

## Пероральный прием кормящими женщинами *Lactobacillus fermentum* СЕСТ5716 предотвращает развитие лактационного мастита: рандомизированное контролируемое испытание

Хосе А. Уртадо,<sup>1</sup> Хосе А. Мальдонадо-Лобон,<sup>2</sup> М. Пас Диас-Роперо,<sup>2</sup> Кэтрин Флорес-Рохас,<sup>3</sup> Хосе Уберос,<sup>4</sup> Хосе Л. Леанте,<sup>5</sup> Лаура Аффумикато,<sup>6</sup> Мария Лус Коус,<sup>7</sup> Хосе М. Гарридо,<sup>8</sup> Моника Оливарес,<sup>2</sup> Юристо Фонолла,<sup>3</sup> и группа «PROLAC»\*

### Аннотация

**Цель:** Цель этого исследования – оценить профилактический эффект перорального приема *Lactobacillus fermentum* СЕСТ5716 в отношении частоты мастита у кормящих женщин.

**Методы:** Проводилось двойное слепое рандомизированное контролируемое испытание с участием 625 женщин. Женщины, получавшие профилактическую дозу антибиотика при родах, включались через 1-6 дней после родов и случайным образом распределялись по группам. Группа пробиотика получала по 1 капсуле, содержащей  $3 \times 10^9$  КОЕ *L. fermentum*, в сутки; контрольная группа получала по 1 капсуле плацебо, содержащей мальтодекстрин, в сутки. Период вмешательства составлял 16 недель. Основным исходом в исследовании была частота клинического мастита, определявшегося по наличию как минимум двух симптомов со стороны молочной железы из трех (боль, покраснение и уплотнение) и хотя бы одного симптома лихорадки или гриппоподобного состояния (озноб, потливость или ломота).

**Результаты:** Двести девяносто одна женщина прошла 16-недельный курс вмешательства. Мастит развился у шестнадцати женщин в группе пробиотика в сравнении с 30 женщинами в контрольной группе (отношение шансов = 0,531;  $p = 0,058$ ). Частота возникновения мастита в группе пробиотика была значительно меньшей, чем в контрольной группе (ЧВ = 0,130 в группе пробиотика и ЧВ = 0,263 в контрольной группе;  $p = 0,021$ ). Таким образом, пероральный прием *L. fermentum* СЕСТ5716 в период лактации снизил частоту возникновения клинического мастита на 51%. Стафилококковая нагрузка в конце вмешательства была значительно ниже в грудном молоке женщин в группе пробиотика в сравнении с грудным молоком женщин в контрольной группе ( $p = 0,025$ ).

**Вывод:** Прием пробиотического штамма *L. fermentum* СЕСТ5716 может быть эффективной стратегией профилактики развития лактационного мастита у женщин в период кормления. Регистрация испытания: NCT02203877.

<sup>1</sup> Отделение неонатологии, Больница матери и ребенка Университетского клинического центра, Гранада, Испания.

<sup>2</sup> Исследовательское подразделение, «Biosearch Life», Гранада, Испания.

<sup>3</sup> Подразделение исследований в области метаболизма и педиатрии, Больница Рейна София, Кордова, Испания.

<sup>4</sup> Отделение педиатрии, Школа медицины, Университет Гранады, Испания.

<sup>5</sup> Отделение неонатологии, Общая университетская клиника Санта Люсия, Картахена, Мурсия, Испания.

<sup>6</sup> Отделение неонатологии, Университетская клиника, Малага, Испания.

<sup>7</sup> Отделение неонатологии, Больница Университетского клинического центра, Сантьяго-де-Компостела, Ла-Корунья, Испания.

<sup>8</sup> Отделение педиатрии, Университетская клиника, Саламанка, Испания.

\* Члены группы «PROLAC» указаны в разделе «Благодарности» в конце статьи.

**Ключевые слова:** мастит, профилактика, пробиотики

### **Введение**

Человеческая микробиота играет важную и все более признаваемую роль в здоровье человека. Дисбиоз в разных частях организма человека связан с такими заболеваниями, как воспалительное заболевание кишечника, диабет, ожирение, аллергия, влагалищные инфекции, атопический дерматит и кариес зубов.<sup>1</sup> Стоит отметить, что пробиотики положительно влияют на эти заболевания, восстанавливая баланс микробиоты.<sup>2,3</sup> В 2003 году было впервые описано присутствие физиологической микробиоты в человеческом молоке.<sup>4,5</sup> Недавние исследования показали, что дисбиоз этой микробиоты связан с маститом.<sup>6-8</sup>

Мастит – это воспалительное состояние молочной железы, обычно связанное с лактацией. Дисбиоз при мастите характеризуется пролиферацией отдельных видов бактерий, таких как *Staphylococcus*, одной из основных бактериальных групп, связанных с маститом.<sup>6,9-11</sup> Данные по частоте возникновения этой проблемы очень различаются, возможно, из-за различий в диагностических критериях. Данные ВОЗ по частоте возникновения сильно варьируются и могут достигать 33 %.<sup>9</sup> За последнее десятилетие в разных исследованиях была показана способность отдельных пробиотических штаммов восстанавливать баланс микробиоты в человеческом молоке за счет снижения бактериальной нагрузки, связанной с маститом.<sup>12-14</sup> Снижение бактериальной нагрузки было связано со снижением тяжести заболевания. В этих исследованиях были представлены некоторые доказательства возможности эффективного решения проблемы мастита с помощью пробиотических бактерий.

