



Современный метод исследования колонизации пристеночного биотопа кишечника сорбированными пробиотиками

Борис Кареткин

к.т.н., заместитель генерального директора по науке ООО «АВАН»

Пробиотики



– живые микроорганизмы, которые при введении в адекватном количестве оказывают благотворный эффект на здоровье хозяина.

WHO, FAO, 2001



WHO Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology



Norwegian Institute of Public Health

[New search](#) [Hide text from Guidelines](#)

ATC/DDD Index

Updates included in the ATC/DDD Index

ATC/DDD methodology

ATC

DDD

ATC/DDD alterations, cumulative lists

ATC/DDD Index and Guidelines

Use of ATC/DDD

Courses

Meetings/open session

Deadlines

Links

Postal address:
WHO Collaborating Centre for Drug Statistics

A ALIMENTARY TRACT AND METABOLISM

A07 **ANTIDIARRHEALS, INTESTINAL ANTIINFLAMMATORY/ANTIINFECTIVE AGENTS**

A07F **ANTIDIARRHEAL MICROORGANISMS**

A07FA **Antidiarrheal microorganisms**

Preparations with e.g. lactic acid producing organisms are classified in this group.

The DDDs are given in UDs (e.g. numbers of tablets).

ATC code	Name	DDD	U	Adm.R	Note
A07FA01	lactic acid producing organisms				

[List of abbreviations](#)

Last updated: 2019-12-16

Пробиотики

ОФС.1.7.1.0008.15

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на группу иммунобиологических лекарственных препаратов (ИЛП) – пробиотики.

Пробиотики – иммунобиологические лекарственные препараты, которые содержат живые или инактивированные апатогенные микроорганизмы (эубиотики), обладающие антагонистической активностью в отношении патогенных и условно-патогенных бактерий, а также продукты их жизнедеятельности или факторы роста для микробов нормофлоры (пребиотики) и их рациональные комбинации друг с другом (синбиотики). Эта группа препаратов оказывает положительные эффекты на физиологические, биохимические и иммунные реакции организма человека благодаря стабилизации и оптимизации функций его нормальной микрофлоры.

ферментативным свойствам, антагонистической активности, продукции биологически активных веществ, механизму действия или другим свойствам;

- *Сорбированные* полученные на основе одного или нескольких штаммов микроорганизмов, сорбированных на частицах активированного угля, кремния диоксида коллоидного или других сорбентах (например, бактерии штамма *B. bifidum* 1, сорбированные на угле);
- *Комбинированные* в состав которых помимо одного или нескольких видов микроорганизмов входят активные компоненты иной природы (например, лизоцим, инулин, действующие вещества лекарственных растений, витамины, микроэлементы, гормоны и др.), оказывающие терапевтическое воздействие на организм человека (например, сочетание в препарате бактерий штамма *B. bifidum* 1 и лизоцима).

Производственные штаммы бактерий рода *Bifidobacterium*

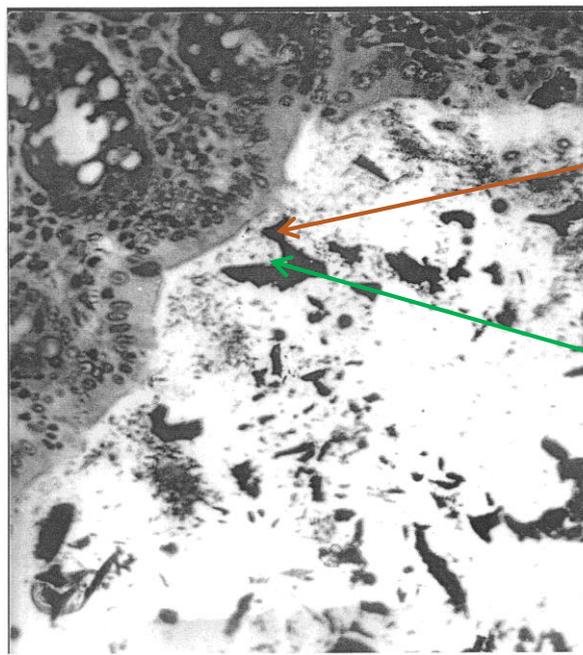
Штаммы рода *Bifidobacterium*, используемые для производства бифидосодержащих пробиотиков, депонируют в официальных коллекциях (табл. 1).

