

ВПЛИВ НОВИХ ПРОБІОТИЧНИХ ШТАМІВ БАКТЕРІЙ НА ПРОДУКЦІЮ ІНТЕРФЕРОНУ

*Ю. О. Мельниченко, Д. Д. Маляр, асистенти
Білоцерківський національний аграрний університет
Л. М. Лазаренко, доктор біологічних наук
В. В. Мокрозуб, кандидат біологічних наук
О. А. Демченко, Л. П. Бабенко, провідні інженери
М. Я. Співак, доктор біологічних наук
Інститут мікробіології і вірусології
ім. Д. К. Заболотного НАН України*

*Визначено інтерфероногенні властивості пробіотичних штамів *L. casei* IMB B-7280, *L. acidophilus* IMB B-7279, *B. animalis* VKL та *B. animalis* VKB за дослідження їх впливу на показники імунітету. Пробіотичні штами *L. casei* IMB B-7280, *L. acidophilus* IMB B-7279, *B. animalis* VKL та *B. animalis* VKB за інтрагастрального введення інтактним мишам у дозі 1×10^6 кл. на тварину один раз на добу протягом 7 діб проявляли імуномодулювальні властивості. Усі ці пробіотичні штами, за умов фізіологічної норми, у різні терміни спостереження посилювали інтерфероноутворення. Досліджені штами є перспективними для корекції показників імунореактивності організму, порушених унаслідок перебігу інфекційно-запальних захворювань.*

Пробіотичні штами, лактобактерії, біфідобактерії, інтерферон, імуномодулювальні властивості.

Дисфункція імунної системи, яка виникає внаслідок зміни екології, широкого застосування новітніх хіміопрепаратів різної природи, порушення нормальної мікрофлори тощо є однією з найважливіших причин підвищення агресивності умовно-патогенних коменсальних мікроорганізмів з подальшим розвитком інфекційно-запальних хвороб людини й тварин [10]. Одержання сучасних препаратів-імунобіотиків на основі представників нормальної мікрофлори, зокрема штамів лакто- та біфідобактерій, є важливою проблемою сучасної біотехнології [2].

Дані літературних джерел свідчать, що імуномодулювальні властивості окремих культур лакто- та біфідобактерій суттєво відрізняються між собою, це є їх індивідуальною характеристикою. Створюючи препарати на основі лакто- та біфідобактерій з підвищеним рівнем імуномодулювальної активності – імунобіотики – доцільно забезпечити виконання всіх умов максимальної реалізації закладеного в цих бактеріях біологічного потенціалу [1]. Останніми роками особливу увагу спрямовано на вивчення механізмів модулювального впливу лактобактерій на імунні реакції організму. Асоційовані зі слизовою оболонкою кишечника лактобактерії

мають універсальні імуномодулювальні властивості, що включають як імуностимуляцію, так і імуносупресію [4–6]. Стимуляційні ефекти лактобактерій проявляються в механізмах активації ретикуло-ендотеліальної системи шлунково-кишкового тракту та продукції низки цитокінів, що забезпечують баланс між гуморальним та клітинно-опосередкованим імунітетом [2, 4–9].

Найважливішим механізмом взаємодії лактобактерій та взагалі представників облигатної мікрофлори з організмом хазяїна, що спрямовано на підтримку гомеостазу, є стимуляція продукції низки цитокінів [9,11]. Цитокіни поділяють на кілька груп: інтерлейкіни (ІЛ) – фактори взаємодії між лейкоцитами; інтерферони (ІФН) – цитокіни протівірусної та імуномодулюючої активності; фактори некрозу пухлин (ФНП) – цитокіни з цитотоксичною активністю; колонієстимуляційні фактори (КСФ) – гемопоетичні цитокіни та хемокіни (ХК) – хемотаксичні цитокіни [4,11–14].

Мета досліджень – визначення імуномодулювальних властивостей пробіотичних штамів *L. casei* IMB B-7280, *L. acidophilus* IMB B-7279, *B. animalis* VKL та *B. animalis* VKB шляхом дослідження їх впливу на продукцію ендogenous інтерферону.

Матеріали та методи досліджень. У роботі використовували штамми *L. casei* IMB B-7280, *L. acidophilus* IMB B-7279, *B. animalis* VKL та *B. animalis* VKB як індивідуально, так і в різних композиціях. Ці штамми раніше ми виділили з асоційованої культури за лабораторних досліджень ферментованого біологічного матеріалу. Дослідження проводили з використанням ліофілізованих бактерій. Перед кожним експериментом перевіряли життєздатність пробіотичних культур шляхом контролю їх росту на середовищі Man-Rogosa-Sharpe (MRS) за +37 °C протягом 24–48 годин.

