

УДК 576.8.52 579.083.13

Л.Б. Орябінська, В.Д. Прасанна, Л.Н. Лазаренко, О.М. Дуган

ІМУНОМОДУЛЮВАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ ПРОБІОТИКА НА ОСНОВІ МОЛОЧНОКИСЛИХ БАКТЕРІЙ ТА РОСЛИННОГО КОМПОНЕНТА

Purpose of this work was determination of the immunomodulatory effects of base probiotic composition of lactic acid bacteria based on genus *Lactobacillus* and the complex probiotic with carbyuloza on an experimental model of intact mice. It was found, that injection of carbyuloza in the probiotic composition increased functional activity of phagocytic system – namely, absorbing activity of macrophages. After injection of complex composition to intact mice, there was a tendency to increase the number of CD19+ B-lymphocytes, CD25+ cells in the spleen including activated T- and B-lymphocytes and activated macrophages. In addition, under the influence of net carbyuloza in spleens of mice the number of CD4+ cells (on 9th day), and CD25+ cells (at the third day and 6th) where up. The received data indicate the potential ability of a base composition of the probiotic and complex preparation with carbyuloza guide to the development of the immune response to cell type which is important in protecting against bacterial and viral pathogens.

Keywords: probiotic, lactic acid bacteria, immune response.

Вступ

Підвищення загального рівня захворюваності населення України стимулює пошук і розроблення нових пробіотичних препаратів, здатних контролювати та моделювати важливі фізіологічні функції, біохімічні реакції, сприяти підтриманню здоров'я, знижувати ризик розвитку захворювань і прискорювати процес одужання.

Підвищення ефективності та розширення спектра біологічної активності пробіотиків можуть бути досягнуті за рахунок поєднання в одній композиції відомих виробничих штамів, кожен з яких характеризується своїм терапевтичним потенціалом [1]. Полівидовий склад облигатної мікрофлори всіх екосистем організму вказує на доцільність конструювання подібних препаратів, що визначаються як поліштамові пробіотики. Такі препарати більш адаптовані до організму будь-якої людини та значною мірою проявляють свої захисні та біотерапевтичні функції [2]. Створення таких комплексних препаратів є на сьогодні важливим стратегічним напрямом у боротьбі з багатьма інфекційними, а також деякими неінфекційними захворюваннями.

Підвищити одну із специфічних здатностей пробіотиків виводити з організму людини радіонукліди та солі важких металів можна завдяки комбінуванню бактеріального складника препарату зі сполуками, що проявляють сорбційну активність. Значні сорбційні властивості має природний полімер рослинного походження карбюлоза, створений спільними зусиллями співробітниками Національного технічного університету України "Київський політехнічний інститут" та Національного медичного університету ім. О.О. Богомоль-

ця. Цей препарат має показання до широкого клінічного застосування з метою виведення іонізуючої радіації та солей важких металів з організму людини. Концепція введення до складу класичної композиції пробіотика рослинного препарату карбюлози дає змогу прогнозувати розширення лікувальних і профілактичних властивостей пробіотичного препарату за рахунок адитивного характеру позитивного ефекту обох препаратів.

Постановка задачі

Визначення імуномодулювальної дії базової пробіотичної композиції молочнокислих бактерій на основі роду *Lactobacillus*, рослинного компонента карбюлози та комплексного пробіотика на експериментальній моделі інтактних мишей.

Матеріали та методи

Об'єктом дослідження стала базова композиція пробіотика на основі бактерій роду *Lactobacillus*, розроблена на кафедрі промислової біотехнології факультету біотехнології і біотехніки НТУУ "Київський політехнічний інститут". Композиція включала п'ять штамів: *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* LB86 ВКПМ-В-5788; *L. delbrueckii subsp. delbrueckii* DSM; *L. rhamnosus* LB3 IMB В-703820074; *L. acidophilus* ©; *L. rhamnosus* V® [1].