Производственные штаммы рода *Bifidobacterium* проверяют по культуральным, тинкториальным, морфологическим и биохимическим свойствам (табл. 2 и 3), безопасности (*in vitro* и *in vivo*) (табл. 4). Определение проводят в соответствии с ОФС «Производственные пробиотические штаммы и штаммы для контроля пробиотиков» и «Безопасность пробиотиков в тестах *in vivo*», которые могут быть дополнены молекулярно-генетическими методами.

Сорбированные бифидобактерии



Григорьев А.В., Бондаренко В.М., Абрамов Н.А., Мурашова А.О., Феклисова Л.В., Чупринина Р.П. Разработка и клиническая оценка пробиотика «Бифидумбактерин форте»// Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии – 1997 – № 3, – с. 92–96

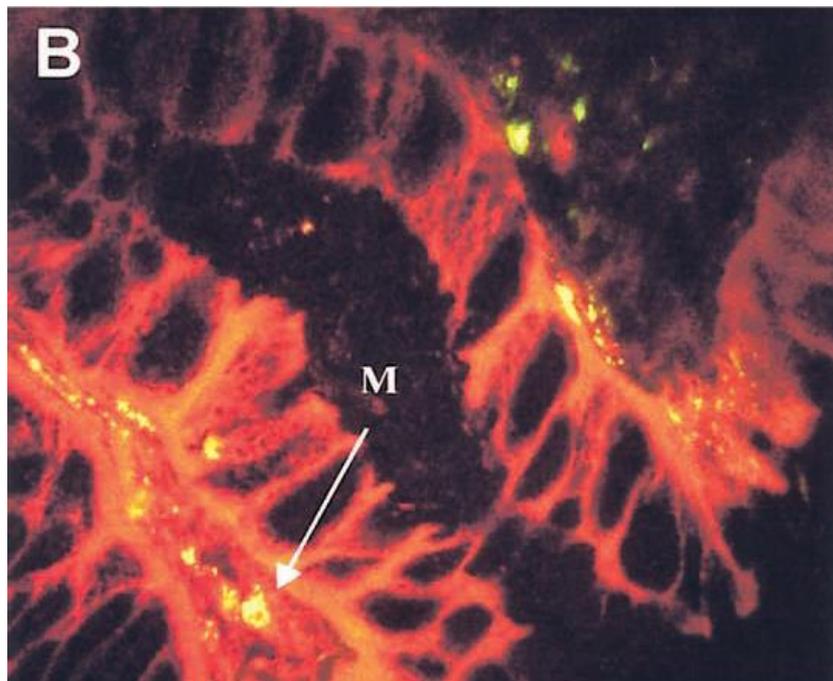


частица угля

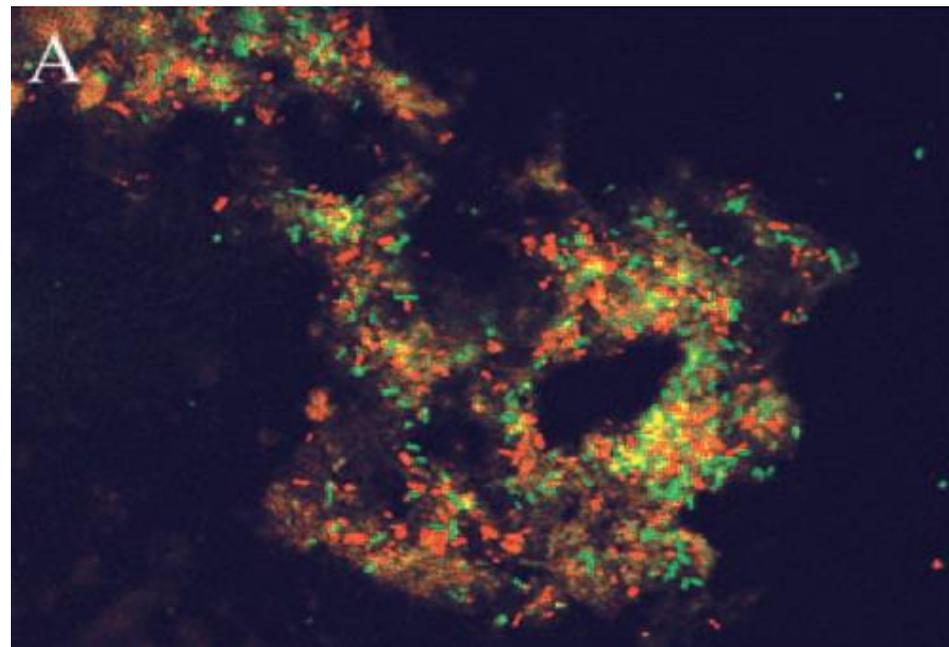
Бифидобактерии колонизируют слизистую

Введение сорбированных бифидобактерий лабораторным животным позволило превысить уровень колонизации слизистой оболочки в 50-100 раз по сравнению с показателем, полученным от введения несорбированных бифидобактерий в аналогичном количестве

Современные методы исследования биопленки кишечника



Микроколония (M) бифидобактерий в биопленке ректального отдела кишечника здорового человека (биопсия, поперечный разрез). FISH с использованием красителя FITC (желтый). (Macfarlane S. et al., 2002)



Большое количество бифидобактерий (зеленые) в биопсии нисходящей кишки здорового человека (Ahmed S. et al., 2007)

