

УДК: 576.8+616.345+616.72–002.77

АНТИКОМПЛЕМЕНТАРНА АКТИВНІСТЬ ПРЕДСТАВНИКІВ МІКРОБІОЦЕНОЗУ ТОВСТОЇ КИШКИ У ХВОРИХ НА РЕВМАТОЇДНИЙ АРТРИТ

Кучмак О.Б., Климнюк С.І.

ДВНЗ «Тернопільський державний медичний
університет

ім. І. Я. Горбачевського», м. Тернопіль

Кафедра мікробіології, вірусології та імунології,
ТДМУ ім. І.Я. Горбачевського, майдан Волі, 1,
м. Тернопіль, 46001, E-mail:
universty@tdmu.edu.te.ua
med_biol@ukr.net,
<http://www.tdmu.edu.te.ua>

Високочутливим індикатором, який відображає стан імунної системи кишків є його мікрофлора [3, 17]. У той же час у 53-88 % хворих на ревматоїдний артрит (РА) зустрічаються ознаки ураження системи травлення [4]. Однак напрями змін кишківної мікрофлори на фоні перебігу РА залишаються до кінця не вивченими, а дисбактеріоз може проявитися не тільки змінами видового спектру та біологічних властивостей мікробних популяцій, але й бути причиною порушення важливих функцій організму [3, 4, 20].

Взаємодія між макроорганізмом і патогеном упродовж усього захворювання є динамічним процесом, інтенсивність якого часто залежить від початкового етапу їх взаємодії – колонізації біотопу збудником. При заселенні екологічних ніш мікроорганізмів повинні проявляти не тільки високу інвазивну активність, але й здатність протистояти гуморальним чинникам захисту хазяїна [10, 15, 18, 17]. Зараз все більше уваги приділяється вивченню властивостей патогенних мікроорганізмів, направлених на інактивацію чинників природної резистентності організму-господаря. Найважливішою ланкою такого протиінфекційного захисту макроорганізму є система комплементу – важливий механізм протидії, який спричиняє лізис бактерій з переважно позаклітинним типом паразитування. Згідно з даними літератури здатність до інактивації системи комплементу стабільно проявляється в багатьох мікробів, зокрема, у *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Clostridium histolyticum*, *Streptococcus pyogenes*, *Corynebacterium diphtheria*, *Neisseria gonorrhoeae*. Вона реалізується як за рахунок секреції специфічних протеаз, так і завдяки наявності спеціалізованих сполук клітинної мембрани [1, 2, 5, 14, 16]. Саме визначення здатності мікроорганізмів інактивувати комплемент проводиться в експерименті з метою визначення вірулентних і персистентних характеристик бактерій, а в клініці – для встановлення їх етіологічної значущості при патологічних процесах. Наявність у збудника антикомплементавної активності навіть при відсутності деяких інших чинників вірулентності, визначає його можливість ініціювати і підтри-

мувати запальний процес. Дослідження антикомплементавної активності бактерій дає можливість підвищити точність мікробіологічної діагностики, здійснити контроль ефективності лікування й зробити прогноз перебігу захворювання.

Метою дослідження було вивчення антикомплементавних властивостей умовно-патогенних бактерій, які формують мікробіоценоз товстої кишки у хворих на РА та обґрунтувати використання пробіотиків та основі лактобактерій для корекції дисбіотичних порушень у таких хворих.

Матеріали і методи дослідження

Класичним бактеріологічним методом досліджено мікробіоценоз товстої кишки у 72 хворих на ревматоїдний артрит віком від 20 до 55 років [11]

На основі визначення біохімічної активності мікроорганізмів за допомогою ідентифікаційних наборів «Микро-ЛА-Тест»; комерційної тест-системи СТАФІ-тест 16 виробництва фірми «PLIVA-Lachema» (Чехія) проведено їх ідентифікацію згідно класифікації Берджі [12].

