препаратов [6, 8, 11], представляющих сегодня особую область научных и клинических исследований [5, 12–14].

Термин «пробиотики» появился в 1965 г., когда под ними понимались вещества, секретируемые одними живыми микроорганизмами и усиливающие рост других микроорганизмов [11]. Согласно современному определению, пробиотики – это живые микроорганизмы, которые при употреблении в достаточном количестве оказывают позитивное воздействие на здоровье [8].

На данный момент пробиотики представляют собой неуклонно увеличивающийся рынок сбыта кисломолочных продуктов. Во Франции в 1997 г. рынок пробиотических йогуртов составил 219 млн долларов [15]. В первой половине 2006 г. объем рынка пробиотических йогуртов и кисломолочных напитков в Великобритании составил 307 млн фунтов стерлингов [2]. В России потребителю также предлагается широкий выбор продуктов кисломолочного брожения, при этом врачу нередко приходится решать сложную задачу выбора того или иного пробиотического препарата.

К настоящему времени сформулированы основные требования, направленные на выбор штаммов для лекарственных препаратов, и доказательств их клинической эффективности [1, 7–9]. По результатам работы круглых столов с участием ведущих экспертов были уточнены критерии для микроорганизмов, входящих в состав пробиотика. Это фенотипическая и генетическая характеристики [3, 10], сведения о наличии или отсутствии мобильной генетической информации, о способности подавлять условно-патогенную флору, об антагонистической активности и чувствительности к антибиотикам. Такие характеристики штаммов, как устойчивость в кислой среде, к солям желчи, полученные в ходе исследований *in vitro*, должны подтвердить целесообразность дальнейшей разработки пробиотического препарата. Эффективность применения необходимо доказать в ряде многоцентровых сравнительных клинических исследований, по окончании которых можно сделать четкие выводы о схемах лечения этим препаратом.

При обсуждении вопросов использования пробиотиков нельзя упускать такую важную область, как процесс их производства. Современные методики (лиофилизация, микрокапсулирование, создание таблетированных или капсулированных лекарственных форм) призваны обеспечить жизнеспособность бактериальных клеток во время всего срока хранения пробиотика и биодоступность при применении. О безопасности препарата следует судить по результатам исследований *in vitro* и клинических испытаний, а также с учетом условий производства (например, использование

стерильных сред культивирования и исключение возможности контаминации).

Цель исследования состояла в уточнении соответствия качественных параметров препарата «Аципол» современным требованиям, предъявляемым к пробиотическим средствам.

Материал и методы исследования

Объектами исследования служили 4 штамма (NK₁, NK₂, NK₅, NK₁₂) молочнокислых лактобацилл, входящих в состав пробиотического препарата «Аципол». Для выделения чистых культур и их культивирования стерильным наконечником или шпателем отбирали 50 мкл образца продукта, который переносили в пробирку с 1 мл физиологического раствора и тщательно ресуспендировали. Затем из этого раствора делали серию разведений, после чего производили посев материала разного разведения на агаризованную питательную среду MRS. Чашки инкубировали в термостате при температуре 42 °С в течение 48 ч. Отдельные колонии применялись для получения чистой культуры и дальнейшего исследования. Для выделения препаратов ДНК использовали набор Wizard® Genomic DNA Purification Kit фирмы «Promega» согласно протоколу изготовителя. *Полимеразную цепную реакцию* (ПЦР) проводили с применением реактивов фирмы «АмплиСенс» и праймеров, синтезированных с помощью синтезатора ДНК ASM-800 фирмы «Biosset». Использовались праймеры 8f: 5'-aga gtt tga tcc tgg ctc ag- 3' и 1492r: 5'-ggt tac ctt gtt acg act t- 3' [16], позволяющие осуществлять амплификацию гена 16S рРНК. Температурно-временной профиль ПЦР был следующим: 94° 5' [94° 30'' (денатурация ДНК); 55° 30'' (отжиг праймеров); 72° 1' (элонгация)] 35 циклов; 72° 4' (окончательная полимеризация); 4° – хранение. Амплификацию проводили в термоциклерах «Терцик» фирмы «ДНК-Технология» и «Master Cycler Gradient» фирмы «Eppendorf».

