

**ВЛИЯНИЕ ПРОБИОТИКОВ НА ПРОЯВЛЕНИЕ СИМПТОМОВ
ХРОНИЧЕСКОГО ДЕРМАТИТА И ПАРКИНСОНИЗМА У
СТАРЕЮЩИХ САМОК МЫШЕЙ CBRB**

Моисеева Е.В.¹, Нефедова Н.В.², Семушина С.Г.¹, Кесслер Ю.В.¹,
Стоянова Л.Г.³, Литвин А.А.⁴

¹*Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва*

²*Московский государственный университет прикладной
биотехнологии, Москва*

³*Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова,
Москва*

⁴*Национальная исследовательская компания, Москва*

Подробная информация об авторах размещена на сайте
«Ученые России» - <http://www.famous-scientists.ru>

Стареющие самки мышей CBRB в конвенциональных условиях воспроизводят как локализованную (импетиго), так и генерализованную (синдром ошпаренной кожи) формы хронического дерматита (ХД) человека, позднее у них развиваются симптомы болезни Паркинсона (ригидность, дискинезия и тремор задних конечностей). Возбудителями ХД у мышей и человека, являются *Staphylococcus aureus* и коагулазонегативные стафилококки, рост которых ингибируют пробиотические культуры. На данной мышинной биомодели было выявлено синергическое терапевтическое воздействие пробиотиков *B. subtilis* 604Т и *L. sbsp. lactis* 194 на проявление признаков ХД, количество стафилококков в крови и на кожных покровах леченых мышей было снижено. Однако лечение не повлияло на проявление признаков паркинсонизма.

Ключевые слова: мышинная модель, дерматит, импетиго, синдром ошпаренной кожи, пробиотик, болезнь Паркинсона.

Введение

Стафилококковая инфекция у человека приводит к развитию симптомов дерматита, наблюдаемого в локализованной – импетиго и генерализованной - синдром ошпаренной кожи (SSSS в англоязычной литературе) формах [1]. При этом заболевании выделяются две возрастные группы: маленькие дети и престарелые пациенты [2]. В первой группе заболевание хорошо поддается лечению антибиотиками, во второй – редко, приводя к гибели более половины пожилых пациентов [3].

Ранее нами было показано, что вялотекущая хроническая инфекция у стареющих мышей CBRB-Rb(8.17)Het (далее CBRB [4-6]), сопровождающаяся аллопцией и множественными поражениями

кожи типа импетиго (рис.1А), без симптоматического лечения приводит, в конце концов, к развитию генерализованной инфекции и тогда, - или к гибели животных, или к развитию симптомов дерматита, напоминающего синдром ошпаренной кожи человека (СОК, рис. 1Б). С пораженных участков кожи спины самок CBRB был выявлен *Staphylococcus aureus*. Таким образом, было подтверждено, что один и тот же возбудитель может вызывать СОК у человека и мышей CBRB. При этом у выживших престарелых самок CBRB после 16 месяцев развивались симптомы, сходные с болезнью Паркинсона (БП), а именно: ригидность, дискинезия и прогрессирующий тремор задних конечностей. Стандартная терапия антибиотиками не

приводит к излечению симптоматики СОК у стареющих самок мышей, что позволяет тестировать новые подходы к лечению, в частности влияние пробиотиков, на этой спонтанной мышинной биомодели.

Бактериоцины, синтезируемые пробиотиками, активны против патогенных возбудителей, в том числе *S. aureus*. Под действием *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* и *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* на 39-44% снижалась адгезия стафилококков в слизистом слое желудочнокишечного тракта (ЖКТ). Действие молочнокислых бактерий и пропионовокислых бактерий после двух часов инкубации приводило к снижению адгезионной способности стафилококков на 24% [7, 8]. Известно, что культура *L. lactis*, синтезирующая низин, ингибирует образование и выделение энтеротоксина В клетками *S. aureus* (S6 and 243). Для ингибирования роста клеток стафилококка в лаг-фазе и лизиса клеток в логарифмической стадии роста достаточно количества низина с активностью 12 мг/мл [9]. Бактериоцин лактококков *Lactococcus* sp. NY 449 проявляет антибактериальное действие при воспалении кожного покрова, человека, вызываемого стафилококками [7]. Подтверждение отсутствия патогенности и нетоксичности дают возможность использования *Bacillus subtilis* в спорной или вегетативной форме в качестве пробиотика [10-12].