*Lactobacillus fermentum* СЕСТ5716 – это пробиотический штамм, выделенный из грудного молока здоровых женщин.<sup>15</sup> Этот штамм продемонстрировал выраженную противоинфекционную активность, вероятно, связанную с его антибактериальной и иммуномодулирующей активностью.<sup>16-19</sup> Что касается мастита, два разных исследования показали, что *L. fermentum* СЕСТ5716 оказывает значительное положительное влияние на мастит за счет снижения нагрузки *Staphylococcus* в грудном молоке.<sup>13,14</sup> Бактерии видов *Staphylococcus* – основная причина мастита и фактор риска заболевания.<sup>6,9,10</sup> Способность *L. fermentum* СЕСТ5716 уменьшать этот важный фактор риска мастита вдохновила нас на проведение клинического испытания с целью оценки потенциала этого штамма в профилактике развития лактационного мастита.

### **Материалы и методы**

#### *Дизайн и протокол исследования*

Было проведено двойное слепое рандомизированное плацебо-контролируемое многоцентровое испытание. Критерии включения были следующими: здоровые женщины в возрасте от 18 до 45 лет с нормальным течением беременности, роды за 1-6 дней до набора, роды в срок между 37 и 42 неделями гестации, профилактический прием антибиотиков в срок между 48 часами до и 48 часами после родов (для включения было достаточно одной дозы, независимо от типа антибиотика), твердое намерение кормить детей грудью хотя бы 16 недель. Критериями исключения из исследования были патологии молочных желез или патологии детей, мешавшие грудному вскармливанию, и низкая вероятность приверженности протоколу исследования. Женщины давали письменное информированное согласие.

Размер выборки рассчитывался по эффекту в отношении основного исхода и частоте возникновения мастита. Исходя из предшествующих данных по частоте возникновения мастита, было запланировано исследование с достаточной мощностью (80 %) для обнаружения 40 %-ной разницы между группами в частоте возникновения мастита после вмешательства с уровнем значимости 0,05 (программное обеспечение «R» версии 2.12.2). Необходимое число женщин составляло 258 на группу, общий размер выборки

был увеличен до 625 женщин для компенсации выбываний.

Женщины были включены и распределены в две группы в соответствии с рандомизацией, проведенной компьютерной программой («R» версии 2.12.2). Группа пробиотика получала *L. fermentum* СЕСТ5716 в течение 16 недель в дозе  $3 \times 10^9$  КОЕ/сутки. Контрольная группа получала плацебо – мальтодекстрин.

*L. fermentum* СЕСТ5716 предоставила компания «Biosearch Life». Капсулы, содержащие по  $3 \times 10^9$  КОЕ *L. fermentum* СЕСТ5716 или мальтодекстрин, были приготовлены «Biofabri S.L.» (А Релва 36400 О Порриньо, Понтеведра, Испания).

Женщины принимали по одной капсуле пробиотика (группа пробиотика) или мальтодекстрина (контрольная группа) в день. Пробиотик и плацебо предоставлялись в идентичных желатиновых капсулах, упакованных в идентичные пластиковые тубы с белыми этикетками с указанием кода производственной серии. Поскольку стабильность пробиотических бактерий зависит от температуры хранения, капсулы хранились при  $4^\circ\text{C}$  в течение исследования. Концентрация жизнеспособных бактерий *Lactobacillus* в капсулах пробиотика была стабильной в течение всего исследования ( $2,9 \times 10^9$  КОЕ на капсулу в конце вмешательства).

Исследование проводилось в двенадцати больницах в разных регионах Испании. Исследование проводилось в соответствии с Хельсинкской декларацией, а протокол был одобрен Региональным этическим комитетом Системы Андалус де Салуд в Севилье (Испания) для больниц в Андалусии и местными этическими комитетами для остальных больниц. Испытание было зарегистрировано в Медицинской библиотеке США ([www.clinicaltrial.gov](http://www.clinicaltrial.gov)) под номером NCT02203877.

#### *Результаты исследования*

Основным исходом испытания была частота возникновения мастита в первые 4 месяца грудного вскармливания. Мастит определялся согласно Амир и соавт.<sup>20</sup>: по наличию как минимум двух симптомов со стороны молочной железы из трех (боль, покраснение и уплотнение) и хотя бы одного симптома лихорадки или гриппоподобного состояния (озноб, потливость или ломота).

Вторичными исходами были: микробиота грудного молока в конце вмешательства и в случае мастита, ежемесячный опрос для оценки боли в молочных железах и воспалительные маркеры в грудном молоке в конце вмешательства и в случае мастита.

#### *Сбор данных*

Для диагностики мастита отмечалось присутствие местных симптомов со стороны молочных желез (боль, покраснение и уплотнение) и системных симптомов (лихорадка, озноб, потливость или ломота). С женщинами ежемесячно связывались по телефону, спрашивали о симптомах мастита и просили оценить боль в молочных железах по шкале от 0 (отсутствие боли) до 10 (крайне сильная боль). В случае симптомов мастита диагноз подтверждался соответствующим врачом или акушеркой. Также собирались данные об использовании антибиотиков, обезболивающих и местных средств при симптомах со стороны сосков и молочных желез.

Поскольку изменения в диете могли влиять на основные исходы в исследовании, эта переменная контролировалась с помощью опросника частоты потребления пищевых продуктов. Опросник заполнялся женщинами в начале и в конце вмешательства. Приверженность женщин оценивалась путем сбора оставшихся капсул в конце вмешательства.