Схема експериментальних досліджень біологічної активності пробіотичних препаратів бактерій *in vivo*. Дослідження проведено на самках мишей лінії BaLb/c вагою 18–20 г. Тварин було поділено за принципом аналогів на 5 груп по 15 голів. Пробіотичні штамми бактерій (кожний окремо) вводили мишам *per os* впродовж 7 діб один раз на добу. Доза пробіотичних препаратів на одну тварину (*per os*) становила 1×10^6 кл. Динаміку інтерфероноутворення досліджували за зміною вмісту інтерферону у сироватці крові через 6 год, на першу, третю, шосту та 12-ту добу.

Дослідження показників інтерферонового статусу організму. Досліджували продукцію інтерферону- α імунними клітинами (лейкоцитами периферійної крові, клітинами селезінки) *in vitro* у відповідь на адекватну індукцію індуктором інтерферону – ридостином, визначали спонтанну продукцію інтерферону, а також вміст ендogenous інтерферону у біологічних рідинах.

Для індукції інтерферону- α у лунки стерильного плоскодонного 24-лункового планшета вносили по 400 мкл відповідного живильного середовища, 500 мкл суспензії клітин та 100 мкл розчину ридостину (100 мкг/мл). У контрольні лунки замість ридостину додавали 100 мкл живильного середовища. Клітини культивували за +37 °C протягом 24 год у водонасиченій атмосфері з постійним рівнем CO₂ (5 %). Після інкубації клітини переноси-

ли у стерильні центрифужні пробірки та центрифугували (10 хв, 1500 об/хв.). Із кожної лунки відбирали надосад в іншу стерильну пробірку.

Продукцію інтерферону визначали мікрометодом [7] у інтактних та дослідних мишей через 8, 24 та 72 години після початку введення препаратів. Для цього по 5 мишей з кожної групи забивали методом цервікальної дислокації та одержували сироватку крові тварин [7], селезінку [5], з якої отримували спленоцити [3].

Усі отримані цифрові дані опрацьовували за допомогою комп'ютерної програми Epi Info (версія 6.0) методом варіаційної статистики. Числові дані представляли у вигляді середнього арифметичного значення та стандартної похибки ($M \pm m$). Відмінності між групами вважали статистично значимими за $P < 0,05$.

Результати досліджень. Результати проведених досліджень показали, що введення мишам препаратів лактобактерій або біфідобактерій призводило до стимуляції ендogenous інтерферогенезу (рис. 1). Однак сила та динаміка інтерфероутворення суттєво відрізнялися, залежно від штаму як лактобактерій, так і біфідобактерій. Серед лактобактерій найбільшу інтерферогенну активність мав *L. acidophilus* IMB B-7279, а біфідобактерій – *B. animalis* VKL.

Суттєве накопичення інтерферону у сироватці крові за впливу *L. acidophilus* IMB B-7279 та *B. animalis* VKL спостерігалось уже через 6 год: титри інтерферону підвищувалися з $5,30 \pm 0,40 \log_2$ Од/мл у контролі до $7,05 \pm 0,01$ та $7,00 \pm 0,04 \log_2$ Од/мл, відповідно ($P < 0,05$). Високий рівень сироваткового інтерферону зберігався на першу добу ($8,06 \pm 0,01$ та $6,9 \pm 0,01 \log_2$ Од/мл), третю ($9,10 \pm 0,05$ та $9,30 \pm 0,20 \log_2$ Од/мл) та шосту добу ($9,00 \pm 0,01$ та $8,04 \pm 0,02 \log_2$ Од/мл). У мишей, які отримували *L. acidophilus* IMB B-7279, концентрація цього цитокіну у сироватці крові виявилася підвищеною і на 12-ту добу ($6,75 \pm 0,02 \log_2$ Од/мл). Водночас, після введення мишам *B. animalis* VKL, титри інтерферону на 12-ту добу зменшувалися до рівня $4,4 \pm 0,30 \log_2$ Од/мл.

