

УДК 579.61:616.5-002.2:616.858-008.6

ВЛИЯНИЕ КУЛЬТУРЫ LACTOCOCCUS LACTIS SUBSP. LACTIS 194-K НА ПРОЯВЛЕНИЕ СИМПТОМОВ СПОНТАННОГО ХРОНИЧЕСКОГО ДЕРМАТОЗА

¹Моисеева Е.В., ²Устюгова Е.А., ¹Семущина С.Г., ¹Аронов Д.А., ²Стойанова Л.Г.

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, e-mail: evmoise@gmail.com;

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва

Ранее было показано, что старые мыши линии CBRB при содержании в конвенциональных условиях спонтанно воспроизводят симптомы ряда хронических воспалительных заболеваний кожи человека: импетиго, эктимы и др. Целью данной работы было исследование влияния культуральной жидкости штамма *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 194-K на проявление симптомов хронического дерматоза у самцов мышей линии CBRB при добавлении культуральной жидкости к подкормке в течение четырех недель. У мышей, получавших добавку ежедневно per os, степень изъязвления кожи и площадь пораженного участка кожи спины были достоверно меньше уже к концу первой недели, но затем оба параметра уравнились со значениями аналогичных параметров контрольной группы. Начиная с первой недели, и до конца эксперимента степень выраженности алопеции у пролеченных мышей была меньше, чем в контроле. К концу эксперимента прибавка в весе наблюдалась только у пролеченных мышей. Таким образом, мы показали, что использование культуральной жидкости штамма *lactis* 194-K в качестве пищевой добавки уменьшает выраженность наблюдаемых симптомов дерматоза, но длительность применения препарата и дозировка должны быть оптимизированы.

Ключевые слова: импетиго, эктима, дерматоз, мышинная модель, алопеция, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 194-K

THE INFLUENCE OF CULTURE OF LACTOCOCCUS LACTIS SUBSP. LACTIS 194-K ON SPONTANEOUS CHRONIC DERMATOSIS SYMPTOMS

¹Moiseeva E.V., ²Ustyugova E.A., ¹Semushina S.G., ¹Aronov D.A., ²Stoyanova L.G.

¹Institute of Bioorganic Chemistry, RAS, Moscow n.a. M.M. Shemyakin and Y.A. Ovchinnikov;

²Moscow State University n.a. M.V. Lomonosov

Old CBRB mice under conventional (non-SPF) conditions were shown to mimic some characteristics of human chronic dermatitis spontaneously, resembling impetigo, ectyma, and some other human conditions. The aim of this study was to investigate the influence of culture broth of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strain 194-K on symptoms of chronic dermatitis in the CBRB male mice during four weeks. Culture broth was used daily as food additive. The following parameters and symptoms of dermatitis were monitored: the level of skin ulceration and alopecia, the square of damaged skin of the back, and the weight of the animals. The degree of ulceration and the square of damaged skin of the back of treated mice decreased after one week of drug application; but later both parameters became equal to the corresponding control parameter values. After one week of treatment and then till the end of experiment the extent of alopecia of treated animals remained decreased as compared to the control value. The weight of treated animals increased at the end of experiment. Thus, we showed that use of culture broth as food additive clearly reduced the severity of dermatitis symptoms, but timing, dosages, and scheme of additive application should be optimized.

Keywords: impetigo, ectyma, dermatitis, mouse model, alopecia, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 194-K

Высокая распространенность, сложный патогенез и течение хронических воспалительных заболеваний кожи (ХВЗК) человека определяют актуальность разработки новых методов лечения [2, 7], эффективность которых необходимо тестировать на животных моделях, адекватно воспроизводящих определенную форму или стадию дерматоза. Стандартные индуцированные мышинные модели ХВЗК (например, химический ожог [1]), воссоздают только острую стадию заболевания человека, тогда как спонтанные модели помогают изучать закономерности хронического течения воспалительного процесса. Для этих целей предлагается коллекция мышинных моделей разных генотипов [11], которые при одинаковом спектре инфекционных агентов (внутрививарные возбудители) воспроизводят симптомы, напоминающие разные