Эти данные послужили основанием протестировать действие спор *B. subtilis*, штамм 604Г (далее BS) на развитие симптомов хронического дерматита (ХД) на спонтанной мышинной биомодели. А известные факты об ингибировании и вытеснении стафилококка в микробиоте ЖКТ человека молочнокислыми бактериями [8] навели на мысль использовать в этих целях культуру *L. lactis*, штамм 194 в корм экспериментальных животных. Поэтому задачами данного исследования было изучить влияние этих двух пробиотиков по отдельности и в комбинации на симптоматику ХД и БП, а именно: 1- спор BS при подкожном введении раз в две недели в течение двух недель; 2- культуры LL при ежедневном добавлении в корм в течение последующих двух недель; 3- и опреде-

лить влияние пробиотиков на диссеминацию стафилококка в крови и на поверхности кожных покровов экспериментальных животных.

Методика

Объектом наблюдения были мыши CBRB-Rb(8,17)1em (далее CBRB) в возрасте 18 ± 0.5 мес. с симптомами дерматита (рис. 1), у которых с кожных покровов спины был выделен *S. aureus*. Схема эксперимента представлена в таблице 1. Мышей содержали в конвенциональных, не свободных от специфических патогенов условиях при обычном световом режиме, кормили полнорационными гранулированными кормами, в качестве стандартной подкормки по разработанной ранее рецептуре использовали молочные зерновые каши с растительным маслом и витаминами А, Е, D, F; воду предоставляли без ограничений. Самки CBRB были разделены на опытную ($n=22$, споры BS вводили подкожно в область холки, один раз в две недели в количестве 10^7 на мышшь на инъекцию) и контрольную ($n=22$, одновременно получали подкожно физиологический раствор) группы. Начиная с 3-й недели, внутри этих групп были выделены подгруппы, получавшие (0.2 и 1.2) и не получавшие (0.0 и 1.0) культуру LL в подкормку. Двенадцать новых самок в возрасте 13 ± 0.7 мес. было добавлено в подгруппы. LL выращивали на питательной среде (дрожжевой экстракт, глюкоза, пептон, хлорид натрия) при температуре 37°C в течение 20-24 часов. Для кормления животных ежедневно использовали стандартную культуральную жидкость с лактококками из расчета 5 мл на мышшь в день.

Пять показателей измеряли у всех мышшей индивидуально 1-2 раза в неделю:

1 – наличие аллопеции (отсутствие волосяного покрова) на холке: 0-нет, 1-есть; 2 – степень выраженности изъязвлений: 0-нет, 1- поверхностные раны, дерматит типа импетиго (рис. 1А), 2- более глубокие эктиматические мокнущие раны, 3-развернутая симптоматика СОК (рис. 1Б); 3 – площадь пораженного участка спины, мм^2 (независимо от того, какие симптомы наблюдаются у этой самки: только аллопеция, только изъязвления, или оба симптома); 4 – степень выраженности тремора

(0-нет, 1-есть, одна конечность, 2-есть, обе конечности); 5 – вес самок, г.

При микробиологических исследованиях проводили выделение стафилококков из крови и с пораженных участков кожного покрова мышей. Смывы с кожного покрова и дефибринированную кровь добавляли в 10 %-ый солевой бульон и термостатировали при температуре 37°C 24 ч. Солевой бульон с накопленной биомассой бактерий использовали для приготовления десятикратных разведений, и по 0,2 мл каждого разведения высевали на

среду Байд-Паркер. Выдерживали при температуре 37°C в течение 48 часов и подсчитывали выросшие колонии. Выделенные колонии на чашках Петри (не менее 10 идентичных колоний) оценивали по лецитиназной активности и проверяли их способность коагулировать кроличью плазму.

