

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ НА БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МИКРООРГАНИЗМОВ, ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ МИКРОБИОМА ЧЕЛОВЕКА

Ракипова И.Р.¹, Жеребятъева О.О.¹, Михайлова Е.А.¹, Киргизова С.Б.¹, Храпунова Д.Р.¹, Азнабаева Л.М.¹

¹ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, Оренбург, e-mail: infosector@mail.ru

Проблема влияния витаминов на отдельные патогенные, условно-патогенные и пробиотические штаммы микроорганизмов, в связи с их широким применением в практической медицине, представляется в настоящее время актуальной и исследуется в различных направлениях. В статье представлены результаты оценки влияния различных концентраций витаминов (тиамина, аскорбиновой кислоты, ретинола, токоферола) на рост и биологические свойства микроорганизмов, представителей микробиома человека. Показано, что биологические характеристики микроорганизмов (лецитовителлазная и гемолитическая активности) и скорость их роста изменялись в присутствии исследуемых препаратов. Однако направленность и степень выраженности эффекта зависела от вида объекта исследования - *Staphylococcus aureus* или *Escherichia coli*, а также типа и концентрации воздействующих веществ. Проведенные исследования показали, что при использовании витаминов в качестве препаратов для коррекции микробиоценозов различных биотопов необходима оценка эффекта их действия с учетом допустимой концентрации *in vivo*, а также сочетанного влияния витаминных комплексов на представителей микробиома человека. Обнаруженная способность ингибировать / стимулировать рост микроорганизмов, а также способность витаминов модифицировать их биологические свойства может представлять интерес, поскольку витамины могут рассматриваться как важнейшая группа биологически активных веществ, используемых в лечении заболеваний инфекционной природы, в частности дисбиотических состояний.

Ключевые слова: синтетические препараты, витамины, биологические свойства, микроорганизмы, микробиом человека.

STUDY OF THE INFLUENCE OF SYNTHETIC PREPARATIONS ON THE BIOLOGICAL PROPERTIES OF MICROORGANISMS, REPRESENTATIVES OF THE HUMAN MICROBIOM

Rakipova I.R.¹, Zherebyateva O.O.¹, Mikhailova E.A.¹, Kirgizova S.B.¹, Khrapunova D.R.¹, Aznabaeva L.M.¹

¹FGBOU VO "Orenburg state medical university of Ministry of Health of Russia", Orenburg, e-mail: infosector@mail.ru

The problem of the effect of vitamins on certain pathogenic, opportunistic and probiotic strains of microorganisms, due to their widespread use in practical medicine, is currently relevant and is being studied in various directions. The article introduces the assessment result of the various concentrations effect of vitamins (thiamine, ascorbic acid, retinol, tocopherol) on the growth and biological properties of microorganisms, which are representatives of the human microbiome. It has been shown that the biological characteristics of microorganisms (lecitovitellase and hemolytic activity) and the rate of their growth change in the investigational drugs. The direction and severity of the effect depended on the type of the object of study - *Staphylococcus aureus* or *Escherichia coli*, as well as the type and acting substances. Studies have shown that when vitamins are used as drugs for the correction of microbiocenoses of various biotopes, it is necessary to assess the effect of drugs taking into account the permissible *in vivo* concentration, as well as the combined effect of vitamin complexes on representatives of the human microbiome. The discovered ability to inhibit / stimulate the growth of microorganisms, as well as the ability of vitamins to modify their biological properties, may be of interest, since vitamins can be considered as the most important group of biologically active substances used in the treatment of diseases of an infectious nature, in particular, dysbiotic conditions.

Keywords: synthetic drugs, vitamins, biological properties, microorganisms, human microbiome.

В течение ряда лет активно исследуется влияние витаминов на протекание биохимических и физиологических процессов в организме человека. Множество эффектов общеизвестны из доступной литературы, описаны минимальные и рекомендуемые суточные дозы поступления этих химических соединений в организм [1]. Витамины используются в комплексной терапии и профилактике инфекционных заболеваний и коррекции дисбиотических состояний. В то же время, в рамках открывающихся в последние годы сведений о влиянии витаминов на функции микробиома различных биотопов (в первую очередь - микробиома кишечника) [2], важным является изучение воздействия употребляемых человеком витаминов на жизнедеятельность симбионтов, представленных как условно-патогенными, так и патогенными микроорганизмами.

