

Бойцов А.Г. Адгезия лактобактерий к клеткам вагинального и буккального эпителия / А.Г. Бойцов, С.В. Рищук, Ю.Ю. Ильясов, Т.А. Гречанинова // Вестник Санкт-Петербургской Медицинской академии им. И.И. Мечникова. – 2004. – №4 (5) – С. 191-193.

АДГЕЗИЯ ЛАКТОБАКТЕРИЙ К КЛЕТКАМ ВАГИНАЛЬНОГО И БУКАЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ

Бойцов А.Г., Рищук С.В., Ильясов Ю.Ю., Гречанинова Т.А.

ГОУВПО Санкт-Петербургская государственная медицинская академия им. И.И.Мечникова

РЕЗЮМЕ

Оценена адгезия препаратов лактобактерий к буккальному и вагинальному эпителию 24 женщин в 91 опыте. Полученные результаты подтверждают специфический характер адгезии лактобацилл. Это определяется, вероятно, степенью гомологии рецепторов эпителиальных клеток и бактерий. Определена высокая корреляционная взаимосвязи между степенью адгезии лактобацилл к двум видам эпителия (коэффициент ранговой корреляции Спирмена 0,7). С практической точки зрения подтверждается необходимость индивидуального подбора пробиотиков при заместительной терапии дисбиозов влагалища. Простым и удобным методом для осуществления такого подбора может служить предлагаемая методика определения адгезии бактерий к буккальному эпителию.

THE RESUME

The adhesion of preparations of Lactobacilli valued to buccal epithelial cells and vaginal epithelial cells of 24 women in 91 experiments. The received results to confirm specific character of an adhesion the Lactobacilli. It's defined probably a degree of gomology receptors of epithelial cells and bacteria. It's determined the high correlation interrelations between the degree of an adhesion the Lactobacilli to two kinds of an epithelium (the factor of ranking correlations Spirmen 0,7). From the practical point of view to confirm the necessity of individual selection of probiotics attached by replaceable therapy of disbiozis of vaginas. As a simple and convenient method for exercise of such selection can serve the offered technique of definition of an adhesion of bacteria to buccal epithelial cells.

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что лактобациллы являются основной составляющей микробного биоценоза влагалища взрослой половозрелой женщины. Их выраженная антагонистическая активность

по отношению к большинству чужеродных микроорганизмов является одним из главных механизмов обеспечивающих предотвращение развитие вагинитов и вагинозов. Не случайно, снижение числа этих микроорганизмов наблюдается на фоне многих патологических проявлений или является одной из причин практически всех видов патологии этого отдела генитального тракта. По мнению многих исследователей, восстановление нормальной численности лактобацилл, одна из важных составляющих лечения вагинозов и вагинитов. Для этих целей неоднократно предлагалось использовать препараты, содержащие живые лактобактерии, например, лактобактерин. Главным условием эффективности такого лечения является прикрепление лактобактерий к клеткам эпителия влагалища.

Молекулярные механизмы, обеспечивающие адгезию лактобацилл к клеткам вагинального эпителия, до конца не ясны. По данным разных авторов рецепторы лактобацилл, ответственные за этот процесс имеют белковую [4, 7, 11] или карбогидратную [3,6] природу. Имеются сведения об участии в этом процессе липотейхоевых кислот [5]. Возможно рецепторы разных видов лактобацилл имеют различную природу.

Можно предположить, что адсорбция лактобацилл носит специфический характер и зависит от соответствия рецепторов данного конкретного штамма лактобацилл рецепторам клеток вагинального эпителия конкретной женщины. Согласно гипотезы Б.А.Шендерова [2] еще в период внутриутробного развития организм ребенка готовится принять микрофлору матери в качестве «своей», или, другими словами у него формируется иммунологическая толерантность к нормальной микрофлоре. Кроме того, показано, что адсорбция лактобацилл на слизистой кишечника зависела от возраста донора. Установлено, что лактобациллы вагинального происхождения лучше прикрепляются к клеткам вагинального эпителия, по сравнению со штаммами, выделенными из других источников, например, пищевых продуктов [8,10]. Всё вышеизложенное позволяет предположить, что препараты, содержащие лактобациллы и предназначенные для внутривагинального применения должны подбираться для каждой женщины индивидуально. Настоящая работа является попыткой апробации метода для достижения этой цели.