За впливу *L. casei* IMB B-7280 концентрація сироваткового інтерферону не змінювалася, порівняно з показниками контролю, через 6 год ($5,0 \pm 0,09 \log_2$ Од/мл) та на першу добу ($5,30 \pm 0,07 \log_2$ Од/мл), однак підвищувалася на третю ($6,30 \pm 0,01 \log_2$ Од/мл) та шосту добу ($5,9 \pm 0,04 \log_2$ Од/мл). Через 12 діб вміст інтерферону у сироватці крові мишей, які отримували *L. casei* IMB B-7280, зменшувався до рівня показників у контролі ($4,25 \pm 0,30 \log_2$ Од/мл). Після введення мишам *B. animalis* VKB, титри сироваткового інтерферону не змінювалися через 6 год та на першу добу (відповідно, $6,00 \pm 0,01$ та $4,30 \pm 0,10 \log_2$ Од/мл), але підвищувалися на третю добу до $7,30 \pm 0,30 \log_2$ Од/мл ($P < 0,05$). На шосту та 12-ту добу титри інтерферону у сироватці крові цих мишей зменшувалися до рівня контролю (відповідно, $4,8 \pm 0,04$ та $4,90 \pm 0,30 \log_2$ Од/мл). Отримані нами результати свідчать, що препарати *L. acidophilus* IMB B-7279 та *B. animalis* VKL виявились ефективними індукторами як «раннього», так і «пізнього» інтерферону, *L. casei* IMB B-7280 після введення мишам індуквали утворення «пізнього» інтерферону.

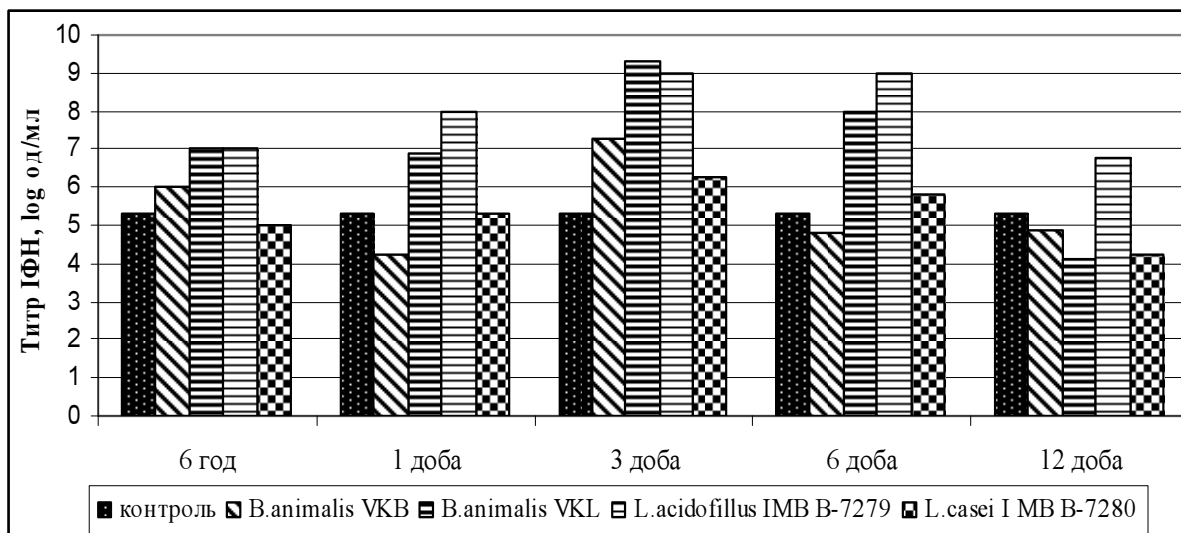


Рис. 1. Зміна вмісту сироваткового інтерферону після введення інтактним мишам пробіотичних штамів бактерій

Спонтанна продукція інтерферону клітинами селезінки. Встановлено, що введення пробіотиків призвело до зміни інтерферогенної активності клітин селезінки (рис. 2). За введення *B. animalis* VKL спостерігалось підвищення здатності спленоцитів до продукції спонтанного інтерферону *in vitro*. Спленоцити, отримані на першу добу, *in vitro* спонтанно продукували інтерферон у титрах $7,10 \pm 0,06 \log_2$ Од/мл проти $5,00 \pm 0,20 \log_2$ Од/мл ($P < 0,01$) у контролі. На третю добу встановлено тенденцію до підвищення рівня спонтанної продукції інтерферону: титри становили, відповідно, $6,4 \pm 0,01 \log_2$ Од/мл, однак різниця з контролем не була вірогідною. Титри інтерферону у супернатантах нестимульованих спленоцитів, отриманих на 12-ту добу після введення мишам *B. animalis* VKL, зберігалися на рівні контролю ($4,8 \pm 0,01 \log_2$ Од/мл).