Антикомплементавну активність (АКА) штамів визначали за допомогою фотометричного методу, який базується на вимірюванні оптичної щільності та відповідно визначенні ступеня гемолізу (після сумісного культивування з патогеном, що досліджується) у підготовленій гемолітичній системі [8]. Як джерело комплементу використовували ліофілізовану сироватку морської свинки (виробництва ЗАТ «Біолік», м. Харків). У дослідних пробах об'єднували по 0,1 мл базової суспензії бактерій (оптична щільність – 1,0 за McFarland) і розчиненого у фізіологічному розчині комплементу, активність 1 мл якого становила 20 С'Н50-одиниць. Контролем служили проби з буферним розчином замість суспензії бактерій. Проби культивували впродовж двох годин при 37 °С, після чого до кожної пробірки додавали по 3 мл 5 % суспензії еритроцитів барана у фосфатному буфері (рН 7,2-7,4), сенсibiliзованих гемолітичною сироваткою. Суміш витримували при 37 °С впродовж однієї години, а потім при температурі 4 °С – 10 хвилин для зупинення процесу. Проби центрифугували при 2000 об/хв 10 хвилин і вимірювали екстинкцію ($\lambda=480$ нм, $L=5$ мм) на спектрофотометрі СФ-56 (Ломоспектр). АКА виражали в умовних анти-С'Н50 одиницях (далі ум. од.) розрахованих за формулою:

$$АКА = \frac{E_k - E_d}{E_s} \times C,$$

де E_k і E_d – контрольне і дослідне значення екстинкції (одиниць оптичної густини), C – початкова активність комплементу (С'Н50 – одиниць), E_s – екстинкція суспензії бактерій (од. опт. густ.). Досліди проводили у триразових повторюваннях.

Антагоністичну активність пробіотичного штаму *Lactobacillus rhamnosus* GG вивчали за методом відстроченого антагонізму, оцінюючи ступінь чутливості досліджуваних штамів до нього [7].

Результати обробляли статистично за допомогою комп'ютерного програмного пакетів Microsoft Excel-

2007. Для характеристики показників антикомплементарної активності використовували параметричні критерії з визначенням значення середньої арифметичної (M) та її помилки ($\pm m$). Оцінку вірогідності різниці між порівнюваними показниками визначали за допомогою критерію Стьюдента. Різницю

між показниками, що порівнювалися, вважали статистично значимою при $p < 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення

На підставі результатів мікробіологічного дослідження фекалій виявлено динамічні зміни мікрофлори, що відповідають різним ступеням дисбіозу товстої кишки в хворих на РА (табл.1).

Таблиця 1. – Ступені дисбактеріозу товстої кишки у хворих на ревматоїдний артрит

Ступінь дисбактеріозу	Хворі на ревматоїдний артрит	
	абсолютне число	%
I	27	37,5
II	30	41,7
III	15	20,8
Всього:	72	100,0

Як засвідчують дані, представлені у табл. 1, понад 60 % хворих на РА мали дисбактеріоз II та III ступеня, а в 37,5 % випадків зареєстровано наявність дисбактеріозу I ступеня. У більшості досліджуваних у вмісті товстої кишки зафіксовано високі титри дріжджоподібних грибів роду *Candida spp.*, *Staphylococcus aureus*, коагулазонегативних стафілококів, умовно патогенних кишкових бактерій, зокрема, лактозонегативних *E. coli*

та їх популяцій з гемолітичною активністю, *Proteus spp.*, суттєве зниження вмісту біфідобактерій та лактобактерій.

У процесі лабораторної діагностики від хворих на РА вилучено 40 клінічних штамів представників умовно-патогенної флори товстої кишки різних видів з метою встановлення ступеню прояву антикомплементарної активності (рис.).

