

## ***Lactobacillus fermentum* СЕСТ 5716 снижает стафилококковую нагрузку в грудном молоке кормящих женщин, испытывающих боль в молочных железах: рандомизированное контролируемое испытание**

Jose A. Maldonado-Lobón,<sup>1,2</sup> Miguel A. Díaz-López,<sup>3</sup> Raffaele Carputo,<sup>3</sup> Pilar Duarte,<sup>3</sup> María Paz Díaz-Ropero,<sup>1</sup> Antonio D. Valero,<sup>1</sup> Ana Sañudo,<sup>1</sup> Lluís Sempere,<sup>1</sup> María Dolores Ruiz-López,<sup>4,5</sup> Óscar Bañuelos,<sup>1</sup> Juristo Fonollá,<sup>1</sup> и Mónica Olivares Martín<sup>1</sup>

### **Аннотация**

**Введение:** Недавно полученные результаты свидетельствуют о том, что мастит и болезненность при грудном вскармливании могут характеризоваться бактериальным дисбиозом молочных желез – процессом, при котором популяция возможных патогенов растет за счет нормальной микробиоты молочных желез. Целью данного исследования является оценка применения трех разных доз *Lactobacillus fermentum* СЕСТ5716 для снижения стафилококковой нагрузки в грудном молоке женщин, испытывающих болезненность при кормлении.

**Материалы и методы:** Было проведено двойное слепое рандомизированное контролируемое исследование с четырьмя группами. Три группы получали штамм пробиотика в течение 3 недель в дозах 3 x 10<sup>9</sup> колониеобразующих единиц (КОЕ)/сут, 6 x 10<sup>9</sup> КОЕ/сут или 9 x 10<sup>9</sup> КОЕ/сут. Четвертая группа получала плацебо – мальтодекстрин. Основным исходом в исследовании было число стафилококков в грудном молоке. Вторичными исходами были число *Streptococcus*, *Lactobacillus* и общее бактериальное число в грудном молоке, концентрации иммуноглобулина А и интерлейкина 8 в грудном молоке и оценка боли в молочных железах.

**Результаты:** В конце исследования в группах пробиотика наблюдалось значимое снижение стафилококковой нагрузки по сравнению с исходной ( $p = 0,045$ ), тогда как в контрольной группе уровни оставались практически неизменными. Между группами трех разных доз пробиотика и контрольной группой отмечались значимые различия в оценке боли ( $p = 0,035$ ,  $p = 0,000$  и  $p = 0,028$  соответственно). Оценка дозозависимого эффекта была невозможной, так как три исследуемые дозы давали схожий эффект, и значимых различий не наблюдалось.

**Выводы:** *L. fermentum* СЕСТ5716 – эффективное средство для лечения боли в молочных железах в период лактации, связанной с высоким уровнем стафилококков в грудном молоке.

### **Введение**

ИСКЛЮЧИТЕЛЬНО ГРУДНОЕ ВСКАРМЛИВАНИЕ в первые 6 месяцев жизни рекомендовано Всемирной организацией здравоохранения<sup>1</sup>, поскольку грудное молоко обеспечивает ребенка всеми питательными веществами и элементами, необходимыми для нормального развития и роста. В первые недели кормления женщины могут особенно часто сталкиваться с рядом проблем, таких как боль в молочных железах и сосках, трещины сосков и мастит. Эти проблемы затрудняют кормление и, в некоторых случаях, приводят к прекращению грудного вскармливания. Мастит действительно является основной медицинской причиной прекращения лактации.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> «Biosearch Life S.A.», Гранада, Испания

<sup>2</sup>Программа аспирантуры по питанию и пищевым технологиям, Университет Гранады, Гранада, Испания.

<sup>3</sup>Клиника Университета Вирген де лас Ньевес, Гранада, Испания.

<sup>4</sup>Отделение питания и броматологии, Университет Гранады, Гранада, Испания.

<sup>5</sup>Институт питания и пищевых технологий, Университет Гранады, Гранада, Испания.

Исследование зарегистрировано на [www.ClinicalTrials.gov](http://www.ClinicalTrials.gov) под регистрационным номером клинического испытания NCT02093338.

Мастит – это воспаление молочной железы, зачастую связанное с лактацией. Частота встречаемости варьирует от 3 до 33 %; заболевание может как сопровождаться инфекцией, так и протекать без нее.<sup>3</sup> Стафилококки считаются наиболее распространенным этиологическим агентом мастита.<sup>2</sup> *Staphylococcus aureus* вызывает, в основном, острый мастит, характеризующийся как местными (покраснение молочной железы, нагрубание и боль), так и системными симптомами. Однако кормящие женщины также могут испытывать местные симптомы, такие как боль в сосках или молочных железах и нагрубание молочных желез, без лихорадки или других системных симптомов. Эти симптомы возникают приблизительно у 10 % всех кормящих женщин и носят название подострого мастита.<sup>2,4</sup> Этот тип мастита обычно вызывается коагулаза-отрицательными стафилококками, преимущественно *Staphylococcus epidermidis*, и другими бактериями, такими как стрептококки, и зачастую неверно диагностируется как «неинфекционный» или «кандидоз молочной железы».<sup>2</sup> Грудное молоко здоровых женщин содержит физиологическую микробиоту, состоящую преимущественно из бактерий родов *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium* и *Enterococcus*.<sup>5,8,9</sup> Недавно полученные результаты свидетельствуют о том, что у человека мастит может характеризоваться бактериальным дисбиозом в молочных железах – процессом, при котором популяция возбудителей мастита растет за счет нормальной микробиоты молочных желез.<sup>2</sup>

Некоторые из молочнокислых бактерий, выделенных из грудного молока здоровых женщин, показывают способность подавлять рост широкого спектра патогенных бактерий путем образования антибактериальных соединений, конкурентной адгезии и коагрегации,<sup>10,11</sup> а также иммуномодуляторных свойств.<sup>12</sup> В предыдущем исследовании было показано, что *Lactobacillus fermentum* СЕСТ5716, пробиотический штамм, ранее выделенный из грудного молока, может использоваться для эффективного лечения мастита за счет снижения числа патогенов в грудном молоке.<sup>13</sup>

Целью данного исследования является оценка применения трех разных доз *L. fermentum* СЕСТ5716 для снижения стафилококковой нагрузки в грудном молоке женщин, испытывающих боль в молочных железах, не связанную с острым маститом.

