© Нетребенко О.К., 2009

О.К. Нетребенко

ОБЗОР НОВЫХ СТАТЕЙ И МАТЕРИАЛОВ ПО МЕХАНИЗМАМ ДЕЙСТВИЯ И РОЛИ ПРОБИОТИКОВ У ДЕТЕЙ (2007–2008 гг.)

Вопросы клинической эффективности и профилактической активности пробиотиков (ПБ) в последние годы привлекают внимание исследователей и педиатров многих европейских научных центров. Каждый новый месяц приносит десятки публикаций в научных и медицинских изданиях по этим вопросам (рис. 1). Интерес к ПБ связан прежде всего с тем фактом, что ученые нашли связь ряда заболеваний (аллергических состояний, воспалительных заболеваний кишечника и др.) с нарушениями кишечной микробиоты у детей (КМБ) в развитых странах, а именно в развитых странах растет число случаев аллергических и других иммуноопосредованных заболеваний. Дискуссии в медицинской печати и КОХРАНовские публикации свидетельствуют о неоднозначной оценке действия ПБ: практически равное число исследований показывает отсутствие действия ПБ и/или благоприятный эффект. Имеются случаи бактериемии и сепсиса при использовании ПБ у детей с нарушенным иммунным статусом.

Причиной этих дискуссий, по нашему мнению, является общий подход ко всем микроорганизмам, включенным по тем или иным показателям в ряд ПБ. По-видимому, было бы более правильно говорить об эффективности и безопасности не всех пробиотиков в целом, а оценивать показатели эффективности и безопасности для каждого микроорганизма, являющегося потенциальным ПБ. Следует отметить, что еще в 2002 г. появилось руководство по оценке безопасности и эффективности ПБ, выпущенное ФАО/ВОЗ — Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food [1]. В этом руководстве приводится схема поступенчатой оценки эффективности и безопасности ПБ, которая включает на первом этапе идентификацию штамма бактерий фенотипическими и генотипическими методами, оценку рода, вида, штамма бактерии и депонирование исследуемого штамма в международной коллекции штаммов (рис. 2). Далее проводится функциональная оценка с тестами in vitro и на животных. Одновременно оценивается безопасность штамма также тестами in vitro и на животных. Следующая фаза включает оценку действия бактерии в исследованиях на здоровых добровольцах, далее два рандомизированных, двойных, слепых, плацебо-контролируемых исследования на здоровых детях. Последний этап — клиническое исследование, позволяющее сравнить действие ПБ со стандартным лечением.

К настоящему времени появились убедительные доказательства штаммоспецифичности действия ПБ. Ярким примером, подтверждающим это положение, является экспериментальное исследование O. Menard и соавт. [2].

Авторы публикации во вступительной части отметили тот факт, что бифидобактерии (ББ) доминируют в кишечнике младенцев, получающих исключительно грудное вскармливание. Поэтому целью исследования явилась оценка влияния младенческих штаммов ББ на состояние иммунитета новорожденных экспериментальных животных. Исследователи ввели 9 штаммов ББ, полученных из фекалий грудных детей, гнотобиологическим (не имеющим своей микрофлоры) мышам, и оценили влияние каждого штамма на показатели иммунного статуса: баланс Th1/Th2, цитокины TGFβ1, IL4, IL10, TNFα, IFNγ. Анализ иммунного статуса мышей показал, что некоторые ББ *(B. adolescentis, B. breve)* минимально влияли или не влияли вообще на иммунные показатели. *B. bifidum, B. dentium, B. longum* индуцировали продукцию цитокинов клеток хелперов 1-го и 2-го типа. Исследователи обнаружили также, что разные виды *B. longum* действуют разнонаправленно: *B. longum* CUETM-85 вместе с некоторыми другими штаммами индуцировала продукцию цитокинов Th2, в то время как *B. longum* NCC2705 (коллекция Нестле) индуцировала продукцию цитокинов Th1, и таким образом изменяла направленность иммунного ответа в благоприятную сторону.