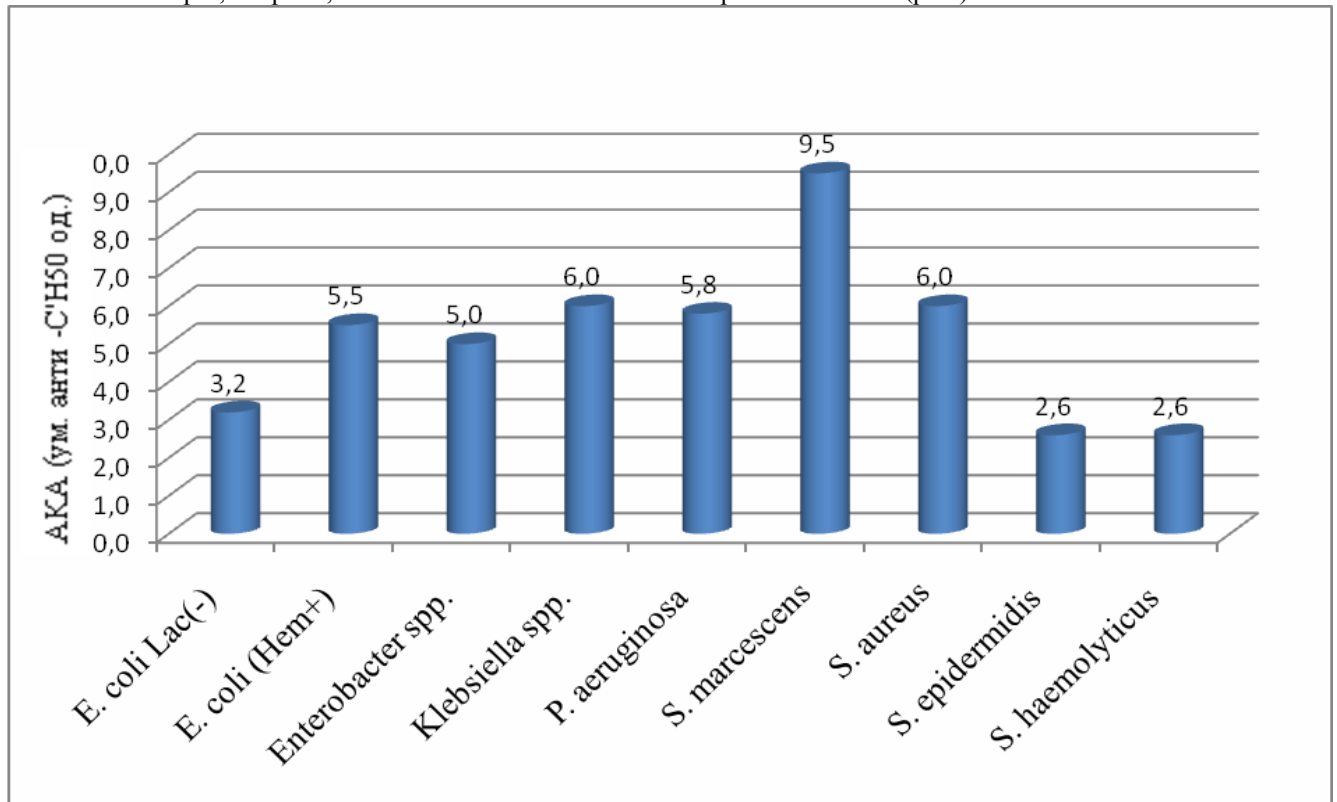


Рис. 1. Антикомплементарна активність окремих представників мікробіоценозу товстої кишки у хворих на ревматоїдний артрит

Встановлено, що у всіх досліджуваних клінічних штамів мікробів був різний ступінь прояву антикомплементарної активності. Найвищою вона була у штамів *Serratia marcescens* – (9,5 \pm 0,1) ум.од., але у 1,6 рази меншою у *P. aeruginosa*. Антикомплементарна активність *E. coli* з гемолітичними властивостями була на 70 % вищою в порівнянні з її лактозонегативними варіантами. Золотисті стафілококи мали суттєво вищу антикомплементарну активність у порівнянні з до XV з'їзду мікробіологів, епідеміологів, паразитологів України «ПРОБЛЕМИ ТА ЕВОЛЮЦІЯ ЕПІДЕМІЧНОГО ПРОЦЕСУ І ПАРАЗИТАРНИХ СИСТЕМ ПРОВІДНИХ ІНФЕКЦІЙ СУЧАСНОСТІ», 23-25 Листопада 2011 Р., М. ХАРКІВ

коагулазонегативними *S. epidermidis* і *S. haemolyticus* ($p < 0,05$).

Враховуючи вірогідні несприятливі наслідки виявлених дисбіотичних змін у хворих на РА, є необхідним проведення комплексу заходів щодо відновлення нормобіоценозу тонкої та товстої кишків або його суттєвого поліпшення. Це можна забезпечити введенням у схеми лікування хворих пробіотичних препаратів [6, 13, 16, 19].