На основании индивидуальных данных вычисляли среднее значение параметров; статистическую значимость различий в значениях параметров определяли с помощью t-критерия.

Таблица 1. Разделение самок на группы (с начала эксперимента) и подгруппы (начиная с третьей недели)

Группы	Недели 0- 2	Подгруппы	Недели 3- 4
0	Нет пробиотиков, n=22	0.0, n=14	Контроль, нет пробиотиков
		0.2, n=13	только LL
1	только BS на дни 0 и 16, n=22	1.0, n=12	только BS на дни 0 и 16
		1.2, n=12	BS на дни 0 и 16 и LL ежедневно в корм



А



Б

Рис. 1. Проявления хронического дерматита и аллопеции у старых самок СБРВ.

А - локализованный поверхностный дерматит типа импетиго человека; Б - крайняя степень процесса, воспроизводящего генерализованную форму синдрома ошпаренной кожи человека.

Результаты и обсуждение

Влияние *B. subtilis* на проявление симптомов ХД и тремора. Сначала была проведена оценка влияния двукратного введения *B. subtilis* на развитие симптомов ХД по группам с учетом значений параметров только более старых мышей, находящихся под наблюдением с начала эксперимента (табл. 1). Симптомы аллопеции у леченой группы достоверно уменьшились уже после однократной инъекции BS (рис. 2А, день 16, $p < 0.05$). К 30-ому дню у леченных BS самок аллопеция практически

не наблюдалась (рис. 2А, день 30, $p < 0.05$). В процессе наблюдения степень выраженности изъязвлений у контрольных мышей прогрессивно увеличивалась, тогда как у леченой группы этот показатель практически не менялся (рис. 2Б, день 16, $p < 0.05$).

После двух инъекций BS наблюдалась тенденция к замедлению прогрессии ХД, а именно, площадь пораженного участка кожи увеличивалась заметно быстрее у контрольных животных (рис. 2В). Наблюдалась слабая тенденция к уменьше-

нию тремора под действием двух инъек-

ций *B. subtilis* (данные не показаны).