Высокую специфичность действия отдельных штаммов на продукцию цитокинов продемонстрировало исследование R. Kekkonen и соавт. [3]. В этом рандомизированном слепом исследовании четыре группы здоровых добровольцев ежедневно получали молочный напиток, содержащий один

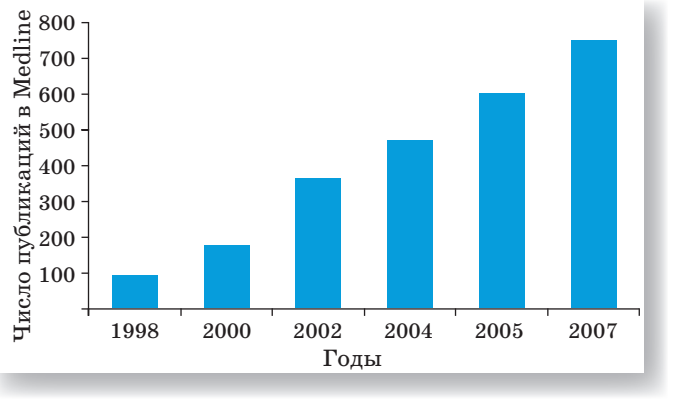

Рис. 1. Пробиотики — растущий интерес к проблеме.

Рис. 2. Схема оценки эффективности и безопасности пробиотиков*.
* по данным [1]; ДСРП — двойное слепое рандомизированное плацебо-контролируемое исследование.

из трех бактерий-ПБ: *L. rhamnosus* (LGG), *B. lactis* (Bb12), *Propionibacterium shermani* (PJS). 4-я группа (контрольная) получала молочный напиток без ПБ. Проводился забор венозной крови и слюны перед началом исследования и на 1-й, 7-й и 21-й день от начала исследования. Анализировалась продукция цитокинов Т-клетками после стимуляцией клеток патогенными бактериями. Результаты исследования показали достоверное снижение продукции провоспалительных цитокинов TNFα и IL2 на фоне использования LGG или Bb12 (рис. 3). Продукция IL2 была достоверно ниже в группе добровольцев, получавших Bb12, а продукция TNFα — в группе добровольцев, получавших LGG. В заключение авторы отмечают наличие штаммоспецифичного и противовоспалительного действия ПБ у здоровых добровольцев. Это исследование позволяет оценить механизм защитного действия ПБ, так как целый ряд заболеваний патогенетически связан с процессами хронического воспаления и снижение выброса провоспалительных цитокинов позволяет предотвратить эти процессы.

Обнаружение ББ в материнском молоке явилось новым фактором, свидетельствующим в пользу включения ПБ в детские молочные смеси (ДМС) для детей, лишенных материнского молока. Впервые живые бактерии были обнаружены в грудном молоке (ГМ) группой испанских исследователей в 2003 г. С тех пор появилось много новых публикаций по этому вопросу.

В работе M. Gueimonde и соавт. [4], проводилось определение количества и состава штаммов ББ ГМ методом ПЦР. На рис. 4 представлено наличие ББ в образцах ГМ. Наиболее часто встречающимся штаммом были *B. longum* (98%). Авторы этой публикации высказывают мнение, что ББ ГМ являются важным стимулом развития кишечника и становления иммунитета грудного ребенка.

Исследование M. Gronlund и соавт. [4] позволяет связать уровень ББ в материнском молоке с развитием атопии у младенца. Авторы изучали состав КМБ беременных женщин при сроке гестации 35–36 недель (ПЦР), после родов анализировали уровень ББ ГМ и фекалий младенца в возрасте 1 месяца. В исследовании учитывали наличие у матери аллергических заболеваний. Результаты исследования показали, что в ГМ матерей наиболее часто присутствовали *B. longum* (77% образцов), на втором месте были *B. animalis* (58%) и на 3-м месте — *B. bifidum* (26%). В КМБ детей также преобладали *B. longum* (75%), *B. bifidum* и *B. animalis (lactis)*. Наличие аллергического заболевания у матери существенным образом влияло на состав бактерий в ГМ: выявлено достоверное снижение количества ББ в молоке матерей с аллергией. Одновременно в кале детей, рожденных от матерей с аллергией, также достоверно снижалось общее количество ББ (рис. 5). Авторы отмечают, что только у детей, рожденных от матерей с атопией, выявлено наличие *B. adolescentis* в кале. Дополнительными находками в этом исследовании явились отсутствие ББ в возрасте 1 месяца жизни в кале у ребенка, рожденного кесаревым сечением, и другого младенца, получавшего антибиотикотерапию с рождения. Авторы исследования делают заключение, что ГМ содержит значительное количество ББ, уровень которых снижен у матерей-аллергиков. Бактерии ГМ являются важным фак-

