

УДК 576.751.5.+[577.154.25:615.246.1]

ХАРАКТЕРИСТИКА АДГЕЗИВНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ЛАКТОБАЦИЛ -КЛІНІЧНИХ ІЗОЛЯТІВ ТА СКЛАДНИКІВ БІОПРЕПАРАТІВ

Лаврик Г.С.

Львівський національний медичний університет
імені Данила Галицького
lavryk@ukr.net

Виділено 102 штами лактобацил, ізольованих з різних біотопів людського організму. Досліджено адгезивні властивості лактобацил з використанням букального епітелію та еритроцитів 0 (1) групи крові людини клінічних штамів та складників біопрепаратів. Було встановлено, що показники адгезії лактобацил до клітин букального епітелію та еритроцитів 0 (1) групи крові відрізняються між собою. Практично усі ізоляти лактобацил виявили високу та середню адгезивну активність щодо букального епітелію. Щодо еритроцитів лактобацили виявили середню або низьку адгезивність. Так, індекс адгезивності *L.acidophilus*, що були виділені з різних біотопів до букального епітелію складав $4,15 \pm 0,03$, а до еритроцитів - відповідно $2,50 \pm 0,01$. Серед «кишкових» ізолятів найбільш виражену адгезію виявляли до букального епітелію *L.casei* $4,66 \pm 0,04$, *L.acidophilus* $4,13 \pm 0,08$. У ізолятів *L.plantarum* та *L.casei*, як з ротової порожнини так і з вагіни, адгезивна активність однакова $4,02 \pm 0,02$, $4,02 \pm 0,03$ відповідно.

Усі пробіотичні штами були високоадгезивними. Індекс адгезії у *L.reuteri* DSM 179385 до букального епітелію та еритроцитів становив $5,18 \pm 0,03$ і $3,02 \pm 0,03$ відповідно. Високоадгезивні пробіотичні штами можуть витіснити або гальмувати формування власної мікрофлори, особливо у новонароджених дітей.

Ключові слова: лактобацили, пробіотики, адгезія, букальний епітелій, еритроцити.

Лактобацили виявляються у всіх біотопах травного тракту, починаючи з ротової порожнини і закінчуючи товстою кишкою, є домінуючою флорою вагінального біотопу. Їхня адгезія до епітеліальних клітин зумовлює можливість виживати в умовах біотопів макроорганізму та формувати біоплівку, опосередковуючи таким чином пасивний антагонізм щодо умовно-патогенних бактерій [1].

Колонізаційна резистентність забезпечується сукупністю механізмів, що надають індивідуальну і анатомічну стабільність нормальній мікрофлорі [2]. Експериментально підтверджено, що лактобацили забезпечують колонізаційну резистентність біотопів тіла людини за рахунок конкурентного інгібування і коагрегації алохтонних мікроорганізмів і коагрегації алохтонних мікроорганізмів [3]. Встановлено здатність лактобацил, виділених з репродуктивного тракту жінки, до адгезії на поверхні культур клітин і інгібування адгезії більше, ніж 80% штамів *E. coli*, *S. epidermidis*, *E. faecalis* [4]. У штамів *L. acidophilus* виявлено адгезини білкової природи, які здатні

зв'язуватись з специфічними рецепторами клітин вагінального епітелію, тим самим конкурентно інгібувати цитадгезію *C.albicans* [5]. Останніми десятиліттями вивчаються механізми епітеліально-мікробної взаємодії, які впливають на формування мікробіоценозів і беруть участь у підтримці колонізаційної резистентності [6] та стимуляції здатності до біоплівкоутворення асоціативних мікросимбіонтів [7].

Адгезія молочнокислих бактерій – складний процес, в який задіяні як специфічні (ліганд-рецепторні), так і неспецифічні (гідрофобні, електростатичні) взаємодії між мікробними клітинами і епітеліоцитами [8,9,10]. В якості адгезивів виступають ліпотейхоєві та тейхоєві кислоти, які є компонентами їхньої клітинної стінки, або лектини [1,11,12,], а також колаген, фібронектин, ламінін, олігосахаридні ланцюги [13,14], манозоспецифічні рецептори [15].