Продукты ПЦР анализировали при помощи электрофореза в камере SE-2 фирмы «Helikon» в 1% агарозном ТБЕ-геле фирмы «АмплиСенс». Выделение и очистку амплифицированной ДНК проводили с использованием набора GenElute Minus EtBr Spin Columns фирмы «Sigma» согласно протоколу изготовителя. Нуклеотидную последовательность генов 16S рРНК исследовали по методу Сэнгера. Секвенирование осуществляли с применением праймера 8f, позволяющего определять нуклеотидную последовательность проксимального участка гена 16S рРНК, при помощи автоматического анализатора ДНК SEQ8000 Beckman-Coulter фирмы «Beckman».

Для анализа нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК использовали программы Blast в Internet [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast]; для анализа результатов секвениро-

Таблица 1

Уровень гомологии с последовательностью исследуемых штаммов препарата «Аципол»

Штамм	Номер референтной последовательности	Описание последовательности	Уровень гомологии, %
NK ₁	AY763430.1	<i>L. acidophilus</i> strain LH5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99
NK ₂	EF533992.1	<i>L. acidophilus</i> strain IDCC 3301 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	100
NK ₅	AB008203.1	<i>L. acidophilus</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: YIT 0070 (= ATCC 4356)	99
NK ₁₂	AF429494.1	<i>L. acidophilus</i> ATCC 521 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98

вания – компьютерную программу Vector NTI: ContigExpress. Для сравнения последовательностей генов рибосомальных РНК у ацидофильных лактобацилл нами были использованы последовательности этого гена, характерные для разных видов *Lactobacillus acidophilus*, депонированные в GenBank NCBI (данные представлены в табл. 1).

Способность штаммов синтезировать экзополисахариды оценивали при росте бактерий на среде следующего состава: сухое молоко с пониженным содержанием жира – 10%, дрожжевой экстракт – 0,5%, агар – 1,5%, сахара – 1%, рутениевый красный – 80 мг/л [4].

О способности бактерий переносить низкие значения pH судили по росту на среде MRS с pH 2,0 свежих ночных культур бактерий, выращенных в жидкой среде MRS при pH 6,2. Титры культур измеряли через 30, 60, 90 и 120 мин после посева. Контролем в опыте служили клетки бактерий, внесенные в среду MRS с pH 6,2, титр которых определяли через 120 мин после внесения.

Устойчивость к желчи тестировали в присутствии 20% и 40% желчи в среде культивирования бактерий.

Способность бактерий продуцировать витамины определяли методом *высокоэффективной жидкостной хроматографии* (ВЭЖХ) с использованием колонки «Эликсис-1» C18-150×4,6 мм, 5,0 мм. Температура колонки – 50 °С, инъекция – 10 мкл, λ – 210 нм; градиент: А – ацетонитрил, В – 0,1% трифторуксусная кислота, С – метанол. Данные обрабатывали с помощью компьютерной системы «Empower Pro».

Количественное определение синтезируемых биогенных аминов проводили путем ВЭЖХ на хроматографе «Alliance» (Separations Module Waters 2695, Photodiode Array detector Waters 2996). Дериватизация исследуемых образцов, содержащих биогенные амины, осуществлялась дансилхлоридом. Полученный раствор в количестве 5 мкл наносили на колонку C18 250×4,0 мм, 5,0 мм и анализировали при длине волны λ=254 нм, t=40 °С. Тестировали способность бактерий продуцировать путресцин, кадаверин, гистамин, тира-

мин. Для обработки данных использовалась компьютерная система «Empower Pro».