Природний полімер рослинного походження з комерційною назвою карбюлоза за хімічною структурою – натрієва сіль карбоксиметилцелюлози. Для досліджень було використано карбюлозу, отриману від ВАТ "ДніпроАзот" (м. Дніпродзержинськ).

Дослідження імуномодулювальної дії композиції молочнокислих бактерій, карбюлози та комплексного препарату проведено на інтактних мишах лінії BALB/c, самицях, віком шість тижнів. Мишей утримували в стандартних умовах віварію при температурі $(22\pm 1)^\circ\text{C}$. Утримання і поводження із піддослідними тваринами проводили згідно з вимогами “Європейської конвенції з захисту прав хребетних, використовуваних для експериментальних і інших наукових цілей” (Страсбург, 1986). Дослідження впливу препаратів на імуномодулювальну активність лактобактерій проводили в лабораторії проблем інтерферону та імуномодуляторів ІМВ НАНУ. Миші отримували композицію молочнокислих бактерій інтрагастрально один раз на добу протягом семи діб у концентрації $1\cdot 10^6$ кл/тварину. Сформовано чотири групи по 12 мишей: 1 – отримували лише композицію молочнокислих бактерій; 2 – отримували композицію молочнокислих бактерій разом із карбюлозою; 3 – отримували лише карбюлозу; 4 – отримували фізіологічний розчин (контроль).

На першу, третю, шосту та дев'яту добу від початку введення препаратів від декапітованих мишей, які попередньо отримували повну анестезію, відбирали кров [3], селезінку [4] та перитонеальний ексудат [5]. У дослідженні використовували такі середовища та реактиви: живильні середовища RPMI-1640 або 199; глютамін (0,3 мг/мл); фетальну телячу сироватку; антибіотики (гентаміцин у концентрації 0,08 мг/мл або пеніцилін + стрептоміцин по 100 од/мл); NEPES; фітогемаглютинін Р (ФГА; Difco, США); гепарин, латекс, азуреозин, сафранін.

Функціональну активність клітин фагоцитарної системи – макрофагів перитонеальної порожнини – оцінювали, використовуючи загальноприйняті методи дослідження поглинальної та киснезалежної бактерицидної активності [5]. Визначали показник фагоцитозу (ПФ), підраховуючи у полі зору мікроскопа кількість клітин, які містили частинки латексу (у %); та фагоцитарне число (ФЧ) – середню кількість частинок латексу, які поглинались фагоцитами (в ум. од.) [6].

Киснезалежну бактерицидну активність фагоцитів досліджували у спонтанному та стимульованому тесті відновлення нітросинього тетразолію (НСТ-тест) цитохімічним методом [5]. У стимульованому НСТ-тесті в інкубаційне середовище додавали по 0,2 мл суспензії латексу у 0,15 М NaCl. У спонтанному НСТ-тесті до

фагоцитів вносили 0,2 мл 0,15 М NaCl. Клітини культивували при 37°C протягом 45 хв у водонасиченій атмосфері з постійним рівнем CO_2 (5 %). Скельця з фагоцитами відмивали у розчині Хенкса. Препарати висушували, фіксували у метанолі протягом чотирьох хвилин і фарбували у 0,1 % розчині сафраніну протягом 45 с. У полі зору мікроскопа вираховували відсоток клітин, які містили темно-сині гранули диформазау на 100 підрахованих фагоцитів. Функціональний резерв (ФР) визначали за різницею між показниками стимульованого та спонтанного НСТ-тесту (у %).

Визначення кількості Т-, В-лімфоцитів, а також CD25+ клітин у селезінці визначали методом прямої імунофлюоресценції [4]. У роботі використовували моноклональні антитіла до CD3+, CD4+, CD8+, CD19+ та CD25+-антигенів (MACS, Miltenyi Biotec, Німеччина). Підрахунок клітин, а також аналіз результатів, проводили на цитофлюориметрі FACStar Plus (Becton-Dickinson, США).