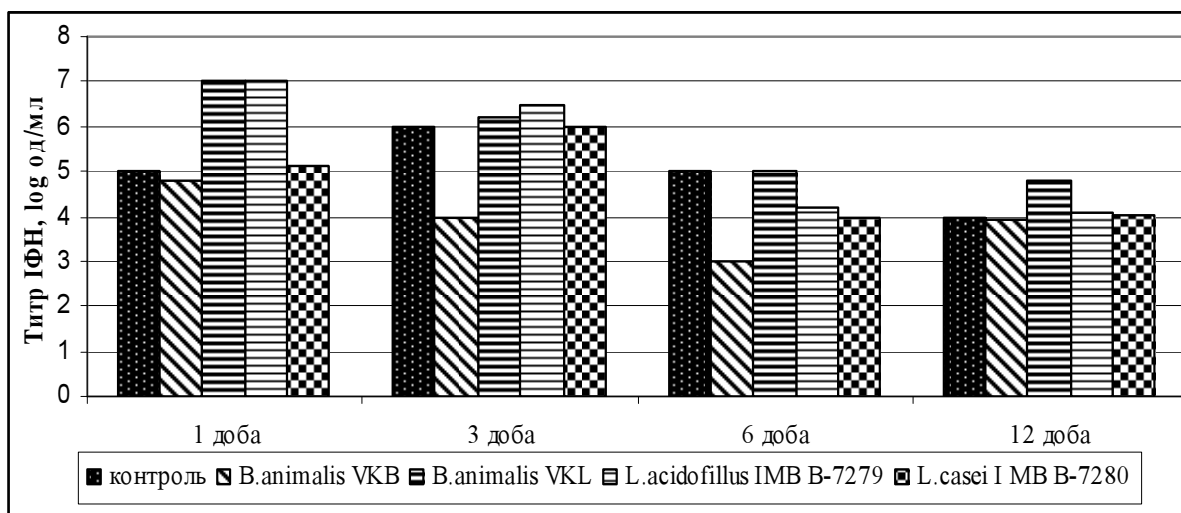


Рис. 2. Спонтанна продукція інтерферону *in vitro* клітинами селезінки інтактних мишей, які отримували пробіотичні штами бактерій

Водночас, за впливу *B. animalis* VKB встановлено зниження здатності до спонтанної продукції інтерферону у спленоцитів, отриманих на третю та шосту добу після введення: титри дорівнювали, відповідно, $4,00 \pm 0,01$ та $3,00 \pm 0,01 \log_2$ Од/мл, проти $6,00 \pm 0,01$ ($P < 0,01$) та $5,00 \pm 0,01$ ($P < 0,01$) \log_2 Од/мл у контролі. Титри інтерферону у супернатантах нестимульованих спленоцитів, отриманих на першу та 12-ту добу, вірогідно не відрізнялися від контрольних показників, відповідно, $4,8 \pm 0,01$ та $3,9 \pm 0,02 \log_2$ Од/мл; у контролі $5,00 \pm 0,01$ та $4,00 \pm 0,01 \log_2$ Од/мл.

Спонтанна продукція інтерферону клітинами селезінки *in vitro* зростала після введення мишам *L. acidophilus* IMB B-7279. На першу добу титри інтерферону підвищувались до $7,00 \pm 0,04 \log_2$ Од/мл проти $5,00 \pm 0,01 \log_2$ Од/мл ($P < 0,01$) у контролі. Проте на третю, шосту та 12-ту добу вони вірогідно не відрізнялися від показників контролю (відповідно, $6,5 \pm 0,01$; $4,2 \pm 0,02$ та $4,1 \pm 0,02 \log_2$ Од/мл).

За впливу *L. casei* IMB B-7280 на першу добу спонтанна продукція інтерферону спленоцитами *in vitro* незначно зростала ($5,30 \pm 0,06 \log_2$ Од/мл), однак різниця, порівняно з показниками контролю, виявилася невірогідною.

На третю, шосту та 12-ту добу після введення мишам *L. casei* IMB B-7280 спленоцити спонтанно продукували інтерферон у титрах, відповідно, $6,00 \pm 0,01$; $4,10 \pm 0,02$ та $4,00 \pm 0,03 \log_2$ Од/мл, що не відрізнялися від показників контролю.