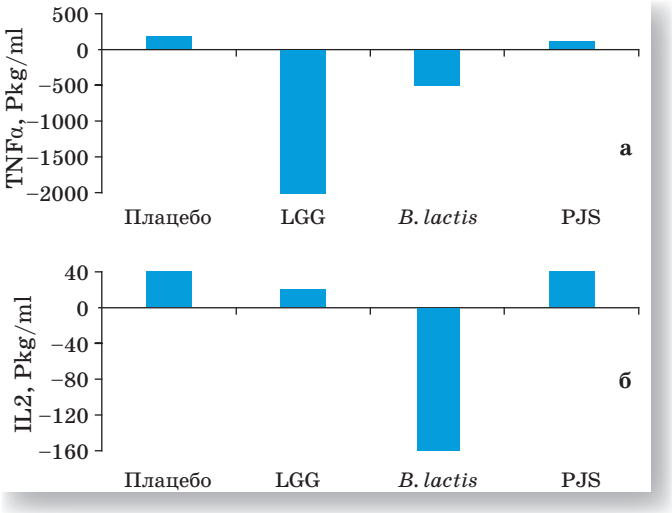

Рис. 3. Динамика продукции TNF (а) и IL2 (б) на фоне использования молочного напитка с ПБ и без ПБ здоровыми взрослыми людьми*.
*по данным [3].

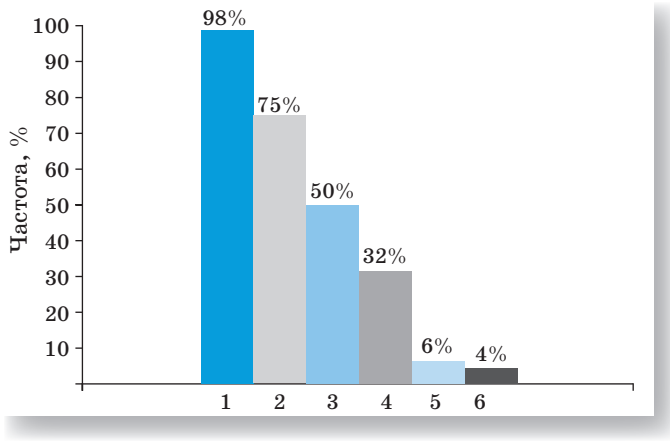

Рис. 4. Частота выделения различных штаммов ББ в ГМ в количестве 2,5–4 log/ml.*
1 — *B. longum*, 2 — *B. lactis*, 3 — *B. bifidum*, 4 — *B. catenualatum*, 5 — *B. breve*, 6 — *B. adolescentis*; * по данным [4].

тором, определяющим колонизацию кишечника у младенцев.

Поиск взаимосвязи нарушения состава КМБ с риском развития атопии проводился в крупном многоцентровом исследовании под руководством J. Penders и соавт. [6]. В этом исследовании проводилось определение уровня различных бактерий в кале у 957 детей в возрасте 1 месяца жизни (методом ПЦР). Наблюдение за детьми проводилось до 2-летнего возраста с учетом всех атопических проявлений. Результаты исследования показали, что повышение уровня *E. coli* в кале у детей являлась прогностическим фактором развития атопического дерматита (АД), причем риск развития заболевания увеличивался пропорционально увеличению количества *E. coli* в стуле у детей. У детей с повышенным уровнем *C. difficile* в кале также был более высок риск развития АД, но, кроме того, такой состав КМБ был важным прогностическим фактором развития аллергического ринита и аллергической сенсибилизоции в целом. Это исследование подтверждает предположение экспертов о том, что изменения КМБ предшествуют развитию атопии.

