

ІМУНОМОДУЛЮВАЛЬНА ДІЯ ПРОБІОТИЧНОГО ШТАМУ *LACTOBACILLUS CASEI* ІМВ В-7280 ЗА ФІЗІОЛОГІЧНОЇ НОРМИ В ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ТВАРИН

Л.М. Лазаренко, Л.П. Бабенко, М.Я. Співак

*Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна
e-mail: LazarenkoLM@gmail.com*

Метою роботи було визначення імуномодулювальної дії штаму *Lactobacillus casei* В-7280 за фізіологічної норми шляхом дослідження його впливу на функціональну активність клітин фагоцитарної системи, фенотиповий склад лімфоцитів селезінки та рівень про- і протизапальних цитокінів у сироватці крові експериментальних тварин. **Методи.** Штам В-7280 вводили інтактним імунодефіцитним мишам лінії BALB/c перорально за допомогою зонду або вагінально. Поглинальну активність та киснево-возлежну бактерицидність макрофагів перитонеального ексудату (МФПЕ) оцінювали за допомогою загальноприйнятих методів дослідження. У селезінці визначали кількість CD16+/56+ природних кілерних клітин (ППК), CD3+ Т-лімфоцитів, CD4+ Т-хелперів/індукторів, CD8+ Т-супресорів/цитотоксичних та CD19+ В-лімфоцитів за допомогою методу протокової цитометрії. Рівень про- (інтерлейкіну(ІЛ)-12, інтерферону(ІФН)- γ) та протизапальних (ІЛ-4) цитокінів у сироватці крові визначали за допомогою імуноферментного аналізу. **Результати.** Встановлено, що штам В-7280 за фізіологічної норми активував фагоцитарні механізми імунної реактивності: збільшувалась кількість МФПЕ, здатних до поглинання об'єкту фагоцитозу, посилювалась інтенсивність їх поглинальної функції й перетравлюючої здатності при збереженому на рівні норми функціональному резерві. Рівні ІЛ-12 та ІФН- γ у сироватці крові підвищувались у мишей, яким вводили цей штам як перорально, так і вагінально, на тлі зниження або тенденції до зниження рівня сироваткового ІЛ-4 у різні терміни спостереження, що свідчить про його потенційну здатність до індукції розвитку клітинної ланки імунітету. За фізіологічної норми штам В-7280 не впливав на кількість ППК у селезінці, а також на такі важливі показники клітинних і гуморальних факторів набутого імунітету як фенотиповий склад лімфоцитів селезінки. Активація фагоцитів та зміна рівня цитокінів у сироватці крові мишей при застосуванні штаму В-7280 не супроводжувались погіршенням їх фізичного стану або будь-якими проявами інтоксикації. **Висновки.** Штам В-7280 має імуномодулювальні властивості за фізіологічної норми, спрямовані на активацію вроджених факторів імунітету та балансування продукції Th1/Th2 цитокінів. Штам є перспективним для розробки пробіотиків (імунобіотиків) із імуномодулювальними властивостями, які можна буде використовувати для профілактики та лікування інфекційно-запальних та інших захворювань. Обґрунтовано доцільність подальших досліджень його біологічної активності та безпечності за різних експериментальних моделей, а також у клінічних дослідженнях.

Ключові слова: лактобактерії, імунна система, цитокіни, фізіологічна норма, експериментальні тварини.

Розробка пробіотиків для профілактики і лікування інфекційно-запальних та інших захворювань систем органів травлення, дихання, руху та опору, а також сечостатевої, серцево-судинної і нервової систем, ендокринних органів, шкіри тощо, пов'язаних з дисбіозами є актуальним напрямком сучасної мікробіології, імунології та біотехнології. Перевагами пробіотиків є: природне походження та безпечність; здатність одночасно здійснювати цілеспрямовану антибактеріальну, імуномодулювальну та протизапальну дію; можливість регуляції метаболічних шляхів, що покращує функціонування клітин, органів, систем та організму загалом; персоналізоване і вибіркоче використання для всіх вікових груп та кожної конкретної хвороби самостійно або разом із етіотропною чи патогенетичною терапією із урахуванням рівня дисбіотичних та імунних порушень, а також характеру перебігу і тяжкості патологічного процесу [1–6]. Зокрема, пробіотики, створені на основі непатогенних коменсальних мікроорганізмів, найчастіше бактерій родів *Lactobacillus* і *Bifidobacterium*, вирізняються тим, що мають мультифакторну дію: впливають на обмін речовин; покращують бар'єрну функцію шлунково-кишкового тракту; змінюють рН кишечника; пригнічують адгезію патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів до слизової оболонки кишечника та їх ріст, забезпечуючи їй колонізаційну резистентність; нормалізують якісний та кількісний склад мікробіоти різних біотопів людини тощо [1, 2, 6–8].

Окремі пробіотичні штами лактобацил та біфідобактерій активують рецептори шаблонного розпізнавання – Толл-подібні рецептори, експресовані в імунних і неімунних клітинах (дендритних клітинах, макрофагах, ентероцитах тощо), та індукують продукцію цитокінів, тому можуть залучатись у механізми регуляції імунної відповіді. Вони стимулюють фактори вродженого імунітету (насамперед, підвищують цитотоксичність природних кілерів (ПКК) і функціональну активність антигенпредставляючих клітин), а також впливають на розвиток набутого імунітету, спрямовуючи диференціювання Т-лімфоцитів Th0-типу у бік дозрівання Т-лімфоцитів Th1-, Th2-, Th17-, Th22-типів або Treg [7, 9–12].

Однак саме завдяки такій різноспрямованій дії пробіотики можуть, з одного боку, посилювати або модулювати захисні локальні та системні імунні реакції стосовно патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів (бактерій, грибів, вірусів) [7], з іншого – викликати надмірну стимуляцію імунної системи внаслідок індукції цитокінів у сприйнятливих осіб, що загрожує їхньому здоров'ю [13, 14], тобто мати імунотоксичну дію. У зв'язку з цим, на нашу думку, імуномодулювальні властивості кожного окремого пробіотичного штаму бактерій, що входитимуть (чи вже входять) до складу пробіотиків або продуктів харчування, повинні бути досліджені. Це дозволить, з одного боку, виявити пробіотичні штами, перспективні для розробки імуномодулювальних препаратів природного походження (імунобіотиків), які можна буде використовувати для цільової корекції системи імунітету при імунодефіцитах, тобто за наявності стійкої імунної недостатності, з іншого – визначити відсутність (наявність) у них імунотоксичної дії.