стадии и нозологические формы ХВЗК человека. Так, например, мыши линии CBRB в зависимости от возраста и проводимого симптоматического лечения спонтанно воспроизводят разные формы ХВЗК человека, при этом полного выздоровления старых животных практически не наблюдается [3]. В медицинской практике пожилые пациенты также практически не отвечают на традиционно применяемую комплексную терапию противовоспалительными препаратами и антибиотиками [9]. Новым подходом к лечению ХВЗК является пероральное использование пробиотиков на основе молочнокислых бактерий [8]. Возможный механизм действия пробиотических бактерий заключается в подавлении роста патогенов и их конкурентном исключении из полости кишечника за счет синтеза антимикробных веществ и иммуномодуляции [10].

Ранее из коровьего молока в Бурятии был выделен перспективный штамм *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 194 [4]; его активный вариант, полученный при диссоциации культуры, был обозначен как *L. lactis* subsp. *lactis* 194-К. Штамм 194-К образует антибиотический комплекс с широким спектром действия, который подавляет развитие грамположительных, грамотрицательных бактерий, а также микроскопических грибов [5]. Данное свойство является довольно редким для лактококков, что делает штамм 194-К уникальным. Кроме того, лактококки подвида *L. lactis* subsp. *lactis* имеют статус GRAS (generally regarded as safe) и разрешены к использованию в пищевой промышленности. Таким образом, изучение свойств штамма 194-К *in vivo* на адекватной модели ХВЗК человека является актуальным.

Целью настоящей работы было исследование долгосрочного влияния культуральной жидкости штамма 194-К *in vivo* на проявление симптомов хронического дерматоза у стареющих самцов мышей линии CBRB.

Материалы и методы исследования

В исследовании были использованы самцы мышей оригинальной линии CBRB-Rb (8.17)11em, далее CBRB [3, 11] с симптомами спонтанного ХВЗК в возрасте $23,0 \pm 1,3$ недели. Мышей разводили инбредно и содержали в конвенциональных условиях при естественном режиме освещения. Каждой мыши при регистрации в племенном журнале присваивали собственную метку, различимую в течение всей жизни, что позволяло проследить изучаемые параметры индивидуально. Животных кормили полнорационными гранулированными кормами для мышей и крыс. В качестве стандартной подкормки использовали зерновые каши с добавлением подсолнечного масла и витаминов А, Е, D, F по разработанной ранее рецептуре (5 г на мышь в день); воду предоставляли без ограничений. Самцам опытной группы ($n = 17$) ежедневно в течение четырех недель добавляли к подкормке культуральную жидкость штамма *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 194-К (КЖ, 300 мкл на мышь в день) с антибиотической активностью 3600 МЕ/мл. В составе КЖ были живые клетки лактококков и их метаболиты, включая антибиотические вещества и молочную кислоту (рН 4,2). Животным контрольной группы ($n = 15$) к подкормке добавляли раствор молочной кислоты в тех же количествах (рН 4,2). Культуру *L. lactis* subsp. *lactis* 194-К, хранившуюся в обрате (обезжиренном молоке), культивировали при 28 °С в течение 20–25 ч в стационарных условиях в посевной среде, приготовленной на водопроводной воде с дрожжевым экстрактом (20 г/л) и глюкозой (10 г/л); рН 6,8–7,0. Затем культуру из посевной среды в количестве 5% вносили в ферментационную среду, содержащую (г/л): сахарозу – 20,0; KH_2PO_4 – 10,0; NaCl – 2,0; MgSO_4 – 0,2; дрожжевой экстракт – 20,0; рН 6,8–7,0 и культивировали в тех же условиях. Биомассу определяли нефелометрически на ФЭК-56 (Россия) при 540 нм. Антибиотическую активность определяли методом диффузии в агар с измерением зоны ингибирования роста тест-организма, мм. В ка-

честве тест-организма использовали спорообразующую кислотоустойчивую бактерию *Bacillus coagulans* 429 [4].