Важливо врахувати той факт, що пробіотик не повинен конкурувати з індигенною мікрофлорою, яка завжди є більш фізіологічною для кожного конкретного індивідуума, ніж найцінніші екзогенні бактерії, навіть із найвищим потенціалом корисних властивостей. Активність пробіотика повинна бути спрямована на основну ціль бактеріальної терапії, що полягає у відновленні фізіологічного біоценозу.

Ключове значення має не здатність бактерій пробіотика адгезувати до епітелію, а тривалість їхнього активного життя в біотопах людини, що прямо корелює з ефективністю препарату та залежить від здатності пробіотичних клітин тимчасово закріпитися різними способами в екосистемі. Природа винайшла та нагородила мікрофлору великим розмаїттям таких можливостей (соадгезія, коадгезія з утворенням конгломератів клітин, «прилипання» до глікокаліксу, затримка клітин у гаустрах товстої кишки тощо), за рахунок використання яких пробіотик при оптимальній тривалості курсу бактеріальної терапії здатний затримуватись в біотопі на певний час, достатній для реалізації свого основного спектра фізіологічної активності [16].

Метою наших досліджень було порівняння адгезивних властивостей лактобацил – клінічних ізолятів, виділених з різних біотопів людського організму та складників пробіотичних препаратів до клітин букального епітелію та еритроцитів 0 (1) групи крові системи АВ0 людини.

Матеріали і методи

Об'єктом дослідження були клінічні штами *Lactobacillus spp.*, виділені з ротової порожнини, кишечника, вагіни практично здорових людей. З метою отримання лактобактерій клінічний матеріал висівали на поживних середовищах: напіврідкому тіогліколевому, щільному МРС („Біокомпас”, Росія) в мікроаерофільних умовах протягом 48 годин. При видовій ідентифікації лактобактерій враховували морфологічні та культуральні властивості, аеротолерантність, вуглеводний профіль визначали за допомогою тест-системи API-50CH L (Bio-Merieux), рости при температурі 30°C та 44°C, відсутність

каталазної активності та бути резистентними до жовчі.

Здатність виділених бактерій до адгезії вивчали на еритроцитах 0 (1) групи крові та клітинах букального епітелію людини за методом Бріліс В.І. і спів. [8]. Для порівняння використовували пробіотичні штами *L. plantarum* 8P-A3, *L. acidophilus* KS 400, *L. reuteri* DSM 17938.

Ефективність адгезії оцінювали за індексом адгезивності мікроорганізмів (ІАМ) – середня кількість мікроорганізмів на одній епітеліальній клітині, що бере участь у процесі адгезії – визначали за формулою $ІАМ = (СПА \times 100) / К$. Мікроорганізм вважався неадгезивним при $ІАМ \leq 1,75$; низькоадгезивним – при показниках 1,76-2,5; середньоадгезивним – 2,51-4,0 та високоадгезивним при $ІАМ > 4,0$. Визначали цей показник при підрахунку під мікроскопом 50 букальних клітин/еритроцитів.

Результати експериментів опрацьовували за допомогою програми Microsoft Office Excel 2003.

Результати та обговорення

Отримано 102 штами лактобацил з них 32 «оральних», 41 «кишкових» та 29 «вагінальних» ізолятів. За видовим складом серед ізолятів відповідних біотопів домінували види лактобацил: *L. acidophilus* (з ротової порожнини - 15 штамів, кишечника - 12, вагіни - 9), відповідно *L. plantarum* (4, 6, 3), *L. fermentum* (5, 10, 8), *L. rhamnosus* (4, 3, 6),

L. casei (4, 7, 3), лише вид *L. brevis* (3) виділявся тільки з кишечника.

В процесі досліджень були встановлені відмінності у показниках адгезії лактобацил до букального епітелію та еритроцитів 0 (1) групи крові. Практично усі ізоляти лактобацил виявили високу та середню адгезивну активність щодо букального епітелію. Високоадгезивними виявились «вагінальні» ізоляти лактобацил $4,19 \pm 0,06$. Серед «кишкових» ізолятів найбільш виражену адгезію виявляли до букального епітелію *L. casei* $4,66 \pm 0,04$, *L. acidophilus* $4,13 \pm 0,08$. Найвищу адгезивність встановлено до «оральних» ізолятів *L. acidophilus* та *L. plantarum* ($4,12 \pm 0,07$ та $4,10 \pm 0,08$) (рис.1). У ізолятів *L. plantarum* та *L. casei*, як з ротової порожнини так і з вагіни, адгезивна активність однакова $4,02 \pm 0,02$, $4,02 \pm 0,03$ відповідно.