З'ясовано, що іншими можливими побічними ефектами пробіотикотерапії є виникнення системних інфекцій (у рідких випадках), порушення метаболізму, перенесення генів (наприклад, стійкості до антибіотиків)

тощо [13–16]. Тому, незважаючи на те, що лактобацили та біфідобактерії відносять до групи GRAS (Generally Recognized As Safe), важливою вимогою є підтвердження їх безпечності, доведеної за результатами ґрунтовних наукових досліджень *in vitro* і *in vivo* на тваринних моделях, а також у клінічній практиці при лікуванні хворих й у віддалені періоди після пробіотикотерапії. Згідно настанови робочої групи Продовольчої і сільськогосподарської організації ООН (Food and Agriculture Organization, FAO) та Всесвітньої організації охорони здоров'я безпечність пробіотичних культур рекомендовано визначати з використанням ряду тестів [14], що включають також оцінювання їх здатності до надмірної стимуляції імунної відповіді.

Раніше нами було встановлено, що оригінальний пробіотичний штам *Lactobacillus casei* IMB B-7280 (B-7280) з антибактеріальними, протизапальними та імуномодулювальними властивостями є перспективним для розробки пробіотиків (дієтичних добавок та лікарських засобів) для перорального і вагінального застосування для профілактики і лікування інфекційно-запальних та інших захворювань. За різних експериментальних моделей інфекційно-запальних процесів (стафілококової та кандидозної інфекції), а також метаболічного синдрому штам B-7280 мав ефективну лікувальну дію, пов'язану з нормалізацією мікробіоти різних біотопів організму і запальної реакції, а також його вибіркоким впливом на фактори вродженого імунітету, клітинну ланку імунітету та цитокиновий профіль [17, 18]. Зауважимо, що при лікувальному застосуванні цього штаму за експериментальних моделей патологічних станів у тварин різних видів у жодному випадку ми не спостерігали надмірної стимуляції імунної відповіді чи виникнення інших побічних ефектів. Для визначення ефективності і безпечності профілактичного застосування штаму B-7280, а також розширення панелі біомаркерів ефективності пробіотикотерапії обґрунтованим є дослідження механізмів його дії за фізіологічної норми, оскільки відомо [19], що одні й ті ж пробіотичні культури можуть мати різну, часто протилежну дію за норми та патології.

У зв'язку з вищенаведеним **метою** роботи було визначення імуномодулювальних властивостей штаму B-7280 за фізіологічної норми шляхом дослідження його впливу на функціональну активність клітин фагоцитарної системи, фенотиповий склад лімфоцитів селезінки та рівень про- і протизапальних цитокинів у сироватці крові мишей.

Матеріали і методи. Дослідження проведено з використанням статевозрілих самиць мишей лінії BALB/c 16–18 г (віком 6–7 тижнів). Розбіжність по масі тварин не перевищувала 15 %. Тварин утримували в стандартних умовах в пластикових клітках в окремому приміщенні при сталій температурі повітря (22–25° C). Вони отримували повноцінне харчування та мали вільний доступ до автопоїлок. Перед початком експериментів тварини витримувалися на карантині не менше 14 діб. Усі дослідження проведено з урахуванням норм Європейської конвенції з захисту хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей, від 18.03.1986 (Страсбург) та закону України № 3447-IV “Про захист тварин від жорстокого поводження” [20, 21]. У роботі використано ліофілізовану

ний пробіотичний штам В-7280, задепонований в Депозитарії мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України. Життєздатність цього штаму перед кожним експериментальним дослідженням перевіряли шляхом контролю його росту на поживному агаризованому середовищі для лактобактерій – Man-Rogosa-Sharpe Agar (MRSA, HiMedia, Індія) при 37° С протягом 24–48 год.

Суспензію штаму В-7280 у 0,15 М NaCl вводили інтактним мишам перорально за допомогою зонду або у піхву в дозах 500 та 25 мкл відповідно у кількості 5×10^6 кл/тварину щодоби протягом 7 діб. Інтактним мишам інших двох експериментальних груп за цією схемою вводили суспензію препаратів порівняння “Лацидофіл” (Інститут Розель Інк., Канада) або “Лабілакт®” (Аріадна ТОВ, Україна) у 0,15 М NaCl відповідно у піхву або перорально за допомогою зонду. Інтактним мишам контрольних груп аналогічним шляхом вводили 0,15 М NaCl. Дослідження проводили в 3 серіях незалежних експериментів. Сформовано наступні групи мишей (по 36 тварин у кожній): 1) миші, яким вводили суспензію штаму В-7280 у 0,15 М NaCl перорально; 2) миші, яким вводили суспензію препарату “Лацидофіл” у 0,15 М NaCl перорально; 3) миші, яким вводили суспензію штаму В-7280 у 0,15 М NaCl у піхву; 4) миші, яким вводили суспензію препарату “Лабілакт®” у 0,15 М NaCl у піхву; 5) миші, яким вводили 0,15 М NaCl перорально (контроль 1); 6) миші, яким вводили 0,15 М NaCl у піхву (контроль 2). За фізичним станом мишей спостерігали щоденно під час та після введення штаму В-7280 протягом 14 діб та наступні 6 міс. Визначали кількість живих та мертвих тварин, здатність поїдати харчові раціони, проводили офтальмологічні дослідження. Після введення мишам цього штаму також реєстрували можливість зміни стану шкіри, шерсті, слизових оболонок, частоти дихання, а також їх поведінкових реакцій.

Від мишей (6 тварин із кожної групи), яких послідовно умертвляли шляхом декапітації після анестезії на 1, 3, 6 та 9 добу після введення штаму В-7280, отримували перитонеальний ексудат та селезінку. Фагоцитарну активність та кисневозалежну бактерицидність макрофагів перитонеального ексудату (МФПЕ) оцінювали за допомогою загальноприйнятих методів дослідження [22]. Визначали відсоток клітин (фагоцитарний індекс (ФІ)), які фагоцитували латекс (ПанЕко, Російська Федерація), та кількість частинок латексу, які поглинулися одним макрофагом (фагоцитарне число (ФЧ)). Кисневозалежну бактерицидність МФПЕ оцінювали за показниками спонтанного та стимульованого цитохімічного тесту відновлення нітросинього тетразолію (НСТ-тест). У полі зору мікроскопа вихарували відсоток клітин, що містили темно-сині гранули диформагану на 100 підрахованих фагоцитів. Функціональний резерв (ФР) визначали за різницею між показниками стимульованого та спонтанного тесту (у %). За допомогою методу протокової цитометрії у селезінці мишей визначали кількість CD16+/56+ ППК, а також CD3+ Т-лімфоцитів, CD4+ Т-хелперів/індукторів, CD8+ Т-супресорів/цитотоксичних, CD19+ В-лімфоцитів, використовуючи моноклональні антитіла (Miltenyi Biotec, Німеччина) за рекомендацією виробника. Аналіз зразків проводили за допомогою проточного цитофлюориметра FACStar Plus (Becton-Dickinson, США).