Оценку проявления симптомов ХВЗК проводили независимо два экспериментатора двойным слепым методом раз в неделю у всех животных индивидуально. Регистрировали следующие параметры:

- 1) вес животного, г;
- 2) степень изъязвления кожи на спине по 7-балльной шкале (0 – нет повреждений; 1 – только перхоть; 2–4 балла – симптоматика, сходная с импетиго человека; 5–6 баллов – симптоматика, сходная с проникающей эктимой; 7 баллов – симптоматика, сходная с синдромом ошпаренной кожи);
- 3) степень проявления алопеции на спине и голове отдельно по 7-балльной шкале (0 – волосяной покров не нарушен; 1 – нарушена только структура волоса, нет оголенных участков кожи; 2 – отсутствие шерстного покрова на 10–20% площади повреждения; 3 – на 30–40% площади повреждения; и т.д.);
- 4) площадь пораженного участка спины, мм² (только алопеция, только изъязвления или оба симптома). На день начала эксперимента мышей разделили на опыт и контроль таким образом, что в обеих группах значения всех вышеперечисленных параметров были в среднем одинаковы.

Относительное изменение параметров в опытной группе по сравнению с контрольной по мере проведения эксперимента определяли по формуле

$$(O_i - K_i) / K_i \cdot 100\%,$$

где O_i – значение показателя в опытной группе; K_i – значение аналогичного параметра в контроле в то же самое время.

В конце эксперимента выборочно провели микробиологическое исследование смывов с кожного покрова спины мышей. Для этого из опытной ($n = 2$) и контрольной ($n = 2$) групп были выбраны мыши со средними по группе значениями массы тела с максимально и минимально выраженными изъязвлениями. Пробы отбирали стерильным ватным тампоном, смоченным физиологическим раствором, протирали поверхность кожи мыши площадью 20×20 мм и помещали его в пробирку с физиологическим раствором. Высевы производили на дифференцирующие среды: МПА и Байрд-Паркер. Общую обсемененность определяли по количеству колоний на среде с МПА («ЗАО НИЦФ», Россия) через 24–48 ч при 30 °С; наличие стафилококков определяли по лецитиназной реакции на среде Байрд-Паркер («HiMedia», Индия) [6]. Количество КОЕ рассчитывали на 1 мл пробы.

Данные вводили и анализировали в программе Excel и представляли как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего, статистическую значимость различий определяли с помощью t-критерия Стьюдента.

Результаты исследования и их обсуждение

Ежедневное употребление мышами культуральной жидкости *L. lactis* subsp. *lactis* 194-К (КЖ) *per os* уже через одну неделю привело к улучшению состояния кожи спины у пролеченных мышей: изъязвления на спине были выражены в среднем на 80% меньше, чем у контрольных мышей (рис. 1, а и б, $p = 0,01$). Однако после двух

неделю применения КЖ в опытной группе наблюдалось достоверное ($p = 0,007$) ухудшение по сравнению с началом эксперимента и значения степени изъязвления кожи в опытной и контрольной группах к этому

сроку не различались (рис. 1,а). Вероятно, слишком продолжительное применение препарата в используемой дозировке могло привести к проявлению побочных эффектов пробиотика [10].