Существующие методы определения адгезии лактобацилл к клеткам вагинального эпителия, как правило, достаточно сложны и мало доступны для воспроизведения в условиях практических лабораторий [10, 12]. Нами предпринята попытка максимального их упрощения, с целью сделать возможной их реализацию в условиях практически любой диагностической лаборатории со стандартным оборудованием и реагентной базой. Одной из задач работы явилась оценка возможности использования определения адгезии лактобацилл к вагинальному эпителию с применением в качестве тест объекта клеток букального эпителия.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Способность к адгезии на эпителиальных клетках изучали у лактобактерий, выделенных от обследуемых женщин (аутоштаммы) и лактобактерий, входящих в состав препаратов «Лактобактерин» (НПО «Биомед», Пермь), «Лактобактерин» (НПО «Иммунопрепарат», Уфа), «Витафлор» (ГНИИ Особо чистых биологических препаратов, Санкт-Петербург), «Ацилакт» (ООО «Фермент», Московская область), «Имбио» (НПО «Микроген», Нижний Новгород), «Биовестин лакто» («Биовеста», Санкт-Петербург). Аутоштаммы выделяли путём посева мазков с заднего свода влагалища на среду МРС с последующей инкубацией посевов в анаэробных условиях. Непосредственно перед проведением эксперимента лактобактерии дважды отмывали цитрат-фосфатным буфером Мак-Илвейна pH 5,4 [1] путем центрифугирования. Из осадка готовили суспензию 10^6 клеток в 1 мл по «стандарту мутности».

Клетки вагинального эпителия забирались врачом-гинекологом с заднего свода влагалища во время рутинной процедуры осмотра с помощью ложки Фолькмана, после тщательного удаления слизи ватным тампоном. Одновременно забирали соскоб буккального эпителия. Клетки помещали в пробирки Эппендорфа с цитрат-фосфатным буфером и доставляли в лабораторию в течение 2-3 часов. Непосредственно перед началом исследования эпителиальные клетки отмывали путем трехкратного центрифугирования (1000 об/мин – 5 минут). После отмывки из осадка готовились контрольные мазки. Для этого на поверхность предметного стекла наносили 1 каплю осадка и распределяли в диск диаметром около 1,5 см. Мазки фиксировали и окрашивали водным раствором метиленового синего. Образец считали пригодным для дальнейшего исследования, если при микроскопии (увеличение $\times 900$) в каждом поле зрения было не менее 2-3 эпителиальных клеток.

Для изучения адгезивной активности в пробирку Эппендорфа вносили 800 мкл суспензии эпителиальных клеток и 600 мкл суспензии лактобактерий. Содержимое пробирок тщательно перемешивали и инкубировали в течение 2 часов при температуре $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ с периодическим повторным перемешиванием путём переворачивания пробирок. После инкубации не адсорбированные бактериальные клетки удаляли путем двукратного отмывания путем центрифугирования (1000 об/мин в течении 3х минут). Из осадка готовили мазки, которые после фиксации окрашивали метиленовым синим.

При микроскопии препарата подсчитывали количество бактериальных клеток, прикрепившихся к поверхности каждой эпителиальной клетки. В каждом препарате анализировали не менее 50 клеток. Результат выражали в виде среднеарифметического числа лактобактерий на поверхности одного эпителиоцита.

Адгезия параллельно к буккальному и вагинальному эпителию 24 женщин была оценена в 91 опыте. При этом «Лактобактерин» (Пермь) был использованы в 24, «Ацилакт» в 20,

«Биовестин» в 13, «Инбио» в 9, «Лактобактерин» (Уфа) в 9, аутоштаммы в 9, «Витафлор» в 7 случаях.

В совокупности результаты 91 опыта показали, что в 65 случаях среднее число бактерий, прикрепившихся к вагинальному эпителию было больше, чем к букальному, в 17 наоборот. В 9 случаях средние количества бактерий, прикрепившихся к букальному и вагинальному эпителиям было одинаковым. Наблюдалась сильная, достоверная корреляционная взаимосвязь между степенью адгезии к двум видам эпителия: коэффициент линейной корреляции – 0,74, коэффициент ранговой корреляции Спирмена – 0,64. Степень взаимосвязи несколько колебалась в зависимости от вида препарата. Так, если в опытах с лактобактерином коэффициент корреляции Спирмена составил 0,71 ($P=0,001$), то в опытах с ацилактом 0,43 ($P=0,078$). Тем не менее, полученные результаты свидетельствуют о возможности использования оценки степени адгезии лактобактерий к клеткам букального эпитеоия для получения представления об из адгезивной способности по отношению к вагинальному эпителию конкретной пациентки. Выше указанное утверждение основывается на высокой корреляционной взаимосвязи между степенью адгезии к двум видам эпителия (коэффициент ранговой корреляции Спирмена составил 0,7).

