

Для корреспонденции

Кравченко Лидия Васильевна – кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории энзимологии питания НИИ питания РАМН
Адрес: 109240, г. Москва, Устьинский проезд, д. 2/14
Телефон: (495) 698-53-65

М.А. Ускова, Л.В. Кравченко

Антиоксидантные эффекты молочнокислых бактерий – пробиотиков и йогуртных заквасок

НИИ питания РАМН, Москва

Antioxidant properties of lactic acid bacteria – probiotic and yogurt strains

M.A. Uskova, L.V. Kravchenko

Antioxidant properties of 14 strains of lactic acid bacteria were evaluated in vitro using FRAP assay, inhibition of luminol oxidation in Hb-H₂O₂ system and inhibition of NADPH-Fe²⁺ induced microsomal lipid peroxidation. All strains demonstrated high reducing properties, but only L. casei spp. (including L. casei 114001) and L. fermentum ME-3 revealed pronounced ability to suppress oxidation of luminol (by 43–65,8%) and microsomal lipid peroxidation (by 57,9–89,5%). Either L. casei 114001 (10⁸ CFU suspended in physiological solution) or fermented dairy drink containing equivalent amount of L. casei 114001 were daily administered orally to male Wistar rats. Antioxidant capacity of blood plasma, liver and intestines of animals elevated while MDA content in blood plasma decreased.

Антиоксидантную активность 14 штаммов молочнокислых бактерий in vitro оценивали по их способности восстанавливать Fe³⁺ в системе FRAP, тормозить окисление люминола в системе Hb-H₂O₂–люминол и подавлять индуцированное НАДФН-Fe²⁺ перекисное окисление липидов мембран микросом. Все штаммы обладали высокой восстанавливающей активностью, но только представители L. casei (в том числе L. casei 114001) и L. fermentum ME-3 проявляли выраженную способность подавлять окисление люминола (на 43–65,8%) и перекисное окисление липидов микросом (на 57,9–89,5%). Введение крысам внутрижелудочно в течение 3 нед взвеси L. casei 114001 в количестве 10⁸ КОЕ или кисло-молочного напитка с тем же количеством L. casei 114001 приводило к возрастанию антиоксидантной емкости плазмы крови, цитозоля печени и тонкой кишки при одновременном снижении содержания малонового диальдегида в плазме крови.

Ключевые слова: пробиотики, молочнокислые бактерии, антиоксиданты

Плезные для здоровья человека свойства молочнокислых бактерий (МКБ), впервые описанные И.И. Мечниковым, спустя столетие вновь стали объектом интенсивного изучения. В настоящее время широко используется понятие «пробиотик» для обозначения живых микроорганизмов (преимущественно МКБ), употребление которых с пищей в достаточных количествах оказывает благоприятное влияние на здоровье [8]. К пробиотикам относятся главным образом представители родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*, а также отдельные штаммы некоторых видов *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus* и *Saccharomyces* [19].

Наиболее хорошо документированы положительные эффекты пробиотиков и пробиотических продуктов при профилактике и лечении хронических воспалительных и инфекционных заболеваний желудочно-кишечного тракта. В то же время накапливаются доказательства их значительно более широкой функциональной активности: наряду со способностью нормализовать функции кишечной

микрофлоры пробиотики могут способствовать усилению иммунитета, ослаблению проявлений пищевой аллергии, облегчать симптомы непереносимости лактозы, оказывать гипохолестеринемическое и антимуутагенное действие [6, 19].