Можемо відмітити, що індекс адгезивності лактобацил до еритроцитів є значно нижчим, ніж до букального епітелію, що може бути пов'язаним із більшими розмірами епітеліальних клітин-мішеней. Завдяки своїй паличкоподібній морфології клітин і розмірам, лактобацили

можуть створювати просторові перешкоди для прикріплення великої кількості бактеріальних клітин до еритроцитів [17]. Так, ІАМ *L. acidophilus*, що були виділені з різних біотопів, до букального епітелію складав $4,15 \pm 0,03$, а до еритроцитів відповідно $2,50 \pm 0,01$ ($p > 0,05$). «Оральні» ізоляти *L. fermentum* та *L. rhamnosus* до еритроцитів виявили слабкі адгезивні властивості $2 \pm 0,03$ та $2,14 \pm 0,02$.

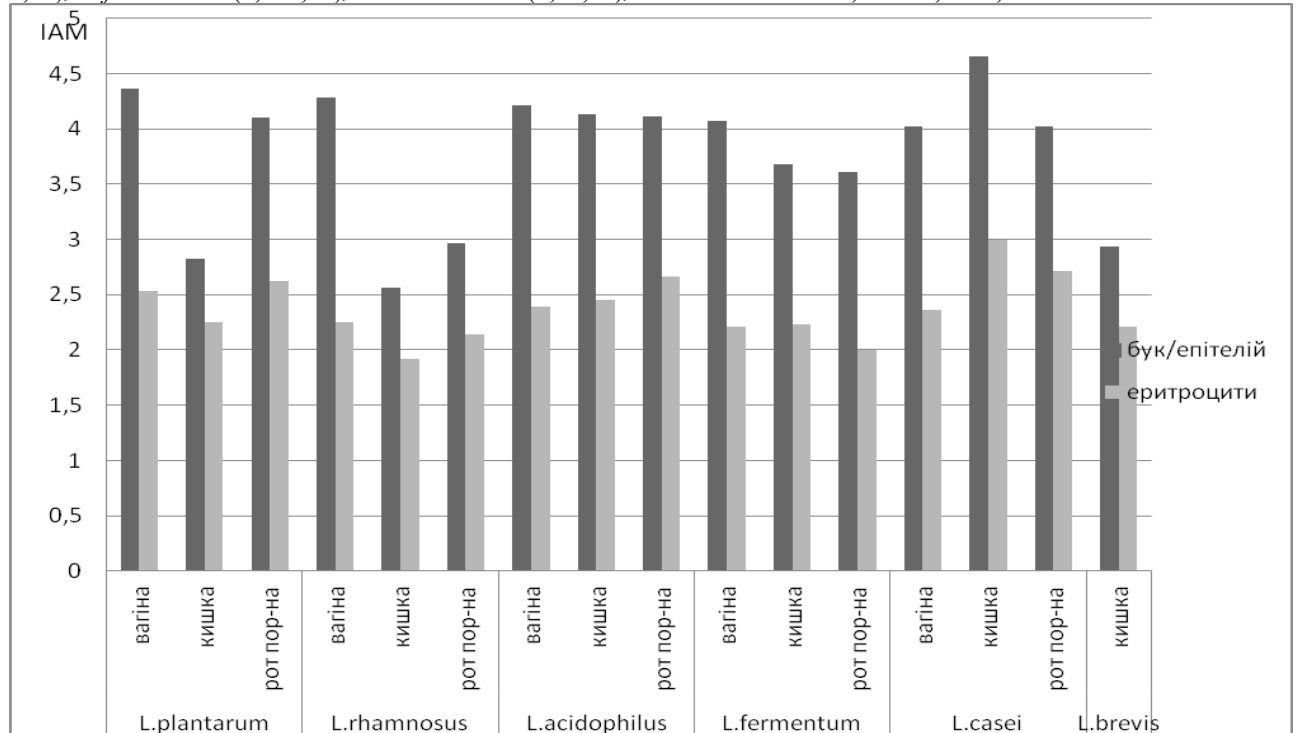


Рисунок 1. Індекс адгезивності лактобацил, ізольованих з різних біотопів.