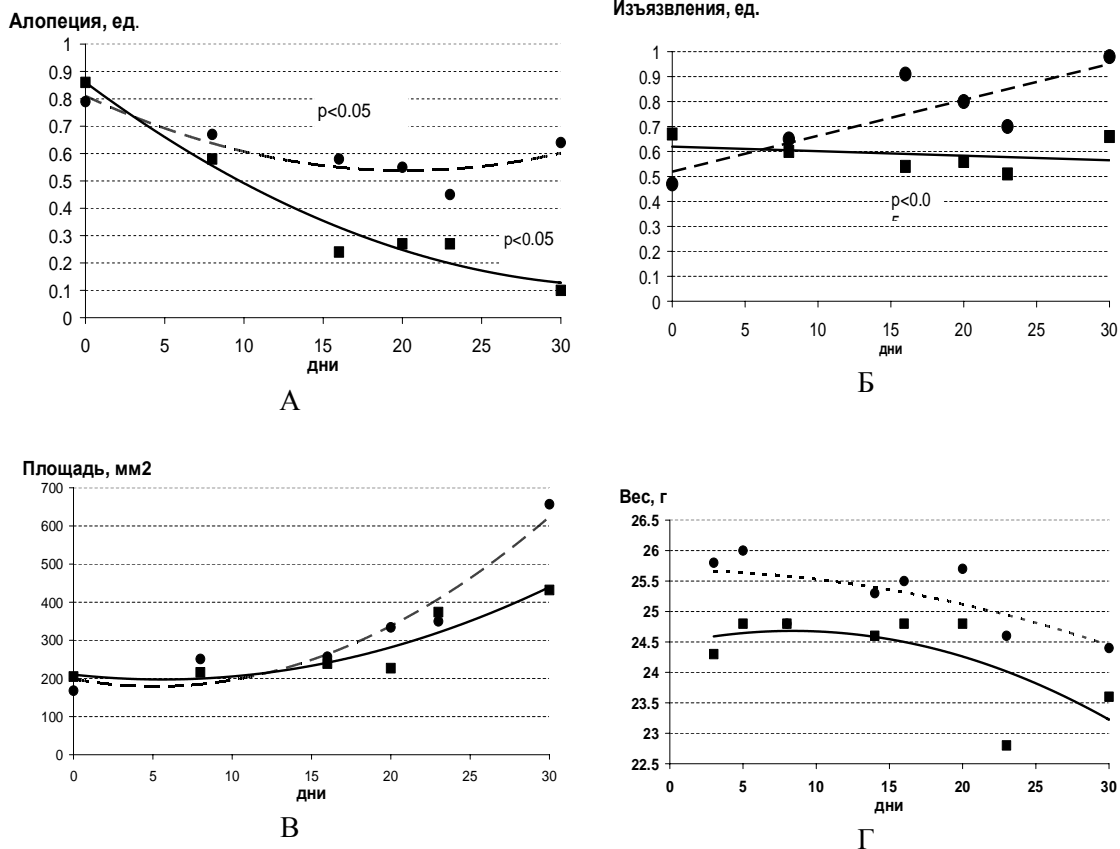


Рис. 2. Улучшение состояния самок, пролеченных *B. subtilis* (две подкожные инъекции на дни 0 и 16 эксперимента) - ■ по сравнению с контролем - ●.

А – достоверное снижение выраженности алопеции у леченных самок; Б - достоверное увеличение степени выраженности изъязвлений у контрольных самок при практически неизменном уровне показателя у леченных мышей; В - увеличение площади пораженного участка у контрольных самок было выражено заметно сильнее; Г - динамика изменения веса самок по ходу эксперимента.

В процессе наблюдения вес мышей уменьшался как в контрольной, так и в опытной группах (рис. 2Г). При этом выживание в леченой группе было лучше, а именно, 21/22= 95% против 19/22=86% в контрольной группе. Это указывает на то, что самки с потерей веса погибали в контроле, но продолжали жить в леченой группе.

В заключение, лечение спорами *BS* достоверно уменьшило признаки ХД, практически не повлияв на симптоматику БП в спонтанной мышинной модели этих заболеваний человека.

Влияние *BS* и *LL* на симптомы течения стафилококковой инфекции у мышей четырех подгрупп. Самок, обработанных спорами *BS*, и контрольных групп (не получавших лечения) после 16-ого дня от начала эксперимента разделили на 2 подгруппы: получающие и не получающие ежедневно *LL* в корм. Теперь был проведен анализ симптоматики ХД и тремора по этим четырем подгруппам с учетом значений параметров более молодых самок, добавленных в подгруппы. Четкий синергический эффект исчезновения алопеции отмечался в результате лечения двумя пробиотиками одновременно, при

этом каждый пробиотик по отдельности тоже снижал развитие аллопеции (рис. 3А). При уменьшении изъязвлений под действием двух инъекций BS, добавление половине групп животных ежедневно в корм LL привело к усилению действия BS (рис. 3Б, $p < 0.05$). Достоверный синергический эффект на уменьшение изъязвлений на холке в результате лечения BS и LL од-

новременно выявлен на 30 день (рис. 3Б, $p < 0.001$). Интересно, что при этом LL не только не снижал выраженность данного параметра, но даже наблюдалась тенденция к увеличению выраженности изъязвлений в подгруппе, леченной LL. Пробиотик BS снижал выраженность изъязвлений, но не значительно (рис. 3Б).