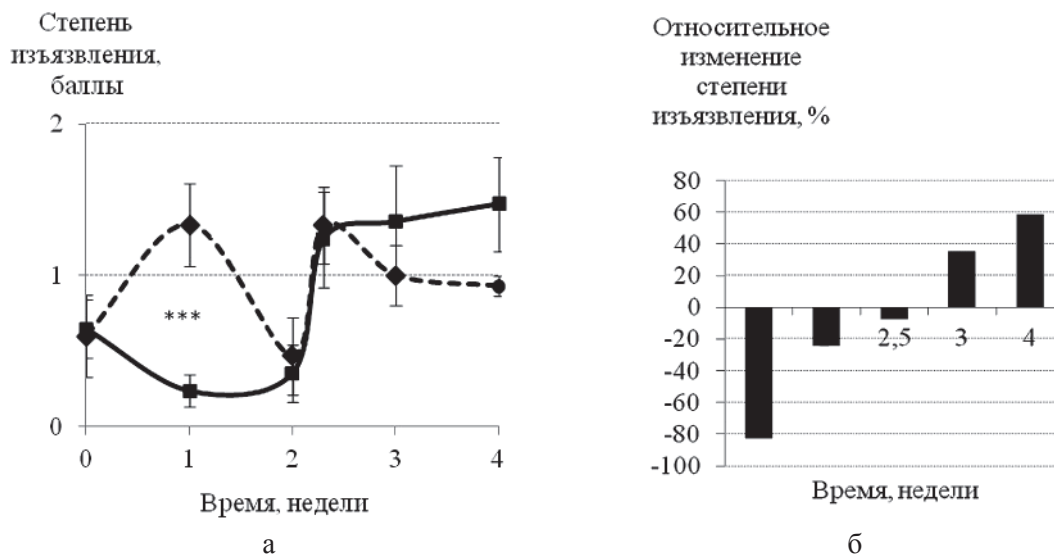


Рис. 1. Степень изъязвления на спине у самцов мышей линии CBRB:
а – динамика изменения (баллы), ■ – опыт, ● – контроль;
б – относительное изменение степени изъязвления кожи животных, %.
*** – уровень достоверности различий показателя в опыте и контроле, $p = 0,001$

Применение КЖ *per os* уже через одну неделю привело к улучшению состояния шерстного покрова экспериментальных животных по сравнению с контрольными (рис. 2,а). Наименьшая степень проявления алопеции в опытной группе наблюдалась через две недели применения препарата,

когда уменьшение по сравнению с началом эксперимента составило 18% ($p = 0,04$). Начиная с первой недели, и далее в течение всего эксперимента, степень проявления алопеции в опытной группе была достоверно меньше на 21–25% по сравнению с показателями в контрольной группе (рис. 2,б).

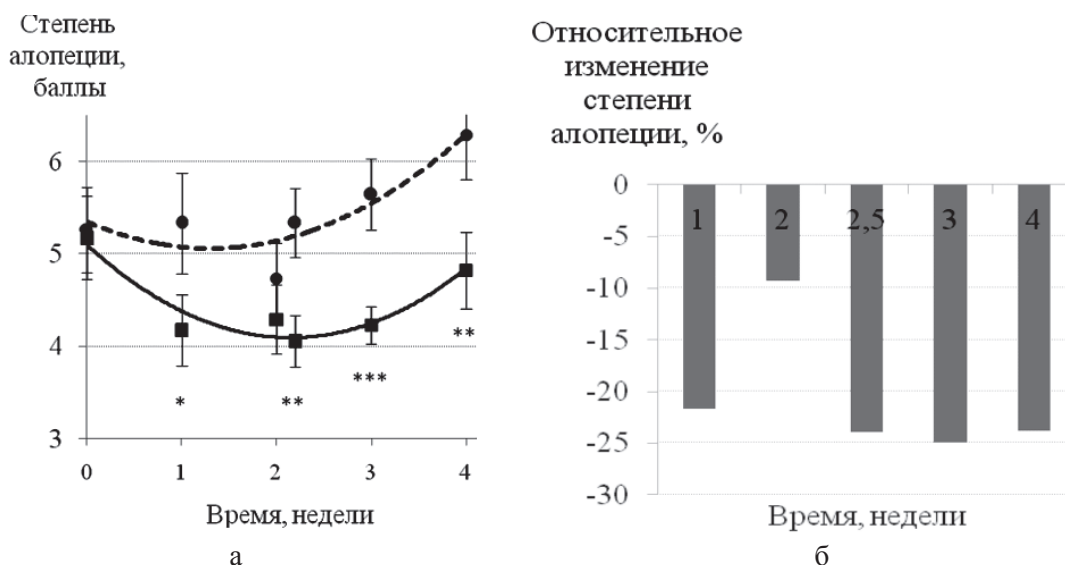


Рис. 2. Степень проявления алопеции на спине у самцов мышей линии CBRB:
а – динамика изменения степени алопеции (баллы), ■ – опыт, ● – контроль; б – относительное изменение степени алопеции в опытной группе по сравнению с контрольной, %. * – $p = 0,02$; ** – $p = 0,01$; *** – $p = 0,001$ – уровни достоверности различий показателя в опыте и контроле

Уже через одну неделю эксперимента в опытной группе площадь пораженного участка спины в среднем была меньше, чем в контроле на 24% ($p = 0,02$, рис. 3,а и б). После двух недель применения препарата

не было достоверных различий по площади пораженного участка между опытной и контрольной группами вплоть до конца эксперимента, при этом в пролеченной группе наблюдалась тенденция к ухудшению.