Усі досліди проводили не менше ніж у трьох повторах з використанням відповідних контролів. Цифрові дані, отримані в результаті досліджень, оброблялися статистичними методами з використанням t – критерію Ст'юдента для малих вибірок на 95–99 % рівні значимості. Розрахунки та побудову графіків і діаграм здійснювали, використовуючи комп'ютерну програму Excel (Microsoft Office 2000XP).

Результати та їх обговорення

Останніми роками особливу увагу направлено на вивчення механізмів модулювального впливу лактобактерій на імунні реакції організму. Асоційованим із слизовою оболонкою кишковика лактобактеріям властиві універсальні імуномодулювальні властивості, що включають як імуностимуляцію, так і імуносупресію [7]. Відомо, що ключовим елементом вродженого імунітету є клітини фагоцитарної системи, які чинять значну дію на формування специфічної імунної відповіді – клітинної та гуморальної ланок імунітету. Через активацію фагоцитів пробіотичні штами молочнокислих бактерій можуть впливати послідовно на розвиток як вродженого, так і набутого імунітету.

Результати проведених досліджень показали, що композиція молочнокислих бактерій з карбюлозою та без цього препарату, а також сама карбюлоза після інтрагастрального введення інтакт-

ним мишам, змінювали функціональну активність макрофагів перитонеальної порожнини (табл. 1).

Під впливом нативної карбюлози спостерігали підвищення поглинальної активності макрофагів за ПФ та ФЧ на третю та шосту добу. В інші терміни спостереження після введення мишам цього препарату поглинальна активність макрофагів зберігалась на рівні контролю. Водночас на третю, шосту та дев'яту добу активувалась здатність макрофагів до накопичення реактогенних метаболітів кисню за показниками спонтанного НСТ-тесту. Зауважимо, що на шосту та дев'яту добу встановлено тенденцію до зниження їх ФР, але різниця порівняно з показниками контролю була незначною.

Активіацію поглинальної активності макрофагів за ПФ та ФЧ під впливом композиції молочнокислих бактерій без карбюлози встановили лише на третю добу. На третю, шосту та дев'яту добу після введення мишам цієї композиції підвищувалась здатність макрофагів до накопичення реактогенних метаболітів кисню за показниками спонтанного НСТ-тесту, а на шосту добу істотно зростав їх ФР.

Під впливом комплексного препарату на основі композиції молочнокислих бактерій з карбюлозою поглинальна активність макрофагів підвищувалась за показниками ПФ на третю, шосту та дев'яту добу, а за ФЧ – на третю добу. Однак їх здатність до накопичення реактоген-

них метаболітів кисню незначно підвищувалась лише на шосту та дев'яту добу після введення мишам цієї композиції із карбюлозою.

Отже, композиція молочнокислих бактерій з карбюлозою та без цього препарату, а також сама карбюлоза у різні терміни спостереження підвищували функціональну активність клітин фагоцитарної системи. Композиція молочнокислих бактерій без карбюлози активувала як поглинальну активність макрофагів (однак лише на третю добу), так і їх киснезалежну бактерицидність (на третю та шосту добу). Разом з тим після введення мишам комплексного препарату з рослинним компонентом встановлено більш тривале підвищення поглинальної функції макрофагів, принаймні за ПФ, протягом трьох–дев'яти діб. Однак ФЧ макрофагів цих мишей зростав лише на шосту добу, а киснезалежна бактерицидна активність – на шосту та дев'яту. Натомість сам препарат карбюлоза спричиняв підвищення як поглинальної (на третю та шосту добу), так і киснезалежної бактерицидної активності (на третю–дев'яту добу) макрофагів після введення мишам у різні терміни спостереження. Можемо припустити, що ефективніша дія комплексного препарату на основі молочнокислих бактерій та карбюлози на поглинальну активність макрофагів (за ПФ) пов'язана із наявністю саме карбюлози у складі цього препарату, але для підтвердження потрібні додаткові дослідження.