На сегодняшний день является актуальным применение в клинике витаминных препаратов. Как известно, недостаток различных элементов приводит к ослаблению работы иммунной системы, организм становится более подверженным атаке бактерий [3]. Витамины назначают с лечебной целью при некоторых инфекционных заболеваниях внутренних органов, кожных покровов, нервных расстройствах и прочих заболеваниях [4]. Такой витамин, как тиамин, способствует хорошему усвоению белка и участвует во всех клеточных процессах, ретинол оказывает влияние на обменные процессы в организме и обеспечивает здоровый и красивый вид эпидермиса, аскорбиновая кислота активизирует выработку коллагена и повышает защитные функции кожи, токоферол эффективно устраняет раздражение на коже и обеспечивает хорошее заживление ран [5].

Присутствующие в организме хозяина микроорганизмы способны синтезировать разнообразные витамины, необходимые как для организма хозяина, так и для стимуляции роста других микроорганизмов. Витамины также поступают в организм человека с продуктами питания и фармацевтическими препаратами. Выявлена связь дефицита α -токоферола, ретинола ацетата и аскорбиновой кислоты с дефицитом лактофлоры, высокой частотой бактериального вагиноза и кандидоза, изменениями параметров мукозального иммунитета провоспалительной направленности. Доказано нормализующее влияние всех исследуемых витаминов на состояние лактофлоры влагалища, выраженность иммунитета при этом уменьшалась в ряду α -токоферол \rightarrow ретинола ацетат \rightarrow аскорбиновая кислота [6].

Проблема влияния витаминов на отдельные патогенные, условно-патогенные и пробиотические штаммы - микроорганизмы, в связи с их широким применением в практической медицине, представляется в настоящее время актуальной и исследуется в различных направлениях. Выявлены значительные изменения антагонистической активности молочнокислых, пропионовокислых бактерий и их ассоциаций под влиянием некоторых витаминов и аминокислот как в сторону увеличения, так и уменьшения. Показано, что

испытанные витамины и аминокислоты не оказывают существенного влияния на адгезивную способность большинства тест-культур, но изменяют их резистентность к антибиотикам, причем последняя повышается у патогенных и условно-патогенных микроорганизмов и снижается у пробиотических микроорганизмов [7].

Витаминные препараты способны воздействовать на персистентный потенциал патогенных и условно-патогенных бактерий, установлено влияние витаминов на ферментативную активность микроорганизмов [8]. Известны способы санации стафилококковых бактерионосителей растворами витаминов А и Е, проявляющих высокое антиоксидантное действие, способствующих репаративным процессам носового эпителия и тормозящих персистентные свойства микроорганизмов [9], что показывает возможность регуляции данного признака бактерий витаминами.

Однако при анализе доступной нам литературы не найдено сведений о влиянии витаминов на такие факторы патогенности микроорганизмов, как гемолитическая и лецитовителлазная активность.

Целью исследования явилось изучение влияния синтетических препаратов-витаминов, используемых в практической медицине, на рост и биологические свойства *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*, представителей микробиома человека.

Материал и методы исследования

Исследования были проведены на 20 штаммах *Staphylococcus aureus*, выделенных из переднего отдела носовой полости стафилококковых бактерионосителей, обладающих способностью к продукции лецитовителлазы, и 20 штаммах *Escherichia coli*, проявляющих гемолитическую активность и являющихся представителями микрофлоры кишечника человека (коллекция микробиологической лаборатории Научно-исследовательского центра ОрГМУ).

Выделение и идентификацию микроорганизмов проводили общепринятыми методами на основании морфологических, тинкториальных, культуральных свойств; биохимический профиль оценивали с помощью тест-систем «STAPHYtest» и «ENTEROtest» фирмы LACHEMA (Чехия). Для характеристики биологических свойств у выделенных микроорганизмов определяли способность к продукции лецитовителлазы, гемолизина и скорость роста.

В работе были использованы разные концентрации коммерческих препаратов-витаминов: тиамин/витамин В₁ («Мосхимфармпрепараты им. Н.А. Семашко», Россия) и аскорбиновая кислота/витамин С («Армавирская биологическая фабрика», Россия) - 50, 5, 0,5, 0,05, 0,005 мг/мл; ретинол/витамин А («Марбиофарм» ОАО, Россия) – 100 000, 10 000, 1000, 100, 10 МЕ/мл; токоферол/витамин Е (ЗАО «ЭКОлаб», Россия) - 100, 10, 0,1, 0,01, 0,001 мг/мл.