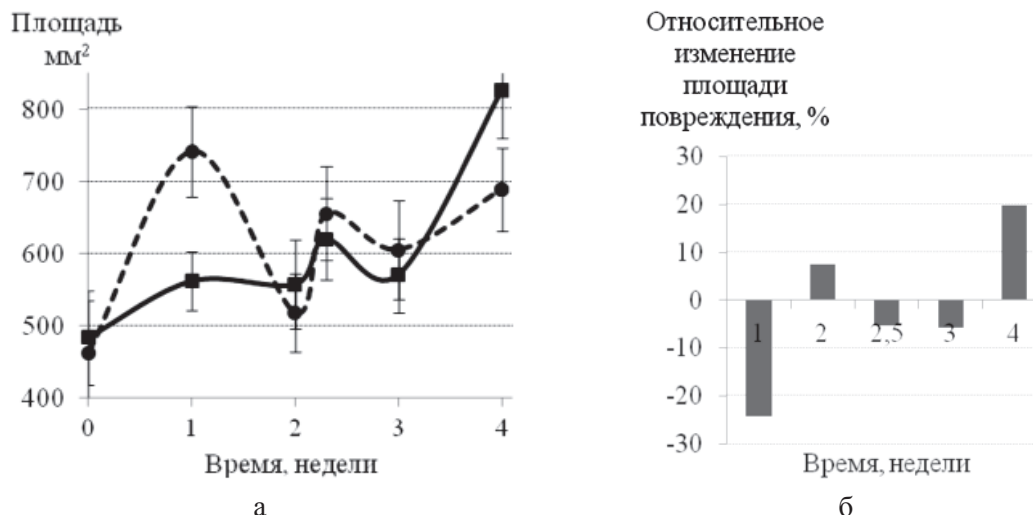


Рис. 3. Изменение площади пораженного участка спины у самцов мышей линии CBRB: а – динамика изменения площади поражения (мм²); ■ – опыт, ● – контроль; б – относительное изменение площади повреждения кожи животных в опытной группе по сравнению с контрольной, %. * – уровень достоверности различий показателя в опыте и контроле, $p = 0,02$

Через неделю эксперимента наблюдалась тенденция к уменьшению массы тела пролеченных мышей ($p = 0,09$). Однако к 4-й неделе пролеченные животные весили больше, чем на момент начала приема пробиотика (рис. 4,а и б, $p = 0,003$), что было достоверно больше веса контрольных

животных (рис. 4,а; $p = 0,02$). Масса тела опытных животных повысилась и практически не менялась до конца эксперимента, в то время как у мышей контрольной группы наблюдались значительные колебания массы тела и к концу эксперимента привесы отсутствовали.