Образцы грудного молока брались в начале и в конце вмешательства. В случае мастита также брались образцы грудного молока. Перед взятием образцов грудного молока сосок и ареолу мыли водой с мылом и обрабатывали антибактериальным раствором хлоргексидина. Образцы грудного молока получали путем ручного выделения и собирали в стерильные пробирки после удаления первых капель молока. Образцы хранились при  $-20^\circ\text{C}$  и обрабатывались в течение 1 месяца.

#### *Определение числа бактерий в грудном молоке*

Чтобы оценить общую концентрацию бактерий в грудном молоке, соответствующие разведения образцов в забуференной пептонной воде («биоМерье СА», Марси-л'Этуаль, Франция) распределяли в четырехкратном количестве на чашки с агаром для подсчета (РСА) и анаэробным агаром Уилкинса-Чалгрена (WCA) («Оксоид», Бейсингсток, Великобритания). Культуры инкубировали в аэробных (РСА) и анаэробных (WCA) условиях («АнаэроДжен»; «Оксоид», Бейсингсток, Великобритания) при 37°C в течение 48 часов. После инкубации подсчитывались колонии, выросшие на среде, и рассчитывалось число жизнеспособных микроорганизмов в миллилитре молока (КОЕ/мл).

Число *стафилококков*, *стрептококков* и *лактобацилл* определялось количественной ПЦР по методу, описанному Мальдонадо-Лобон и соавт.,<sup>14</sup> за исключением общего температурного профиля для амплификации – в этом случае температура составляла 95°C в течение 5 минут с последующими 40 циклами 95°C в течение 30 секунд и 65°C в течение 60 секунд и конечной кривой плавления от 55 до 95°C.

Для обнаружения *L. fermentum* образцы грудного молока (250-500 мкл) использовали как инокулят для обогатительного культивирования *Lactobacillus* на трех разных бульонных средах (15 мл): M.R.S. («Оксоид») с ванкомицином (100 мкг/мл; «Сигма-Алдрич»); M.R.S. с коррекцией pH до 4,5 и бульон Рогозы. После 24-48 часов бескислородной инкубации при 37°C 100 мкл жидких культур распределяли на соответствующем эквивалентом агаре, за исключением культур со среды M.R.S. с pH 4,5, которые распределяли на агаре LAMVAB. Чашки Петри инкубировали в течение 48 часов при 37°C в бескислородной атмосфере («АнаэроДжен», «Оксоид»). Колонии с характерной для *Lactobacillus* морфологией были отобраны и идентифицированы с помощью масс-спектрометрии MALDI-TOF («Брюкер Байотайпер»). Вкратце, небольшое количество биомассы переносили из отобранных колоний на 96-точечный планшет, затем на каждый образец добавляли 1 мкл матричного раствора (2-циано-3-(4-гидроксифенил) акриловая кислота) и высушивали планшет при комнатной температуре 10-15 минут. В ходе анализов *L. fermentum* СЕСТ 5716 использовали как положительный контроль, а точную идентификацию на уровне вида предполагали тогда, когда контроль и образцы давали результат больше или равный 2,2.

#### *Количественное определение интерлейкина-8 в грудном молоке*

Концентрации интерлейкина (ИЛ)-8 в образцах грудного молока измерялись с помощью наборов для количественного ИФА согласно инструкциям производителя («Бетил», Монтгомери, Техас и «Дайклон», Франция).

#### *Статистический анализ*

Для непрерывных исходов статистические тесты различий в эффекте вмешательства (на визит) проводились с использованием параметрических (*t*-критерий, если допускалось нормальное распределение) и непараметрических (*U*-критерий Манна-Уитни и бутстраповские доверительные интервалы, если нормальное распределение не допускалось) критериев.

Для основного исхода у матерей, диагноза мастита, подсчитывали общее число случаев за время исследования и получали частоту возникновения. Для категориальных исходов (на визит) использовали критерий хи-квадрат для бинарных или категориальных ответов. Наконец, с помощью более робастного и точного анализа путем статистического моделирования оценивался эффект вмешательства с учетом соответствующих ковариат в исследовании.

Модели, примененные к данным, были линейными смешанными моделями для непрерывных данных при нормальном распределении остатков, ординальными смешанными моделями, когда данные были связаны с категориями числа частот в день, неделю или месяц или с любым типом переменной с возрастающим или убывающим

порядком для определенных категорий, и логистическими смешанными моделями, когда анализируемый исход был бинарным ответом. Для рассмотрения различий в числе диагностированных случаев мастита использовали модель регрессии Пуассона.

Тесты проводились при двустороннем 5 % уровне значимости, и для оценок были получены 95 % доверительные интервалы.

Статистический анализ проводился с помощью программного обеспечения «SPSS» версии 19 и «R» версии 3.1.

## Результаты

### Участники

Набор в исследование начался в августе 2013 года и закончился в апреле 2015 года. Вмешательство было завершено в июле 2015 года.

Схема распределения участников исследования представлена на Рисунке 1. В исследование были включены шестьсот двадцать пять женщин. Женщины были рандомизированы и получали вмешательство (322 в контрольной группе и 303 в группе пробиотика). Триста тридцать четыре женщины прекратили вмешательство из-за причин, указанных на Рисунке 1. Четыреста двадцать пять женщин завершили 1-месячный курс вмешательства (221 в контрольной группе и 203 в группе пробиотика), 359 завершили 2-месячный курс (186 в контрольной группе и 173 в группе пробиотика), и 309 завершили 3-месячный курс (165 в контрольной группе и 144 в группе пробиотика). Наконец, 291 женщина (152 в контрольной группе и 139 в группе пробиотика) завершили 16-недельный курс вмешательства. Данные этих женщин (291) были включены в анализ основных исходов у матерей и частоты возникновения мастита в первые 4 месяца грудного вскармливания. Для ежемесячной оценки симптомов при анализе учитывались все доступные данные.