## Материалы и методы

### Дизайн и протокол исследования

Было проведено двойное слепое рандомизированное контролируемое исследование с четырьмя группами. Отбирались женщины, испытывавшие боль в молочных железах в период лактации. Женщины давали письменное информированное согласие. Критериями включения были женщины, испытывающие болезненность при кормлении, и число бактерий в молоке, составляющее как минимум  $3 \log_{10}$  колониеобразующих единиц (КОЕ)/мл. Критериями исключения были лихорадка, антибиотикотерапия, абсцессы молочных желез, синдром Рейно или любые другие патологии молочных желез. Критериями исключения в ходе исследования были несоблюдение протокола исследования, антибиотикотерапия, нежелательные эффекты или добровольное решение женщины о прекращении участия.

Размер выборки рассчитывался по эффекту в отношении основного исхода, числу бактерий в грудном молоке. Исходя из полученных ранее результатов,<sup>13</sup> дизайн исследования обеспечивал достаточную мощность (80 %) для обнаружения снижения общего числа бактерий в грудном молоке на 1 log после лечения с уровнем значимости 0,05. В каждую из групп необходимо было включить по 20 женщин.

Сто сорок восемь женщин были отобраны и случайным образом распределены по четырем группам с помощью компьютерной программы (SIGESMU®; «Ediciones DiazdeSantos», Мадрид, Испания). Три группы получали штамм пробиотика в течение 3 недель в дозах  $3 \times 10^9$  КОЕ/сут в экспериментальной группе I (ЭГ I),  $6 \times 10^9$  КОЕ/сут в экспериментальной группе II (ЭГ II) и  $9 \times 10^9$  КОЕ/сут в экспериментальной группе III (ЭГ III). Четвертая группа, контрольная (КГ), получала плацебо – мальтодекстрин. Были приготовлены таблетки, содержавшие по  $3 \times 10^9$  КОЕ *L. fermentum* СЕСТ5716 или мальтодекстрин. В ЭГ I принимали по одной таблетке пробиотика в сутки во время еды, в ЭГ II – по две таблетки пробиотика (по одной таблетке каждые 12 часов во время еды), в ЭГ III – по три таблетки пробиотика (во время завтрака, ланча

и обеда), а в КГ принимали по три таблетки плацебо (во время завтрака, ланча и обеда). Пробиотик был представлен в форме идентичных белых плоских таблеток с кодом, обозначающим номер произведенной серии. В течение всего исследования таблетки хранились при 4°C. Концентрация жизнеспособных лактобацилл в таблетках пробиотика была стабильной на протяжении всего исследования.

Данное исследование проводилось в соответствии с Хельсинкской декларацией; протокол был одобрен Региональным этическим комитетом Андалусской системы здравоохранения в Севилье (Испания).

#### *Исходы в исследовании и сбор данных*

Основным исходом в исследовании было число стафилококков в грудном молоке. Вторичными исходами были число *Streptococcus*, *Lactobacillus* и общее бактериальное число в грудном молоке, концентрации иммуноглобулина А (IgA) и интерлейкина 8 (ИЛ-8) в грудном молоке и оценка боли в молочных железах.

Взятие образцов грудного молока производилось после 0, 1, 2 и 3 недель лечения. Перед взятием образцов грудного молока сосок и ареола мылись водой с мылом и обрабатывались антибактериальным раствором (хлоргексидина). Образцы грудного молока получали посредством ручного выделения; после получения первых капель образцы молока собирали в стерильные пробирки. Образцы хранились при -20°C и обрабатывались в течение 1 недели.

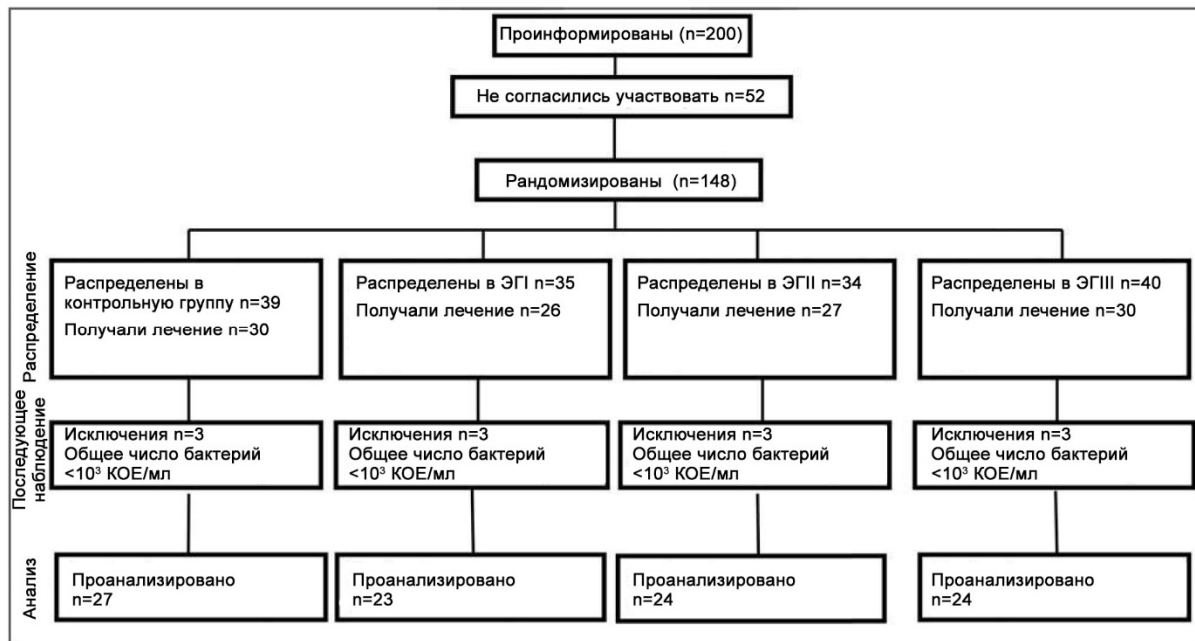
В начале и в конце вмешательства женщины заполняли опросник частоты потребления различных пищевых продуктов.