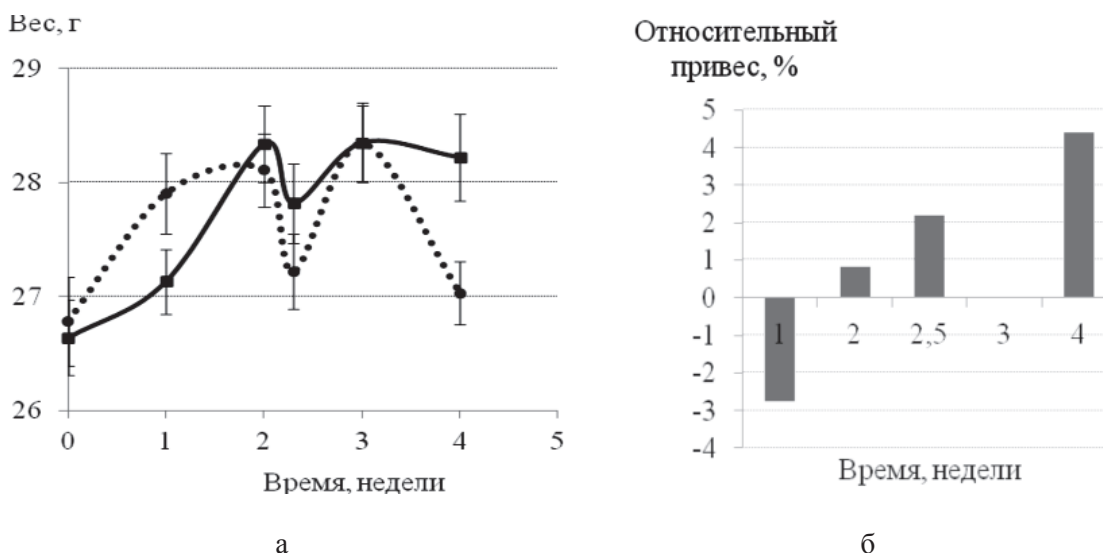


Рис. 4. Изменение веса животных у самцов мышей линии CBRB: а – динамика изменения веса, ■ – опыт, ● – контроль; б – относительный привес в опытной группе по сравнению с контрольной, %. * – уровень достоверности различий показателя в опыте и контроле, $p = 0,02$

Наиболее частыми возбудителями ХВЗК человека являются бактерии *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, а иногда и нормальная микрофлора кожи [7]. Обсемененность кожи и слизистых оболочек пациента зависит от возраста, условий жизни, индивидуальных особенностей кожных покровов, сопутствующих заболеваний и множества других факторов. Ранее было показано, что выраженность проявлений симптомов ХВЗК у старых самок мышей линии CBRB (возраст 70 недель), также как и у человека, была связана с наличием на их коже стафилококков [3]. В локализованной форме это заболевание мышей напоминает импетиго, а в генерализованной — синдром ошпаренной кожи человека, тогда как промежуточные стадии заболевания мышей напоминают проникающую эктиму человека. Как и ранее у самок [3], микробиологическое исследование кожных покровов самцов мышей CBRB обнаружило отсутствие обсемененности патогенной микрофлорой клинически здоровых животных. В настоящем исследовании на коже самцов CBRB в возрасте 23 недели в опытной и контрольной группах на конец эксперимента стафилококки не были обнаружены, либо присутствовали в незначительных количествах (до 10 КОЕ/мл, данные не показаны). Однако общая обсемененность коррелировала со степенью выраженности симптомов ХВЗК: в смывах кожи с поверхностными изъязвлениями типа импетиго (1–2 балла) достоверно значимое количество микроорганизмов (более 10 КОЕ/мл) не было выявлено, тогда как на коже животных с более глубокими изъязвлениями типа эктимы (3–4 балла) микроорганизмы присутствовали в заметно больших количествах (до 50 КОЕ/мл). По морфологии выросшие колонии были представлены одиночными грамположительными кокками, которые можно отнести к сапрофитной микробиоте кожи.

Заключение

Таким образом, в ходе данной работы было показано, что добавление культуры *L. lactis* subsp. *lactis* 194-K в подкормку самцов мышей линии CBRB уже через неделю приводит к достоверному уменьшению проявления всех регистрируемых нами симптомов ХВЗК мышей. Однако более длительное применение препарата в течение четырех недель, вероятно, могло послужить причиной тенденции к усилению ряда симптомов ХВЗК мышей. Поэтому, очевидно, схема применения препарата в качестве биодобавки в дальнейшем должна быть оптимизирована.

Список литературы

1. Бондаренко Д.А., Скобцова Л.А., Скобцов Д.И., Семушина С.Г., Ивашев М.Н., Косякова Н.И. Мурашев А.Н. // Циток. Восп. — 2010. — Т.9, №4. — С. 28–31.