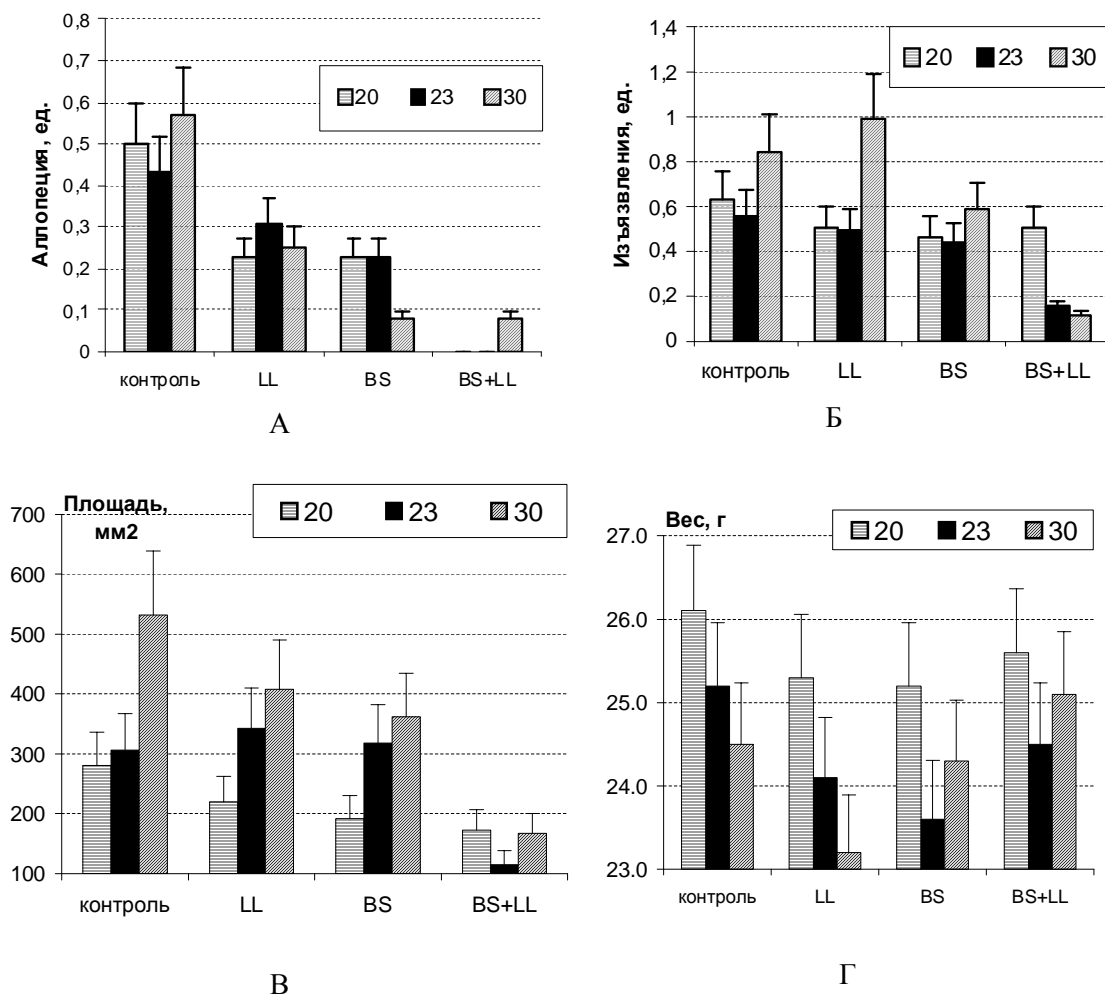


Рис. 3. Синергическое действие пробиотиков *B. subtilis* (BS) и *L. lactis* (LL) на симптомы СОК на дни 20 – , 23 – и 30 – после начала эксперимента.

А – достоверное снижение выраженности аллопеции у пролеченных самок по сравнению с контрольными; Б – степень выраженности изъязвлений была достоверно снижена только при применении двух пробиотиков; В – площадь пораженного участка достоверно уменьшилась только у самок, пролеченных двумя пробиотиками; Г – динамика изменения веса самок по ходу эксперимента: тенденция к увеличению веса наблюдалась только в группах, обработанных BS.

Был установлен синергический эффект на уменьшение площади пораженного участка кожи спины в результате лече-

ния BS и LL (рис. 3В, день 30, $p < 0.05$). Интересно, что при этом каждый пробиотик по отдельности не только не снижал вы-

раженность данного параметра, но даже наблюдалась тенденция к увеличению площади пораженного участка в подгруппах, леченых BS и LL по отдельности (рис.3В).