Следует напомнить, что аллергические заболевания характеризуются преимущественно Th2-иммунным ответом, приводящим к продукции IgE в отношении самых разнообразных антигенов. Одним из возможных механизмов благоприятного действия здоровой кишечной микрофлоры (КМФ) является подавление дифференциации Th2-клеток у новорожденных. В работе A.C. Lundell и соавт. [7] представлены данные изучения реакции моноцитов и дендритных клеток пуповинной крови на действие различных бактерий. В контакте со здоровой КМФ дендритные клетки и моноциты способны продуцировать белки (sCD14 и sCD83), обладающие иммуномодулирующими свойствами. Оба белка способны ингибировать Th2-дифференциацию в ответ на контакт с пыльцевым аллергеном за счет ингибирования продукции и снижения экспрессии генов, ответственных за синтез IL13. Авторы высказывают предположение, что эти белки являются медиаторами, индуцированными комменсальными бактериями и ответственными за снижение активности иммунного ответа, приводящего к аллергическим заболеваниям у детей.

Механизмы действия ПБ во многом аналогичны действию здоровой КМБ. Поэтому основная цель включения ПБ в ДМС — это увеличение уровня ББ в кишечнике младенца до уровня бактерий в кишечнике детей, получающих грудное вскармливание, так как именно эти бактерии обеспечивают максимальную защиту организма младенца при неблагоприятных ситуациях. При выборе ПБ для продуктов детского питания важно учитывать наличие защитных свойств, т. е. способности ПБ противодействовать внедрению патогенной или условно патогенной флоры. Этому направлению посвящено исследование M. Collado и соавт. [8]. В исследовании оценивались свойства ряда ПБ, отобранных из коллекции штаммов Нестле (*B. longum*, *Str. thermophilus*, *B. lactis*, *L. rhamnosus* и *L. paracasei*), их способности влиять на снижение риска инфицирования *E. sakazaki* (*E. sak.*) В настоящее время хорошо известно, что *E. sakazaki* является условно-патогенной бактерией, способной вызывать тяжелое заболевание у детей со сниженным иммунитетом при ряде заболеваний периода новорожденности или у недоношенных детей. Для оценки свойств ПБ в экспериментальных условиях слепым методом каждая бактерия + *E. sakazaki* инкубировалась с резецированным участком толстой кишки. Результаты исследования показали способы влияния ПБ на патогенные микроорганизмы. Каждая из пробиотических бактерий ингибировала рост *E. sak.*, обладала способностью смещать патоген с места адгезии и конкурировать с *E. sak*. Однако возможности разных штаммов отличались. Так, наиболее сильными ингибирующими свойствами обладали Bb12 и LGG (на 28% и 27,7% снижался рост *E. sak.*). Способностью к смещению бактерий обладали практически в равной мере

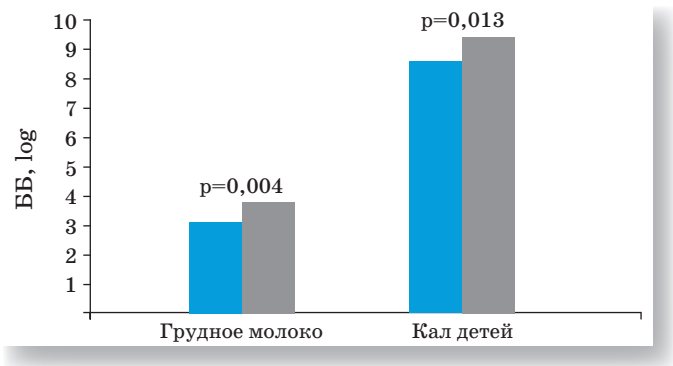

Рис. 5. Общее количество ББ в ГМ и фекалиях детей и матерей с аллергией.*
1-й столбик — аллергия, 2-й столбик — нет аллергии у матери; * по данным [5].