Значимых различий между исходными характеристиками женщин в двух группах обнаружено не было (Таблица 1). Уровни образования и место жительства (центр города, окраины, пригороды, сельская местность) женщин в группах были схожими ( $p = 0,446$  и  $p = 0,216$  соответственно).

Участниц просили заполнить опросник об их диете при наборе и в конце периода исследования. Несмотря на обнаружение некоторых различий между началом исследования и конечной точкой, значимых различий между обеими группами найдено не было (данные не представлены). Следовательно, значимые эффекты в отношении исходов нельзя связать с различиями в пищевых привычках участниц.



**РИС. 1.** Схема распределения участников. (1) Причины: решение матери, получение недостаточного количества молока, мастит. (2) Причины: проблемы со стороны желудочно-кишечного тракта у детей, сыпь у матерей.

### Частота возникновения мастита

В группе пробиотика случаи мастита отмечались у шестнадцати женщин в сравнении

с 30 в контрольной группе. Общее число случаев в каждой группе в ходе исследования получали, исходя из случаев диагностики мастита в каждом месяце. В ходе вмешательства у участниц исследования было диагностировано 58 случаев мастита (частота возникновения 0,199). Частота возникновения мастита в группе пробиотика была значительно меньшей, чем в контрольной группе (ЧВ = 0,130 в группе пробиотика и ЧВ = 0,263 в контрольной группе;  $p = 0,021$ ) (Таблица 2). Таким образом, пероральный прием *L. fermentum* СЕСТ5716 в период лактации снизил частоту возникновения клинического мастита на 51 %.

#### Частота симптомов, связанных с маститом

Также анализировались данные о частоте возникновения различных симптомов, связанных с маститом. Значения частот возникновения разных симптомов были ниже в группе пробиотика (диапазон снижения: 16-42 %), достигая статистической значимости для присутствия зон тепла в молочных железах ( $p = 0,024$ ). Наиболее частым симптомом была боль в молочных железах. Распределение ответов со стороны боли в молочных железах в первый месяц кормления свидетельствует о большей доле женщин с болью в контрольной группе по сравнению с группой пробиотика (43 и 33 %;  $p = 0,033$ ). Шансы столкнуться с болью в молочных железах в группе пробиотика были значительно ниже шансов в контрольной группе (ОШ = 0,65; 95 % ДИ 0,44-0,97). В частности, шансы боли в молочных железах в контрольной группе в 1,5 раза превышают шансы боли в группе пробиотика. Процентная доля женщин с болью в молочных железах снижалась с течением времени, и на четвертом месяце лишь 6,5 % женщин в группе пробиотика сообщали о боли в сравнении с 9,2 % в контрольной группе ( $p = 0,515$ ). Что касается интенсивности боли в молочных железах, значительное общее снижение в ходе исследования наблюдалось в обеих группах. Хотя средние оценки интенсивности боли и были низкими, между группами было обнаружено небольшое различие в интенсивности боли в течение первого месяца кормления (2,92 в контрольной группе и 2,55 в группе пробиотика;  $p = 0,05$ ).

ТАБЛИЦА 1. ИСХОДНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ УЧАСТНИКОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

	Контрольная группа ( $n = 322$ )	Группа пробиотика ( $n = 303$ )	$p/\chi^2$ - квадрат
Возраст матери (средний $\pm$ СО), лет	32,19 $\pm$ 4,8	31,91 $\pm$ 4,9	0,487
Кесарево сечение, $n$ (%)	101 (31,4)	105 (34,7)	0,422
Повторнородящие, $n$ (%)	133 (41,3)	113 (37,3)	0,777
Случаи мастита в анамнезе повторнородящих, $n$ (%)	23 (17,3)	13 (11,5)	0,126
Использование пустышки, $n$ (%)	98 (30,5)	94 (31,2)	0,862
Смешанное вскармливание, $n$ (%) <sup>a</sup>	159 (49,4)	164 (54,3)	0,419
Трудности с сосанием, $n$ (%)	94 (29,2)	80 (26,4)	0,419
Число ежедневных кормлений, среднее $\pm$ СО	9,03 $\pm$ 3,0	9,09 $\pm$ 2,6	0,655
Курение на момент набора, $n$ (%)	29 (9,0)	34 (11,2)	0,344

<sup>a</sup>Число и процентная доля детей, получавших молочную смесь и грудное молоко до начала вмешательства.

ТАБЛИЦА 2. ВОЗНИКНОВЕНИЕ МАСТИТА В ПЕРВЫЕ 4 МЕСЯЦА ГРУДНОГО ВСКАРМЛИВАНИЯ

Диагноз мастита	Контрольная группа (n = 152)			Группа пробиотика (n = 139)			ОЧВ	СОШ	Снижение ЧВ (%)	ЧБНЛ	Значение p ОЧВ
	Явления	ЧВ	СОШ	Явления	ЧВ	СОШ					
	40	0,263	0,042	18	0,130	0,031	2,018	1,328	50,6	8	0,021
	Женщины, у которых развился мастит		Шанс	Женщины, у которых развился мастит		Шанс	Отношение шансов (пробиотик/контроль)			ЧБНЛ	p
	30	0,245		16	0,130		0,531			12	0,058

ЧВ, частота возникновения; ОЧВ, отношение частоты возникновения; ЧБНЛ, число больных, которых необходимо лечить; СОШ, стандартная ошибка.