Для оценки влияния витаминов на гемолитическую и лецитовителлазную активности ежедневно в течение 12 дней проводили соинкубирование взвеси бактерий с разными концентрациями изученных препаратов в условиях шейкер-инкубатора при 37 °С в течение 60 минут. Затем смесь центрифугировали при 3000 оборотов в минуту, после чего двукратно отмывали клетки физиологическим раствором и проводили посев культуры микроорганизмов на поверхность плотных питательных сред (кровяной и желточный солевой агары). Штаммы *E. coli* засеивали на кровяной агар для оценки гемолитической активности, а штаммы *S. aureus* - на желточно-солевой агар для оценки лецитовителлазной активности. Чашки инкубировали при температуре 37 °С в течение 16-18 часов с последующим определением наличия и уровня выраженности у выросших бактерий биологических свойств путем замера вокруг колоний зоны гемолиза на чашках с гемолитической активностью и зоны образования перламутрового преципитата - на желточно-солевом агаре. В качестве контроля вместо препаратов использовали изотонический раствор хлорида натрия. Выраженность изменений биологических свойств микроорганизмов определяли как разницу между опытом и контролем в процентном соотношении.

Во второй серии опытов было изучено влияние разных концентраций витаминов на динамику роста путем культивирования исследуемых микроорганизмов в периодической культуре на жидкой питательной среде как в присутствии разных концентраций витаминов, так и без добавления препаратов. Оптическую плотность измеряли с помощью портативного микрострипового фотометра STAT FAX 303 Plus при длине волны 570 нм. Производили измерение оптической плотности через каждые 3 часа. Изучение влияния витаминов разных концентраций на динамику роста исследуемых штаммов осуществлялось путем определения разницы оптической плотности между опытом и контролем в процентном соотношении.

Все эксперименты проводили в двух сериях при трехкратном воспроизведении. Статистическая обработка результатов исследований проводилась с использованием программ Excel, StatPlus v5 согласно «Методическим указаниям по статистической обработке результатов доклинических исследований» [10].

Результаты исследования и их обсуждение

В первой серии опытов было установлено разнонаправленное действие витаминов на лецитовителлазную активность, являющуюся одним из факторов патогенности стафилококков. При изучении модифицирующего влияния токоферола на лецитовителлазную активность *S. aureus* отмечалось уменьшение выраженности признака в ряду 100 мг/мл (на $20 \pm 8,9\%$) > 10 мг/мл (на $20 \pm 8,9\%$) > 0,1 мг/мл (на $40 \pm 10,9\%$) > 0,01 мг/мл (на $60 \pm 10,9\%$) > 0,001 мг/мл (на $60 \pm 10,9\%$). Под влиянием разных концентраций витамина А происходила модификация продукции лецитовителлазы в зависимости от концентрации препарата: при

концентрации 100 000 МЕ/мл наблюдалась стимуляция продукции фермента на $20 \pm 8,9\%$ от уровня контроля, тогда как при концентрациях 10 000, 1000, 100, 10 МЕ/мл лецитовителлазная активность снижалась, но в меньшей степени, чем под влиянием витамина Е (максимально на $40 \pm 10,9\%$). Экспрессия лецитовителлазной активности *S. aureus* под влиянием разных концентраций витамина С показала стабильное снижение в ряду 10 000 МЕ/мл (на $20 \pm 8,9\%$) > 1000 МЕ/мл (на $40 \pm 10,9\%$) > 100 МЕ/мл (на $60 \pm 10,9\%$) > 10 МЕ/мл (на $80 \pm 8,9\%$), тогда как концентрация 100 000 МЕ/мл не оказывала влияние на первоначальный уровень признака. Ингибирование у стафилококков изученного признака происходило и под влиянием тиамин, но при этом наблюдался обратный дозозависимый эффект: при концентрациях препарата 0,005 и 0,05 мг/мл снижение отмечено на $40 \pm 10,9\%$; при концентрациях препарата 0,5, 5 и 50 мг/мл - на $80 \pm 8,9\%$ от уровня контроля.