Тому в подальшому в умовах дослідів *in vitro* була визначена антагоністична активність пробіотичного штаму *Lactobacillus rhamnosus* GG, який входить до складу препарату «Біфі-форм® комплекс» відносно умовно-патогенних мікроорганізмів, які формували мікробіоту товстої кишки у хворих на РА.

Таблиця 2. Антагоністична активність *Lactobacillus rhamnosus* GG щодо окремих представників мікрофлори товстої кишки хворих на ревматоїдний артрит

Мікроорганізм	Ступінь чутливості, %			
	високочутливі (>15 мм)	чутливі (10-15 мм)	помірно чутливі (5-10 мм)	нечутливі (<5 мм)
<i>E.coli</i> (n=36)	41,7	27,8	25,0	5,5
<i>Enterobacter spp.</i> (n=30)	0,0	30,0	50,0	20,0
<i>Klebsiella spp.</i> (n=14)	0,0	28,6	35,7	35,7
<i>P. aeruginosa</i> (n=12)	0,0	0,0	33,3	66,7
<i>S. aureus</i> (n=31)	12,9	58,1	22,6	6,4
<i>E. faecalis</i> (n=28)	17,9	46,4	25,0	10,7

Встановлено, що 94,5 % штамів *E. coli*, включаючи лактозонегативні та варіанти з гемолітичними властивостями виявилися помірно-чутливими, чутливими або високочутливими до антагоністичної дії пробіотика. Однак серед них було 5,6 % нечутливих варіантів. Від 28,6 % до 50,0 % штамів *Klebsiella spp.* та ентерококів були чутливими або помірно чутливими до лактобацил. І в той же час ріст від 1/5 до 1/3 з них не пригнічувався лактобацилами. Клінічні варіанти псевдомонад переважно не інгібувалися пробіотичним штамом (66,7 %).

Експерименти також довели достатньо високий протимікробний ефект дії *Lactobacillus rhamnosus* щодо *S. aureus* та *E. faecalis* (89,3 % - 93,6 % штамів із різними видами чутливості).

Висновки

1. У хворих на РА в процесі довготривалого лікування діагностується дисбактеріоз товстої кишки переважно I-го (37,5 %) та II-го (41,7 %) ступеня.
2. Популяції бактерій, які виявляють у вмісті порожнини товстої кишки при дисбактеріозі, мають різного ступеня прояву антикомплемтарні властивості, які більш вираженні у грамнегативних в порівнянні з грампозитивними мікроорганізмами.
3. Пробіотичний штам *Lactobacillus rhamnosus* GG, який введено в препарат «Біфі-форм® комплекс», має виражену антагоністичну активність щодо найзначущих представників мікробіоценозу товстої кишки: *E. coli*, *Enterococcus spp.*, *Klebsiella spp.*, *S. aureus*, однак понад 60,0 % клінічних штамів псевдомонад нечутливі до дії антагоніста.

Перспективи подальших досліджень

Вивчення механізмів впливу пробіотичних штамів бактерій на мікроби, які формують мікробіоту товстої

Досліджено чутливість 151 клінічного штаму мікроорганізмів: *E. coli*, *Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* до пробіотичного штаму лактобацил (табл. 2).

кишки, зокрема на їх вірулентні властивості (антикомплемтарні, антилізоцимні, продукції ферментів агресії тощо). Розробка методичних рекомендацій щодо доцільності використання пробіотиків з метою корекції дисбактеріозу товстої кишки в осіб із РА.