Число бактерий

Бактериальная нагрузка оценивалась в образцах молока женщин в конце вмешательства и в случае мастита (Таблица 3). Среди здоровых женщин в грудном молоке в группе пробиотика отмечался меньший уровень *Staphylococcus*, чем в молоке женщин в контрольной группе (-48 %;  $p = 0,013$ ). При взятии образцов грудного молока в случаях мастита меньший уровень *стафилококковой* нагрузки также наблюдался в образцах женщин в группе пробиотика, а не в контрольной группе (-58 %;  $p = 0,065$ ). Значимые различия были обнаружены в *стрептококковой* и *стафилококковой* нагрузках – в среднем, меньшие значения отмечались у женщин без мастита. Больше число *стафилококков* или *стрептококков* связано с риском мастита [отношение шансов для *стафилококков* составляет 1,961 (95 % ДИ 1,272-3,025),  $p = 0,002$ ; отношение шансов для *стрептококков* составляет 1,687 (95 % ДИ 1,049-2,714),  $p = 0,031$ ].

Значимых различий в числе *Lactobacillus*, аэробов и анаэробов не наблюдалось.

В конце вмешательства образцы грудного молока культивировали на селективной среде для роста бактерий видов *Lactobacillus*. Вид *L. fermentum* обнаруживался в грудном молоке 23,6 % женщин в группе пробиотика и 14,6 % женщин в контрольной группе.

ТАБЛИЦА 3. ЧИСЛО БАКТЕРИЙ И КОНЦЕНТРАЦИЯ ИНТЕРЛЕЙКИНА-8 В ГРУДНОМ МОЛОКЕ ЗДОРОВЫХ ЖЕНЩИН В КОНЦЕ ВМЕШАТЕЛЬСТВА (4 МЕСЯЦА) И В СЛУЧАЕ МАСТИТА

	Группа (контроль группа, n = 123; группа пробиотика n = 126)	Здоровые	95 % доверительный интервал (нижний-верхний уровень)		Значение в контроле в сравнении с пробиотиком	Мастит <sup>a</sup> (контроль группа, n = 49; группа пробиотика, n = 26)		Значение в сравнении со страдавшими от мастита
			95 % доверительный интервал	Значение в контроле в сравнении с пробиотиком		95 % доверительный интервал	Значение в контроле в сравнении с пробиотиком	
<i>Staphylococcus</i>	Контроль	4,264 ± 0,72	4,100-4,420	0,013	4,642 ± 0,89	4,320-4,964	0,065	0,030
	Пробиотик	3,983 ± 0,69	3,831-4,138		4,270 ± 0,57	4,025-4,515		0,080
<i>Streptococcus</i>	Контроль	4,948 ± 0,75	4,769-5,127	0,147	5,139 ± 0,803	4,867-5,411	0,647	0,114
	Пробиотик	4,765 ± 0,65	4,616-4,929		5,501 ± 0,65	4,788-5,313		0,068
Аэробы	Контроль	4,314 ± 1,34	4,073-4,560	0,763	4,209 ± 1,19	3,763-4,654	0,488	0,637
	Пробиотик	4,263 ± 1,25	4,051-4,508		3,996 ± 0,86	3,607-4,386		0,265
Анаэробы	Контроль	4,205 ± 1,25	3,994-4,434	0,326	4,266 ± 1,20	3,820-4,712	0,334	0,975
	Пробиотик	4,050 ± 0,97	3,892-4,222		3,966 ± 0,89	3,560-4,372		0,789
<i>Lactobacillus</i>	Контроль	2,925 ±	2,717-3,191	0,486	2,976 ±	2,665-3,287	0,529	0,718

<i>ис</i>		0,68			0,72			
	Пробиоти	3,050 ±	2,869-3,300		2,846 ±	2,746-2,946		0,202
	к	0,64			0,17			
ИЛ-8	Контроль	1,84 ±	1,757-1,910	0,958	2,437 ±	2,177-2,697	0,037	<0,001
		0,42			0,46			
	Пробиоти	1,84 ±	1,775-1,890		2,074 ±	1,870-2,279		0,034
	к	0,33			0,68			

Число бактерий представлено в виде среднего  $\log_{10}$  КОЕ/мл молока — стандартное отклонение. ИЛ-8 представлен в виде среднего  $\log_{10}$  пг/мл молока — стандартное отклонение.

<sup>a</sup>Образцы грудного молока, взятые у матерей, страдавших от мастита в ходе исследования.

ИЛ, интерлейкин.

### Воспалительный маркер в грудном молоке (ИЛ-8)

Концентрация ИЛ-8 в молоке измерялась в образцах в конце вмешательства и в случае мастита (Таблица 3). У здоровых женщин в группе пробиотика и контрольной группе значимых различий в уровнях ИЛ-8 не наблюдалось. Однако, уровень ИЛ-8 в грудном молоке женщин, страдавших маститом, был значительно выше, чем в грудном молоке здоровых женщин. В этих случаях мастита женщины, получавшие штамм пробиотика, показывали значительно меньшую концентрацию ИЛ-8 в грудном молоке, чем женщины в контрольной группе ( $p = 0,037$ ).

Была обнаружена общая связь *стафилококков* с ИЛ-8, что означает, что при росте бактериальной нагрузки на единицу концентрация ИЛ-8 значимо повышается в 0,147 единицы ( $p < 0,001$ ). Шансы возникновения мастита пятикратно возрастали с единицей увеличения концентрации ИЛ-8 [отношение шансов = 5,502 (95 % ДИ 2,904-10,425),  $p = 0,000$ ].