Современные методы исследования биопленки кишечника

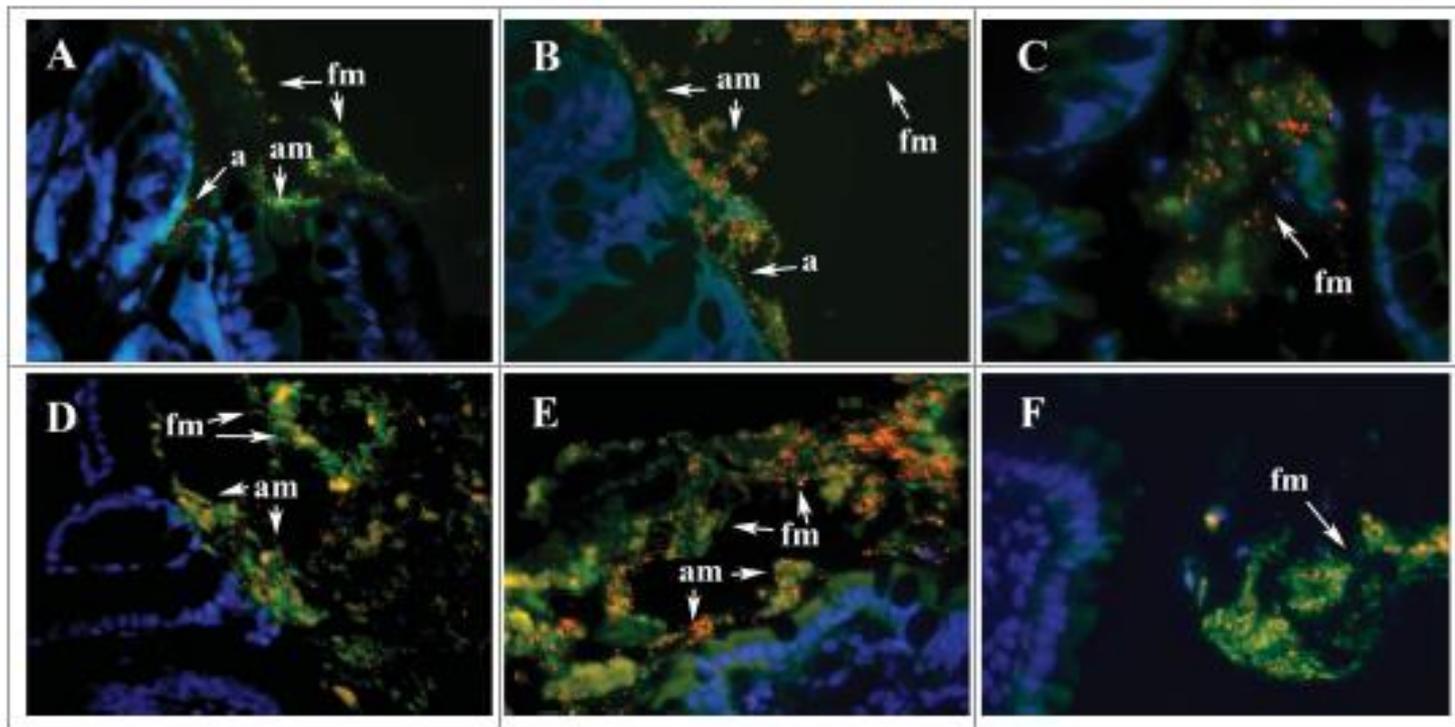
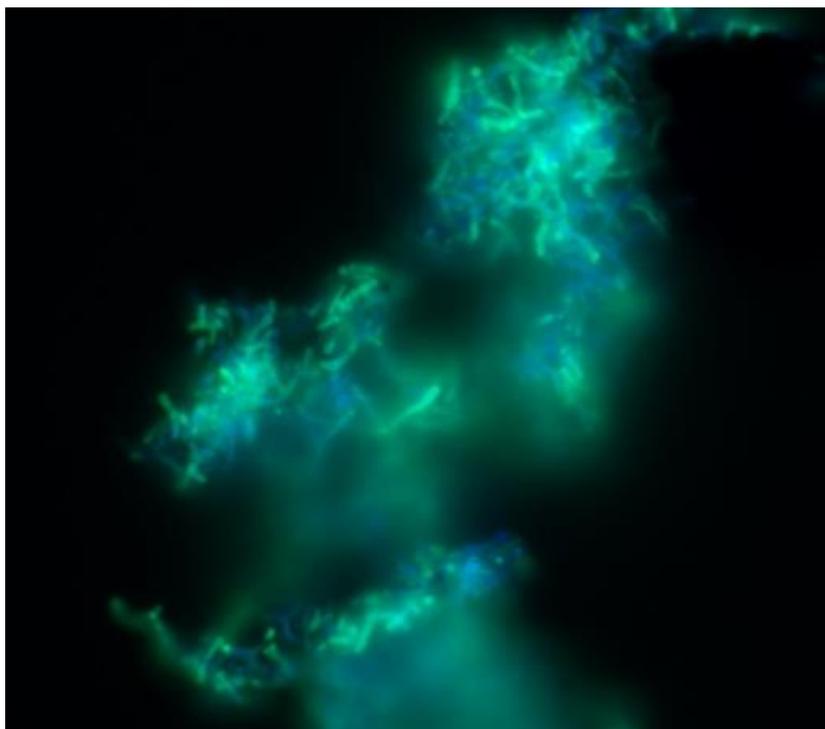


Figure 3. FISH of canine IBD endoscopic biopsies. Triple color FISH identifies colonic microbiota within mucosal compartments of endoscopic biopsies. Panels A-C = ST/probiotic group and panels D-F = ST group. Panel A = tissue hybridized with probe Cy3-Strc493- Panel B = tissue hybridized with probe Cy3-Ebac; Panel C = tissue hybridized with probe Cy3-Faecal698; Panel D = tissue hybridized with probe Cy3-Ebac; Panel E = tissue hybridized with probe Cy3-Bif164; Panel F = issue hybridized with probe Cy3-Strc493. All other bacteria that hybridize exclusively with the universal probe (Eub338-FITC) appear green. DAPI-stained colonic mucosa with goblet cells appears blue. All images at 600x magnification. a = attaching bacteria; am = adherent mucus compartment; fm = free mucus compartment.