2. Кириченко И. М. Современные подходы к терапии инфекционных заболеваний кожи // Cons. Med. — 2006. — Т.8, №1. — С. 15–17.
3. Моисеева Е.В., Неведова Н.В., Семушина С.Г., Кесслер Ю.В., Стоянова Л.Г., Литвин А.А. // Совр. пробл. науки образ. — 2009. — Vol. 3. — С. 21–28.
4. Стоянова Л.Г., Сульимова Т.Д., Ботина С.Г., Нетрусов А.И. // Прикл. биохим. микробиол. — 2006. — Т. 42, №5. — С. 560–568.
5. Устюгова Е. А., Федорова Г. Б., Катруха Г. С., Стоянова Л. Г. // Микробиол. — 2011. — Т. 80, №5. — С. 644–650.
6. Baird-Parker A.C. A classification of micrococci and staphylococci based on physiological and biochemical tests // J. Gen. Microbiol. — 1963. — V. 30. — P. 409–427.
7. Hirschmann J.V. Antimicrobial therapy for skin infections // Cut. Cutan. Med. Pract. — 2007. — V.79, № 6. — P. 26–36.
8. Iannitti T., Palmieri B. Therapeutical use of probiotic formulations in clinical practice // Clin. Nutr. — 2010. — Vol. 29, № 6. — P. 701–725.
9. Laube S., Farrell A.M. Bacterial Skin Infections in the Elderly: Diagnosis and Treatment // Drugs Aging. — 2002. — Vol. 19, №5. — P. 331–342.
10. Marteau P. Basic aspects and pharmacology of probiotics: an overview of pharmacokinetics, mechanisms of action, and side-effects // Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol. — 2003. — Vol. 17, № 5. — P. 725–740.
11. Moiseeva E.V. Original approaches to test anti-breast cancer drugs in a novel set of mouse models: Utrecht, 2005. — P. 121–157. URL: <http://igitur-archive.library.uu.nl/dissertations/2005-1130-200033/index.htm>.

References

1. Bondarenko D.A., Skobtsova L.A., Skobtsov D.I., Semushina S.G., Ivashev M.N., Kosyakova N.I., Murashev A.N. *Tsitok. vosp.*, 2010, no. 4, v. 9, pp. 28–31.
2. Kirichenko I.M. *Cons. Med.*, 2006, v. 8, no.1.
3. Moiseeva E.V., Nefedova N.V., Semushina S.G., Kessler U.V., Stoyanova L.G., Litvin A.A. *Sovr. probl. nauki obraz.*, 2009, v. 3, pp. 21–28.
4. Stoyanova L.G., Sultimova T.D., Botina S.G., Netrusov A.I. *Prkl. Biochim. Microbiol.*, 2006, v. 42, no. 5, pp. 560–568.
5. Ustyugova E.A., Fedorova G.B., Katrukha G.S., Stoyanova L.G. *Microbiol.*, 2006, v. 80, no 5, pp. 644–650.
6. Baird-Parker A.C. A classification of micrococci and staphylococci based on physiological and biochemical tests // J. Gen. Microbiol. 1963. V. 30, pp. 409–427.
7. Hirschmann J.V. Antimicrobial therapy for skin infections // Cut. Cutan. Med. Pract. 2007. V.79, no. 6, pp. 26–36.
8. Iannitti T., Palmieri B. Therapeutical use of probiotic formulations in clinical practice // Clin. Nutr. 2010. Vol. 29, no. 6, pp. 701–725.
9. Laube S., Farrell A.M. Bacterial Skin Infections in the Elderly: Diagnosis and Treatment // Drugs Aging. 2002. Vol. 19, no. 5, pp. 331–342.
10. Marteau P. Basic aspects and pharmacology of probiotics: an overview of pharmacokinetics, mechanisms of action, and side-effects // Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol. 2003. Vol. 17, no. 5, pp. 725–740.
11. Moiseeva E.V. Original approaches to test anti-breast cancer drugs in a novel set of mouse models: Utrecht, 2005. — P. 121–157. URL: <http://igitur-archive.library.uu.nl/dissertations/2005-1130-200033/index.htm>

Рецензенты:

Каменский А.А., д.б.н., профессор, заведующий кафедрой физиологии человека и животных, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, г. Москва;
Сапожников А.М., д.б.н., профессор, руководитель лаборатории клеточных взаимодействий, Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, г. Москва.

Работа поступила в редакцию 28.04.2012.