В последнее время появляются сообщения об обнаружении у некоторых МКБ антиоксидантных свойств, которые сохраняются и даже усиливаются в составе пищевых продуктов, ферментированных или обогащенных ими. В одном из первых проведенных исследований было обнаружено, что 19 из 570 штаммов МКБ подавляют *in vitro* перекисное окисление липидов (ПОЛ) микросом, выделенных из печени крыс, более чем на 90%. В число этих «антиоксидантных» штаммов входят 16 штаммов *Lactobacillus* (из них 11 – *L. casei*), 2 штамма *Streptococcus thermophilus* и 1 штамм – *Lactococcus lactis* [9]. Позже в ряде исследований *in vitro* была показана способность бесклеточных экстрактов различных штаммов МКБ – *Lactobacillus acidophilus*, *L. jensenii*, *L. rhamnosus*, *L. lactis*, *L. fermentum*, *L. casei*, *Streptococcus thermophilus* – подавлять ПОЛ, захватывать свободные радикалы, обезвреживать H_2O_2 [12, 15, 21]. У *L. plantarum* RCTC 3099 обнаружена высокая хелатирующая активность в отношении ионов металлов переменной валентности [14]. По данным М. Terahara и соавт. [22], культуры *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* 2038 и *S. thermophilus* 1131, используемые в составе йогуртных заквасок, обладают способностью подавлять окисление липопротеидов низкой плотности (ЛПНП), выделенных из крови человека. Высокую антирадикальную и восстанавливающую активность в модельных системах *in vitro* проявляли и пробиотические продукты – содержащие МКБ-пробиотики [2, 23, 24].

Подтверждены антиоксидантные свойства МКБ в экспериментах на лабораторных животных и в исследованиях на добровольцах [18]. У крыс линии Вистар, получавших рационы с включением лиофилизированной культуры *L. casei ssp casei* 19 или молока, сквашенного с использованием этого же штамма, возрастала резистентность ЛПНП крови к окислению [10]. Включение молока, ферментированного *L. helveticus* и *Saccharomyces cerevisiae*, в корм крыс линии Вистар в течение 3 нед вызывало усиление экспрессии генов антиоксидантных ферментов в скелетных мышцах животных как в состоянии покоя, так и при физической нагрузке [3]. Подавление образования продуктов ПОЛ и существенное возрастание активности антиоксидантного фермента супероксиддисмутазы (СОД) обнаружены в головном мозге крысят, получавших обогащенное МКБ молоко [4].

И наконец, у добровольцев, получавших в течение 3 нед козье молоко, ферментированное *L. fermentum ME-3*, или капсулы, содержащие *L. fermentum ME-3*, установлено возрастание

антиоксидантной емкости (АОЕ) плазмы крови, снижение в ней уровня диеновых конъюгатов, уменьшение степени окисленности ЛПНП, а также содержания 8-изопростанов в моче [11]. Частота обнаружения антиоксидантных свойств у МКБ, как и механизмы их антиоксидантного действия, изучены слабо.

Целью настоящей работы явилось изучение некоторых антиоксидантных эффектов ряда МКБ, в том числе штаммов с доказанными пробиотическими свойствами и нашедших применение в производстве кисломолочных продуктов (*L. casei* 114001, *L. fermentum ME-3*).

Материал и методы

Бактериальные штаммы

4 штамма *L. bulgaricus*, 6 штаммов *S. thermophilus* и 3 штамма *L. casei* были предоставлены исследовательским центром Данон (Франция), штамм *L. fermentum ME-3* был получен из коллекции Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSM 14241). Штаммы выращивали в жидких средах MRS (*Difco Laboratories*) (*Lactobacillus* spp.) и Elliker (*Difco Laboratories*) (*Streptococcus* spp.) в аэробных условиях при 37 °C в течение 16 ч. Штаммы пересеивали 3 раза последовательно, частоту проверяли путем микроскопирования.

Получение бесклеточных экстрактов

Суспензию бактериальных клеток центрифугировали при 9000 g в течение 10 мин, осадок дважды промывали физиологическим раствором при тех же условиях центрифугирования. Полученный осадок ресуспендировали в физиологическом растворе и после стандартизации концентрации (10^9 КОЕ/мл) подвергали действию ультразвука – 3 раза по 3 мин с минутным интервалом при амплитуде 40 ед (Cole-Parmer ultrasonic processor CP130). Обработанную ультразвуком суспензию центрифугировали при 7000 g в течение 10 мин. Надосадок – бесклеточный экстракт (БЭ) – отбирали для последующих исследований. Все процедуры проводили при 4 °C.