На 1, 3 та 6 добу після введення штаму В-7280 з хвостової вени усіх мишей прижиттєво отримували периферичну кров, з якої виділяли сироватку та зберігали її при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ до постановки експериментальних досліджень (не більше двох тижнів). У сироватці крові визначали вміст інтерлейкіну (ІЛ)-4, ІЛ-12 та інтерферону (ІФН)- γ за допомогою імуноферментного методу дослідження з використанням тест-систем (ІВІ ІNTERNAYIONAL GMBH, Німеччина) згідно рекомендацій виробника. Концентрацію цитокінів виражали у пкг/мл.

Усі отримані цифрові дані опрацьовували за допомогою комп'ютерної програми STATISTICA методом варіаційної статистики, а також програми Excel з пакету послуг Microsoft Office-2007 та -2010. Числові дані представляли у вигляді середнього арифметичного значення та стандартної похибки. Нульову гіпотезу для груп порівняння перевіряли за допомогою непараметричних критеріїв Колмогорова-Смірнова та Вілкоксона-Манна-Уїтні (U). Відмінності між групами вважали статистично значимими при $p < 0,05$ [23].

Результати. Миші лінії BALB/c, яким вводили штаму В-7280 перорально або вагінально, не лише вижили на 100 %, а й мали незмінний фізичний стан (поведінкові реакції, здатність поїдати харчові раціони тощо). Під час та протягом наступних 6 міс після введення мишам цього штаму не виявлено змін стану шкіри, шерсті, очей, слизових оболонок, частоти дихання, а також їх поведінкових реакцій, що може свідчити про його безпечність. Для визначення імуномодулювальних властивостей штаму В-7280 в інтактних мишей використовували методи дослідження, які дозволяють оцінювати стан факторів вродженого імунітету (фагоцитарної активності та кисневозалежної бактерицидності МФПЕ, кількості ПКК у селезінці) та окремих показників клітинної і гуморальної ланок набутого імунітету (кількості CD3+, CD4+, CD8+, CD19+ клітин у селезінці). Водночас досліджували рівень сироваткових про- (ІЛ-12 та ІФН- γ) та проти-запальних (ІЛ-4) цитокінів, які є, як відомо [19, 24], не лише ключовими регуляторами міжклітинних взаємодій за індуктивної та ефекторної фаз розвитку імунної відповіді, а й можуть залучатись у нормальні фізіологічні функції організму і механізми запалення, гострофазної реакції та імунопатологічної дії на тканини та клітини.

У результаті встановлено, що пероральне або вагінальне введення штаму В-7280 інтактним мишам призводило до активації МФПЕ у різні терміни спостереження порівняно з показниками для інтактних мишей, які пробіотичні бактерії не отримували (контроль) (табл. 1). Зокрема, за його перорального застосування виявлено підвищення показників фагоцитозу МФПЕ – ФІ (на 1–9 добу) та ФЧ (на 6 та 9 добу), а також кисневозалежної бактерицидності у спонтанному та стимульованому НСТ-тесті (на 1–6 добу). Стимульовальна дія штаму В-7280 стосовно МФПЕ була слабшою у випадку, коли його вводили мишам у піхву. Так, у мишей цієї групи порівняння спостерігали активацію кисневозалежної бактерицидності МФПЕ у спонтанному та стимульованому НСТ-тесті (на 3–6 та 6 добу відповідно), однак показники фагоцитозу були таким же, як і в контролі протягом усього терміну спостереження. Як наведено у табл. 1, у мишей, які отримували штаму В-7280 перорально або вагінально,

ФР МФПЕ, згідно якого оцінюють резервні можливості системи фагоцитозу та імунітету взагалі [19], зберігався на рівні контролю. Показники функціональної активності МФПЕ, що нами досліджувались, не змінювались у мишей, яким у піхву вводили препарат “Лабілакт®” (табл. 1). Пероральне введення мишам препарату “Лацидофіл” призводило до часткової активації фагоцитарної функції МФПЕ за ФІ (на 1–9 добу) без впливу на їх кисневозалежну бактерицидність у спонтанному та стимульованому НСТ-тесті.

Таблиця 1

Функціональна активність МФПЕ мишей, яким перорально або вагінально вводили штамп В-7280, $M \pm StDev$

Групи тварин	Доба	Показники активності МФПЕ				
		ФІ, %	ФЧ, %	НСТ-тест спонтанний, %	НСТ-тест стимульований, %	ФР, ум. од
Пероральне введення						
Інтактні миші (контроль 1)	1	31,50±2,61	2,61±0,20	42,01±4,32	59,70±1,51	9,90±1,31
	3	32,12±3,01	2,99±1,90	43,56±3,12	55,34±3,15	11,78±2,45
	6	29,67±2,61	2,43±0,67	41,12±2,90	53,50±4,23	12,38±5,12
	9	31,50±2,61	2,99±0,20	40,43±2,17	51,12±2,00	10,62±1,31
Миші, яким вводили штамп В-7280	1	45,71±1,40*	2,63±0,21	55,91±2,61*	69,64±2,41*	13,71±6,36
	3	47,23±2,15*	2,71±0,56	58,11±3,12*	68,45±2,76*	9,67±2,36
	6	50,12±1,31*	5,80±0,23*	52,53±2,92*	65,71±1,62*	8,54±1,38
	9	53,20±1,82*	6,91±0,23*	48,53±1,40	57,73±2,33	9,21±2,31
Миші, яким вводили Лацидофіл®	1	47,81±4,32*	3,40±0,21	35,01±8,74	39,01±6,60	8,64±2,10
	3	54,41±1,76*	3,92±1,23	41,45±5,32	47,45±3,56	8,02±3,43
	6	53,01±2,91*	4,02±1,01	42,02±4,31	46,09±5,61	9,06±2,15
	9	56,03±5,13*	5,04±1,10	46,09±3,93	55,08±8,94	9,00±1,14
Вагінальне введення						
Інтактні миші (контроль 2)	1	32,80±2,76	3,25±0,34	43,38±1,75	51,10±2,25	7,72±1,45
	3	34,00±4,12	3,12±1,93	44,00±3,15	55,23±3,35	11,3±2,34
	6	30,23±1,34	2,98±0,67	42,12±3,11	54,34±4,12	12,2±3,17
	9	31,12±3,44	3,15±1,34	40,20±2,63	53,17±2,14	12,97±4,32
Миші, яким вводили штамп В-7280	1	35,12±1,14	3,65±0,67	46,35±2,50	56,60±2,75	9,00±2,15
	3	34,36±1,78	4,05±0,80	57,15±2,00*	75,05±9,00	17,75±3,92
	6	32,07±2,17	4,14±1,11	68,40±2,25*	84,55±3,75*	16,50±3,13
	9	29,17±3,05	3,99±0,83	43,65±2,25	66,97±5,00	11,00±2,49
Миші, яким вводили Лабілакт®	1	31,56±4,22	3,16±0,38	49,05±3,25	71,25±6,00	10,25±2,07
	3	29,12±3,79	3,27±0,56	48,15±1,75	65,08±3,50	16,93±6,20
	6	25,13±2,64	3,58±0,52	45,90±1,50	56,53±2,75	10,63±1,04
	9	26,68±3,19	3,71±0,67	37,80±2,25	50,35±3,50	12,55±2,11