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

Для определения общей концентрации бактерий в грудном молоке соответствующие разведения грудного молока в пептонно-солевом растворе наносились на чашки с агаром РС («Oxoid», Бейсингсток, Великобритания) в четырех экземплярах. Инкубация культур осуществлялась в анаэробных условиях при 37°C в течение 48 часов. После инкубации подсчитывались колонии, выросшие на среде, и рассчитывалось число жизнеспособных микроорганизмов (в КОЕ) в миллилитре молока.

Число стафилококков, стрептококков и лактобацилл измерялось с помощью количественной полимеразной цепной реакции. Для выделения бактериальной ДНК использовался набор «E.Z.N.A.® Stool DNA» («Omega Bio-Tek», Норкросс, Джорджия). Вкратце, 0,5 мл 0,5 М ЭДТА Тергитол™ («Dow Chemical Co.», Мидленд, Мичиган) сурфактанта (0,1 % [масса/объем]) добавляли к 1 мл грудного молока, а затем раствор смешивали и инкубировали в течение 10 минут при комнатной температуре. После инкубации образцы центрифугировали при 14 000 g и комнатной температуре в течение 10 минут, надосадочная жидкость и остатки жира полностью удалялись.<sup>14</sup> Бактериальный осадок гомогенизировали с 200 мкл стерильной воды, и каждый образец переносили в пробирки с 200 мг стеклянных шариков для выделения ДНК согласно инструкциям набора «E.Z.N.A. Stool DNA».

Определение ДНК производилось посредством количественной полимеразной цепной реакции с использованием «SYBR® green» в качестве флуорофора («PerfeCTa® SYBR Green SuperMix with ROX™» [«Quanta Biosciences», Гейтерсберг, Мэриленд] для стрептококков и стафилококков и мастер-микс «Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QPCR» [«Agilent Technologies», Санта-Клара, Калифорния] для лактобацилл) и специфичных праймеров для каждой группы.<sup>15-17</sup> Для всех амплификаций использовался следующий температурный профиль: 95°C в течение 5 минут, затем 40 циклов при 95°C по 30 секунд, 55°C в течение 30 секунд и 72°C в течение 35 секунд. Итоговая кривая плавления была получена при 55-95°C. В целях амплификации 2 пл ДНК из каждого образца и бактериальной группы использовали в качестве матрицы в 20 пл итогового объема. Значения C<sub>t</sub> (пороговый цикл) были интерполированы в конкретные калибровочные кривые для расчета концентраций бактерий (в КОЕ/мл).



**РИС. 1.** Поток участниц. ЭГ I, ЭГ II и ЭГ III, три экспериментальные группы, получавшие  $3 \times 10^9$ ,  $6 \times 10^9$  и  $9 \times 10^9$  колониеобразующих единиц (КОЕ)/сут соответственно.

#### *Определение уровней IgA и ИЛ-8 в грудном молоке*

Концентрации IgA и ИЛ-8 в образцах грудного молока определялись с помощью наборов для иммуноферментного анализа согласно инструкциям производителя («Bethyl Laboratories» [Монтгомери, Техас] и «Diacclone» [Безансон, Франция] соответственно).

#### *Опросник для оценки боли*

Эволюция симптомов оценивалась на 0, 1, 2 и 3 неделе лечения. Женщин просили оценить боль в молочных железах по шкале от 1 (крайне сильная боль) до 10 (отсутствие боли). Использовался адаптированный опросник боли МакГилла<sup>18</sup>, одобренный в Испании.<sup>19</sup> В опроснике интенсивность боли оценивается по четырем аспектам: сенсорному, аффективному, текущей интенсивности и оценочному аспекту. В результате сложения значений дескрипторов в опроснике получают оценки. 1 балл присваивался, если участница описывала боль, и 0, если участница не сообщала о боли этого типа. Таким образом, сенсорный аспект интенсивности оценивается по шкале от 0 до 33, поскольку в опроснике содержится 33 дескриптора. Аффективный аспект оценивается по шкале от 0 до 19, а текущая интенсивность и оценочный аспект – по шкале от 0 до 6 и 5 соответственно.

#### *Статистический анализ*

Вначале для статистической оценки различий в эффектах лечения применялись параметрические (дисперсионный анализ) и непараметрические (Крускала-Уоллиса) критерии (в зависимости от предположений), если данные были непрерывными, или критерий хи-квадрат в случае двоичных или категориальных ответов. Затем с помощью более робастного и точного анализа путем статистического моделирования производилась оценка эффекта лечения с коррекцией по времени и ковариатам, указанным выше. Более того, исследовалась связь биохимических параметров с оценками боли путем включения этих параметров в качестве ковариат при моделировании исходов, связанных с болью. В случае нормального распределения остатков использовались смешанные линейные модели<sup>20</sup> для непрерывных данных; для данных о числе наблюдавшихся явлений применялись смешанные модели Пуассона, а при анализе двоичных ответов – смешанные логистические модели.<sup>21</sup> Тесты производились с двусторонним уровнем значимости 5 %, для значений были получены 95 %-ные доверительные интервалы. Для проведения анализа использовалось статистическое

программное обеспечение «SPSS» версии 19 («IBM», Армонк, Нью-Йорк) и «R» версии 3.0 (<http://www.R-project.org/>).

Таблица 1. Исходные характеристики участниц исследования

	<i>Контрольная группа</i>	<i>ЭГ1</i>	<i>ЭГ2</i>	<i>ЭГ3</i>	<i>Значение p</i>
Возраст матери (лет)	33,4 ± 4,5	33,3 ± 5,2	34,3 ± 4,3	36,0 ± 2,8	0,102 <sup>a</sup>
Кесарево сечение (%)	32,0	25,0	12,5	20,8	0,443 <sup>b</sup>
Другие дети (%)	41,7	57,1	37,5	25,0	0,231 <sup>b</sup>
Случаи мастита в анамнезе (%)	38,5	21,7	8,3	16,7	0,063 <sup>b</sup>
Продолжительность вскармливания (дни)	93,1 (56,3-137,7)	54,0 (27,7-87,8)	109,2 (74,0-155,9)	106,2 (59,2-175,7)	0,007 <sup>c</sup>
Смешанное вскармливание (%)	23,1	21,7	25,0	25,0	1,000 <sup>b</sup>
Число дней с болью (дни)	56,6 (23,8-99,4)	36,2 (9,4-75,7)	46,2 (23,1-71,9)	84,7 (30,8-158,7)	0,305 <sup>c</sup>
Предшествующая антибиотикотерапия (%)	4,2	10,5	4,5	4,8	0,806 <sup>b</sup>
Трещины сосков (%)	28,0	47,8	54,2	29,2	0,159 <sup>b</sup>

Данные представлены в виде средних значений ± стандартное отклонение, процентных значений или средних (доверительных интервалов) согласно указанию.