Исследования *in vitro*

Восстанавливающую активность определяли в тест-системе FRAP (ferric reducing antioxidant power) [5]. Метод основан на способности антиоксидантов восстанавливать Fe^{3+} -TPTZ (трипиридилтриазина) в Fe^{2+} -TPTZ, что сопровождается развитием голубой окраски с максимумом поглощения при 593 нм. Исследуемый БЭ (60 мкл) вносили в реакционную смесь общим объемом 1,86 мл, содержащую 0,81 мМ TPTZ («Acros Organics») и 1,61 мМ $FeCl_3 \times 6H_2O$ в 250 мМ ацетатном буфере (pH 3,6). Измерение проводили в течение 4 мин. Восстанавливающую активность выражали в мМ Fe^{2+} -эквивалентов (Fe^{2+} -экв).

Торможение свободнорадикального окисления (СРО) люминола. В основе принципа действия этой системы лежит способность гемоглобина (Hb), по большей части представляющего собой metHb, при взаимодействии с H_2O_2 образовывать феррил-радикалы Hb, индуцирующие СРО люминола, что сопровождается хемилюминесценцией (ХЛ) [1]. ХЛ регистрировали при 37 °С на хемилюминиметре «Люцифер-иммуно». Основными оцениваемыми параметрами кинетики ХЛ были величина латентного периода развития ХЛ и максимальная ее интенсивность. Реакционная среда общим объемом 1 мл содержала 2,79 мкМ Hb и 56,2 мкМ люминола в фосфатном буфере (50 мМ KH_2PO_4 , 100 мкМ ЭДТА, pH 7,4). Инициирование СРО люминола осуществляли введением 73 нМ H_2O_2 . Кинетические параметры ХЛ обсчитывали с помощью компьютерной программы «Microsoft® Excel 2002».

Торможение ПОЛ микросом. Микросомы выделяли из печени крыс-самцов линии Вистар с массой тела 150 г. ПОЛ мембран микросом индуцировали системой НАДФН- Fe^{2+} . Окислительную модификацию липидов оценивали по накоплению ТБК-реактивных продуктов ПОЛ. Для оценки влияния изучаемых БЭ на скорость индуцированного ПОЛ суспензию микросом в 40 мМ трис- HCl буфере pH 7,4 (1 мг белка/мл) инкубировали с БЭ при 37 °С в течение 10 мин в среде, содержащей 12 мкМ $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$, 0,2 мМ $Na_4P_2O_7$ и 0,025 мМ НАДФН при постоянном встряхивании. После остановки реакции 30% ТХУ инкубационную смесь центрифугировали при 5200 g в течение

5 мин. К 1 мл надосадка добавляли 0,2 мл 0,6 н HCl , 0,8 мл 0,06 М ТБК и нагревали в течение 10 мин при 100 °С. После охлаждения концентрацию образовавшегося малонового диальдегида (МДА) измеряли при длине волны 532 нм и рассчитывали, используя коэффициент молярной экстинкции $1,56 \times 10^5 M^{-1} cm^{-1}$.

Активность СОД. Активность СОД в БЭ определяли методом [17], основанным на конкурирующем взаимодействии СОД и нитросинего тетразолия (НСТ) с супероксид-анион-радикалами, образующимися в результате аэробного взаимодействия НАДН и феназинметосульфата (ФМС) при 25 °С. В результате этой реакции НСТ восстанавливается с образованием бисформазана и регистрируется при 540 нм. Реакционная среда общим объемом 1,8 мл содержала БЭ, 47 мкМ НСТ и 132 мкМ НАДН. Реакцию инициировали введением 2 мкМ ФМС.

Исследования in vivo. Исследования проводили на трех группах крыс-самцов линии Вистар (по 8 животных в группе) с исходной массой тела 179 ± 3 г, получающих полусинтетический рацион. В течение 3 нед крысы 1-й опытной группы получали внутрижелудочно по 0,5 мл взвеси *L. casei* 114001 в физиологическом растворе (2×10^8 КОЕ/мл), крысы 2-й опытной группы – по 0,5 мл используемого кисломолочного напитка, содержащего *L. casei* 114001 в количестве 2×10^8 КОЕ/мл, а также *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* и *S. thermophilus* в количестве 10^7 КОЕ/мл. Животным контрольной группы внутрижелудочно вводили по 0,5 мл физиологического раствора. Через 24 ч после последнего введения в плазме крови и цитозольной фракции

Таблица 1. Антиоксидантная активность и активность супероксиддисмутазы (СОД) бесклеточных экстрактов молочнокислых бактерий