Майже усі штами, виділені з кишечника та вагіни, слабо адгезувались до еритроцитів $2,21 \pm 0,04$ та $2,31 \pm 0,04$ відповідно, за винятком *L. casei* кишкового походження і *L. plantarum*, ізольованої з вагіни, у яких ІАМ склав $3 \pm 0,03$ і $2,53 \pm 0,08$.

При дослідженні здатності пробіотичних штамів лактобацил прикріплюватися до клітин різного

походження, встановлено менш виражену різницю в кількісних показниках щодо букального епітелію та еритроцитів. Найбільшу адгезію зафіксовано у *L. reuteri* DSM 179385 $5,18 \pm 0,03$. Результати цих досліджень наведені нижче у таблиці 1.

Також потрібно відмітити, що адгезивна активність пробіотичних штамів in vitro та in vivo

може відрізнитись, позаяк в лабораторних умовах пробіотичні штами лактобацил мають більш сприятливі умови для їхньої життєдіяльності.

Таблиця 1. Показники індексу адгезії пробіотичних штамів лактобацил

Клітини	Пробіотичні штами		
	<i>L. plantarum</i> 8P-A3	<i>L. acidophilus</i> KS 400	<i>L. reuteri</i> DSM 17938
	Індекс адгезивності мікроорганізмів (ІАМ)		
Букальний епітелій	4,4±0,18	4,3±0,02	5,18±0,03
Еритроцити 0 (1)	2,42±0,05	2,57±0,04	3,02±0,03

Висновки

1. Виділено з різних біотопів організму людини 5 домінуючих видів лактобактерій: *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. brevis* виділявся тільки з кишечника.
2. Високу адгезивність зафіксовано для штамів *L. casei* та *L. plantarum*, ізольованих, як з ротової порожнини так і з вагіни, що свідчить про високу спорідненість оболонкових структур, вказаного виду лактобацил до відповідних структур букального епітелію. Найвищий показник адгезії для ізолятів з травного тракту встановлено для виду *L. casei*. Отримано прямий корелятивний зв'язок між індексом адгезії лактобацил до клітин букального епітелію та еритроцитів. Отримані дані підтверджують, що адгезивність є більшою мірою штамовою ознакою, ніж видовою.
3. За відсутності клінічних проявів дисбіотичних змін, (особливо у новонароджених дітей), може бути рекомендоване обмеження застосування пробіотичних препаратів з «профілактичною метою», оскільки існує ризик гальмувати формування власної мікрофлори або її витіснення високоадгезивними пробіотичними штамами.
4. Залишається відкритим питання ефективності окремих біотерапевтичних препаратів, наслідком дії яких є заміна пробіотичними штамами автоштамів лактобацил в природних біотопах організму людини.

Referencens

1. Livinska, O.P. The influence of teichoic acids from probiotic Lactobacilli on microbial adhesion to epithelial cells [Text] / O.P. Livinska, I.L. Garmasheva, N.K. Kovalenko // Microb. zhurnal. -2012. -Vol.74, № 3. - P. 16-22.
2. Shenderov B. Medical microbial ecology and functional nutrition. Probiotics and functional food / B. Shenderov. - M.: Изд-во Грантъ, 2001. - Т. 3. - 287 с.
3. Piard, J. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 2. Bacteriocins and other antibacterial substances [Text] / J. Piard, M. Desmaseud // Lait. - 1992. - V. 72. - P. 113-142.
4. Reid, G. Implantation of Lactobacillus casei var rhamnosus into the vagina [Text] / G.Reid, K. Millsap, A.W. Bruce // Lancet. - 1994. - V. 344. - P. 1229.
5. McGroarty, J.A. Probiotic use of lactobacilli in the human female urogenital tract [Text] / J. A. McGroarty // FEMS Immunol Med Microbiol. - 1993. - V. 6, №4. - P. 251-264.