Список літератури

1. Антикомплемтарна активність грамнегативних умовно-патогенних бактерій – збудників гнійно-запальних захворювань [Текст] / І. С. Гайдаш // Буковинський медичний вісник. – 2001. – № 4. – С. 42-45.
2. Ахунова Н. Р. Антикомплемтарная активность *Neisseria gonorrhoeae* [Текст] / Н. Р. Ахунова, Д. Г. Дерябин, Ю. А. Брудастов Ю. А. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 1997. – № 4. – С. 63-67.
3. Блудова Н. Г. К вопросу о патогенезе поражения толстого кишечника у больных ревматоидным артритом [Текст] / Н. Г. Блудова // Сучасна гастроентерологія. – 2005. – № 6(26). – С. 44-47.
4. Блудова Н. Г. Клінічна характеристика хворих на ревматоїдний артрит в сполученні з дисбіозом кишечника [Текст] / Н. Г. Блудова // 36. наук. праць I нац. конгресу лікарів внутрішньої медицини. – Київ, 2005. – С. 110-111.
5. Брудастов Ю. А. Антикомплемтарная активность бактерий [Текст] : автореф. дис. ... канд. мед. наук : 03.00.07 / Брудастов Юрий Авенирович; Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения РАН – Челябинск, 1992. – 22 с.
6. Галисина Т. В. Клинические аспекты применения *Lactobacillus rhamnosus* GG [Текст] / Т. В. Галисина, С. В. Бельмер С.В. // Вопросы детской диетологии/ – 2009. – Т. 7, № 2. – С. 30-35.
7. Егоров Н. С. Микробы-антагонисты и биологические методы определения антибиотической активности / Егоров Н. С. — М.: Высшая школа. — 1965. — 211 с.

8. Калініченко С. В. Вплив електромагнітних полів на біологічні властивості токсиноутворюючих коринібактерій [Текст] : автореф. дис. ... канд. мед. наук : 03.00.07 / Калініченко Світлана Вікторівна; Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова. – Харків, 2006. – 24 с.
9. Калюжная О.С. Изучение антагонистической активности лактобактерий [Текст] / О. С. Калюжная, Л. С. Стрельников, О. П. Стрилец // II Междунар. науч. конф. молодых ученых-медиков: сб. тр., г. Курск, 21 – 22 февр. 2008 г. – Курск, 2008. – С. 264 – 266.
10. Кременчуцкий Г. Н. Роль микробиологии организма человека и принципы ее коррекции: Монография. / Г. Н. Кременчуцкий, С. А. Рыженко, С. И. Вальчук — Днепропетровск.: Пороги, 2003. — 230 с.
11. Методики клинических лабораторных исследований: Справочное пособие Том 3. Клиническая микробиология. Бактериологические исследования. Микологические исследования. Паразитологические исследования. Инфекционная иммунодиагностика. Молекулярные исследования в диагностике инфекционных заболеваний / Под ред. В.В. Меньшикова. – М.: Лабора, 2009. – 880 с.
12. Определитель бактерий Берджи. В 2-х т. / под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейнли, С. Уильямса [пер. с англ. под ред. акад. РАН Г. А. Заварзина]. — М.: Мир, 1997. — 800 с.
13. Пробиотичні властивості промислових штамів лактобацил і біфідобактерій [Текст] / Н. К. Коваленко [та ін.] // Мікробіологічний журнал. – 2010. – Т. 72, № 1. – С. 5-17.
14. Рижкова Т.А. Антиккомплементарна активність коринібактерій за аерофільних і мікроаерофільних умов їх культивування [Текст] / Т. А. Рижкова // Буковинський медичний вісник – 2008. – № 2. – С. 86-90.
15. Фильчаков И. В. Персистенция бактерий: механизмы и иммунная реактивность организма / И. В. Фильчаков, А. М. Зарицкий // Сучасні інфекції. – 2003. – № 3. – С. 71-82.
16. Флегонтова В.В. Антиккомплементарна активність стафілококів – збудників нозокоміальних захворювань [Текст] / В. В. Флегонтова // Буковинський медичний вісник. – 2000. – № 1. – С. 226-228
17. Янковский Д.С. Микробная экология человека: современные возможности ее поддержания и восстановления. – К.; Эксперт ЛТД, 2005. – 362 с.
18. Antagonistic activity of probiotic lactobacilli and bifidobacteria against entero- and uropathogens [Текст] / P. Hütt [et al.] // J. Appl. Microbiol. – 2006. – Vol. 6, no 100. – P. 1324-1332.
19. Impact of Environmental and Genetic Factors on Biofilm Formation by the Probiotic Strain *Lactobacillus rhamnosus* GG [Текст] / Sarah Lebeer [et al.] // Applied and Environmental Microbiology. – 2007. – Vol. 73, no. 21. – P. 6768-6775.
20. Hawrelak J. A. The causes of intestinal dysbiosis: a review [Текст] / J. A. Hawrelak, S. P. Myers // Altern. Med. Rev. – 2004. – Vol. 9, № 2. – P. 180-197.