Полученные результаты показали, что только самки, леченные BS, демонстрировали положительную динамику привесов в последние дни эксперимента. При этом добавление в корм LL усиливало действие BS (рис. 3Г).

Не наблюдалось синергического влияния двух инъекций BS и ежедневного добавления LL в корм на уменьшение выраженности тремора. Очевидно, эта дис-

функция не поддается лечению данными пробиотиками. Предполагается, что этот симптом у мышей линии CBRB является следствием или интоксикации нервной системы токсинами стафилококка, или проявлением аутоиммунных реакций вследствие длительной вялотекущей инфекции.

Микробиологические исследования крови и смывов с кожного покрова мышей. На момент завершения эксперимента были прижизненно отобраны пробы крови мышей с наименьшим весом из каждой подгруппы (n=2), взяты смывы с поверхности их кожного покрова (10x10мм²).

Таблица 2. Микробиологические показатели мышей.

Подгруппа	Количество стафилококков, выделенных	
	из крови, lg КОЕ/мл	с кожного покрова, lg КОЕ/см ²
Контроль	0	0
LL	3.48	1.44
BS	0	Менее 1
BS+LL	0	Менее 1

При проведении исследования, из крови мышей, которым скармливали LL, выделены культуры микроорганизмов, морфологически представленные грамположительными кокками, представляющими собой стафилококки. Количество микроорганизмов при выделении со среды обогащения (солевой бульон) составляло 3.48 lg КОЕ/мл (таблица 2). Следует отметить, что из крови вышеуказанных мышей 80% выделенных стафилококков не обладали лецитиназной активностью и только 20% стафилококков ее проявляли, но были коагулазоотрицательными. В крови мышей контрольной и других экспериментальных подгрупп стафилококка не было обнаружено.

С кожного покрова мышей, которым инъецировали BS, не выделены стафилококки. Стафилококки обнаружены на коже мышей, которым скармливали LL, причем, выделенное количество возбудителя 1.44 lg КОЕ/см² было больше, чем у мышей других групп (p<0.05).

Наши результаты согласуются с данными разных авторов, полученных на

грызунах [13, 14] и человеке [15], которые свидетельствуют о контаминирующей роли *S. aureus* и коагулазонегативных стафилококков в развитии дерматита. Обнаружение в нашем эксперименте только коагулазонегативных стафилококков подтверждает, что совместное действие пробиотиков приводит к подавлению роста *S. aureus* в организме мышей и на их кожных покровах. Остаются неизвестными причины полного вытеснения *S. aureus* и обнаружения только коагулазонегативных стафилококков при лечении мышей CBRB пробиотиком LL.

Заключение и выводы

Симптоматика локализованного и генерализованного хронического дерматита стареющих мышей CBRB представляет собой, по-видимому, уникальную спонтанную биомодель, адекватно воспроизводящую импетиго и синдром ошпаренной кожи человека, так как возбудителями заболевания и мышей, и человека являются стафилококки. Более того, одновременное спонтанное проявление симптомов паркинсонизма у этих же самок с хрониче-

ским дерматитом по мере их старения, как правило, около полутора лет жизни, позволяет предполагать возможную причинно-следственную связь между стафилококковой инфекцией, аутоиммунными нейродегенеративными процессами и болезнью Паркинсона.

Влияние пробиотиков *B. subtilis* и *L. lactis* на проявление стафилококковой инфекции было протестировано на данной биомодели. Полученные результаты показали, что:

1. Испытуемые пробиотики оказали влияние на уменьшение степени выраженности алопеции, изъязвлений на холке и площади пораженного участка.

2. В течение первых двух недель испытуемый пробиотик BS достоверно уменьшил признаки ХД у леченых самок, тогда как LL не повлиял на их развитие.

3. Испытуемые пробиотики совместно оказали достоверное синергическое влияние на все параметры выраженности ХД, не влияя на проявление признаков паркинсонизма.

4. Лечение пробиотиками BS и LL приводит к подавлению роста *S. aureus* в крови и на кожных покровах мышей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Van den Broek P.J. //Ned Tijdschr Geneesk. 2003. 147. (22).1045-1048.