Для исследования влияния витаминов на патогенный потенциал *E. coli* была выбрана гемолитическая активность. Изучение регулирующего действия витамина Е на кишечную палочку показало, что происходила модификация продукции гемолизина в 1,5-2,0 раза при высоких концентрациях препарата (в концентрации 100, 10 и 0,1 мг/мл), тогда как при концентрациях 0,01 и 0,001 мг/мл уровень изученного признака не изменялся. Анализ модифицирующего эффекта витамина А на гемолитическую активность *E. coli* показал, что действие препарата приводит как к стимуляции, так и ингибированию изученного признака: при концентрациях 1000, 100, 10 МЕ/мл уровень признака возрастал на $20 \pm 8,9\%$ - $30 \pm 10,2\%$, тогда как при концентрации 10 000 МЕ/мл наблюдалось снижение продукции гемолизина на $50 \pm 11,2\%$ от исходного уровня вплоть до полного его исчезновения при максимальной концентрации в 100 000 МЕ/мл. Под влиянием разных концентраций витамина С на *E. coli* отмечалось увеличение продукции гемолизина 1,5-3,5 раза в ряду 50 мг/мл > 5 мг/мл > 0,5 мг/мл > 0,05 мг/мл, тогда как при минимальном разведении препарата (0,005 мг/мл) уровень изученного признака не изменялся. При изучении действия витамина В1 эффект влияния препарата на продукцию гемолизина *E. coli* варьировал от стимуляции признака в 0,6 – 2,5 раза (при концентрациях 5, 0,5, 0,05 мг/мл) до угнетения (при концентрации витамина 50 мг/мл) на $50 \pm 11,2\%$ от контрольного уровня. Под действием витамина В1 в концентрации 0,005 мг/мл значение признака не изменилось.

Во второй серии опытов оценивали динамику роста микроорганизмов, измеряя оптическую плотность бульонной культуры с добавлением разных концентраций изученных витаминов. В результате исследования влияния препаратов на динамику роста *S. aureus* было установлено, что все концентрации тиамин, аскорбиновой кислоты и токоферола оказывали ингибирующее действие на скорость роста и размножения данного микроорганизма. Причем наиболее выраженным данный эффект был в экспоненциальной фазе роста бактерий при более

высоких концентрациях препаратов: при концентрациях тиаминa 0,5 и 5 мг/мл снижение произошло на $12,5 \pm 7,4\%$; при концентрациях аскорбиновой кислоты 50 мг/мл - на $43,0 \pm 11,1\%$; при концентрациях токоферола 100 мг/мл - на $16,0 \pm 8,2\%$ от уровня контроля. Изучение регулирующего действия ретинола показало, что витамин А, наоборот, в максимальной концентрации стимулировал ростовые характеристики стафилококков: при высокой концентрации ретинола 100 000 МЕ/мл скорость роста *S. aureus* была выше на $21,5 \pm 9,1\%$ по сравнению с контролем.

Анализ результатов исследования влияния препаратов на динамику роста *E. coli* показал, что все концентрации тиаминa, аскорбиновой кислоты и токоферола не оказывали модифицирующего действия на скорость роста и размножения данного микроорганизма, кроме витамина А, который при концентрации 100 000 МЕ/мл увеличивал скорость роста популяции на $10,7 \pm 6,9\%$ по сравнению с контрольной пробой.

В результате проведенных исследований получены новые знания по модифицирующему действию исследованных витаминов на гемолитическую и лецитовителлазную активности микроорганизмов, которые показали, что разные концентрации витаминов неоднозначно влияют на уровень выраженности биологических характеристик изученных штаммов микроорганизмов и оказывают в некоторых случаях стимулирующий, а в других – ингибирующий эффекты. Исследование выявило, что высокие дозы тиаминa оказывают ингибирующее влияние на гемолитическую активность *E. coli* и лецитовителлазную активность *S. aureus*. Выявленный эффект воздействия витамина В1 на микроорганизмы может расширить спектр его биологических свойств, а возможно и применения.

В работе было показано, что высокая концентрация ретинола оказывала тормозящее влияние на гемолитическую активность *E. coli* и стимулирующий эффект - на лецитовителлазную способность *S. aureus* и скорость роста изученных микроорганизмов. Интересен тот факт, что такие витамины, как тиамин, аскорбиновая кислота и токоферол, проявляли ингибирующее действие во всех изученных концентрациях на скорость роста микроорганизмов.

Влияние ретинола на рост и свойства микроорганизмов согласуются с некоторыми известными данными. Установлена способность витамина А в суббактериостатических концентрациях снижать персистентные свойства стафилококков, в частности антилизоцимную активность, дающую патогену преимущества в биоценозе. Описано, что ретинол может подавлять персистентные свойства стафилококков и способствовать заживлению слизистой оболочки носовой полости. Это свойство ретинола, вместе с его

способностью усиливать регенерацию тканей, было положено в основу метода санации стафилококковых бактерионосителей [11].