Реферати

До XV з'їзду мікробіологів, епідеміологів, паразитологів України «ПРОБЛЕМИ ТА ЕВОЛЮЦІЯ ЕПІДЕМІЧНОГО ПРОЦЕСУ І ПАРАЗИТАРНИХ СИСТЕМ ПРОВІДНИХ ІНФЕКЦІЙ СУЧАСНОСТІ», 23-25 Листопада 2011 Р., м. Харків

УДК: 576.8+616.345+616.72–002.77

АНТИКОМПЛЕМЕНТАРНА АКТИВНІСТЬ ПРЕДСТАВНИКІВ МІКРОБІОЦЕНОЗУ ТОВСТОЇ КИШКИ У ХВОРИХ РЕВМАТОЇДНИМ АРТРИТОМ

Кучмак О. Б., Климнюк С.І.

Класичним методом досліджено мікробіоценоз товстої кишки в 72 хворих на ревматоїдний артрит у віці від 20 до 55 років. Встановлено, що у хворих на РА діагностується дисбактеріоз переважно I (37,5%) і II (41,7%) ступеня. Окрім популяції бактерій, виділені від таких хворих, мають антикомплементарні властивості, які найбільш виражені в грамнегативних в порівнянні з грампозитивними мікроорганізмами. Пробиотичний штам *Lactobacillus rhamnosus* GG має достатню сильну антагоністичну активність відносно найзначущих представників мікробіоценозу товстої кишки: *E. coli*, *Enterococcus* spp., *Klebsiella* spp., *S. aureus*, проте понад 60,0 % клінічних штамів псевдомонад нечутливі до дії антагоніста.

Ключові слова: мікрофлора товстої кишки, антагоністична активність, антикомплементарна активність, ревматоїдний артрит.

УДК: 576.8+616.345+616.72–002.77

АНТИКОМПЛЕМЕНТАРНА АКТИВНОСТЬ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ МИКРОБИОЦЕНОЗА ТОЛСТОЙ КИШКИ У БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ

Кучмак О. Б., Климнюк С.И.

Классическим методом исследовано микробиоценоз толстой кишки у 72 больных ревматоидным артритом в возрасте от 20 до 55 лет. Установлено, что у больных ревматоидным артритом диагностируется дисбактериоз преимущественно I (37,5%) и II (41,7%) степени. Отдельные популяции бактерий, выделенные от таких больных, имеют антикомплементарные свойства, которые наиболее выражены у грамотрицательных по сравнению с грамположительными микроорганизмами. Пробиотический штам *Lactobacillus rhamnosus* GG имеет выраженную антагонистическую активность относительно значимых представителей микробиоценоза толстой кишки: *E. coli*, *Enterococcus* spp., *Klebsiella* spp., *S. aureus*, однако свыше 60,0 % клинических штаммов псевдомонад нечувствительны к действию антагониста. **Ключевые слова:** микрофлора толстой кишки, антагонистическая активность, антикомплементарная активность, ревматоидный артрит.

UDC: 576.8+616.345+616.72–002.77

ANTICOMPLEMENTARY ACTIVITY OF COLON MICROBIocenosis REPRESENTATIVES IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS

Kuchmak O.B., Klymnyuk S.I.

Key words: microflora of colon, antagonism activity, anticomplementary activity, rheumatoid arthritis.

The classic bacteriological method was used for investigation of colon microbiocenosis in 72 patients with rheumatoid arthritis at the age of 20 to 55 years. It was revealed that patients with rheumatoid arthritis had dysbacteriosis mainly

I (37,5%) and II (41,7%) degree. Some populations of bacteria isolated from these patients had anticomplementary activity that was most prominent in gram-negative than in gram-positive microorganisms. *Lactobacillus rhamnosus* GG probiotic strain had a pronounced antagonistic activity against important representatives of colon microbiocenosis: *E. coli*, *Enterococcus* spp., *Klebsiella* spp., *S. aureus*, but more than 60,0 % of clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* were insensitive to the action of this antagonist.