Примітка: * – $p < 0,05$ відносно показників для інтактних мишей.

Водночас показано, що штамп В-7280 та препарати порівняння “Лабілакт®” і “Лацидофіл” не впливали на кількість ПКК у селезінці інтактних мишей (табл. 2). При застосуванні цього штаму зберігались на рівні контролю й кількість CD3+, CD4+, CD8+ Т-лімфоцитів, CD19+ В-лімфоцитів у селезінці та імунорегуляторний індекс CD4+/CD8+. Лише на 6 добу після його введення у піхву виявлено тенденцію до підвищення індексу CD4+/CD8+ (за рахунок тенденції до підвищення кількості CD4+ клітин),

однак різниця порівняно з контролем не була вірогідною. Кількість ПКК, CD3+, CD4+ та CD8+ Т-лімфоцитів, CD19+ В-лімфоцитів у селезінці та імунорегуляторний індекс CD4+/CD8+ були такими ж, як у контролі і у мишей, що отримували препарати “Лацидофіл” або “Лабілакт®” (табл. 2).

Таблиця 2

Фенотиповий склад клітин селезінки та індекс CD4+/CD8+ в мишей, яким перорально або вагінально вводили штаму В-7280, $M \pm StDev$

Групи тварин	Доба	Відносна кількість клітин, %					CD4+/CD8+, ум. од.
		CD3+	CD4+	CD8+	CD19+	ПКК	
Пероральне введення							
Інтактні миші (контроль 1)	1	59,5±2,7	35,5±2,4	27,0±1,9	6,5±1,9	8,6±1,8	1,5±0,1
	3	61,9±2,2	38,6±1,3	26,3±0,9	7,1±0,5	7,8±1,4	1,4±0,2
	6	62,2±1,4	43,8±3,1	25,5±2,2	7,0±2,3	8,1±1,0	1,7±0,5
	9	60,4±3,3	39,4±1,2	25,4±3,0	6,7±1,5	7,4±1,1	1,6±0,3
Миші, яким вводили штаму В-7280	1	37,8±6,1	15,4±1,3	9,8±0,6	6,1±0,4	9,3±1,6	1,6±0,2
	3	50,1±2,0	24,9±1,5	19,0±1,5	6,8±0,7	15,9±1,8	1,3±0,2
	6	39,6±1,9	30,0±2,0	20,6±1,3	10,9±0,7	11,2±1,6	1,5±0,3
	9	41,0±1,9	27,4±1,7	17,0±1,1	6,5±0,6	9,5±1,5	1,6±0,2
Миші, яким вводили “Лацидофіл”	1	36,4±5,0	21,3±1,4	13,2±0,6	6,7±0,5	12,1±1,8	1,6±0,2
	3	49,5±1,3	28,3±1,6	18,2±0,8	5,6±0,3	13,8±1,9	1,6±0,3
	6	50,4±1,7	33,1±2,1	17,7±0,7	8,0±0,7	9,3±1,6	1,7±0,3
	9	52,4±1,5	37,7±1,9	15,2±0,6	7,3±0,6	8,1±1,7	1,5±0,2
Вагінальне введення							
Інтактні миші (контроль 2)	1	56,6±3,8	33,4±3,0	21,7±2,1	7,0±1,1	10,3±2,0	1,5±0,1
	3	57,4±1,3	36,2±2,8	23,3±4,0	8,9±1,7	14,4±3,7	1,6±0,2
	6	50,9±4,1	30,1±3,3	19,6±3,2	6,2±1,0	8,2±1,9	1,5±0,1
	9	51,0±2,0	32,2±2,4	20,7±2,1	6,9±1,1	9,4±1,0	1,6±0,4
Миші, яким вводили штаму В-7280	1	48,1±5,8	34,9±1,7	19,1±1,5	7,2±2,8	7,6±1,5	1,8±0,2
	3	46,3±6,6	30,4±1,1	18,5±1,6	6,2±2,7	9,0±1,1	1,6±0,1
	6	57,5±2,4	39,3±2,7	20,0±2,2	10,8±2,9	8,7±0,9	1,9±0,4
	9	58,5±2,6	36,4±1,3	22,2±1,7	9,5±2,8	10,0±1,3	1,6±0,6
Миші, яким вводили “Лабілакт®”	1	56,9±2,1	36,8±1,5	25,9±2,7	11,8±2,9	12,4±1,2	1,4±0,2
	3	60,0±2,5	35,1±2,0	24,8±2,8	10,1±3,2	13,0±2,1	1,4±0,9
	6	56,6±2,6	38,0±1,6	21,6±1,9	6,3±2,9	10,0±2,5	1,7±0,7
	9	55,5±2,1	39,4±2,5	25,8±2,4	10,5±3,6	13,3±2,6	1,5±0,3

Для з'ясування можливих механізмів дії штаму В-7280 на наступному етапі досліджень визначали його вплив на рівень цитокинів різних опозиційних груп у сироватці крові (табл. 3). Було встановлено, що під впливом штаму В-7280 відбувалось підвищення рівнів сироваткових ІЛ-12 та ІФН- γ порівняно з показниками контролю у різні терміни спостереження залежно від способу його введення. У мишей, які отримували цей штаму перорально, рівень ІЛ-12 у сироватці крові підвищувався на 1–6 добу, а ІФН- γ – на 1 добу. Після вагінального введення штаму В-7280 рівень сироваткового ІЛ-12 підвищувався пізніше – на 3 та 6 добу, але активація γ -інтерфероногенезу була тривалішою. Рівень ІФН- γ в сироватці мишей цієї групи порівняння зростав на 1 та 6 добу спостереження; на 3 добу виявлено тенденцію до його підвищення, але різниця порівняно з контролем не виявилась вірогідною.