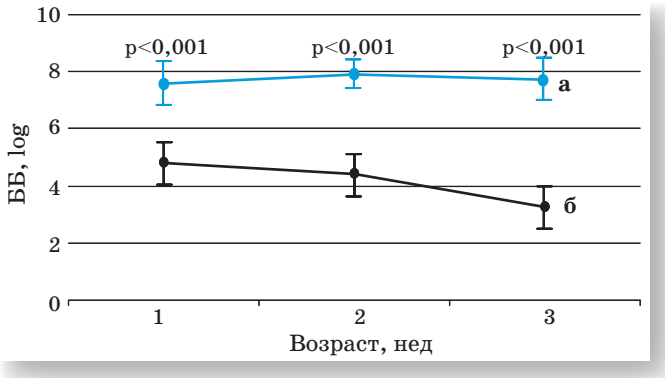

Рис. 6. Динамика содержания ББ в кале у недоношенных детей, получавших *B. lactis*.
а — *B. lactis*, б — контрольная группа.

все изученные штаммы, а конкурентные свойства были наиболее присущи Bb12 (40,5%), *B. longum* (39,2%), *L. paracasei* (33,5%), LGG (30,8%). Интересно отметить, что способность адгезии пробиотических штаммов не соответствовала степени ингибирования, конкурентности или смещения. Так, штамм *L. paracasei*, обладавший наиболее высокой способностью к адгезии, в меньшей степени ингибировал *E. sak*. по сравнению с другими ПБ.

В последние годы проведен целый ряд клинических исследований, демонстрирующих роль отдельных ПБ. Интересно отметить, что хотя нет специальных показаний для использования ПБ в питании недоношенных детей, тем не менее ряд убедительных исследований демонстрирует благоприятные свойства ПБ в отношении этого очень сложного контингента детей. G. Deshpange и соавт. [9] провели мета-анализ всех исследований по применению ПБ у недоношенных детей. В мета-анализ были включены 12 клинических работ, в которых использовались ПБ *B. lactis*, LGG, *L. acidopfilus*. Все исследования проведены в рамках доказательной медицины и представляли собой двойные слепые, рандомизированые, плацебо-контролируемые исследования. В 7 работах отмечено достоверно более высокое число случаев некротизирующего энтероколита в контрольной группе (плацебо) по сравнению с группой использования ПБ, более того, отсутствие ПБ достоверно повышало риск развития энтероколита у детей. Анализ доступных данных из 5 работ (число детей 1268) показал снижение риска летального исхода при использовании ПБ. Авторы отмечают, что необходима определенная осторожность в интерпретации этих данных, особенно в отношении дозы, штамма, продолжительности использования ПБ.

Одно из последних исследований использования ПБ у недоношенных новорожденных проведено R. Mohan и соавт. [10]. Работа представляет собой двойное слепое плацебо-контролируемое исследование, проведенное у 69 недоношенных новорожденных, получавших антибиотикотерапию. В этой работе исследовалось влияние *B. lactis* (Bb12) на процессы ферментации в кишечнике и некоторые показатели иммунного и воспалительного статуса (калпротектин, IgA). Все дети получали стандартную антибиотикотерапию, включавшую цефотаксим и пиперациллин в первые 3 дня, далее ванкомицин и амикацин. Анализ полученных результатов показал прежде всего высоко достоверную ($p<0,001$) более высокую прибавку массы тела в группе детей, получавших ПБ по сравнению с контрольной группой. В основной группе отмечалась также более высокая концентрация короткоцепочечных жирных кислот, наиболее выраженные отличия — в первые 2 недели жизни. Дети, получавшие ПБ, имели на 38% более высокую концентрацию лактата по сравнению с детьми контрольной группы. Кроме того, отмечался более низкий уровень pH и более высокое количество ББ в кале у детей, получавших Bb12. В основной группе детей выявлено снижение уровня калпротектина (маркер воспаления) и повышение уровня IgA (на 44% выше по сравнению с контрольной группой). Авторы исследования делают заключение, что включение Bb12 в питание недоношенных детей улучшает прибавку веса, повышает уровень лактата и IgA в стуле, снижает содержание маркера воспаления (калпротектина). Использование Bb12 в питании благоприятно для здоровья и роста недоношенных детей (рис. 5).