Способность штаммов ферментировать углеводы тестировали в среде MRS с анализируемым углеводом (лактоза, галактоза) в концентрации 10 г/л и красителем бромкрезоловым пурпурным в концентрации 32 мг/л. Об утилизации сахара судили по приобретению колониями и питательной средой желтой окраски.

Свойство штаммов подавлять рост условно-патогенной микрофлоры исследовали методом нанесения капли инокулята изучаемых штаммов, нанесения фильтров, смоченных в суспензии клеток, и внесения клеточной суспензии в лунки. В качестве тесторных культур использовали штаммы условно-патогенных микроорганизмов *Micrococcus luteus* B5389, *Enterococcus faecalis* B4610, *Bacillus subtilis* B4537, *Staphylococcus aureus* B6646, *Pseudomonas aeruginosa* PAOI, предоставленных ГосНИИ «Генетика». Устойчивость к антибиотикам тестировали методом определения максимальной ингибирующей концентрации при культивировании штаммов в среде с присутствием ванкомицина и метронидазола.

Результаты исследования и их обсуждение

Штаммы *L. acidophilus* NK₁, NK₂, NK₅, NK₁₂ были выделены от здоровых лиц в ходе скрининговых исследований в 1955 г. в Институте молочной промышленности. Идентификация бактерий проводилась с помощью фенотипических методов.

В настоящее время видовая принадлежность бактерий определяется секвенированием последовательности малой субчастицы рибосом 16S РНК, порядок нуклеотидов в которой идентичен для представителей одного вида. Полученная последовательность сравнивается с уже известными, и высокий уровень гомологии (выше 97%) является доказательным для идентификации. Проведенное нами секвенирование гена 16S РНК штаммов *L. acidophilus* NK₁, NK₂, NK₅, NK₁₂ доказало их принадлежность к виду *Lactobacillus acidophilus* (табл. 2) на генетическом уровне.

Таблица 2
Уровень гомологии последовательности 16S
РНК различных штаммов *L. acidophilus*

Эталонные последовательности <i>L. acidophilus</i>	Уровень гомологии сравниваемых последовательностей <i>L. acidophilus</i> , %			
	NK ₁	NK ₂	NK ₅	NK ₁₂
LH5	99	—	—	—
LH4	98	—	—	—
NCFM	98	99	99	—
ATCC 4356	97	—	99	—
JCM 11047	97	—	99	98
IDCC 3301	—	100	—	—
YI	—	99	—	—
НВАРТ1	—	99	—	—
ATCC 521	—	98	—	98
JVT5	—	—	99	—
CCC B1209	—	—	—	98
DLH 3501	—	—	—	98

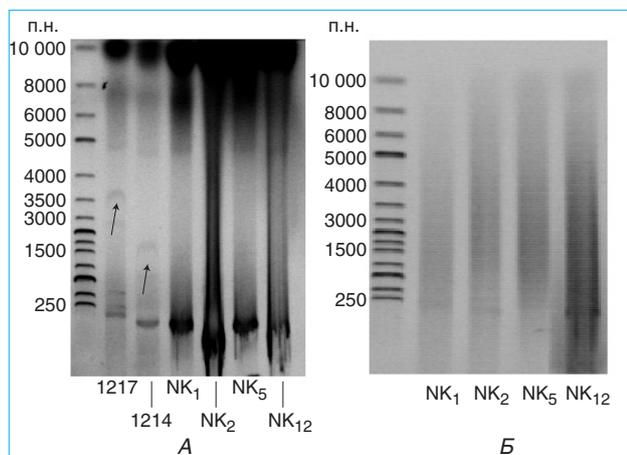


Рис. 1. Определение плазмидного профиля исследуемых штаммов *L. acidophilus*.