### Фармакологические вмешательства

В группе пробиотика антибиотики принимали четыре женщины (2,9 %), а в контрольной группе – восемь женщин (5,3 %); однако различие не было статистически значимым ( $p = 0,308$ ). Употребление анальгетиков было меньшим в группе пробиотика, но различия между группами не были статистически значимыми. Значимое различие между группами обнаруживается в течение третьего месяца вмешательства, когда процентная доля приема анальгетиков в связи с симптомами со стороны молочных желез ниже в группе пробиотика [11 женщин в контрольной группе (6,7 %) и отсутствие приема в группе пробиотика в этом периоде (0 %;  $p = 0,001$ )]. Использование местных средств в связи с трещинами сосков (помады с ланолином) отмечалось, по большей части, в первый месяц кормления (4,7 % женщин использовали это средство). Однако применение местных средств было менее частым в группе пробиотика [13 женщин в контрольной группе (6 %) и 4 женщины в группе пробиотика (2 %;  $p = 0,048$ )].

### Обсуждение

*Стафилококки* считаются основным этиологическим агентом мастита.<sup>6,9,10</sup> Высокое число *стафилококков* в грудном молоке связано с маститом и болезненным кормлением.<sup>14,21</sup> Предшествующие исследования показали способность *L. fermentum* СЕСТ5716 снижать *стафилококковую* нагрузку в грудном молоке женщин с маститом и болью при кормлении.<sup>13,14</sup> Результаты этого исследования показывают, что прием *L. fermentum* СЕСТ5716 в период лактации значительно снижает частоту возникновения мастита – на 51 %. 24,6 % женщин в контрольной группе страдали маститом. Данные по частоте возникновения мастита очень различаются.<sup>9</sup> Это может быть связано с различиями в диагностических критериях. Частота возникновения мастита в исследованиях приема *L. fermentum*, в которых применялись те же диагностические критерии, была немного ниже, между 13 и 20 %.<sup>10,11,20</sup> Ранее сообщалось, что антибиотикотерапия в родах значительно чаще назначалась женщинам, сообщавшим о мастите (ОШ 1,53).<sup>22</sup> Эти данные могут объяснять несколько большую частоту возникновения в исследовании *L. fermentum*, так как в него включали женщин,



получавших антибиотикопрофилактику при родах. Касательно эффективности пробиотических штаммов в профилактике мастита, Фернандес и соавт.<sup>11</sup> оценили эффективность пробиотического штамма, *Lactobacillus salivarius* PS2, в профилактике мастита. Они наблюдали схожее снижение частоты возникновения мастита в первые 3 месяца кормления (56 %) при приеме пробиотика. Хотя снижение частоты было схожим с таковым в исследовании *L. fermentum*, имеются важные различия в протоколах, помимо разных оценивавшихся видов *Lactobacillus*. К примеру, в исследовании Фернандес *L. salivarius* назначали в последние 10 недель беременности но прием пробиотика не продолжался в период лактации. В исследовании *L. fermentum*, в котором пробиотический штамм применялся в период лактации, большинство эпизодов мастита возникали в первые 4 недели после родов. В новых исследованиях следует оценить, помогает ли назначение *L. fermentum* за несколько недель до родов более эффективно предотвращать ранние эпизоды мастита.

Боль в молочных железах была довольно частой преимущественно в первый месяц, но в большинстве случаев не была связана с клиническим маститом. Прием *L. fermentum* снижал шансы столкнуться с болью и ее интенсивность. Фактически, у женщин с маститом уровень ИЛ-8 – цитокина, непосредственно связанного с болью,<sup>23</sup> – был значительно ниже в группе пробиотика. Уровни ИЛ-8 в грудном молоке также были напрямую связаны со *стафилококковой* нагрузкой в нем. Эта связь также наблюдалась в предыдущем исследовании среди женщин, испытывавших боль при кормлении.<sup>14</sup> ИЛ-8 считается индикатором мастита,<sup>9,24</sup> а значит, снижение у женщин с маститом в группе пробиотика также свидетельствует о меньшем воспалении и меньшей тяжести мастита.

Уровни *Staphylococcus* в молоке были значительно ниже у женщин, получавших *L. fermentum* СЕСТ5716. Поскольку высокий уровень *Staphylococcus* – фактор риска лактационного мастита, снижение числа этих бактерий может объяснять наблюдаемое снижение частоты возникновения мастита. Фактически, хотя в молоке женщин, страдавших маститом в ходе исследования, отмечался более высокий уровень *Staphylococcus*, в группе пробиотика наблюдалась тенденция к меньшему уровню.

Механизм, за счет которого *L. fermentum* СЕСТ5716 снижает *стафилококковую* нагрузку в грудном молоке, не до конца ясен, хотя возможно участие различных активностей пробиотического штамма. В анализах *L. fermentum* СЕСТ5716 *in vitro* описывались антибактериальная активность или феномен конкуренции.<sup>16</sup> Однако, хотя *L. fermentum* у женщин в группе пробиотика обнаруживали на 61 % чаще, чем у женщин в контрольной группе, мы не смогли наблюдать значимого присутствия штамма в грудном молоке в конце вмешательства. Таким образом, есть вероятность, что местная активность в молочной железе не является основным компонентом активности. Другие авторы предположили, что метаболиты с антибактериальными свойствами, вырабатываемые пробиотическими штаммами, могут достигать молочных желез и влиять на выживаемость или вирулентность *стафилококков*.<sup>11</sup> *L. fermentum* продемонстрировал *in vitro* способность ингибировать рост *стафилококков* при диффузии в агар, доказывая выработку необнаруженных антибактериальных соединений.<sup>16</sup> Напротив, *L. fermentum* СЕСТ5716 продемонстрировал иммуномодулирующую активность за счет повышения уровня иммуноглобулинов и цитокинов Th1, таких как фактор некроза опухоли (ФНО)- $\alpha$  и ИЛ-12.<sup>18</sup> *Стафилококки* имеют механизм, позволяющий избегать фагоцитоза, основной клеточной защиты молочных желез против патогенов.<sup>25</sup> В моделях на животных *L. fermentum* СЕСТ5716 повышала фагоцитарную активность циркулирующих в крови лейкоцитов. Этот тип активности у людей может помочь предотвратить пролиферацию *стафилококков* в молочной железе.<sup>17</sup>