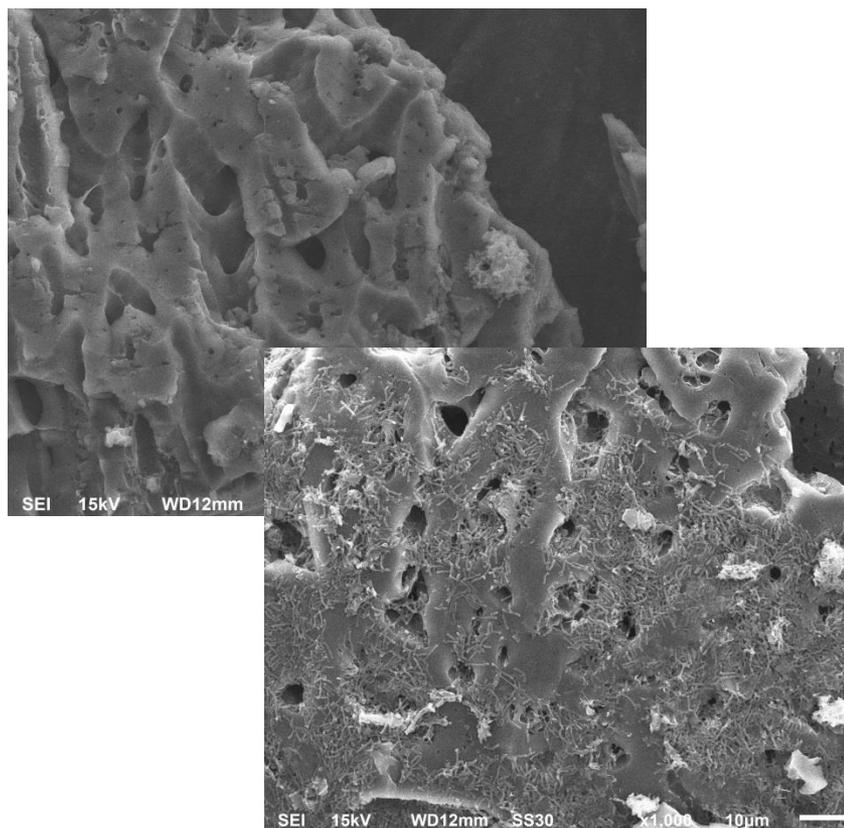
White R. et al. Gut microbes, 2017

Сорбированные бифидобактерии

Avan



Микроколония бифидобактерий *B. bifidum* сорбированных на частице активированного угля. FISH. Зонд 6-FAM-Bif164



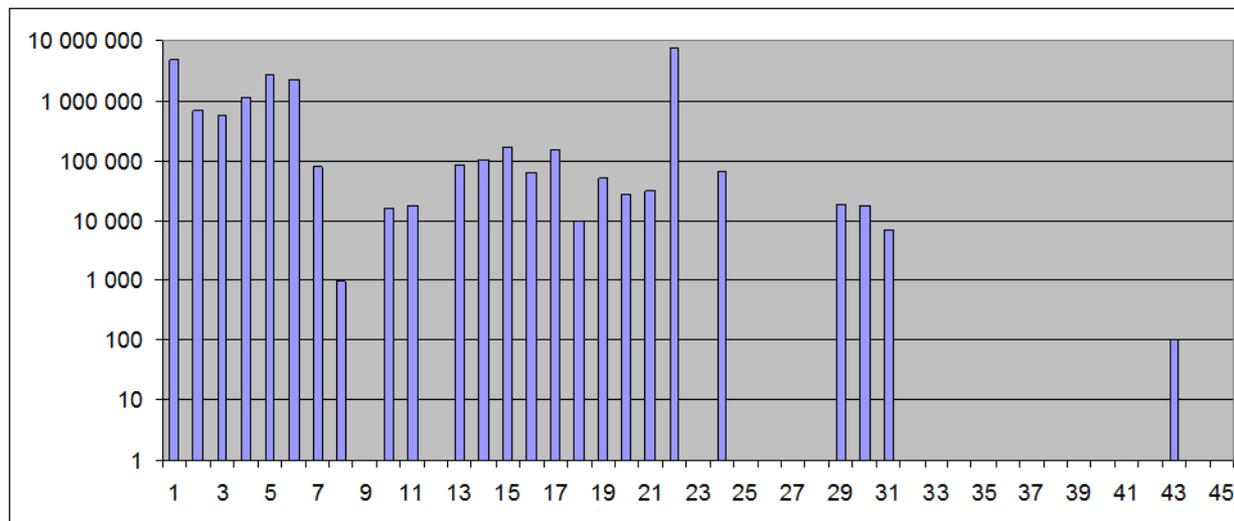
Микроколония бифидобактерий *B. bifidum* сорбированных на частице активированного угля. SEM 1000x