А — электрофорез экстрахромосомной ДНК штаммов *L. acidophilus* 1217, 1214, NK₁, NK₂, NK₅, NK₁₂. Стрелками показано наличие кольцевых плазмид (3000 п.н. и 1800 п.н.) в контрольных штаммах. Б — электрофорез экстрахромосомной ДНК *L. acidophilus* NK₁, NK₂, NK₅, NK₁₂ после реакции рестрикции с ферментом Hind III

Определение плазмидного профиля бактериальных клеток направлено на выявление наличия мобильной генетической информации (плазмиды, трансферроны) и возможности ее передачи. Для этого с помощью ультрацентрифугирования клеток бактерий добиваются сепарации ядерной (заключенной в хромосомах) и экстрахромосомной ДНК с дальнейшим электрофоретическим разделением и визуализацией экстрахромосомной фракции в агарозном геле. На рис. 1А показан электрофорез в агарозном геле экстрахромосом-

ной ДНК, направленный на выявление кольцевой ДНК. В качестве контроля взяты другие штаммы того же вида *L. acidophilus* 1217 и 1214, содержащие плазмиды, что хорошо визуализируется на форе. На следующем этапе был проведен рестрикционный анализ. ДНК производственных штаммов была обработана рестриктазой Hind III для образования линейных структур. Но, как и на первом форе, не видно каких-либо включений (рис. 1Б), что убедительно доказывает отсутствие в штаммах *L. acidophilus* NK₁, NK₂, NK₅, NK₁₂ мобильной генетической информации.

Определение устойчивости штаммов бактерий, входящих в состав пробиотического препарата, к низким значениям pH среды и солям желчи *in vitro* доказывает способность штаммов к выживанию при неблагоприятных для них условиях верхних отделах желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) на пути к топическому органу — кишечнику.

Устойчивость культур в неблагоприятных условиях обеспечивают экзополисахариды — вещества, окружающие клетку снаружи и защищающие клеточную стенку от воздействия кислой среды и ферментов. Способность штаммов аципола синтезировать экзополисахариды мы оценивали при росте бактерий на среде с красителем. Клетки *L. acidophilus* NK₁, NK₂, NK₅, NK₁₂ образовывали экзополисахаридные капсулы, поэтому были защищены от проникновения в клетку красителя и оставались бесцветными, что позволило сделать вывод о способности культур аципола к синтезу экзополисахаридов.

Свежие ночные культуры бактерий, выращенные в жидкой среде MRS при pH 6,2, засевали в среду MRS с pH 2,0, затем каждые 30 мин определяли титр колоний жизнеспособных бактерий после нахождения в кислой среде (табл. 3). Контролем в опыте служили колонии клеток бактерий, внесенных в среду MRS с pH 6,2, титр которых определяли через 120 мин после внесения.

Культуры штаммов *L. acidophilus* NK₁, NK₂, NK₅, NK₁₂ засевали в жидкие среды MRS с различным содержанием желчи (20% и 40%), в которых бактерии культивировали в течение 12 ч. В контрольных посевах клетки культивировали без добавления желчи. Результаты опытов показали способность штаммов аципола к росту в среде с 20% содержанием желчи (рис. 2).

Таким образом, высокая устойчивость производственных штаммов аципола к низким значениям pH и солям желчи, способность к синтезу экзополисахаридов обуславливают их выживание и успешное прохождение верхних отделов ЖКТ.

К основным физиологическим свойствам пробиотических культур относится синтез ими витаминов. Способность производственных штаммов к синтезу витаминов определялась нами по их содержанию в среде культивирования (табл. 4).

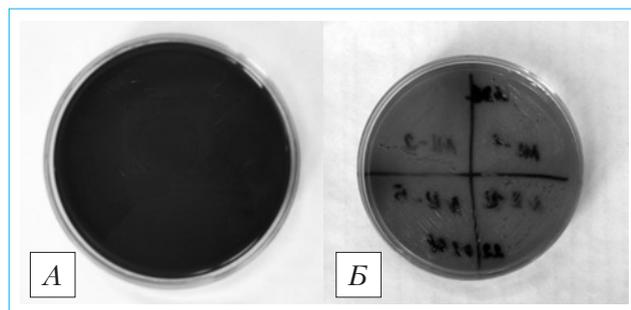


Рис. 3. Культуры *L. acidophilus* NK₁, NK₂, NK₅, NK₁₂ на среде MRS с лактозой и красителем.