Штамм	Восстанавливающая активность, мМ Fe^{2+} -экв	Подавление ХЛ (система Hb- H_2O_2 -люминол), %	Подавление НАДФН-индуцированного ПОЛ микросом, %	Активность СОД, Ед/ 10^9 КОЕ
<i>L. bulgaricus</i> 100182	0,337	5,7	4,9	21,6
<i>L. bulgaricus</i> 100508	0,225	11,1	3,7	9,7
<i>L. bulgaricus</i> 100479	0,733	11,5	14,3	22,2
<i>L. bulgaricus</i> 100504	0,248	14,4	17,90	16,8
<i>L. casei</i> 114001	0,254	43,0	57,9	17,3
<i>L. casei</i> 153	0,390	62,1	88,5	5,5
<i>L. casei</i> 154	0,319	65,8	89,5	20,4
<i>L. fermentum</i> ME-3	0,260	53,3	72,8	24,4
<i>S. thermophilus</i> 001618	0,177	7,8	4,3	28,8
<i>S. thermophilus</i> 001358	0,367	10,7	9,6	35,2
<i>S. thermophilus</i> 001646	0,272	0,7	0	28,3
<i>S. thermophilus</i> 001642	0,284	12,8	8,5	31,9
<i>S. thermophilus</i> 001614	0,449	15,9	8,6	33,9
<i>S. thermophilus</i> 001519	0,296	8,7	0	28,0

(105 000 g × 60 мин) печени и слизистой оболочки тонкой кишки крыс определяли восстанавливающую активность (в системе FRAP) и АОЕ (в системе Hb–H₂O₂–люминол). В плазме крови определяли также содержание МДА [16].