- Исследование проведено на крысах самцах, массой 230-250 г, сток Wistar-Kyoto, категории SPF.
- До начала исследования животные находятся в общей клетке, доступ к воде и пище не ограничен.
- За 12 часов до введения препарата животных взвешивают, метят, проводят клинический осмотр и лишают корма. Доступ к воде сохраняется на всем протяжении исследования.
- Через 12 часов голодной депривации животным опытной группы внутрижелудочно вводили сорбированные бифидобактерии 10^8 КОЕ, контрольной – не вводили
- После введения препарата, животных помещали в метаболические клетки, в которых в течение 8 часов собирали фекалии. Доступ к воде и еде не ограничивали.
- Через 8 часов после введения препарата животных подвергали эвтаназии путем подачи углекислого газа (CO_2)
- После эвтаназии животных вскрывали, осматривают пищевод на следы повреждения, желудок и кишечник отбирают полностью по приведённой схеме, кишечник выделяют, разрезают вдоль и промывают в 50 мл стерильного фосфатного буфера в стерильной ёмкости.

rtPCR исследование образцов



Образцы для ПЦР хранили в 4М растворе гунидина, выделение ДНК из биоматериала (фрагментов кишечника, смывы и фекалии) и очистку проводили по стандартному протоколу с использованием набора ПРОБА-ГС (ООО «ДНК-Технология ТС», Россия). ПЦР осуществляли в амплификаторе ДТпрайм (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) с флуоресцентно-мечеными зондами типа TaqMan со специфичным к *Bifidobacterium bifidum* праймером (ген экстрацеллюлярных сиалидаз) и системой на общую бактериальную массу bac16S