Таблиця 3

Вміст цитокінів у сироватці крові мишей, яким перорально або вагінально вводили штаму В-7280, $M \pm StDev$

Групи тварин	Доба	Рівень цитокінів у сироватці крові, пкг/мл		
		ІЛ-12	ІФН- γ	ІЛ-4
Пероральне введення				
Інтактні миші (контроль 1)	1	740,7 \pm 42,2	3,2 \pm 0,3	1,5 \pm 0,1
	3	763,9 \pm 21,9	3,0 \pm 0,9	1,6 \pm 0,2
	6	736,1 \pm 19,9	3,1 \pm 0,7	1,6 \pm 0,9
Миші, яким вводили штаму В-7280	1	967,8 \pm 47,0*	8,5 \pm 0,4 *	1,1 \pm 0,1*
	3	1125,6 \pm 49,7*	2,8 \pm 0,2	1,0 \pm 0,1*
	6	890,0 \pm 44,5*	2,9 \pm 0,2	1,0 \pm 0,1*
Вагінальне введення				
Інтактні миші (контроль 2)	1	723,8 \pm 56,9	3,7 \pm 0,5	1,2 \pm 0,2
	3	739,9 \pm 67,1	3,2 \pm 0,2	1,3 \pm 0,4
	6	745,0 \pm 46,0	3,1 \pm 0,1	1,4 \pm 0,1
Миші, яким вводили штаму В-7280	1	736,0 \pm 41,6	9,2 \pm 0,6*	1,0 \pm 0,1
	3	928,8 \pm 56,6*	4,3 \pm 0,9	1,9 \pm 0,1
	6	904,4 \pm 66,3*	7,0 \pm 0,7*	0,9 \pm 0,2

Примітка: * – $p < 0,05$ відносно показників для інтактних мишей.

Як наведено у табл. 3, у мишей, при пероральному застосуванні штаму В-7280 стимуляція γ -інтерфероногенезу супроводжувалась зниженням рівня протизапального цитокіну – ІЛ-4 – у сироватці крові на 1–6 добу спостереження. Індекс співвідношення ІФН- γ /ІЛ-4 у мишей цієї групи порівняння на 1 добу підвищувався до $9,0 \pm 0,8$ ум. од. проти $3,0 \pm 0,4$ ум. од. у контролі ($p < 0,05$), але на 3 та 6 добу нормалізувався (відповідно $2,8 \pm 0,6$ та $2,4 \pm 0,9$ ум. од.; $p > 0,05$). На 1 та 6 добу після введення штаму В-7280 мишам у піхву виявлено тенденцію до зниження рівня ІЛ-4 у сироватці крові, але різниця порівняно з контролем виявилась не вірогідною. Однак індекс співвідношення ІФН- γ /ІЛ-4 у мишей цієї групи порівняння на 1 та 6 добу підвищувався до $9,1 \pm 0,9$ та $7,2 \pm 0,5$ ум. од. (за рахунок активації γ -інтерфероногенезу) відповідно проти $3,0 \pm 0,4$ ум. од. в контролі ($p < 0,05$), але на 3 добу був на рівні контролю ($2,4 \pm 0,9$ ум. од.; $p > 0,05$).

Обговорення. Результати проведених нами досліджень показали, що під впливом штаму В-7280 за фізіологічної норми збільшувалась кількість МФПЕ, здатних до поглинання об'єкту фагоцитозу, а також відбувалось посилення інтенсивності їх поглинальної функції (за перорального застосування) й перетравлюючої здатності (за перорального та вагінального застосування), але їх резервні можливості зберігались на рівні контролю. Вміст ІЛ-12 та ІФН- γ (цитокінів Th1-типу) у сироватці крові підвищувався у мишей, що отримували цей штаму, на тлі зниження або тенденції до зниження вмісту сироваткового ІЛ-4 (цитокіну Th2-типу) у різні терміни спостереження. Однак за фізіологічної норми він не впливав на кількість ПКК у селезінці та такі важливі показники клітинних і гуморальних факторів набутого імунітету як фенотиповий склад лімфоцитів селезінки. При застосуванні штаму В-7280 не спостерігали погіршення фізичного стану мишей або виникнення будь-яких проявів його токсичної дії. Водночас з периферичної крові, серця, печінки, нирок та мезентеріальних лімфатич-

них вузлів цих мишей лактобактерії не висівались (неопубліковані дані), що також підтверджує його безпечність. Отримані дані свідчать, з одного боку, про імуномодулювальні властивості штаму В-7280 за фізіологічної норми, з іншого – на користь відсутності у нього імунотоксичної дії. Зауважимо, що активацію МФПЕ інтактних імунодефіцитних мишей лінії BALB/c викликав й пробіотик “Лацидофіл”, безпечність якого вже є доведеною.

Наші спостереження можна пояснити тим що, імовірно, внаслідок взаємодії штаму В-7280 з ентероцитами та імунними клітинами слизових оболонок шлунково-кишкового тракту і піхви відбувається індукція цитокінів, зокрема – ІЛ-12 та ІФН- γ , які здатні впливати на розвиток системної імунної відповіді. Відомо [19, 24], що активація продукції ІЛ-12 антигенпредставляючими клітинами після взаємодії молекулярних структур мікроорганізмів з Толл-подібними рецепторами, експресованими в них, відіграє ключову роль у спрямуванні диференціювання Th0 Т-лімфоцитів у бік переважного розвитку Th1 Т-лімфоцитів, що призводить до індукції експресії генів низки цитокінів, серед яких ключовим регулятором клітинного імунітету є ІФН- γ . Логічно стверджувати, що клітини-продуценти ІЛ-12 є важливою мішенню імуномодулювальної дії штаму В-7280, кінцевим результатом якої є як активація вроджених факторів імунітету, так і балансування Th1/Th2 імунної відповіді.