Интересное исследование Z. Stratiki и соавт. [11] рассматривает вопрос влияния ПБ на проницаемость кишечника у недоношенных детей. Известно, что недоношенные новорожденные характеризуются повышенной проницаемостью кишечной стенки, что свидетельствует о нарушении барьерной функции кишечника. Автором проведено проспективное рандомизированное исследование 41 недоношенного ребенка, получавших смесь, содержащую *B. lactis*, в сравнении с группой недоношенных детей, получавших смесь без ПБ. Проницаемость кишечника измерялась на 2-й, 7-й, 30-й дни жизни с использование теста абсорбции сахаров. Все дети хорошо переносили смесь. На 2-й день жизни показатели уровня ББ и теста лактулоза/маннитол не отличались у детей обеих групп. На 7-й и 30-й день исследования количество ББ в кале было достоверно выше в группе детей, получавших ПБ. Соотношение лактулоза/маннитол было достоверно ниже на 30-й день жизни в группе детей, получавших смесь с ПБ. Автор делает заключение, что использование смесей с ПБ улучшает барьерную функцию кишечника и восстанавливает сниженную кишечную проницаемость.

Мета-анализ клинических исследований использования ПБ в питании для профилактики и лечения атопического дерматита был проведен J. Lee и соавт. [12]. В мета-анализ включена 21 работа, из них 10 — двойных слепых плацебо-контролируемых исследования. Результаты мета-анализа показывают, что использование ПБ (LGG) в пренатальном и/или постнатальном периоде достоверно, в среднем на 61% снижает риск развития АД у

детей. Достоверность использования ПБ в процессе лечения АД пока остается под вопросом.

M. Kalliomaki в своем письме к редактору журнала J. Allergy Clin. Immunol. [13] приводит данные 7-летнего наблюдения за детьми, получавшими ПБ в перинатальном периоде (беременные женщины в последние 4 недели беременности, далее — дети до 6-месячного возраста). В качестве ПБ использовали *L. rhamnosus* (LGG). Результаты наблюдения показали достоверное снижение риска развития АД в группе LGG по сравнению с контрольной группой.

Глубокая оценка роли ПБ у детей первого года жизни проведена в обзоре J. Saavedra [14]. Автор этой работы суммирует современные данные роли КМФ в сохранении целостности кишечной стенки и развития иммунитета у младенца, отмечает изменение состава КМБ у детей, получающих ГМ или ДМС. Нарушения КМБ, в частности снижение уровня ББ, выявлено в группе детей, склонных в дальнейшем к развитию атопии, других заболеваний, сопровождающихся процессами хронического воспаления. ПБ существенным образом влияют на состояние кишечного барьера и иммунные функции. В экспериментальных исследованиях введение лактобацилл лабораторным животным сопровождалось усилением продукции макрофагов и усилением фагоцитоза. У новорожденных детей, получавших ПБ, увеличивалось количество sCD14 — маркера иммунологического созревания. *B. lactis* и некоторые другие виды ПБ увеличивают фагоцитарную активность, направленную на штаммы *E. coli*. ПБ увеличивают уровень IgA и других иммуноглобулинов, а также количество клеток, секретирующих специфические IgA к ротавирусам. Особое внимание автор уделяет вопросам безопасности ПБ, дозировке и регуляторным аспектам. Отмечено, что некоторые ПБ, в частности *B. lactis,* имеют очень высокий потенциал безопасности. *B. lactis* использовалась в питании детей с рождения, в питании недоношенных новорожденных, детей с тяжелой гипотрофией и детей, рожденных от ВИЧ-больных матерей. При этом не выявлено ни одного случая осложнений. В большинстве исследований доза ПБ колебалась от 10^7 до 10^{10} КОЕ/1 кормление. Ежедневное потребление ПБ в этом случае варьировало от 10^8 до 10^{10} КОЕ/день. Здесь очень важно понимать, что «передозировка» ПБ маловероятна, если вообще возможна. Количество бактерий в дистальном отделе толстой кишки составляет до 10^{12} КОЕ/мл кишечного содержимого. Поэтому, если продукт содержит 10^9 КОЕ/кормление, необходимо по крайней мере 100 кормлений для того, чтобы начать приближаться к количеству бактерий, содержащихся в толстой кишке. Кроме того, очень важен способ доставки ПБ. Терапевтические препараты содержат определенные дозы ПБ в таблетках, капсулах и др. В педиатрической практике, где особенно важна профилактическая направленность (предотвращение аллергии, антибиотикоассоциированной диареи и др.), более важным является долговременное постоянное поступление ПБ с питанием (смеси, напитки, йогурты, продукты прикорма). В отношении регуляторных вопросов автор отмечает, что в настоящее время *B. lactis* является единственным ПБ, получившим от FDA статус GRAS, то есть абсолютно безопасный ПБ.