<sup>a</sup>Дисперсионный анализ.

<sup>b</sup>Тест хи-квадрат.

<sup>c</sup>Тест Крускала-Уоллиса.

ЭГ1, ЭГ2 и ЭГ3, три экспериментальные группы, получавшие  $3 \times 10^9$ ,  $6 \times 10^9$  и  $9 \times 10^9$  колониеобразующих единиц/сут соответственно.

## Результаты

### Популяция

Об исследовании были проинформированы двести женщин, однако лишь 148 согласились участвовать и были рандомизированы для включения в исследование. В итоге, 113 женщин (30 в КГ, 26 в ЭГ1, 27 в ЭГ2 и 30 в ЭГ3) получали лечение. Женщины, общее число бактерий в молоке которых составляло  $< 10^3$  КОЕ/мл, были исключены. До завершения 3-недельного лечения 17 женщин прекратили курс по следующим причинам: антибиотикотерапия мастита ( $n = 1$  в КГ, 2 в ЭГ1, 2 в ЭГ2 и 2 в ЭГ3), ощущение недостаточного улучшения ( $n = 2$  в КГ, 2 в ЭГ1 и 1 в ЭГ2), антибиотикотерапия тонзиллита ( $n = 1$  в ЭГ2) или выбывание до наблюдения ( $n = 1$  в КГ, 1 в ЭГ1 и 2 в ЭГ3). Данные по этим женщинам были включены в анализ.

Таким образом, в итоге в анализ были включены данные по 98 женщинам (27 в КГ, 23 в ЭГ1, 24 в ЭГ2 и 24 в ЭГ3). Поток участниц исследования представлен на Рисунке 1. Исходные характеристики женщин во всех группах были схожими, за исключением длительности лактации, которая была значительно ниже в ЭГ1: она составляла примерно половину средней длительности (в днях) в ЭГ2 и ЭГ3 и в среднем на 40 дней отличалась от таковой в КГ (Таблица 1). Связь между лечением и этой ковариатой была включена для анализа при моделировании.

Участниц просили заполнить опросник об их диетах в период исследования. В целом, значимых отличий в отношении диет между группами или между началом и концом исследования не было. Следовательно, значимые эффекты в отношении исходов нельзя связать с различиями в пищевых привычках участниц.

### Число бактерий

В конце вмешательства в ЭГ1 наблюдалось значимое снижение бактериальной нагрузки (0,764) в сравнении с КГ и началом исследования ( $p = 0,011$ ). Результат контрастирует с полученным в КГ, где отмечалось значимое повышение общей бактериальной нагрузки на 21-й день вмешательства (в сравнении с началом исследования) (Таблица 2). Следует отметить, что мы обнаружили связь между длительностью вскармливания (в днях) и бактериальной нагрузкой; с повышением длительности вскармливания бактериальная нагрузка значимо падала ( $p = 0,027$ ).

Помимо этого, уровни ИЛ-8 также были сильно связаны с бактериальной нагрузкой – последняя возрастала со значимым повышением уровня ИЛ-8 ( $p = 0,000$ ).

В конце исследования в экспериментальных группах наблюдалось значимое снижение стафилококковой нагрузки по сравнению с исходной ( $p = 0,045$ ), тогда как в КГ уровни оставались практически неизменными (Таблица 2). Средние значения снижения составляли -1,387 в ЭГ1, -1,736 в ЭГ2 и -0,589 в ЭГ3. Более высокие значения ИЛ-8 были значимо связаны с более высокой стафилококковой нагрузкой ( $p = 0,029$ ). В ЭГ1 и ЭГ2 была отмечена связь с наличием трещин сосков. В этих группах снижение стафилококковой нагрузки среди женщин без трещин сосков было большим, чем среди женщин с трещинами сосков ( $p = 0,017$  для ЭГ1 и  $p = 0,039$  для ЭГ2). Эта связь также наблюдалась в ЭГ3, хотя и не была статистически значимой ( $p = 0,191$ ).

Таблица 2. Число бактерий

	КГ	ЭГ1	ЭГ2	ЭГ3
Общее количество бактерий				
Начало исследования	4,41 ± 0,93	4,55 ± 1,32	4,31 ± 0,75	4,39 ± 1,02
7 дней	4,65 ± 0,94	4,37 ± 0,88	4,15 ± 0,88	4,53 ± 1,20
14 дней	4,61 ± 1,10	4,58 ± 0,97	4,38 ± 0,97	4,62 ± 1,11
21 день	4,66 ± 0,99	4,18 ± 0,73 <sup>ab</sup>	4,36 ± 0,93	4,33 ± 1,15
<i>Staphylococcus</i>				
Начало исследования	3,61 ± 1,06	3,85 ± 1,63	3,70 ± 0,89	3,61 ± 1,07
7 дней	3,71 ± 1,44	3,23 ± 1,33	3,17 ± 1,32	3,66 ± 1,17
14 дней	3,83 ± 1,40	3,58 ± 1,20	3,21 ± 1,11	3,41 ± 1,40
21 день	3,60 ± 1,14	3,33 ± 1,18 <sup>ab</sup>	2,93 ± 1,31 <sup>ab</sup>	3,15 ± 0,54 <sup>a</sup>
<i>Streptococcus</i>				
Начало исследования	3,12 ± 0,99	3,38 ± 0,93	2,99 ± 0,69	3,08 ± 0,96
7 дней	2,91 ± 0,86	3,34 ± 0,92	3,39 ± 0,76	3,20 ± 0,78
14 дней	3,31 ± 0,86	3,51 ± 1,09	3,17 ± 0,89	3,03 ± 0,82
21 день	3,29 ± 0,76	3,33 ± 0,55	3,04 ± 0,93 <sup>b</sup>	3,15 ± 0,74
<i>Lactobacillus</i>				
Начало исследования	2,11 ± 0,51	1,96 ± 0,19	1,95 ± 0,37	2,05 ± 0,30
7 дней	2,30 ± 0,37	2,10 ± 0,38	1,97 ± 0,47	2,19 ± 0,42
14 дней	2,19 ± 0,34	2,12 ± 0,41	1,86 ± 0,45	2,03 ± 0,35
21 день	2,20 ± 0,42	1,94 ± 0,34	1,88 ± 0,31	1,98 ± 0,40

Данные представлены в виде средних значений ± стандартное отклонение ( $\log_{10}$  колониеобразующих единиц/мл молока).