А — красный (темный) цвет красителя до начала роста культур и ферментации.

Б — пожелтение среды и желтый цвет колоний свидетельствуют о ферментации исследуемого углевода

Таблица 6

Способность к расщеплению полисахаридов штаммами *L. acidophilus* NK₁, NK₂, NK₅, NK₁₂

Полисахарид	NK ₁	NK ₂	NK ₅	NK ₁₂
Лактоза	+	+	+	+
Глюкоза	+	+	+	+
Галактоза	+	+	+	+
Мальтоза	+	+	+	+
Сахароза	+	+	+	+
Целлобиоза	+	+	+	+
Манноза	+	+	+	+
Салицин	+	+	+	+
Маннит	—	—	—	—
Рамноза	—	—	—	—
Ксилоза	—	—	—	—
Сорбит	—	—	—	—
Арабиноза	—	—	—	—

катора фенолфталеина до нейтральной реакции. Активная кислотность — это концентрация водородных ионов. Она выражается отрицательным логарифмом концентрации ионов водорода — рН. Молочная кислота, образующаяся при сбраживании молочного сахара, нейтрализуется буферными системами молока. Вследствие высокой буферной емкости молока рН кефира в конце сквашивания при титруемой кислотности 75–80 °Т составляет лишь 4,85–4,75. Для свежего молока рН составляет 6,47–6,67, а титруемая кислотность — 16–18 °Т. То есть при сквашивании молока резко меняется титруемая кислотность, а рН меняется не столь значительно.

Для производственных штаммов аципола характерна высокая активность кислотообразования — выше 200 °Т при инкубации в течение 48 ч. Это свойство предопределяет антагонистическую активность штаммов *L. acidophilus* NK₁, NK₂, NK₅, NK₁₂ в отношении патогенных бактерий.

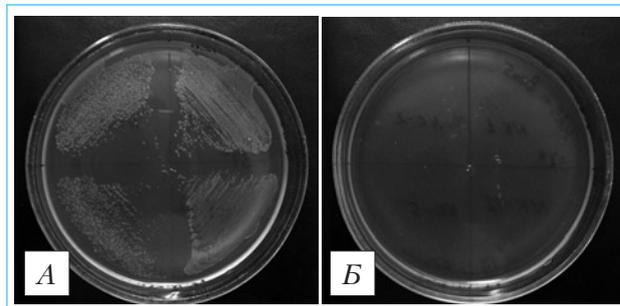


Рис. 4. Рост культур *L. acidophilus* NK₁, NK₂, NK₅, NK₁₂ на среде с содержанием: А — метронидазола (150 мг/мл) и Б — ванкомицина (5 мг/мл)

Производственные штаммы аципола антагонистически активны в отношении *S. sonnei* 5063, *S. flexneri* 337, 170, *E. coli* 157, *P. mirabilis* 56/10, *P. vulgaris* 401, *S. aureus* 209. При засевах культур перпендикулярным штрихом к зоне роста *L. acidophilus* NK₁, NK₂, NK₅, NK₁₂ зоны угнетения тест-штаммов составляют не менее 20 мм.

С целью выявления чувствительности к различным антибактериальным веществам производственные штаммы аципола тестировали на способность к выживанию при различных концентрациях метронидазола и ванкомицина (рис. 4). Культуры бактерий засеивали на твердую среду MRS с концентрациями метронидазола 50, 100 и 150, 200 мкг/мл, при которых все штаммы показывали нормальный рост. В то же время при добавлении в среду культивирования ванкомицина в концентрации 5 мкг/мл рост культур отсутствовал.

Таким образом, производственные штаммы аципола резистентны к метронидазолу и чувствительны к ванкомицину.