Підвищення вмісту ІЛ-12 та ІФН- γ у сироватці крові інтактних мишей, яким вводили штам В-7280, а також індексу співвідношення ІФН- γ /ІЛ-4 свідчить про домінування імунної відповіді Th1-типу та вказує на його потенційну здатність активувати клітинну ланку імунітету. Раніше це нами вже було підтверджено на моделі вагініту у мишей лінії BALB/c, індукованого *Staphylococcus aureus*. У мишей з вагінітом на тлі ефективного лікувального ефекту штаму В-7280 також спостерігали активацію МФПЕ, підвищення рівнів сироваткових ІЛ-12, ІФН- γ та зниження рівня ІЛ-4, що підтверджує переважний розвиток імунної відповіді Th1-типу, порушеної внаслідок перебігу захворювання [18]. Відмінність у профілактично-лікувальному застосуванні штаму В-7280 за метаболічного синдрому у щурів, індукованого глутаматом натрію, полягає у зниженні під його впливом продукції прозапальних та відновленні до рівня норми продукції протизапальних цитокінів [17, 25]. Тобто штам В-7280 за різних експериментальних моделей патологічних процесів здійснював про- або протизапальну дію залежно від ролі про- та протизапальних цитокінів у патогенезі того чи іншого захворювання.

Встановлено, що й інші штами *L. casei* мали різноспрямований вплив на цитокінову регуляцію імунної відповіді та запалення за інфекційних, алергічних, аутоімунних та інших патологічних процесів. Наприклад, при застосуванні штаму *L. casei* Shirota у мишей, яким попередньо вводили овальбумін, підвищувалась продукція цитокінів Th1-типу таких, як ІФН- γ і ІЛ-2, а також ІЛ-12 за одночасного зниження продукції цитокінів Th2-типу – ІЛ-4, ІЛ-5, ІЛ-6 та ІЛ-10 [26]. Під впливом штаму *L. casei* CRL 431, який вводили мишам перед сенсibiliзацією овальбуміном, також зменшувався рівень ІЛ-4 на тлі підвищення рівня ІФН- γ [27]. Підвищення стійкості до грипозної інфекції дихальних шляхів у новонаро-

джених мишей, яким вводили штам *L. casei* Shirota, супроводжувалось активацією ПКК та підвищенням продукції ІЛ-12 клітинами медіастинальних лімфатичних вузлів [28]. Наслідком застосування штаму *L. casei* CRL 431 у мишей з експериментальною легеневою інфекцією, індукованою *Streptococcus pneumonia*, було підвищення рівнів ІЛ-4 і ІЛ-10, які регулювали протизапальні, прокоагулянтні та антифібринолітичні ефекти прозапальних цитокінів – фактора некрозу пухлин(ФНП)- α , ІЛ-1 β і ІЛ-6 [29]. Штам *L. casei* SABA6 за експериментальної моделі ентеропатогенної інфекції у кролів, викликаній *Escherichia coli*, знижував частоту виникнення діареї, захищав тварин від інфікування за одночасного підвищення рівнів як про- (ІЛ-6), так і протизапальних (ІЛ-10) цитокінів [30]. Під впливом штаму *L. casei* вар. *rhamnosus* (Lcr35, Antibiophilus™, Франція) поліпшення перебігу діареї в імунодефіцитних мишей лінії SCID/NOD асоціювалось з відновленням глибини крипт та пригніченням продукції низки про- та протизапальних цитокінів таких, як ФНП- α , ІФН- γ , ІЛ-1 β , ІЛ-6, ІЛ-4, ІЛ-10 і ІЛ-17 [31]. Інші штами *L. casei* також по-різному впливали на продукцію цитокінів за різних експериментальних моделей [32-34].

Отже, пробіотичні культури можуть мати специфічну дію на цитокінову регуляцію імунної відповіді, яка відрізняється навіть у штамів одного виду. Зауважимо, що при дослідженні їх впливу на функціонування цитокінової сітки важливим є і визначення концентрації цитокінів у біологічних рідинах або тканинах. Так, у низьких концентраціях цитокіни необхідні для правильного формування місцевого запалення, у вищих – викликають розвиток системної запальної реакції, однак у патологічно високих концентраціях можуть викликати септичний шок і навіть загибель організму [24]. Тому важливим є обґрунтування раціональних схем застосування пробіотиків, зокрема – їх оптимального індивідуалізованого дозування, оскільки відомо, що пробіотичні культури у високих дозах можуть викликати інтенсивніше запалення [35]. Водночас аналіз отриманих нами даних свідчить про те, що дослідження їх імуномодулювальних властивостей доцільно проводити за різних експериментальних моделей як патологічних процесів, так і фізіологічної норми.

Таким чином, результати проведених досліджень показали, що штам В-7280 є перспективним для розробки пробіотиків (імунобіотиків) із імуномодулювальними властивостями, які можна буде використовувати для профілактики та лікування інфекційно-запальних та інших захворювань. Обґрунтована доцільність подальших досліджень його біологічної активності та безпечності за експериментальних моделей, а також у клінічних дослідженнях.

Фінансова підтримка. Дослідження проведено коштом Міністерства освіти і науки України в рамках виконання договору № ДЗ/48-2018 від 05.10.2018 “Розроблення пробіотиків для профілактики та лікування інфекційно-запальних захворювань”. Фінансуюча організація не брала участі у плануванні досліджень та їх проведенні, а також аналізі отриманих результатів і підготовці рукопису до друку.

ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ПРОБИОТИЧЕСКОГО ШТАММА *LACTOBACILLUS CASEI* ИМВ В-7280 ПРИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ НОРМЕ У ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