Ограничение этого исследования – высокий уровень выбывания из него. Несмотря на то, что в исследование включали женщин с твердым намерением кормить грудью первые 4 месяца, около 25 % женщин прекратили грудное вскармливание во время

вмешательства. В Испании, где проводилось это исследование, согласно данным Национального института статистики, распространенность грудного вскармливания на третьем месяце лактации составляет 53,5 %.<sup>26</sup> Большинство случаев выбывания имели место в первый месяц исследования. Женщины сообщали, что были слишком заняты своими детьми, чтобы участвовать в исследовании. Несмотря на то, что число женщин, завершивших исследование, было значительно ниже запланированного, исследование сохраняет достаточную статистическую мощность. Это объясняется наблюдавшейся высокой частотой возникновения мастита и большой разницей в частоте между группами.

Другим ограничением исследования была популяция. Для наблюдения более высокой частоты возникновения включались лишь женщины, получавшие антибиотикопрофилактику. В еще одном недавнем исследовании другого пробиотического штамма, *L. salivarius* PS2, отбиралась группа с маститом в анамнезе.<sup>11</sup> В этом исследовании снижение частоты возникновения мастита в группе пробиотика было схожим с таковым в нашем исследовании. Таким образом, несмотря на то, что следует провести больше исследований в общей популяции, способность отдельных пробиотических штаммов защищать от мастита, судя по всему, не зависит от этих факторов риска.

Помимо того, что это исследование было двойным слепым рандомизированным плацебо-контролируемым, его сильной стороной является и то, что в рамках одного исследования оценивались частота возникновения заболевания, его факторы риска и параметры, свидетельствующие о его тяжести.

Исключительно грудное вскармливание в первые 6 месяцев рекомендовано ВОЗ, поскольку грудное молоко обеспечивает ребенка всеми питательными веществами и элементами, необходимыми для нормального развития и роста.<sup>27</sup> Мастит – важная проблема, касающаяся здоровья большой доли женщин в период лактации. Эта проблема непосредственно влияет не только на здоровье матерей, но и на детей, поскольку мастит затрудняет нормальное кормление грудью, а в некоторых случаях может приводить и к его прекращению. Помимо этого, симптомы мастита влияют на отношения матери и ребенка, поскольку симптомы боли, связанной с маститом, могут вызывать тревогу и раздраженность из-за проблем при кормлении грудью.<sup>14</sup> На данный момент для профилактики мастита рекомендуется надлежащая организация грудного вскармливания.<sup>9</sup> Результаты этого исследования показывают, что прием *L. fermentum* СЕСТ5716 может быть новой эффективной стратегией профилактики лактационного мастита.

### **Благодарности**

Анализы MALDI-TOF были возможны с помощью и содействием д-ра Федерико Гарсия и персонал Отделения микробиологии Университетской больницы Сан-Сесильо, Гранада, Испания. Авторы хотят поблагодарить Лленалию Гарсию Фернандес («SEPLIN, Soluciones Estadísticas» - Гранада, Испания) за помощь в статистическом анализе данных в этом исследовании. Исследование финансировалось Правительством Андалусии и софинансировалось Европейским фондом регионального развития в рамках андалусского гранта в области глобальных инноваций, технологий и предпринимательства 2007-2013 годов.

Членами группы «PROLAC» являются: О. Бануэлос, «Biosearch Life», Гранада, Испания; С. Райт, Университетская больница им. Мигеля Сервета, Сарагоса, Испания; С. Луна, Университетская больница Вирген Макарена, Севилья, Испания; М.К. Диаз-Фаура, Университетская больница Вирген де ла Арриксака, Мурсия, Испания; М.П. Вентура, Университетская клиника Лозано Блеса, Сарагоса, Испания; Л. Серрано-Лопес, Больница матери и ребенка Университетского клинического центра, Гранада, Испания; М. Гил-Кампос, Больница Рейна София, Кордова, Испания; Э. Нарбона, Школа

медицины, Университет Гранады, Гранада, Испания; С. Фуэнтес-Гутьеррес, Общая университетская больница Санта Люсия, Картахена, Мурсия, Испания; А. Иглесиас-Деус, Университетский клинический центр, Сантьяго-де-Компостела, Ла-Корунья, Испания; Э.Н. Родиллья, Университетская клиника, Саламанка, Испания; К. Родригес, «Biosearch Life», Гранада, Испания; А.Д. Валеро, «Biosearch Life», Гранада, Испания; А. Санудо, «Biosearch Life», Гранада, Испания.

#### Заявление о раскрытии интересов

Х.А.М.-Л., М.П.Д.-Р., М.О., Ю.Ф., О.Б., К.Р., А.Д.В. и А.С. являются сотрудниками «Biosearch Life», владельца патента на *Lactobacillus fermentum* СЕСТ5716.