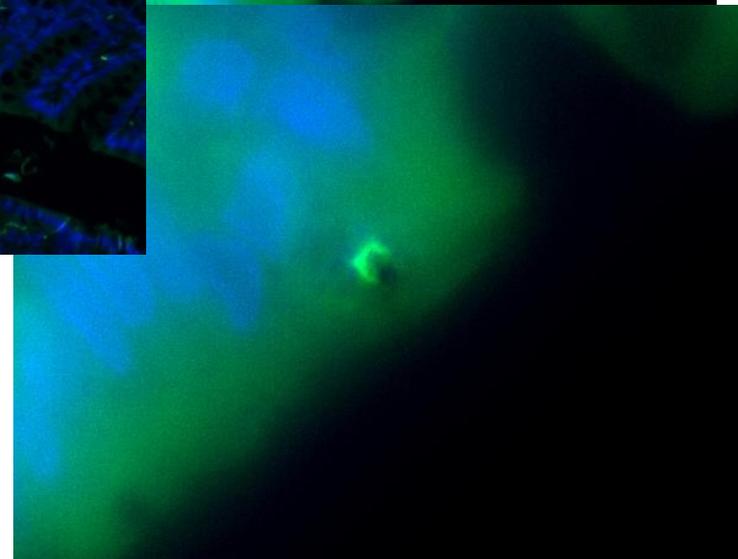
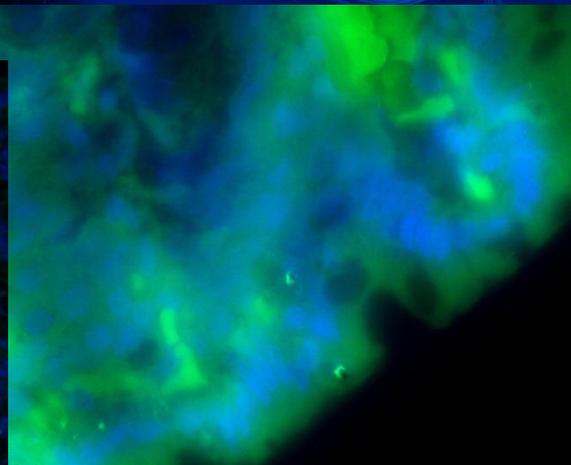
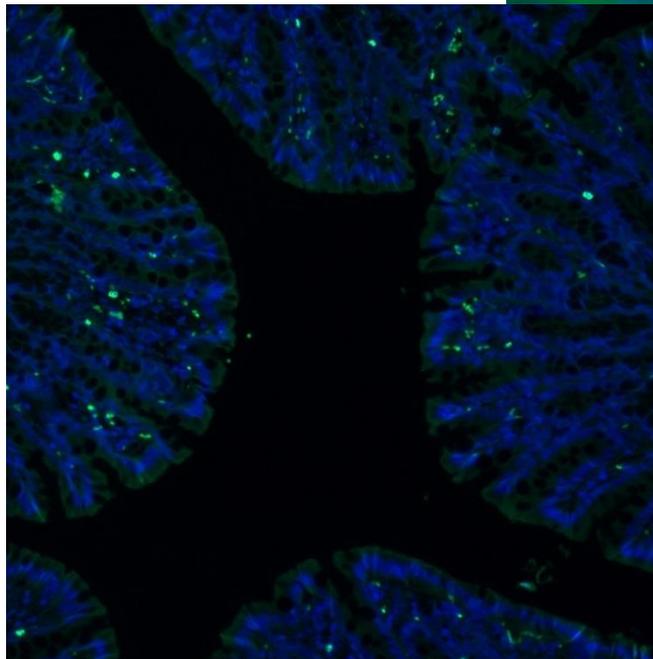


Содержание *Bifidobacterium bifidum* в биологическом образце, нормированное на общую (суммарную) бактериальную массу. По оси абсцисс даны номера исследованных образцов ДНК. Использована логарифмическая шкала ординат.

Флюоресцентная гибридизация in situ (FISH)