Л.Н. Лазаренко, Л.П. Бабенко, Н.Я. Спивак

*Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина*

Резюме

Целью работы было определение иммуномодулирующего действия штамма *Lactobacillus casei* В-7280 при физиологической норме путем исследования его влияния на функциональную активность клеток фагоцитарной системы, фенотипический состав лимфоцитов селезенки и уровень про- и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови экспериментальных животных. **Методы.** Штамм В-7280 вводили интактным иммунодефицитным мышам линии BALB/с перорально с помощью зонда или вагинально. Поглотительную активность и кислородзависимую бактерицидность макрофагов перитонеального экссудата (МФПЭ) оценивали с помощью общепринятых методов исследования. В селезенке определяли количество CD16⁺/56⁺ природных киллерных клеток (ПКК), CD3⁺ Т-лимфоцитов, CD4⁺ Т-хелперов/индукторов, CD8⁺ Т-супрессоров/цитотоксических и CD19⁺ В-лимфоцитов с помощью метода проточной цитометрии. Уровни про- (интерлейкина (ИЛ)-12 и интерферона (ИФН- γ)) и противовоспалительных (ИЛ-4) цитокинов в сыворотке крови определяли с помощью иммуноферментного анализа. **Результаты.** Установлено, что штамм В-7280 при физиологической норме активировал фагоцитарные механизмы иммунной реактивности: увеличивалось количество МФПЭ, способных к поглощению объекта фагоцитоза, усиливалась интенсивность их поглотительной функции и переваривающей способности при сохраненном на уровне нормы функциональном резерве. Уровни ИЛ-12 и ИФН- γ в сыворотке крови повышались у мышей, получавших этот штамм как перорально, так и вагинально, на фоне снижения или тенденции к снижению уровня сывороточного ИЛ-4 в разные сроки наблюдения, что свидетельствует о его потенциальной способности индуцировать развитие клеточного звена иммунитета. При физиологической норме штамм В-7280 не влиял на количество ПКК в селезенке, а также на такие важные показатели клеточных и гуморальных факторов приобретенного иммунитета, как фенотипический состав лимфоцитов селезенки. Активация фагоцитов и изменение уровня цитокинов в сыворотке крови мышей после использования штамма В-7280 не сопровождалась ухудшением их физического состояния или любыми проявлениями интоксикации. **Выводы.** Штамм В-7280 имеет иммуномодулирующие свойства при физиологической норме, направленные на активацию врожденных факторов иммунитета и балансирование продукции Th1/Th2 цитокинов. Штамм является перспективным для разработки пробиотиков (иммунобиотиков) с иммуномодулирующими свойствами, которые можно будет использовать для профилактики и лечения инфекционно-воспалительных и других заболеваний. Обоснована целесообразность дальнейших исследований его биологической активности и безопасности при разных экспериментальных моделях, а также в клинических исследованиях.

Ключевые слова: лактобактерии, иммунная система, цитокины, физиологическая норма, экспериментальные животные.

IMMUNOMODULATORY EFFECT OF PROBIOTIC STRAIN *LACTOBACILLUS CASEI* IMV B-7280 ON PHYSIOLOGICAL NORM IN EXPERIMENTAL ANIMALS

L.M. Lazarenko, L.P. Babenko, M.Ya. Spivak

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NAS of Ukraine,
154 Akad. Zabolotny Str., Kyiv, 03143, Ukraine

Summary

The aim of this work was to determine the immunomodulatory effect of the *Lactobacillus casei* B-7280 strain in the physiological norm by studying its effect on the functional activity of cells of the phagocytic system, the phenotypic composition of spleen lymphocytes and the level of pro- and anti-inflammatory cytokines in the blood serum of experimental animals. **Methods.** The B-7280 strain was administered to intact immunodeficient BALB/c mice orally using a probe or vaginally. Absorption activity, as well as oxygen-dependent bactericidal activity of macrophages of peritoneal exudate (MFPE) was assessed using common research methods. The number of CD16+/56+ natural killer cells (NKC), CD3+ T-lymphocytes, CD4+ T-helpers/inductors, CD8+ T-suppressors/cytotoxic and CD19+ B-lymphocytes was determined in the spleen using the method of flow cytometry. The levels of pro- (interleukin (IL)-12 and interferon (IFN)- γ) and anti-inflammatory (IL-4) cytokines in serum were determined by enzyme immunoassay. **Results.** It was found that the B-7280 strain activated the phagocytic mechanisms of immune reactivity at the physiological norm: the number of MFPEs capable for absorbing the object of phagocytosis increased, the intensity of their absorbing function and digestive capacity increased and the level of functional reserve remained normal. The levels of IL-12 and IFN- γ in blood serum were increased in mice that received this strain both orally or vaginally, against the background of decrease or tendency to decrease the level of serum IL-4 in different terms of observation, which indicates its potential ability to induce the development of the immunity cellular link. At the physiological norm, the B-7280 strain did not influence the amount of NKC in the spleen and such important parameters of cellular and humoral factors of acquired immunity as the phenotypic composition of spleen lymphocytes. Activation of phagocytes and changes in the level of cytokines in mice' blood serum after the use of strain B-7280 was not accompanied by deterioration of their physical condition or any form of intoxication. **Conclusions.** The B-7280 strain has immunomodulatory properties at the physiological norm aimed at activation of congenital immune factors and balancing the production of Th1/Th2 cytokines. The strain is promising for the development of probiotics (immunobiotics) with immunomodulatory properties, which can be used for the prevention and treatment of infectious and other diseases. The expediency of further studies of its biological activity and safety in different experimental models, as well as in clinical studies, has been substantiated.

Keywords: lactobacillus, immune system, cytokines, physiological norm, experimental animals.

1. Shirobokov VP, Yankovskiy DS, Dyiment GS. [Mikrobnaya ekologiya cheloveka s tsvetnyim atlasom. Uchebnoe posobie]. Kiev:OOO Chervona Ruta-Turs, 2010. Russian.
2. Williams NT. Probiotics. Am J Health Syst Pharm. 2010; 67(6):449–58.