Таблиця 1. Функціональна активність макрофагів перитонеальної порожнини після введення інтактним мишам карбюлози, композиції молочнокислих бактерій та комплексного препарату, $M \pm m$

Група тварин	Доба дослідю після початку введення препаратів	ПФ, %	ФЧ, ум. од.	НСТ-спонтанний, %	НСТ-стимульований, %	ФР, ум. од.
Інтактні (контроль)	–	31,5±2,6	3,1±0,2	27,0±2,7	39,9±4,6	10,9±2,8
Отримували карбюлозу	1	40,6±4,0	2,8±0,6	20,0±3,4	34,6±3,2	14,6±1,1
	3	65,8±1,8*	4,8±0,9*	40,0±2,0*	51,0±1,3	11,0±2,0
	6	48,3±2,5*	4,4±1,0*	48,0±1,9*	50,8±2,8	5,6±1,6
	9	25,9±3,2	2,9±0,4	38,4±0,6*	43,0±3,0	4,6±2,0
Отримували композицію лактобактерій	1	26,0±5,2	2,1±0,8	19,9±5,2	29,0±4,3	9,1±1,9
	3	53,6±1,0*	4,4±0,1*	48,7±1,9*	57,8±3,5	7,1±1,4
	6	36,7±4,2	3,3±0,3	44,0±1,6*	79,0±5,6	35,0±5,6*
	9	39,5±3,1	3,7±1,0	37,0±0,9*	49,0±1,5	12,0±3,6
Отримували композицію лактобактерій з карбюлозою	1	37,8±3,6	2,9±0,2	25,0±3,1	35,7±2,1	10,8±3,6
	3	57,8±2,0*	3,3±0,6	27,0±2,6	35,0±3,2	8,0±1,9
	6	51,4±3,1*	4,9±0,1*	33,0±0,6*	41,0±2,3	8,1±2,0
	9	63,5±1,9*	2,5±1,0	34,0±1,0*	42,0±2,4	9,1±1,6

Примітка: * $P < 0,05$ стосовно показників для інтактних мишей.

Дослідження кількості CD3+ Т-лімфоцитів та їх окремих субпопуляцій – CD4+ Т-хелперів і CD8+ Т-супресорів, а також CD19+ В-лімфоцитів та CD25+-клітин у селезінці мишей частково дає можливість оцінити, чи змінюють препарати показники клітинної та гуморальної ланок імунітету.

Результати дослідження впливу *in vivo* різних композицій молочнокислих бактерій та карбюлози на фенотиповий склад лімфоцитів селезінки інтактних мишей наведено у табл. 2.

Встановлено, що під впливом усіх препаратів, які досліджувались, кількість CD3+ Т-лімфоцитів у селезінці інтактних мишей не змінювалась порівняно з показниками у контролі. Водночас, у різні терміни спостереження після введення препаратів у селезінці інтактних мишей підвищувалась кількість CD4+ Т-хелперів/індукторів. Так, кількість цих клітин виявилась більшою, ніж у контролі, в селезінці мишей, які отримували карбюлозу на дев'яту добу або композицію молочнокислих бактерій без карбюлози – на шосту добу, або комплексний препарат – на першу добу. В інші терміни спостереження після введення мишам цих препаратів кількість CD4+-клітин зберігалась на рівні показників контролю. Однак кількість CD8+ Т-супресорів/цитотоксичних у селезінці інтактних мишей, які отримували композицію молочнокислих бактерій з карбюлозою та без цього препарату або карбюлозу, не змінювалась порівняно з контролем.

Варто зазначити, що перерозподіл CD4+ та CD8+-клітин у селезінці інтактних мишей під впливом композицій молочнокислих бактерій із карбюлозою та композиції молочнокислих бактерій без карбюлози, кожної окремо, призводив до збільшення величини імунорегуляторного індексу CD4/CD8 (за рахунок підвищення кількості CD4+-клітин) відповідно на першу та шосту добу. В інші терміни спостереження після введення мишам цих композицій молочнокислих бактерій імунорегуляторний індекс CD4/CD8 зберігався на рівні контролю. Як впливає із даних, наведених у табл. 2, під впливом карбюлози імунорегуляторний індекс CD4/CD8 не змінювався протягом усього терміну спостереження.