Полученные авторами данные о влиянии отдельных витаминов на факторы персистенции эндогенной и транзиторной микрофлоры иллюстрируют новые возможные механизмы регуляции симбиотических взаимоотношений. Регулирующее действие витаминов на качественный и количественный состав микрофлоры может быть объяснено не только подавлением роста отдельных групп бактерий в условиях действия определенных витаминов, но и влиянием данных биологически активных соединений на факторы персистенции и вирулентности микроорганизмов.

Практический интерес также могут представлять полученные в ходе эксперимента данные о дозозависимом эффекте влияния одного и того же витамина на экспрессию факторов вирулентности (гемолитическую и лецитовителлазную активности) и скорость роста *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*, представителей микробиома человека, что может быть связано с антиоксидантной или прооксидантной активностью препаратов.

Таким образом, полученные данные об эффектах воздействия разных концентраций витаминов на биологические характеристики микроорганизмов представляют интерес, поскольку изменение степени выраженности биологических свойств бактерий, представителей микробиоты человека, обосновывают целесообразность комплексного изучения витаминов не только в качестве перспективы борьбы с патогенными штаммами, но и как препаратов для стимуляции роста представителей собственной нормофлоры.

Заключение

Результаты экспериментов еще раз свидетельствуют о том, что витамины могут рассматриваться как важнейшая группа биологически активных веществ для использования в лечении заболеваний микробной этиологии, в частности дисбиотических состояний.

Рассматривая витамины в качестве препаратов для коррекции биоценозов различных биотопов, необходимо оценивать их эффект с учетом допустимой концентрации *in vivo*, возможного разнонаправленного действия на патогены и представителей эндогенной флоры биотопа, а также принимать во внимание сочетанное влияние витаминных комплексов на представителей микробиома человека.

Научные исследования выполнены по проекту «Технология рационального применения лекарственных препаратов, избирательно подавляющих факторы вирулентности микроорганизмов» НИР в рамках государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации на 2018-2020 годы.

Список литературы

1. Обухова О.Л., Ларцева Л.В., Лактионова Е.Г. Роль минеральных веществ и витаминов для организма человека. Астрахань: Издательство АГТУ, 2012. 119 с.
2. Гаврилова Н.Н., Ратникова И.А., Треножникова Л.П., Баякышева К.Б., Хасенова А.Х. Влияние витаминов на рост и биологическую активность патогенных, условно-патогенных и пробиотических микроорганизмов // Биотехнология. Теория и практика. 2010. № 2. С. 85-92.
3. Долматова И.А., Зайцева Т.Н., Рябова В.Ф., Горелик О.В. Биологическая роль витаминов // Актуальные проблемы современной науки, техники и образования. 2020. № 1. С. 116-119.
4. Бабаян М.Л. Эффективность и безопасность антиоксидантов в комплексной терапии инфекционных болезней у часто болеющих детей // Вопросы современной педиатрии. 2013. № 2. С. 85-88.
5. Высоцкая Р.У., Морозов Д.Н. Витамины, их роль в процессах жизнедеятельности организма. П.: Издательство Карельский научный центр РАН, 2012. 136 с.
6. Строкова О.А., Кремлева Е.А., Константиновна О.Д., Сгибнев А.В. Регуляция микрoэкологического состояния нижних отделов женского репродуктивного тракта витаминами // ЖМЭИ. 2020. № 3. С. 251-257.
7. Ратникова И.А., Гаврилова Н.Н., Баякышева К.Б., Турлыбаева З.Ж., Кошелева Л.А., Утегенова Н.М. Влияние витаминов на рост и резистентность к антибиотикам патогенных и условно-патогенных микроорганизмов // Альманах мировой науки. 2015. № 1. С. 28-29.
8. Кириллов Д.А. Лекарственная регуляция персистентных свойств микроорганизмов: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Оренбург, 2004. 22 с.
9. Карташова О.Л., Уткина Т.М. Регуляция персистентных свойств микроорганизмов факторами различной природы (Обзор) // Бюллетень ОНЦ УрО РАН. 2013. № 1. [Электронный ресурс]. URL: [http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2013-1/Articles/KOL-TMU\(2013-1\)](http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2013-1/Articles/KOL-TMU(2013-1)) (дата обращения: 05.05.2021).
10. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под общей редакцией член-корреспондента РАМН, профессора Р.У. Хабриева. 2-изд., перераб и доп. М.: Медицина. 2005. 832 с.
11. Алексеева Н.Б., Чельшева Г.М. К вопросу о способах санации стафилококковых бактерионосителей // Актуальные проблемы медицины. 2014. № 3. С. 118-120.