3. Lebeer S, Bron PA, Marco ML, Van Pijkeren JP, O'Connell Motherway M, et al. Identification of probiotic effector molecules: present state and future perspectives. *Curr Opin Biotechnol.* 2018; 49:217–23.
4. Yadav R, Singh PK, Shukla P. Metabolic engineering for probiotics and their genome-wide expression profiling. *Curr Protein Pept Sci.* 2018; 19(1):68–74.
5. Zmora N, Zilberman-Schapira G, Suez J, Mor U, Dori-Bachash M, Bashiardes S, Kotler E, et al. Personalized gut mucosal colonization resistance to empiric probiotics is associated with unique host and microbiome features. *Cell.* 2018; 174(6):1388–1405.
6. Nichols RG, Peters JM, Patterson AD. Interplay Between the Host, the Human Microbiome, and Drug Metabolism. *Hum Genomics.* 2019; 13(1):27.
7. Arena MP, Capozzi V, Russo P, Drider D, Spano G, Fiocco D. Immunobiosis and probiosis: antimicrobial activity of lactic acid bacteria with a focus on their antiviral and antifungal properties. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2018; 102(23):9949–58.
8. Halloran K, Underwood MA. Probiotic mechanisms of action. *Early Hum Dev.* 2019; S0378-3782(19):30294–4.
9. Kidd P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern Med Rev.* 2003; 8(3):223–46.
10. Abedin-Do A, Taherian-Esfahani Z, Ghafouri-Fard S, Ghafouri-Fard S, Motevaseli E. Immunomodulatory effects of *Lactobacillus* strains: emphasis on their effects on cancer cells. *Immunotherapy.* 2015; 7(12):1307–29.
11. Rø ADB, Simpson MR, Rø TB, Storrø O, Johnsen R, Videm V, et al. Reduced Th22 cell proportion and prevention of atopic dermatitis in infants following maternal probiotic supplementation. *Clin Exp Allergy.* 2017; 47(8):1014–21.
12. Azad MAK, Sarker M, Wan D. Immunomodulatory effects of probiotics on cytokine profiles. *Biomed Res Int.* 2018; 2018:8063–647.
13. Marteau Philippe. Safety aspects of probiotic products. *Scan J Nutr/Naringsforskning.* 2001; 145:22–242.
14. Guidelines for the Evaluation of Probiotics. Food Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food London Ontario, Canada April 30 and May 1, 2002.
15. Shanahan F. A commentary on the safety of probiotics. *Gastroenterol Clin North Am.* 2012; 41(4):869–76.
16. Doron S, Snyderman DR. Risk and safety of probiotics. *Clin Infect Dis.* 2015; 60 Suppl 2:S129–34.
17. Falalyeyeva TM, Leschenko IV, Beregova TV, Lazarenko LM, Savchuk OM, Sichel LM, et al. Probiotic strains of lactobacilli and bifidobacteria alter pro- and anti-inflammatory cytokines production in rats with monosodium glutamate-induced obesity. *Fiziol Zh.* 2017; 63(1):17–25.
18. Lazarenko LM, Babenko LP, Mokrozub VV, Demchenko OM, Bila VV, Spivak M.Ya. Effects of oral and vaginal administration of probiotic bacteria on the vaginal microbiota and cytokines production in the case of experimental Staphylococcosis in mice. *Mikrobiol. Z.* 2017; 79(6):105–19.
19. Drannik G.N. [Klinicheskaya immunologiya i allergologiya]. Kiev:OOO Poligraf plus, 2010. Russian.
20. Reznikov O. [Problemi etiki pri provedenni eksperimentalnih medichnih i biologichnih doslidzhen na tvarinah]. *Visnik NANU.* 2001; 1:5–7. Ukrainian.

21. [Laboratornyye zhiivotnyie: razvedenie, sodержanie, ispolzovanie v eksperimente]. Pod red. IP Zapadnyuka. Kiev: Vischa shkola, 1983. Russian.
22. [Sovremennyye metody diagnostiki virusnykh respiratornykh infektsiy i ih terapii s ispolzovaniem preparatov interferona (Metodicheskie rekomendatsii)]. Pod. red. Modzolevskogo AF, Dyachenko NS, Spivaka NYa. Kyiv, 1994. Russian.
23. Beyli N. [Statisticheskie metody v biologii]. Moskva: Izd-vo inostrannoy literatury, 1962. Russian.
24. Simbirtsev AS, Totolyan AA. [Tsitokiny v laboratornoy diagnostike. Klinicheskaya laboratornaya diagnostika: Natsionalnoe rukovodstvo], pod red. Dolgova VV, Menshikova VV. Moskva: GEOTAR-Media, 2013; 193–217. Russian.
25. Savcheniuk OA, Virchenko OV, Falalyeyeva TM, Beregova TV, Babenko LP, Lazarenko LM, et al. The efficacy of probiotics for monosodium glutamate-induced obesity: dietology concerns and opportunities for prevention. EPMA J. 2014; 5(1):2.
26. Matsuzaki T, Yamazaki R, Hashimoto S, Yokokura T. The effect of oral feeding of *Lactobacillus casei* strain Shirota on immunoglobulin E production in mice. J Dairy Sci. 1998; 81(1):48–53.
27. De Petrino SF, Bibas Bonet ME, Mesón O, Perdigón G. The effect of *Lactobacillus casei* on an experimental model of atopy. Food Agric Immunol. 2002; 14(3):181–9.
28. Yasui H, Kiyoshima J, Hori T. Reduction of influenza virus titer and protection against influenza virus infection in infant mice fed *Lactobacillus casei* Shirota. Clin Diagn Lab Immunol. 2004; 11(4):675–9.
29. Haro C, Villena J, Zelaya H, Alvarez S, Agüero G. *Lactobacillus casei* modulates the inflammation-coagulation interaction in a pneumococcal pneumonia experimental model. J Inflamm (Lond). 2009; 6:28.
30. Fayyaz I, Zahoor MA, Shahid M, Rasool MH, Nawaz Z. Effect of *Lactobacillus casei* on serum interleukins following enteropathogenic *E. coli* infection in experimental rabbits. Pak J Pharm Sci. 2018;31(5(Supplementary)):2131–36.
31. Huang L, Chiang Chiau JS, Cheng ML, Chan WT, Jiang CB, Chang SW, et al. SCID/NOD mice model for 5-FU induced intestinal mucositis: Safety and effects of probiotics as therapy. Pediatr Neonatol. 2019; 60(3):252–60.
32. Zarfeshani A, Khaza'ai H, Mohd Ali R, Hambali Z, Wahle KW, Mutalib MS. Effect of *Lactobacillus casei* on the production of pro-inflammatory markers in streptozotocin-induced diabetic rats. Probiotics Antimicrob Proteins. 2011; 3(3–4):168–74.
33. Manirarora JN, Parnell SA, Hu YH, Kosiewicz MM, Alard P. NOD dendritic cells stimulated with lactobacilli preferentially produce IL-10 versus IL-12 and decrease diabetes incidence. Clin Dev Immunol. 2011; 2011:6301–87.
34. Soltan Dallal MM, Yazdi MH, Holakuyee M, Hassan ZM, Abolhassani M, Mahdavi M. *Lactobacillus casei* ssp. *casei* induced Th1 cytokine profile and natural killer cells activity in invasive ductal carcinoma bearing mice. Iran J Allergy Asthma Immunol. 2012; 11(2):183–9.
35. Zhang L, Li N, Caicedo R, Neu J. Alive and dead *Lactobacillus rhamnosus* GG decrease tumor necrosis factor- α -induced interleukin-8 production in Caco-2 cells. J Nutr. 2005; 135(7):1752–6.

Отримано 26.07.2019