Кількість CD19+ В-лімфоцитів у селезінці інтактних мишей після введення карбюлози або композиції молочнокислих бактерій без цього препарату не змінювалась порівняно з контролем. Під впливом комплексного препарату кількість цих клітин підвищувалась в селезінці на дев'яту добу, але на першу, третю та шосту добу – зберігалась на рівні показників контролю.

Разом з тим у різні терміни спостереження після введення інтактним мишам усіх досліджуваних препаратів виявлено підвищення у селезінці кількості CD25+-клітин, до яких відносяться активовані Т- та В-лімфоцити, а також активовані макрофаги (IL-2Ra ланцюг, Тас-маркер лімфоцитарної активації). Під впливом карбюлози кількість CD25+-клітин підвищувалась на третю та шосту добу, композиції молочнокислих бак-

Таблиця 2. Кількість лімфоцитів у селезінці інтактних мишей, які отримували карбюлозу, композицію молочнокислих бактерій та комплексний препарат, $M \pm m$

Групи мишей/строк спостереження, доба		Відносна кількість клітин, %					CD4/CD8, ум. од.
		CD3+	CD4+	CD8+	CD19+	CD25+	
Інтактні (контроль)	–	63,8±2,4	35,6±2,8	24,7±2,1	23,0±2,5	12,6±1,9	1,4±0,9
Отримували карбюлозу	1	60,2±4,1	38,9±3,5	27,6±3,2	24,3±3,1	13,5±0,8	1,4±0,8
	3	56,2±3,1	37,4±2,8	25,0±2,2	17,7±2,7	20,1±1,1*	1,5±0,1
	6	55,8±4,9	34,1±1,9	32,2±2,0	19,7±1,8	26,1±1,7*	1,1±0,9
	9	63,3±6,9	42,3±1,4*	28,7±1,9	24,0±0,9	12,4±0,9	1,5±0,3
Отримували композицію лактобактерій без карбюлози	1	61,9±5,1	37,8±3,0	28,3±2,8	23,1±2,4	15,2±2,7	1,4±0,1
	3	57,0±8,9	40,1±3,6	25,2±3,1	23,1±2,7	20,0±1,4*	1,6±0,5
	6	67,6±4,1	47,7±2,9*	22,8±1,7	19,4±1,9	19,8±2,1	2,1±0,1*
	9	60,4±3,8	40,0±4,7	24,3±3,4	18,5±2,8	20,6±1,0*	1,7±0,1
Отримували композицію із карбюлозою	1	54,4±9,8	42,6±1,1*	21,3±1,1	24,8±3,1	20,4±2,3*	2,0±0,2*
	3	54,9±8,7	35,4±2,5	21,0±2,1	15,8±2,9	18,6±2,7	1,7±0,1
	6	60,2±5,9	37,6±2,0	26,5±3,4	21,8±4,7	19,7±1,7	1,5±0,9
	9	61,5±2,9	37,6±3,1	23,2±1,8	33,9±1,0*	20,1±1,5*	1,6±0,3

Примітка: * $P < 0,05$ відносно показників у контролі.

терій з карбюлозою – на першу та дев'яту добу, композиції молочнокислих бактерій без карбюлози – на третю та дев'яту добу. В інші терміни спостереження після введення інтактним мишам композиції молочнокислих бактерій з карбюлозою або без цього препарату встановлено тенденцію до підвищення кількості CD25+ клітин у селезінці, однак, різниця порівняно з контролем була незначною.