<sup>a</sup> $p < 0,05$  в сравнении с исходным (началом исследования).

<sup>b</sup> $p < 0,05$  в сравнении с контрольной группой (КГ)

ЭГ1, ЭГ2 и ЭГ3, три экспериментальные группы, получавшие  $3 \times 10^9$ ,  $6 \times 10^9$  и  $9 \times 10^9$  колониеобразующих единиц/сут соответственно.

Таблица 3. Иммунологические параметры в грудном молоке

	КГ	ЭГ1	ЭГ2	ЭГ3
ИЛ-8 ( $\log_{10}$ пг/мл)				
Начало исследования	2,53 ± 0,49	2,72 ± 0,56	2,52 ± 0,43	2,38 ± 0,62
7 дней	2,61 ± 0,48	2,44 ± 0,61 <sup>a</sup>	2,45 ± 0,42	2,40 ± 0,56
14 дней	2,58 ± 0,56	2,43 ± 0,63 <sup>a</sup>	2,39 ± 0,36	2,40 ± 0,50
21 день	2,75 ± 0,61	2,31 ± 0,57 <sup>a</sup>	2,32 ± 0,36 <sup>b</sup>	2,41 ± 0,52
IgA ( $\log_{10}$ нг/мл)				
Начало исследования	5,4 ± 0,6	5,9 ± 0,2 <sup>a</sup>	5,4 ± 0,5	5,6 ± 0,5
21 день	5,4 ± 0,6	5,6 ± 0,5 <sup>c</sup>	5,4 ± 1,31	5,5 ± 0,5

Данные представлены в виде средних значений ± стандартное отклонение.

<sup>a</sup> $p < 0,05$  в сравнении с контрольной группой (КГ).

<sup>b</sup> $p = 0,067$  в сравнении с КГ.

<sup>c</sup> $p < 0,05$  в сравнении с исходным (началом исследования).

ЭГ1, ЭГ2 и ЭГ3, три экспериментальные группы, получавшие  $3 \times 10^9$ ,  $6 \times 10^9$  и  $9 \times 10^9$  колониеобразующих единиц/сут соответственно; IgA, иммуноглобулин А; ИЛ-8, интерлейкин 8.

Несмотря на то, что стрептококковая нагрузка в грудном молоке женщин в ЭГ1, ЭГ2 и ЭГ3 в среднем была ниже, чем в КГ, различия были статистически значимы лишь для ЭГ2 ( $p = 0,044$ ) (Таблица 2). Более высокие уровни ИЛ-8 значимо коррелировали с более высокой стрептококковой нагрузкой ( $p = 0,007$ ).

Значимых изменений числа лактобацилл не отмечалось.

#### *Иммунные параметры в грудном молоке*

В образцах грудного молока измерялся уровень ИЛ-8. В ЭГ1 наблюдалось значительное прогрессирующее снижение уровней ИЛ-8, и в сравнении с КГ различие было значимым ( $p = 0,003$ ). В ЭГ2 тенденция к снижению отмечалась на 21-й день лечения ( $p = 0,067$ ) (Таблица 3). Была обнаружена сильная связь между бактериальной нагрузкой и уровнями ИЛ-8. Эта связь была обнаружена для общего числа бактерий, стафилококковой нагрузки и стрептококковой нагрузки ( $p = 0,000$ ,  $p = 0,008$  и  $p = 0,007$  соответственно); с увеличением бактериальной нагрузки значимо рос уровень ИЛ-8 – на

0,082-0,125 единицы с каждой единицей бактериального числа. У женщин с трещинами сосков отмечались более высокие значения ИЛ-8, чем у женщин без трещин сосков ( $p = 0,020$ ), и эта связь не зависела от группы.

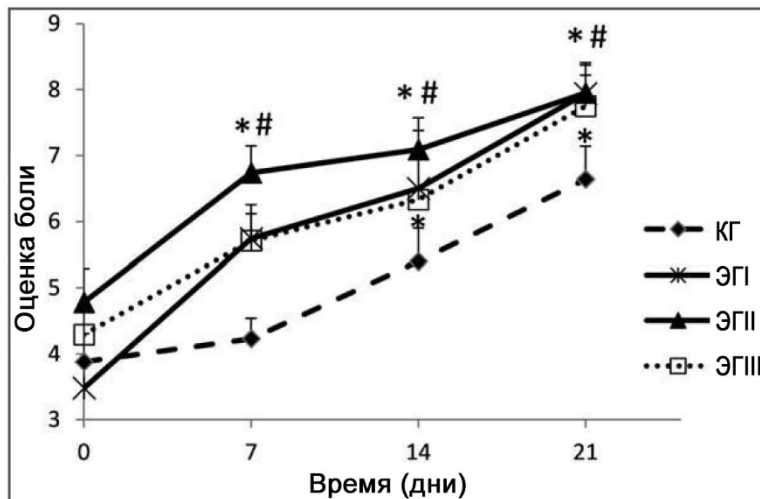
Значения IgA фиксировались только в начале и в конце вмешательства (Таблица 3). В начале исследования уровни IgA в ЭГ1 были значительно выше, чем в КГ ( $p = 0,027$ ), однако в конце вмешательства в ЭГ1 отмечалось снижение значений ( $p = 0,036$ ).