6. Kremleva, E.A. Influence of microbial-epithelial interactions on biological characteristics of vaginal microflora [Text] / E.A. Kremleva, S.V. Chercasov, O. V. Bukharin // Zh. Microbiol. (Moscow). - 2011. - № 2. - P. 53-57.
7. Bukharin, O. V. Features of epithelial-bacterial interactions in bacterial vaginosis [Text] / O. V. Bukharin, E.A. Kremleva, S.V. Chercasov // Zh. Microbiol. (Moscow). - 2012. - № 3. - P. 3-8.
8. Methodology of study of microorganisms adhesive process [Text] / V. I. Brilis, T. A. Brilis, Kh. P. Lentser & A. A. Lentser // Laboratornoedelo. - 1986. - №4. - P. 210-212.
9. Kigel, N.F. Hydrophobicity and adhesion properties of some industrial strains of lactic acid bacteria [Text] / N.F. Kigel, O.V. Naumenko, N.M. Zubkov // Visn. agrar. Science. - 2003. - №4. - P. 61-65.
10. Otero, M.C. Bacterial surface characteristics applied to selection of probiotic microorganisms [Text] / M.C. Otero, V.S. Ocana // Meth. Mol. Biol. - 2004. - V. 268. - P. 435-440.
11. Lactoflora and colonization resistance / Kh. P. Lentser, A. A. Lentser, M.E. Mikelsaar [et al.] [Text] // Antibiotics and medical biotechnology.- 1987. - Vol. XXXII. - №3. - P. 173-179.
12. Kostyuk, O.P. Modern views on the effect of lactic acid bacteria on the immune system of the human body [Text] / O.P. Kostyuk, L.I. Chernyshov, A.P. Volokha // Physiological zhurnal.- 1997. - Vol. 43. - №3. - C. 106-115.
13. Kapczynski D. Adherence of Lactobacillus to intestinal cells in culture correlates with fi bronectin binding [Text] / D. Kapczynski, R. Meinersmann, M. Lee // Current microbiology. - 2000. - Vol. 41. - P. 136-141.
14. Oral and faecal lactobacilli and their expression of mannose-specific adhesins in individuals with and without IgA deficiency [Text] / Lonnermark E., Nowrouzian F., Adlerberth I., Ahrne S., Wold A., Friman V. // Int J. Med. Microbiol. - 2012. - 302, N 1. - P.53-60.
15. The normal Lactobacillus flora of healthy human rectal and oral mucosa [Text] / S. Ahrne, S. Nobaek, B. Jeppsson, I. Adlerberth, A.E. Wold, G.Molin // J Appl Microbiol. - 1998. - 85, N 1. - P.88-94.
16. Shyrobokov V. Microbial ecology of colored satin [Text] / Shyrobokov V., Jankowski D., Dement G. - Kyiv.- 2009.- P.311.
17. Garmasheva, I.L. adhesion of various species of lactic acid bacteria depending on the AB0 system blood

group [Text] / I.L. Garmasheva, N.K. Kovalenko // Microb. zhurnal. -206. -Vol.68, № 5. - P. 62-68.

**UDC576.751.5.+[577.154.25:615.246.1]
CHARACTERISTICS OF ADHESIVE
PROPERTIES OF LACTOBACILLUS - CLINICAL
ISOLATES AND COMPONENTS OF BIOLOGICAL
PRODUCTS**

Lavryk G.

Lactobacilli detected in all biotopes of digestive tract, starting from the mouth and ending with the colon, is the dominant flora of vaginal biotope. Their adhesiveness to epithelial cells leads to survive in conditions of microorganism biotopes and to form biofilm, thus mediating passive antagonism against conditionally pathogenic bacteria. Colonization resistance provides a set of mechanisms that provide individual anatomical stability and normal microflora. It is experimentally confirmed that lactobacilli provide biotopes colonization resistance of the human body due to competitive inhibition and coaggregation of allochthonous microorganisms. It is important to consider the fact that probiotics should not compete with autochthonous microflora, which is always more physiological for each individual than most valuable exogenous bacteria, even with the greatest potential beneficial properties. The probiotic activity should be directed to the main target bacterial therapy, which is to restore physiological ecological community. The aim of research was to compare the adhesive properties of lactobacilli - clinical isolates of probiotic preparations and ingredients to the buccal epithelium cells and erythrocytes 0 (1) of the blood group system AB0 person.