#### Список литературы

1. Schwiertz A. Microbiota of the human body: Implications in health and disease. *Preface Adv Exp Med Biol* 2016; 902:V.
2. Sanchez B, Delgado S, Blanco-Miguez A, et al. Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease. *Mol Nutr Food Res* 2016; DOI: 10.1002/mnfr.201600240.
3. Vandenas Y, Huys G, Daube G. Probiotics: An update. *J Pediatr (Rio J)* 2015;91:6-21.
4. Martin R, Langa S, Reviriego C, et al. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *J Pediatr* 2003;143:754-758.
5. Heikkila MP, Saris PEJ. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. *J Appl Microbiol* 2003;95:471-478.
6. Delgado S, Arroyo R, Martin R, et al. PCR-DGGE assessment of the bacterial diversity of breast milk in women with lactational infectious mastitis. *BMC Infect Dis* 2008; 8:51.
7. Contreras GA, Rodriguez JM. Mastitis: Comparative etiology and epidemiology. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2011;16:339-356.
8. Fernandez L, Arroyo R, Espinosa I, et al. Probiotics for human lactational mastitis. *Benef Microbes* 2014;5:169- 183.
9. World Health Organization. Mastitis: Causes and Management. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2000.
10. Cullinane M, Amir LH, Donath SM, et al. Determinants of mastitis in women in the CASTLE study: A cohort study. *BMC Fam Pract* 2015;16:181.
11. Fernandez L, Cárdenas N, Arroyo R, et al. Prevention of infectious mastitis by oral administration of *Lactobacillus salivarius* PS2 during late pregnancy. *Clin Infect Dis* 2016; 62:568-573.
12. Jimenez E, Fernandez L, Maldonado A, et al. Oral administration of *Lactobacillus* strains isolated from breast milk as an alternative for the treatment of infectious mastitis during lactation. *Appl Environ Microbiol* 2008;74: 4650-4655.
13. Arroyo R, Martin V, Maldonado A, et al. Treatment of infectious mastitis during lactation: Antibiotics versus oral administration of Lactobacilli isolated from breast milk. *Clin Infect Dis* 2010;50:1551-1558.
14. Maldonado-Lobon JA, Diaz-Lopez MA, Carputo R, et al. *Lactobacillus fermentum* СЕСТ 5716 reduces *Staphylococcus* load in the breastmilk of lactating mothers suffering breast pain: A randomized controlled trial. *Breastfeed Med* 2015;10:425-432.
15. Martin R, Olivares M, Marin ML, et al. Probiotic potential of 3 lactobacilli strains isolated from human breast milk. *J Hum Lact* 2005;21:8-17.
16. Olivares M, Diaz-Ropero MP, Martin R, et al. Anti-microbial potential of four *Lactobacillus* strains isolated from breast milk. *J Appl Microbiol* 2006;101:72-79.
17. Diaz-Ropero MP, Martin R, Sierra S, et al. Two *Lactobacillus* strains, isolated from breast milk, differently modulate the immune response. *J Appl Microbiol* 2007;102: 337-343.
18. Olivares M, Diaz-Ropero MP, Sierra S, et al. Oral intake of *Lactobacillus fermentum* СЕСТ5716 enhances the effects of influenza vaccination. *Nutrition* 2007;23:254-260.
19. Maldonado J, Cañabate F, Sempere L, et al. Human milk probiotic *Lactobacillus*

- fermentum* CECT5716 reduces the incidence of gastrointestinal and respiratory infections in infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2012;54: 55-61.
20. Amir LH, Forster DA, Lumley J, et al. A descriptive study of mastitis in Australian breastfeeding women: Incidence and determinants. *BMC Public Health* 2007;7:62.
  21. Delgado S, Arroyo R, Jimeinez E, et al. *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from breast milk of women suffering infectious mastitis: Potential virulence traits and resistance to antibiotics. *BMC Microbiol* 2009;9:82.
  22. Mediano P, Fernandez L, Rodriguez JM, et al. Case-control study of risk factors for infectious mastitis in Spanish breast-feeding women. *BMC Pregnancy Childbirth* 2014;14:195.
  23. Cunha TM, Verri WA, Jr., Silva JS, et al. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:1755- 1760.
  24. Hunt KM, Williams JE, Shafii B, et al. Mastitis is associated with increased free fatty acids, somatic cell count, and interleukin-8 concentrations in human milk. *Breastfeed Med* 2013;8:105-110.
  25. Avall-Jaaskelainen S, Koort J, Simojoki H, et al. Bovine- associated CNS species resist phagocytosis differently. *BMC Vet Res* 2013;9:227.
  26. Informe anual del Sistema Nacional de Salud 2012. Edicion revisada. Junio de 2015. Available at [www.msssi.gob.es/ estad Estudios/estadisticas/sisInfSanSNS/ tablasEstadisticas/ infsns 2012.pdf](http://www.msssi.gob.es/estadEstudios/estadisticas/sisInfSanSNS/tablasEstadisticas/ infsns 2012.pdf) (accessed October 2016).
  27. Kramer MS, Kakuma R. The Optimal Duration of Exclusive Breastfeeding: A Systematic Review. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2002.

Адрес для корреспонденции:  
Юристо Фонолла, д-р философии  
Исследовательское подразделение  
«Biosearch Life»  
Камино де Пурчиль 66  
18004 Гранада  
Испания

Электронная почта: [juristo.fonollajoya@biosearchlife.com](mailto:juristo.fonollajoya@biosearchlife.com)