#### *Оценка боли в молочных железах*

При каждом посещении участницы давали оценку ощущению дискомфорта по шкале от 1 до 10, где 1 означала выраженную боль, а 10 – отсутствие боли (Рис. 2). В начале исследования различий в оценке боли между четырьмя группами не было (Рис. 2). В каждой отдельной группе на 7-й, 14-й и 21-й день отмечалось улучшение оценки боли по сравнению с исходной ( $p = 0,000$ ). В трех экспериментальных группах, ЭГ1, ЭГ2 и ЭГ3, отмечалось улучшение в отношении оценки боли с течением времени по сравнению с КГ ( $P = 0,035$ ,  $p = 0,000$  и  $p = 0,028$  соответственно). Эффект лечения пробиотиком отмечался с первой недели. Была обнаружена связь между бактериальной нагрузкой и оценкой боли – повышение общей бактериальной нагрузки вело к меньшей оценке ( $p = 0,029$ ). Подобная связь была обнаружена и для стафилококковой нагрузки, однако она не была статистически значима ( $p = 0,057$ ).

Для оценки восприятия боли использовался адаптированный опросник боли МакГилла. В опроснике боль оценивается по четырем аспектам: сенсорному аспекту интенсивности, аффективному аспекту интенсивности, текущей интенсивности и оценочному аспекту интенсивности (Таблица 4).

Согласно оценке сенсорного аспекта интенсивности, средние значения свидетельствуют о значительном облегчении боли в экспериментальных группах ЭГ1, ЭГ2 и ЭГ3 в сравнении с КГ ( $p = 0,000$ ,  $p = 0,001$  и  $p = 0,040$  соответственно). Было выявлено, что ковариата ИЛ-8 влияет на оценку сенсорного аспекта интенсивности – с увеличением средней оценки боли на 0,63 уровень ИЛ-8 возрастал на 1 единицу ( $p = 0,037$ ). В начале исследования женщины описывали свою боль преимущественно по субшкале колющего или режущего давления; от 83 до 92 % женщин выбрали как минимум один дескриптор в этой субшкале.



**РИС. 2.** Эволюция боли с течением времени по шкале оценки боли. Данные представлены в виде средних значений  $\pm$  стандартная ошибка. \*Значимое различие,  $p < 0,05$  в сравнении с исходным (началом исследования). #Значимое различие,  $p < 0,05$  для каждой группы пробиотика в сравнении с контрольной группой (КГ) в каждый момент времени. ЭГ I, ЭГ II и ЭГ III, три экспериментальные группы, получавшие  $3 \times 10^9$ ,  $6 \times 10^9$  и  $9 \times 10^9$  колониеобразующих единиц/сут соответственно.

**Таблица 4.** Результаты по адаптированным в Испании опросникам боли МакГилла

Время, шкала	КГ	ЭГ I	ЭГ II	ЭГ III	Крускал-Уоллис значение p
Начало исследования					
Сенсорный аспект интенсивности	$7,88 \pm 3,56$	$5,91 \pm 2,31$	$6,22 \pm 2,33$	$6,50 \pm 2,04$	0,293
Аффективный аспект интенсивности	$5,19 \pm 2,45$	$3,87 \pm 1,96$	$3,70 \pm 2,30$	$4,08 \pm 2,24$	0,131
Текущая интенсивность	$1,08 \pm 0,27$	$0,91 \pm 0,29$	$1,04 \pm 0,21$	$0,92 \pm 0,28$	0,067
Оценочный аспект интенсивности	$1,12 \pm 0,43$	$0,91 \pm 0,29$	$0,96 \pm 0,37$	$0,92 \pm 0,50$	0,254
7 дней					
Сенсорный аспект интенсивности	$6,92 \pm 2,17$	$4,35 \pm 2,95$	$4,48 \pm 2,86$	$5,71 \pm 2,71$	0,023
Аффективный аспект интенсивности	$3,81 \pm 2,00$	$1,91 \pm 2,19$	$1,70 \pm 2,01$	$2,92 \pm 2,32$	0,004
Текущая интенсивность	$1,00 \pm 0,40$	$0,87 \pm 0,34$	$0,96 \pm 0,21$	$1,00 \pm 0,29$	0,465
Оценочный аспект интенсивности	$1,12 \pm 0,43$	$0,74 \pm 0,45$	$0,78 \pm 0,42$	$0,92 \pm 0,41$	0,016
14 дней					
Сенсорный аспект интенсивности	$6,40 \pm 3,71$	$3,89 \pm 2,40$	$3,77 \pm 2,51$	$4,86 \pm 2,82$	0,011
Аффективный аспект интенсивности	$2,80 \pm 2,50$	$1,11 \pm 1,85$	$1,32 \pm 1,89$	$2,41 \pm 2,32$	0,015
Текущая интенсивность	$0,96 \pm 0,35$	$0,84 \pm 0,37$	$0,91 \pm 0,29$	$0,86 \pm 0,35$	0,679
Оценочный аспект интенсивности	$1,00 \pm 0,41$	$0,68 \pm 0,48$	$0,73 \pm 0,46$	$0,91 \pm 0,43$	0,069
21 день					
Сенсорный аспект интенсивности	$5,27 \pm 4,24$	$3,06 \pm 2,56$	$2,85 \pm 2,56$	$3,70 \pm 2,90$	0,070
Аффективный аспект интенсивности	$2,05 \pm 2,36$	$0,53 \pm 1,23$	$0,95 \pm 1,88$	$1,40 \pm 2,01$	0,032
Текущая интенсивность	$1,05 \pm 0,38$	$0,71 \pm 0,47$	$0,85 \pm 0,37$	$0,80 \pm 0,52$	0,104
Оценочный аспект интенсивности	$0,95 \pm 0,58$	$0,58 \pm 0,53$	$0,51 \pm 0,45$	$0,51 \pm 0,75$	0,025

Данные представлены в виде средних значений  $\pm$  стандартное отклонение – для каждой шкалы, в любой момент исследования и для каждого вмешательства.

КГ, контрольная группа; ЭГ I, ЭГ II и ЭГ III, три экспериментальные группы, получавшие  $3 \times 10^9$ ,  $6 \times 10^9$  и  $9 \times 10^9$  колониеобразующих единиц/сут соответственно.

Значимый эффект лечения в отношении оценки аффективного аспекта интенсивности отмечался в ЭГ I и ЭГ II ( $p = 0,011$  и  $p = 0,010$  соответственно). Для описания чувств, связанных



с болью, обычно использовалась субшкала раздражения и отвращения; от 78 до 100 % женщин описывали это чувство в начале исследования. В конце вмешательства доля женщин, выбиравших этот дескриптор, в экспериментальных группах была на 42 % ниже, чем в КГ. Дескрипторы субшкалы страха (страшный, пугающий, ужасный) выбирались 57-85 % женщин в начале исследования. В конце вмешательства доля женщин, выбиравших этот дескриптор, в экспериментальных группах была на 62,3 % ниже, чем в КГ. Схожие результаты были получены и в отношении чувств, связанных с горем и тревогой.