Materials and methods. The object of the research were clinical strains of Lactobacillus spp. selected from the mouth, intestines, vagina healthy people. At the the species identification of lactic acid bacteria were taken into account morphological and cultural properties, aerotolerance. The carbohydrate profile was determined using the test system API-50SN L (Bio-Merieux), lack of catalase activity. The ability of allocated bacteria to adhesion were observed in erythrocytes 0 (1) blood and buccal epithelium cells by human Brilis VI and oth. For comparison were used probiotic strains *L. rlantarum* 8P-A3, *L.acidophilus* KS 400, *Lactobacillus reuteri* DSM 17938. The effectiveness of adhesion was assessed by index microorganism adhesion (I) - the average number of microorganism on one epithelial cells that is involved in the adhesion - determined by the formula = IAM (SPA × 100) / K. We determined this rate when calculating under the microscope 50 buccal cells/erythrocytes.

Results and discussion. We received 102 strains of lactobacilli including 32 oral, 41 intestinal and 29 vaginal isolates. In species composition among isolates from all biotopes were dominated such Lactobacillus species: *L.acidophilus* (15 strains from the mouth, intestine – 12, vaginal - 9), respectively *L.plantarum* (4, 6, 3), *L.fermentum* (5, 10, 8), *L. rhamnosus* (4, 3, 6), *L.casei* (4, 7, 3). The only type *L.brevis* (3) just stood out from the intestine. During the research it was found that indicators of lactobacilli adhesion to buccal epithelium cells and erythrocytes 0 (1) blood are different between each other. Almost all of lactobacilli isolates showed high activity

and high adhesive on the buccal epithelium. Highly adhesive appeared to be vaginal lactobacilli isolates $4,19 \pm 0,06$. Among intestinal isolates the most pronounced adhesion to buccal epithelial showed *L.casei* $4,66 \pm 0,04$, *L.acidophilus* $4,13 \pm 0,08$. In isolated mouthes of *L.acidophilus* and *L.plantarum* adhesive activity almost identical ($4,12 \pm 0,07$ and $4,10 \pm 0,08$). It should be noted that the level of adhesion of lactobacilli to red blood cells is much lower than the buccal epithelium. Thus, the adhesion index of *L.acidophilus*, which were isolated from different biotopes to the buccal epithelium was $4,15 \pm 0,03$, and - according to erythrocytes $2,50 \pm 0,01$ ($p > 0,05$). Almost all strains isolated from the intestines and vagina showed high adhesiveness to erythrocyte $2 \pm 0,03$ and $2,14 \pm 0,02$ accordingly; except *L.casei* of intestinal origin and *L.plantarum*, isolated from the vagina, which amounted IAM $3 \pm 0,03$ and $2,53 \pm 0,08$. In probiotic strains of Lactobacillus was observed a similar situation, but with a less expressed difference in the adhesion index on buccal epithelium and erythrocytes. The greatest adhesion observed in *L.reuteri* DSM 17 938 $5,18 \pm 0,03$.

Conclusion 1. There were isolated from different biotopes of the human body 5 dominant species of lactobacilli: *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*. *L.brevis* was only distinguished from the intestine. 2. High adhesiveness was observed for strain *L. casei*, *L.plantarum*, isolated, both from the mouth and from the vagina, indicating a high affinity of shell structures specified types of lactobacilli in the appropriate structures of buccal epithelium. The highest adhesion to isolates from the digestive tract to found types *L.casei*. Received direct correlative relationship between an index of adhesion on buccal epithelium and erythrocytes. These data confirm that the adhesiveness is more strain feature than species. 3. In the absence of clinical manifestations of dysbiotic changes (especially in infants) to limit the use of probiotic preparations "prophylactically" as high adhesive probiotic strains may displace or inhibit the formation of its own microflora. 4. It is an open question of the effectiveness of some bio therapeutic drugs, the result of which is to replace *Lactobacillus* auto strains to the probiotic strains in natural habitats of the human body.

Key words: lactobacilli, adhesion, buccal epithelium, erythrocytes