Наиболее высокой адгезивной активностью, как по отношению к букальному, так и к вагинальному эпителиям, обладали следующие препараты: «Лактобактерин» (Пермь), «Лактобактерин» (Уфа), «Витафлор». При этом сравнительная активность отдельных препаратов не совпадала у разных пациенток. В качестве примера приводим результаты тестирования трех женщин. Препараты перечислены в порядке убывания активности.

Пациентка З. – «Витафлор», «Лактобактерин» (Уфа), «Лактобактерин» (Пермь), «Ацилакт», аутоштамм;

Пациентка Ф - «Лактобактерин» (Пермь), «Лактобактерин» (Уфа), аутоштамм, «Ацилакт», «Витафлор»;

Пациентка И. - «Лактобактерин» (Пермь), «Имбио», аутоштамм, «Ацилакт».

Полученные результаты подтверждают индивидуум специфический характер адгезии лактобацилл, что определяется, по-видимому, степенью гомологии рецепторов эпителиальных клеток и бактерий. С практической точки зрения это подтверждает необходимость индивидуального подбора пробиотиков при заместительной терапии дисбиозов. Простым и удобным методом для осуществления такого подбора может служить предлагаемая методика определения адгезии бактерий к букальному эпителию.

ЛИТЕРАТУРА

1. Головинский Е.В. Основные методы исследования, применяемые в микробиологии//В кн.: Экспериментальная микробиология.- София: Медицина и физкультура, 1965.- с. 23-39
2. Шендеров Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание. Том 1: Микрофлора человека и животных и ее функции. М., Грантъ, 1998; 288..
3. Brooker, B. E., Fuller R. Adhesion of lactobacilli to the chicken crop epithelium.// J. Ultrastruct. Res.-1975. v.52.- p. 21-31
4. Conway, P. L., Kjelleberg S. 1989. Protein-mediated adhesion of *Lactobacillus fermentum* strain 737 to mouse stomach squamous epithelium. //J. Gen. Microbiol.- v. 135.- 1175-1118;
5. Chan R. C. Y., Reid G., Irvin R. T., Bruce A. W., Costerton J. W.. Competitive exclusion of uropathogens from human uroepithelial cells by *Lactobacillus* whole cells and cell wall fragments.// Infect. Immun.- 1985. – v.47.- p. 84-89
6. Fuller R.. Nature of the determinant responsible for the adhesion of lactobacilli to chicken crop epithelial cells.// J. Gen. Microbiol.- 1975.- v. 87.- p. 245-250
7. Henriksson A., Szewzyk R., Conway P. L. Characteristics of the adhesive determinants of *Lactobacillus fermentum* 104.// Appl. Environ. Microbiol.- 1991.-v. 57.- p. 499-502;
8. Kirjavainen P. V., Ouwehand A. C., Isolauri E., Salminen S. J. The ability of probiotic bacteria to bind to human intestinal mucus. FEMS. // Microbiol. Lett. 1998 167:185–189].
9. Soledad Boris,¹ Juan E. Suárez,¹ Fernando Vázquez,² and Covadonga Barbés [Adherence of Human Vaginal Lactobacilli to Vaginal Epithelial Cells and Interaction with Uropathogens.- Infect Immun, May 1998, p. 1985-1989, Vol. 66, No. 5]
10. Soledad Boris,¹ Juan E. Suárez,¹ Fernando Vázquez,² and Covadonga Barbés Adherence of Human Vaginal Lactobacilli to Vaginal Epithelial Cells and Interaction with Uropathogens.- Infect Immun, May 1998, p. 1985-1989, Vol. 66, No. 5.
11. Wadström, T., K. Andersson, M. Sydow, L. Axelsson, S. Lindgren, and B. Gullmar. 1987. Surface properties of lactobacilli isolated from the small intestine of pigs. J. Appl. Microbiol. 62:513-520
12. Wood, J. R., R. L. Sweet, A. Catena, W. K. Hadley, and M. Robbie. 1985. In vitro adherence of *Lactobacillus* species to vaginal epithelial cells. J. Obstet. Gynecol. 153:740-743,