Лечение оказало значимое влияние на оценочный аспект интенсивности боли (временная, преходящая, усиливающаяся, постоянная, сохраняющаяся). В частности, в ЭГ1 и ЭГ2 сообщалось о 30 %-ном снижении частоты выбора дескрипторов этой шкалы по сравнению с КГ ( $p = 0,035$ ).

Значимых изменений в оценке текущей интенсивности не отмечалось.

#### *Нарушения со стороны желудочно-кишечного тракта и фармакологические вмешательства*

Возникновение диареи или метеоризма оценивалось посредством опросника, заполнявшегося женщинами. Значимых различий между группами в отношении встречаемости диареи ( $p = 0,718$ ) или метеоризма ( $p = 0,905$ ) выявлено не было.

Употребление анальгетиков прогрессирующе снижалось во всех группах в ходе исследования; однако, женщины в ЭГ3 принимали значительно меньше анальгетиков, чем женщины в КГ ( $p = 0,046$ ).

#### **Обсуждение**

*S. aureus* традиционно считается наиболее частым этиологическим агентом мастита; однако, в недавних исследованиях было высказано предположение о том, что с маститом и болью в молочных железах в период лактации связаны другие микроорганизмы, такие как коагулаза-отрицательные стафилококки.<sup>4,22</sup> В предшествующих исследованиях была показана способность отдельных штаммов *Lactobacillus* снижать бактериальную нагрузку в грудном молоке женщин, страдающих маститом.<sup>13</sup> Одним из таких штаммов является *L. fermentum* СЕСТ5716, выделенный из женского молока. В настоящем исследовании оценивалось влияние трех возрастающих доз штамма *L. fermentum* СЕСТ5716 на бактериальную нагрузку в грудном молоке женщин, испытывающих боль в молочных железах, соответствующую подострому маститу. Употребление лактобацилл значимо снизило стафилококковую нагрузку в грудном молоке. Общая бактериальная и стафилококковая нагрузка значимо коррелировали с восприятием боли в молочных железах женщинами, тем самым показывая, что нарушения в микробиоте грудного молока напрямую связаны с болью при данной патологии. Бактериальная нагрузка также сильно коррелировала с уровнем ИЛ-8 в грудном молоке. Этот цитокин способствует инфильтрации очага инфекции иммунными клетками, и его концентрация в грудном молоке считается надежным показателем мастита.<sup>23</sup> Присутствие в грудном молоке физиологической микробиоты – относительно недавняя находка,<sup>5,6</sup> а число исследований, посвященных микробиологическим аспектам мастита у человека, невелико. В данной работе показана корреляция между бактериальной нагрузкой отдельных бактериальных групп в грудном молоке и возникновением боли в молочных железах в период лактации.

С учетом подобных связей между стафилококковой нагрузкой и болью в молочных железах, снижение бактериальной нагрузки в результате приема *L. fermentum* СЕСТ5716 значительно облегчало боль в молочных железах у женщин. Преимуществом этого исследования перед предшествующими является включение в протокол промежуточных показателей разных параметров. Помимо преимуществ модели повторных измерений, этот дизайн позволил нам показать, что эффекты отмечались уже с первой недели лечения. Другим преимуществом исследования является включение валидного опросника боли, в котором оценивались как сенсорные ее аспекты, так и аффективные. До вмешательства женщины, участвовавшие в исследовании, описывали свою боль прилагательными, связанными с раздражением, страхом и тревогой. Лечение лактобациллами значительно улучшило эту оценку у женщин. Этот аспект исследования особенно важен, так как эмоциональные расстройства, вызванные маститом, могут приводить к прекращению грудного вскармливания.

Несмотря на то, что у женщин, принимавших штамм *Lactobacillus*, не отмечалось значительного роста числа лактобацилл в грудном молоке, присутствие штамма в грудном молоке после перорального приема было показано ранее.<sup>13</sup> Относительно низкое число лактобацилл по сравнению со стафилококками позволяет предположить, что механизм облегчения боли не сводится лишь к «феномену конкуренции». Некоторые авторы предполагают, что врожденный иммунный ответ, активируемый в молочной железе, является критически важным звеном патогенеза мастита, и что он может быть следствием воспалительного ответа на непатогенные в других условиях бактерии.<sup>24</sup> Несмотря на то, что *S. epidermidis* часто встречался в грудном молоке женщин с маститом, штаммы этого вида можно обнаружить и в молоке здоровых женщин.<sup>6,8,22</sup> С учетом роли иммунной системы в развитии мастита, эффект пробиотических штаммов был связан с влиянием на иммунный ответ.<sup>25,26</sup> В предыдущих исследованиях было показано, что *L. fermentum* СЕСТ5716 обладает иммуномодуляторными свойствами. К примеру, штамм продемонстрировал противовоспалительную активность на животной модели воспаления<sup>27,28</sup> и иммуностимулирующую активность в интервенционном исследовании среди людей.<sup>29</sup> Иммуномодуляторные свойства *L. fermentum* СЕСТ5716 могут объяснять влияние штамма на мастит.

Дозозависимый эффект не наблюдался, так как три исследуемые дозы давали схожий эффект, и статистически значимых различий не отмечалось. Тот факт, что три исследуемые дозы находились в диапазоне одного порядка,  $9 \log$ , мог быть ограничением исследования. Мы не исключаем вероятность того, что значительно большая доза *Lactobacillus* может привести к дозозависимому эффекту. Мы пришли к выводу, что текущая доза лактобацилл –  $3 \times 10^9$  КОЕ/сут – эффективна и достаточна для снижения стафилококковой нагрузки в грудном молоке, ведущего к облегчению боли в молочных железах, связанной с присутствием стафилококков в грудном молоке.