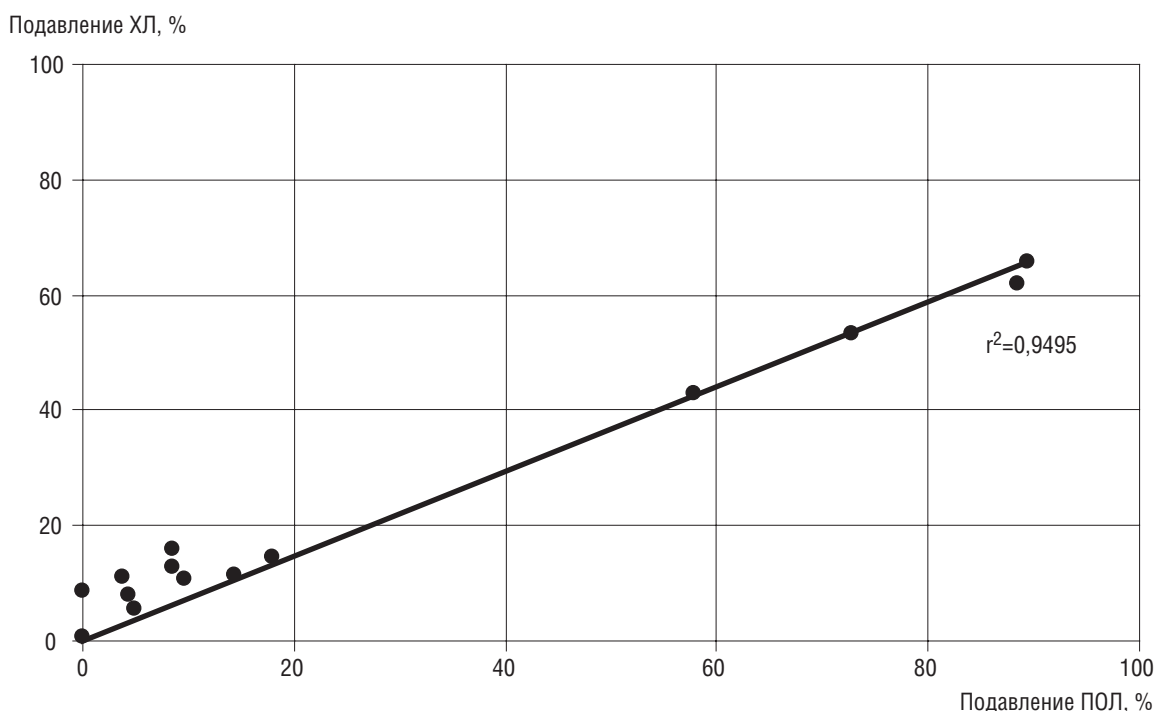
Результаты и обсуждение

Из данных, представленных в табл. 1, видно, что все изученные штаммы МКБ проявляли антиоксидантную активность *in vitro*. Не обнаружено резко выраженных различий восстанавливающей активности у штаммов разных видов МКБ. Для представителей рода *Lactobacillus* она варьировала от 0,225 до 0,733 мМ Fe²⁺-эквивалентов, для *Streptococcus* – от 0,177 до 0,449. В то же время способность подавлять СРО люминола и ПОЛ микросом у штаммов разных видов МКБ существенно различалась. Так, БЭ штаммов *L. bulgaricus* подавляли окисление люминола (оцениваемое по интенсивности ХЛ) на 5,7–14,4%, *S. thermophilus* – на 0,7–15,9%, а *L. casei* и *L. fermentum* – на 43–65,8%. Следует отметить, что БЭ изученных штаммов МКБ не влияли на величину латентного периода развития ХЛ. Представители *L. casei* и *L. fermentum* ME-3 проявляли максимальную антиоксидантную активность и в модельной системе индуцированного ПОЛ микросом: они подавляли ПОЛ на 57,9–89,5%, в то время как остальные штаммы – не более чем на 17,9%. Установлена тесная корреляция ($r^2=0,95$) между способностью БЭ тормозить СРО люминола и подавлять ПОЛ микросом (см. рисунок).

Все изученные штаммы МКБ обладали высокой активностью СОД, которая варьировала для штаммов *Lactobacillus* от 5,5 до 24,4 Ед/10⁹ КОЕ и была несколько выше у штаммов *Streptococcus* (28,0–35,2 Ед/10⁹ КОЕ).

Введение крысам в течение 3 нед взвеси *L. casei* 114001 – штамма, проявляющего высокую антиоксидантную активность в исследованиях *in vitro* (см. табл. 1), приводило к достоверному улучшению антиоксидантного статуса животных, который оценивали по изменению таких интегральных маркеров окислительного стресса, как АОЕ, восстанавливающая активность и уровень продуктов ПОЛ (табл. 2). Так, АОЕ плазмы крови, цитозоля печени и тонкой кишки крыс 1-й опытной группы достоверно возрастала соответственно на 28, 29 и 32%. У этих же животных повышалась (на 34%) и восстанавливающая активность цитозоля печени. При этом в плазме крови достоверно уменьшалось содержание МДА (на 26%). Аналогичные изменения наблюдались и у крыс 2-й опытной группы, получавших в течение 3 нед используемый кисломолочный напиток, содержащий культуру того же штамма *L. casei* 114001. АОЕ плазмы крови, печени и тонкой кишки возрастала соответственно на 32, 18 (статистически недостоверно) и 29%, восстанавливающая активность печени – на 30%; содержание МДА в плазме крови уменьшалось на 18%.

Результаты проведенных *in vitro* исследований (наличие высокой восстанавливающей активности и активности СОД, способность тормозить процес-



Корреляция между подавлением ХЛ (система Hb–H₂O₂–люминол) и подавлением НАДФН-индуцированного ПОЛ микросом БЭ штаммов молочнокислых бактерий

Таблица 2. Влияние *L. casei 114001* (1-я опытная группа) и кислоломочного напитка, содержащего тот же вид микроорганизмов (2-я опытная группа), на показатели антиоксидантного статуса крыс

Показатель	Группа животных		
	контрольная	1-я опытная	2-я опытная
Плазма			
Восстанавливающая активность ¹	0,268±0,005	0,267±0,011	0,258±0,007
АОЕ ²	31,5±2,6	40,3±1,3*	41,6±0,9*
МДА, нмоль/мл	4,11±0,25	3,05±0,08*	3,35±0,18*
Печень			
Восстанавливающая активность	8,13±0,46	10,91±0,27*	10,60±0,39*
АОЕ	27,2±2,6	35,0±1,7*	31,3±3,2
Тонкая кишка			
Восстанавливающая активность	10,14±0,42	9,83±0,11	9,49±0,10
АОЕ	16,1±1,8	21,1±1,9	21,0±1,3*

Примечание. * – $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой.