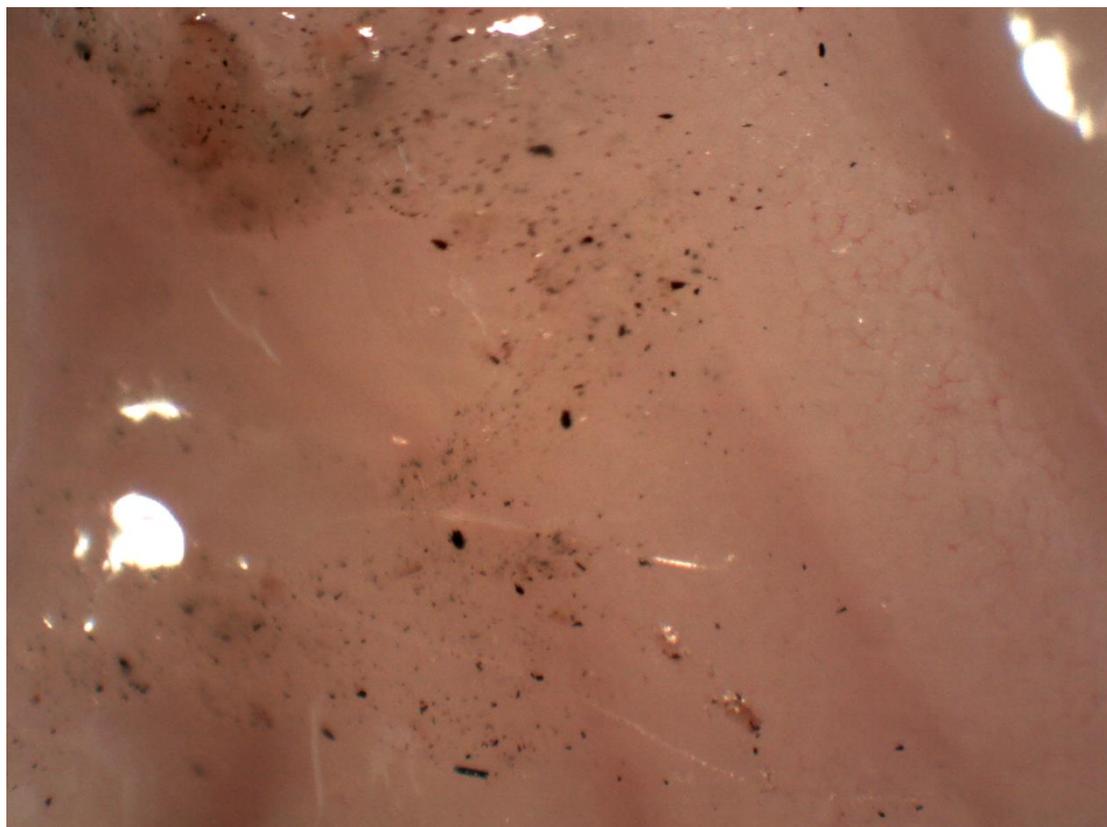


Образцы для FISH фиксировали 4% раствором параформальдегида в фосфатном буфере при +4°C в течение 48 часов, проводили через спирты восходящей крепости и парафинизировали. Перед проведением FISH готовят перпендикулярные срезы через всю толщину стенки кишечника толщиной 4 мкм.  Образцы ткани депарафинируют при помощи ксилола, восстанавливают по градиенту этанола. Для проведения FISH применяют контрастное окрашивание DAPI и зондом без гасителя Bif164-FAM (5' – FAM – CAT CCG GCA TTA CCA CCC – 3')



Микрофотографии FISH поперечного разреза толстого кишечника крысы. Бифидобактерии *B. bifidum* гибридизованы с зондом Зонд 6-FAM-Bif164

- С учетом полученных результатов, дальнейшие исследования будут направлены на изучение динамики колонизации и элиминации *Bifidobacterium bifidum* из кишечника крыс (с учетом того, что данный вид не является характерным представителем микробного сообщества этих животных).
- Необходимо увеличение числа животных в группах и
- Необходимо включение в эксперимент группы, которой будут введены несорбированные бифидобактерии, что позволит установить разницу в колонизации пристеночного биотопа различными типами пробиотиков



Фотографии кишечника крысы после 12 часов от введения сорбированных бифидобактерий, поперечно-ободочная кишка. Материал предоставлен Павловым А.В., Фокановой О.А.

Выражаю благодарность соавторам!

Негребецкий В.В., зав. отделом медицинской химии и токсикологии ФГАОУ ВО РНИМУ им Н.И. Пирогова, профессор РАН, профессор, д.х.н.;

Собянин К.А., ведущий инженер лаборатории биологических испытаний ФГАОУ ВО РНИМУ им Н.И. Пирогова, к.б.н.;

Шмиголь Т.А., ведущий научный сотрудник отдела медицинской химии и токсикологии ФГАОУ ВО РНИМУ им Н.И. Пирогова, к.б.н.;

Ребриков Д.В., проректор по научной работе ФГАОУ ВО РНИМУ им Н.И. Пирогова, профессор РАН, д.б.н.;

Кузнецова В.М., младший научный сотрудник лаборатории прикладной геномики и частной селекции сельскохозяйственных растений ФГБНУ ВНИИСБ;

Дивашук М.Г., ведущий научный сотрудник КГЦ - ВНИИСБ, к.б.н.;

Калинкина М.А., начальник отдела доклинических и клинических исследований ООО «АВАН», к.б.н.



Благодарим за внимание !!!