### Благодарности

Авторы хотят поблагодарить Матильду Паломарес Куадрас, Марию Хосе Гомарис, Розу Хойас Ромеро, Исауру Гонсалес, Марию Хесус Гил и Кармелу Сантамарию Паласиос, акушерок Испанской системы здравоохранения и ассоциаций поддержки грудного вскармливания (Mamilactancia and Grupo Aroyo Multilactancia) за помощь в исследовании, а также Лленалию Гарсиа Фернандес («SEPLIN, Soluciones Estadísticas») за статистический анализ данных. Х.А.М.-Л. получал стипендию университетского бизнес-фонда (Университет Гранады, Гранада, Испания). Данная работа является частью его докторской диссертации «*Lactobacillus fermentum* СЕСТ5716: помощник при лактации» (докторантура в области питания и пищевых технологий [B14.56.1]).

### Заявление о раскрытии интересов

Х.А.М.-Л., М.П.Д.-Р., А.Д.В., А.С., Л.С., О.Б., Ю.Ф. и М.О.М. являются сотрудниками «Biosearch», владеющей патентом на *L. fermentum* СЕСТ5716. М.А.Д.-Л., Р.К., П.Д. и М.Д.Р.-Л. заявляют об отсутствии конфликта финансовых интересов.

### Список литературы

1. Kramer MS, Kamuka R. *The Optimal Duration of Exclusive Breastfeeding. A Systematic Review.* World Health Organization, Geneva, 2001.
2. Contreras GA, Rodríguez JM. Mastitis: Comparative etiology and epidemiology. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2011;16:339-356.
3. World Health Organization. *Mastitis: Causes and Management.* World Health Organization, Geneva, 2000.
4. Amir LH, Cullinane M, Garland SM, et al. The role of micro-organisms (*Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*) in the pathogenesis of breast pain and infection in lactating women: Study protocol. *BMC Pregnancy Childbirth* 2011;11:54.
5. Martín 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.

6. Heikkilä MP, Saris PE. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. *J Appl Microbiol* 2003;95:471-478.
7. Perez PF, Doré, J, Leclerc M, et al. Bacterial imprinting of the neonatal immune system: Lessons from maternal cells? *Pediatrics* 2007;119:e724-e732.
8. Martín R, Heilig HG, Zoetendal EG, et al. Cultivation-independent assessment of the bacterial diversity of breast milk among healthy women. *Res Microbiol* 2007;158: 31-37.
9. Collado MC, Delgado S, Maldonado A, et al. Assessment of the bacterial diversity of breast milk of healthy women by quantitative real-time PCR. *Lett Appl Microbiol* 2009;48:523-528.
10. Martín R, Olivares M, Marin ML, et al. Probiotic potential of three lactobacilli strains isolated from human breast milk. *J Hum Lact* 2005;21:8-17.
11. Olivares M, Díaz-Ropero MP, Martín R, et al. Antimicrobial potential of four *Lactobacillus* strains isolated from breast milk. *J Appl Microbiol* 2006;101:72-79.
12. Díaz-Ropero MP, Martín R, Sierra S, et al. Two *Lactobacillus* strains, isolated from breast milk, differently modulate the immune response. *J Appl Microbiol* 2007;102:337-343.
13. Arroyo R, Martín 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. Grattepanche F, Lacroix C, Audet P, et al. Quantification by real-time PCR of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* in milk fermented by a mixed culture. *Appl Microbiol Biotechnol* 2005;66:414-421.
15. Heilig HG, Zoetendal EG, Vaughan EE, et al. Molecular diversity of *Lactobacillus* spp. and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. *Appl Environ Microbiol* 2002;68:114-123.
16. Dalwai F, Spratt DA, Pratten J. Use of quantitative PCR and culture methods to characterize ecological flux in bacterial biofilms. *J Clin Microbiol* 2007;45:3072-3076.
17. Martineau F, Picard, FJ, Ke D, et al. Development of a PCR assay for identification of staphylococci at genus and species levels. *J Clin Microbiol* 2001;39:2541-2547.
18. Melzack R. The McGill Pain Questionnaire: Major properties and scoring methods. *Pain* 1975;1:277-299.
19. Lázaro C, Caseras X, Whizar-Lugo VM, et al. Psychometric properties of a Spanish version of the McGill Pain Questionnaire in several Spanish-speaking countries. *Clin J Pain* 2001;17:365-374.
20. West BT, Welch KB, Galecki AT. *Linear Mixed Models. A Practical Guide Using Statistical Software*. Chapman & Hall/CRC, Boca Raton, FL, 2007.
21. Gelman A, Hill J. *Data Analysis Using Regression and Multilevel/Hierarchical Models*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom, 2007.
22. Delgado S, Arroyo R, Jiménez 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.
23. 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.
24. Glynn DJ, Hutchinson MR, Ingman WV. Toll-like receptor 4 regulates lipopolysaccharide-induced inflammation and lactation insufficiency in a mouse model of mastitis. *Biol Reprod* 2014;90:91.
25. Klostermann K, Crispie F, Flynn J, et al. Intramammary infusion of a live culture of *Lactococcus lactis* for treatment of bovine mastitis: Comparison with antibiotic treatment in field trials. *J Dairy Res* 2008;75:365-373.
26. Crispie F, Alonso-Gómez M, O'Loughlin C, et al. Intramammary infusion of a live culture for treatment of bovine mastitis: Effect of live lactococci on the mammary immune response. *J Dairy Res* 2008;75:374-384.
27. Peran L, Camuesco D, Comalada M, et al. *Lactobacillus fermentum*, a probiotic capable to release glutathione, prevents colonic inflammation in the TNBS model of rat colitis. *Int J Colorectal Dis* 2006;21:737-746.
28. Arribas B, Elena Rodríguez-Cabezas M, Comalada M, et al. Evaluation of the preventative effects exerted by *Lactobacillus fermentum* in an experimental model of septic shock induced in mice. *Br J Nutr* 2008;29:1-8.
29. Olivares M, Diaz-Ropero MP, Sierra S, et al. Oral intake of *Lactobacillus fermentum* CECT5716 enhances the effect of influenza vaccination. *Nutrition* 2007;23:254-260.

Адрес для корреспонденции:  
*Моника Оливарес Мартин, д-р философии*  
*«Biosearch Life S.A.»*  
*Камино де Пурчиль 66*  
*18004, Гранада, Испания*

*Электронная почта:* [molivares@biosearchlife.com](mailto:molivares@biosearchlife.com)