При подведении итогов исследований *in vitro*, можно сделать вывод о том, что культуры, входящие в состав аципола:

- принадлежат к виду *L. acidophilus*,
- не содержат мобильной генетической информации,
- способны к выживанию в верхних отделах ЖКТ,
- синтезируют экзополисахариды,
- синтезируют витамины,
- продуцируют минимально низкий уровень биогенных аминов,
- ферментируют лактозу, галактозу и другие дисахариды,
- резистентны к метронидазолу и чувствительны к ванкомицину.

Выводы

Отечественный пробиотический препарат «Аципол» по своим качественным параметрам соответствует основным требованиям, предъявляемым к современным пробиотикам.

Список литературы

1. Материалы круглого стола «Рациональный выбор пробиотика в практике гастроэнтеролога» (Москва, 18 декабря 2006 г.) // Рос. мед. вести. — 2007. — Т. 12, № 4. — С. 46–48.
2. Материалы научно-практической конференции «Probiotech 2007». — Нант, Франция, 11–12 июня 2007 г.
3. Boyer T.G., Chen P.L., Lee W.H. Genome mining for human cancer genes: wherefore art thou? // Trends Mol. Med. — 2001. — Vol. 7, N 5. — P. 187–189.
4. Chakraborty A., Das S., Majumdar S. et al. Use of RNA arbitrarily primed-PCR fingerprinting to identify *Vibrio cholerae* genes differentially expressed in the host following infection // Infect. Immun. — 2000. — Vol. 68. — P. 3878–3887.
5. D'Souza A.L., Rajkumar C., Cooke J., Bulpitt C.J. Probiotics in prevention of antibiotic associated diarrhea: meta-analysis // BMJ. — 2002. — Vol. 324, N 8. — P. 1350–1361.
6. Fuller R. Probiotics in man and animals // J. Appl. Bacteriol. — 1989. — Vol. 66, N 5. — P. 365–378.
7. Guandalini S., Pensabene L., Zikri M.A. et al. Lactobacillus GG administered in oral rehydration solution to children with acute diarrhea: a multicenter European trial // J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. — 2000. — Vol. 30, N 1. — P. 54–60.
8. Guidelines for the evaluation of probiotics in food: Joint FAO/WHO Working Group meeting. — London, Ontario, Canada, 30 April–1 May 2002.
9. Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. — Cordoba, Argentina, 1–4 October 2001.
10. Leblond-Bourget N., Philippe H., Mangin I., Decaris B. 16S rRNA and 16S to 23S internal transcribed spacer sequence analyses reveal inter- and intraspecific *Bifidobacterium phylogeny* // Int. J. Syst. Bacteriol. — 1996. — Vol. 46, N 1. — P. 102–111.
11. Lilly D.M., Stillwell R.H. Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms // Science. — 1965. — N 12. — P. 747–748.
12. Lodinova-Zadnikova R., Cukrowska B., Tlaskalova-Hogenova H. Oral administration of probiotic *Escherichia coli* after birth reduces frequency of allergies and repeated infections later in life (after 10 and 20 years) // Int. Arch. Allergy Immunol. — 2003. — Vol. 131, N 3. — P. 209–211.
13. McFarland L.V. Meta-analysis of probiotics for the prevention of antibiotic associated diarrhea and the treatment of *Clostridium difficile* disease // Am. J. Gastroenterol. — 2006. — Vol. 101, N 4. — P. 812–822.
14. Rolfe R.D. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health // J. Nutr. — 2000. — Vol. 130, N 2 (suppl.). — P. 396–402.
15. Stanton C., Gardiner G., Meehan H. et al. Market potential for probiotics // Am. J. Clin. Nutr. — 2001. — Vol. 73 (suppl. 2). — P. 476–483.
16. Torriani S., Zapparoli G., Dellaglio F. Use of PCR-based methods for rapid differentiation of *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* and *L. delbrueckii subsp. lactis* // Appl. Environ. Microbiol. — 1999. — Vol. 65. — P. 4351–4356.