Одна из новаторских работ, позволяющих по-новому оценить роль ПБ, проведена в Финляндии группой R. Kekkonen и соавт. [15]. В этой работе оценивалось влияние ПБ (LGG) на липидный профиль здоровых добровольцев, а также показатели хронического воспаления. Исследование показало, что ПБ снижают уровень лизофосфатидилхолина — основного атерогенного деривата LDL. Это исследование позволяет по-новому оценить роль ПБ в сохранении здоровья людей разных возрастных групп.

ЛИТЕРАТУРА

1. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Report of a Joint FAO/WHO working group on guideliness for the evaluation of probiotics in food. London; Ontario, 2002.

2. *Menard O, Butel MJ, Gaboriau V et al.* Gnotobiotic mouse immune response induced by Bifidobacterium sp. strains isolated from infants. Applied and Environmental Microbiology. 2008; 74: 660–666.

3. *Kekkonen R, Lummela N, Karjalainen et al.* Probiotic intervention has strain-specific anti-inflammatory effects in healthy adults.World. J. Gastroenterol. 2008; 14 (13): 2029–2036.

4. *Guemonde M, Laitinen K, Salminen S et al.* Breast milk: a sourse of bifidobacteria for infant gut development and maturation? Neonatology. 2007; 92: 64–66.

5. *Grunland M. Guimonde M, Laitinen K et al.* Maternal breast-milk and intestinal bifidobacteria guide the compositional development of the Bifidobacterium microbiota in infats at risk of allergic disease. Clin. and Experimental Allergy. 2007; 111: 1–9.

6. *Penders J, Thijs C, van den Brandt et al.* Gut microbiota composition and development of atopic manifestation in infancy: the COALA birth cohort study. Gut, 2007; 56: 661–667.

7. *Lundell AG, Andersson K, Josefsson E et al.* Soluble CD14 and CD83 from human neonatal antigen-presenting cells are inducible by commensal bacteria and suppress human neonatal Th2 differentiation. Infection and Immunity. 2007; 75: 4097–4104.

8. *Collado M, Isolauri E, Salminen S.* Specific probiotic strains counteract adhesion of Enterobacter sakazaki to intestinal mucus FEMS Microbiol. Letter. 2008; 1–7.

9. *Deshpange G, Rae S, Patal S.* Probiotics for prevention of necrotizing enterocolitis in preterm neonates with very low birthweight: a systematic review of randomized controlled trials. Lancet. 2007; 369: 1614–1620.

10. *Mohan R, Koebnick C, Schidt J et al.* Effect of bifidobacterium lactis supplementation on body weight, fecal pH, acetate, lactate, calprotectin and IgA in preterm infants. Pediatric Research. 2008; 64: 418–422.

11. *Stratiki Z, Costalos C, Sevastiadou S et al.* The effect of a bifidobacter supplemented bovine milk onintestinal permeability of preterm infants. Early Human Development. 2007; 83: 575–579.

12. *Lee J, Seto D, Bierlov L.* Meta-analysis of clinical trials of probiotics for prevention and treatment of pediatric atopic dermatitis. J. Allergy Clin. Immunol. 2008; 121: 116–121.

13. *Kalliomaki M.* Probiotics during the first 7 years of life: A cumulative risk reduction of eczema in randormzedrplacebocontrolled trial J. Allergy Clin. Immunol. 2007; 119: 1019–1021.

14. *Saavedra J.* Use of Probiotics in Pediatrics: Rationale, Mechanisms of Action, and Practical application. Nutr. Clin. Pract. 2007; 22: 351–365.

15. *Kekkonen R, Sysi-Aho M, Seppanen T et al.* Effect of probiotic Lactobacillus rhamnosus GCJ intervention on global serum lipidomic profiles in healthy adults. World J. Gastroenterlogy. 2008; 14: 3188–3194.