¹ – mMFe^{2+} -эквивалентов;

² – подавление ХЛ системы $\text{Hb-H}_2\text{O}_2$ -люминол, %

сы СРО) позволяют отнести все изученные штаммы МКБ к антиоксидантным. Насколько нам известно, такая характеристика изученных штаммов МКБ (исключая *L. fermentum ME-3*) дается впервые. Что касается антиоксидантных свойств *L. fermentum ME-3*, то они показаны как *in vitro*, так и *in vivo* [11, 12]. Штамм отличается высокой резистентностью к действию свободных радикалов кислорода, его лизаты подавляют перекисное окисление линоленовой кислоты, содержат значительное количество глутатиона и обладают активностью СОД.

Известно, что большинство антиоксидантов являются восстановителями (донорами Н). К ним относятся фенольные соединения – витамины Е и К, убихинон, каротиноиды, аминокислоты триптофан и фенилаланин, растительные полифенолы; тиолсодержащие соединения – глутатион, аминокислоты цистеин, метионин. Хотя установлено, что многие «антиоксидантные» штаммы МКБ, как и штаммы, изученные в данной работе, *in vitro* проявляют высокую восстанавливающую активность [14], неизвестно, какие компоненты и метаболиты МКБ являются восстановителями. В связи с этим следует отметить, что некоторые штаммы МКБ обладают способностью продуцировать восстановленный глутатион в значительных количествах [13, 20].

Обнаруженная тесная корреляция между способностью изученных штаммов МКБ тормозить СРО люминола и ПОЛ микросом печени крыс (см. рисунок) указывает на общий механизм их действия в обеих модельных системах. Согласно [1], увеличение латентного периода ХЛ модельной системы $\text{Hb-H}_2\text{O}_2$ -люминол отражает способность антиоксиданта взаимодействовать с радикалами-инициаторами окисления (феррил-радикалы, $\text{OH}\cdot$), в то время как уменьшение интенсивности ХЛ – взаимодействие с радикалами, образующимися в реакциях СРО люминола (радикалы люминола, $\text{O}_2\cdot$). Подавление интенсивности ХЛ изученными БЭ при отсутствии их влияния на латентный период ХЛ позволяет заключить, что торможение окисления люминола, как и подавление ПОЛ микросом, происходит за счет прерывания цепного процесса СРО, возможно, при участии содержащихся в БЭ восстановителей и СОД, с образованием менее активных радикалов.

Полученные *in vivo* результаты свидетельствуют о том, что БЭ *L. casei 114001* и *L. casei 114001* в составе используемого пробиотического напитка сохраняют свою антиоксидантную активность при поступлении внутрь и что она проявляется не только на «местном» уровне (желудочно-кишечный тракт), но и носит системный характер.

Пробиотические продукты, содержащие *L. casei 114001*, можно отнести к функциональным продуктам с документированным благоприятным влиянием на здоровье [6], но в опубликованных исследованиях отсутствуют сведения об их антиоксидантной эффективности. В единственной обнаруженной нами публикации, где изучено влияние используемого молочнокислого напитка на показатели антиоксидантного статуса молодых женщин, показано, что употребление в течение 4 нед напитка в количестве 100 г (2 нед) и 200 г (2 нед) приводит к некоторому снижению АОЕ плазмы крови и возрастанию в ней содержания диеновых конъюгатов, что, по мнению авторов, может быть следствием стимулирующего действия пробиотиков на активность иммунной системы и усиления образования активных форм кислорода [7]. В то же время результаты, близкие к нашим, получены при изучении *in vivo* эффективности других «антиоксидантных» МКБ. Так, возрастание АОЕ плазмы крови и снижение в ней содержания диеновых конъюгатов обнаруживали у добровольцев, получавших молоко, ферментированное *L. fermentum ME-3* или *L. fermentum ME-3* в капсулах [11], а также у крыс, находившихся на рационе, содержащем *B. polyfermenticus SCD* [18].

Таким образом, результаты проведенных исследований позволяют заключить, что некоторые штаммы МКБ, обладающие антиоксидантной активностью, способны снижать риск накопления активных форм кислорода в организме и оказывать благоприятное влияние на его антиоксидантный статус.