2. Mockenhaupt M., Idzko M., Grosber M., Schopf E., Norgauer J. // J Invest Dermatol. 2005. 124. (4). 700-703.

3. Patel G.K., Finlay A.Y. // Am J Clin Dermatol. 2003. 4 (3). 165-175.

4. Moiseeva E.V., Farber S.M., Lomova L.V., Nikonenko B.V., Klepikov N.N. // Lab Animals (Balt Lab Anim Sci). 1991. (1). 24-27.

5. The Mouse Tumour Biology Database. 1999. <http://www.informatics.jax.org/external/festing/mouse/docs/CBRB.shtml>

6. Moiseeva E. 2005. Original approaches to test anti-breast cancer drugs in a novel set of mouse models. Pathobiology, Utrecht University, The Netherlands 191 pp, <http://igitur-archive.library.uu.nl/dissertations/2005-1130-200033/index.htm>

7. Oh S., Kim S.H., Ko Y., Sim J.H., Kim K.S., Lee S.H., Park S., Kim Y.J. // Food Chem Toxicol. 2006. 44 (8). 1184-1190.

8. Vesterlund S., Karp M., Salminen S., Ouwehand A.C. // Microbiology. 2006. 152 (6). 1819-1826.

9. Hurst A., Kruse H. // Antimicrobial agents and chemotherapy. 1972. 1 (3). 277-279.

10. Spinosa MR., Braccini T., Ricca E., De Felice M., Morelli L., Pozzi G., Oggioni M.// Res Microbiol. 2000. 151 (5). 361-368.

11. Sorokulova I.B., Pinchuk I.V., Denayrolles M., Osipova I.G., Huang J.M., Cutting S.M., Urdaci M.C. // Dig Dis Sci. 2008. 53 (4). 954-963.

12. Tompkins T.A., Hagen K.E., Wallace T.D., Fillion-Forte V. // Can J Microbiol. 2008. 54 (5). 391-400.

13. Won Y.S., Kwon H.J., Oh G.T., Kim B.H., Lee C.H., Park Y.H., Hyun B.H., Choi Y.K. // Microbiol Immunol. 2002. 46 (9). 629-632.

14. Akimoto T., Kawasumi K., Amao H., Nakama K., Takeuchi Y. // Jikken Dobutsu. 1994. 43 (1). 85-93.

15. Masenga J., Garbe C., Wagner J., Orfanos C.E. // Int J Dermatol. 1990. 29 (8). 579-582.

**EFFECT OF PROBIOTICS ON SYMPTOMS OF CHRONIC DERMATITIS AND
PARKINSON'S DISEASE IN AGING CBRB MOUSE FEMALES**

Moiseeva E.V.¹, Nefedova N.V.², Semushina S.G.¹, Kessler Yu.V.¹, Stoyanova L.G.³,
Litvin A.A.⁴

¹ *Shemiakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic chemistry, RAS, Moscow, Russia*

² *Moscow State University of applied biotechnology, Moscow, Russia*

³ *Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia*

⁴ *National Research Company, Moscow, Russia*

Aging CBRB mouse females in conventional conditions mimic both localized (impetigo) and generalized (staphylococcal scaled-skin syndrome, SSSS) forms of chronic dermatitis in humans. Later in lifespan mice develop symptoms of human Parkinson's disease (PD), namely, rigidity, dyskinesia, and tremor. *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci were recognized to cause dermatitis both in rodents and humans. Probiotic cultures were found to inhibit growth of staphylococci. Using this biomodel, we detected synergistic therapeutic effect of *B. subtilis* 604T spores (BS) and *L. sbsp. lactis* 194 culture (LL) on symptoms of dermatitis during four weeks while BS alone showed weak efficacy, and LL alone was hardly efficient. Tested probiotics diminished amount of staphylococci in blood and on the skin of treated mice, but did not influence signs of PD.

Key words: mouse model, dermatitis, impetigo, staphylococcal scaled-skin syndrome, probiotic, Parkinson's disease.