Таким чином, після інтрагастрального введення інтактними мишам композиції молочнокислих бактерій роду *Lactobacillus* як з карбюлозою, так і без карбюлози, у різні терміни спостереження змінювались показники клітинної ланки імунітету: за рахунок підвищення кількості CD4+ Т-лімфоцитів у селезінці зростала величина імунорегуляторного індексу CD4/CD8 (відповідно на першу та шосту добу), згідно з яким оцінюють силу імунної відповіді, а також підвищувалась кількість активованих лейкоцитів, які експресували CD25+-антиген (відповідно, на першу, дев'яту та третю, дев'яту добу).

Водночас під впливом чистої карбюлози у селезінці кількість CD4+-клітин також підвищувалась (на дев'яту добу), але імунорегуляторний індекс CD4/CD8 не змінювався відносно показників контролю. Однак цей препарат подібно до дії композиції молочнокислих бактерій спричиняв підвищення кількості CD25+-клітин (на третю та шосту добу). На відміну від інших препаратів, лише під впливом комплексної композиції молочнокислих бактерій разом з карбюлозою у селезінці інтактних мишей підвищувалась кількість CD19+ В-лімфоцитів (на дев'яту добу).

Список літератури

1. Старовойтова С.О. Розробка композиції поліштамового пробіотику на основі бактерій роду *Lactobacillus*: Дис. канд. біол. наук: 03.00.20. – К., 2008. – 176 с.
2. Янковський Д.С. Мікробіологічна характеристика системи "організм господаря – мікробіоценози різних екологічних ніш", як основа створення мультипробіотиків нових поколінь: автореф. дис. ... д-ра біол. наук: спец. 03.00.07 "Мікробіологія". – Х., 2006. – 52 с.
3. Папіломовірусна інфекція та система інтерферону / Л.М. Лазаренко, М.Я. Спивак, О.М. Михайленко, Г.Т. Сухих. – К.: Фітосоціоцентр, 2005. – 288 с.
4. Лимфоциты: Методы / Пер. с англ.; под ред. Дж. Клауса. – М.: Мир, 1990. – 396 с.
5. *Современные* методы диагностики вирусных респираторных инфекций и их терапии с использованием препаратов интерферона и его индукторов / Н.С. Дяченко, Н.Я. Спивак, Л.А. Тарастин и др. // Метод. рекомендации. – К., 1994. – 18 с.
6. *Влияние* препаратов интерферона α/β - и γ -типов на функциональную активность макрофагов при экспериментальной стафилококковой инфекции / Н.Е. Вихоть, Н.Я. Спивак, Л.Н. Черная, Е. Пастер // ЖМЭИ. – 1989. – № 4. – С. 57–60.
7. *N.H. Shah et al.*, "Carboxymethylcellulose: effect of degree of polymerization and substitution on tablet disintegration and dissolution", *J. Pharm. Sci.*, no. 70 (6), pp. 28–43, 1981.

Висновки

Вивчено імуномодулювальні властивості базової композиції, карбюлози та комплексного препарату на основі пробіотичних штамів молочнокислих бактерій і карбюлози. Встановлено, що введення до складу пробіотика карбюлози підвищувало функціональну активність клітин фагоцитарної системи. Після введення інтактним мишам комплексного препарату на основі композиції молочнокислих бактерій з карбюлозою виявлено тенденцію до підвищення кількості CD19+ В-лімфоцитів та кількості CD25+-клітин у селезінці, до яких належать активовані Т- та В-лімфоцити й активовані макрофаги. Під впливом чистої карбюлози у селезінці дослідних мишей також підвищувалась кількість CD4+-клітин (на дев'яту добу) та CD25+-клітин (на третю та шосту добу). Отримані дані свідчать про потенційну здатність як базової композиції пробіотика, так і комплексного препарату з карбюлозою, направляти розвиток імунної відповіді по клітинному типу, важливого при захисті як від бактеріальних, так і вірусних патогенів.

Перспективи досліджень за цим напрямом можуть бути направлені на подальші виявлення противірусної активності препаратів *in vitro* та *in vivo*. Це дасть можливість прогнозувати створення пробіотика не тільки з антибактеріальними, але й із антивірусними властивостями.