Отже, ефективними інтерфероногенами серед препаратів, які ми досліджували, виявилися *B. animalis* VKL та *L. acidophilus* IMB B-7279. Після введення мишам *B. animalis* VKL та *L. acidophilus* IMB B-7279 на першу добу суттєво підвищувалася здатність спленоцитів до спонтанної продукції інтерферону *in vitro*. *B. animalis* VKB, *L. casei* IMB B-7280 після введення мишам не впливали на спонтанну продукцію інтерферону спленоцитами *in vitro*.

Продукція інтерферону- α індукованими клітинами селезінки. Введення мишам препаратів супроводжувалося зміною здатності клітин селезінки до продукції інтерферону- α *in vitro* під дією індуктора інтерферону ридостину (рис. 3).

Встановлено, що продукція інтерферону- α активованими ридостином *in vitro* спленоцитами підвищувалася під впливом *B. animalis* VKL. Виявлено тенденцію до підвищення титрів інтерферону- α у супернатантах стимульованих спленоцитів на першу добу після його введення ($5,4 \pm 0,12 \log_2$ Од/мл; у контролі $5,00 \pm 0,01 \log_2$ Од/мл; $P > 0,05$). На третю добу титри інтерферону- α зростали суттєво – до $8,05 \pm 0,01 \log_2$ Од/мл проти $6,00 \pm 0,08 \log_2$ Од/мл ($P < 0,001$) у контролі. На шосту та 12-ту добу, після введення мишам *B. animalis* VKL, спленоцити продукували інтерферон- α на рівні контролю – у титрах, відповідно, $4,1 \pm 0,01$ та $4,3 \pm 0,18 \log_2$ Од/мл, порівняно з $4,00 \pm 0,01$ та $4,1 \pm 0,02 \log_2$ Од/мл у контролі.

B. animalis VKB не впливав на продукцію інтерферону- α *in vitro* у відповідь на адекватну індукцію спленоцитами, отриманими на першу, третю, шосту та 12-ту добу після його введення: титри дорівнювали, відповідно, $4,8 \pm 0,01$; $6,05 \pm 0,02$; $4,1 \pm 0,02$ та $4,10 \pm 0,01 \log_2$ Од/мл.

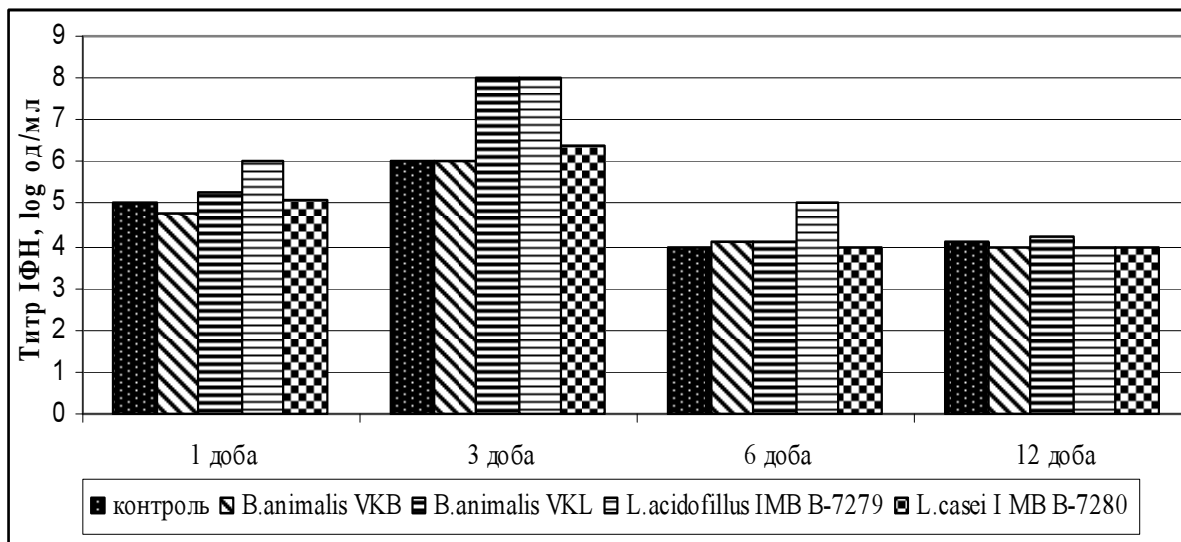


Рис. 3. Продукція інтерферону-а *in vitro* клітинами селезінки інтактних мишей, які отримували пробіотичні штами бактерій

L. acidophilus IMB B-7279 підвищував здатність спленоцитів до продукції інтерферону *in vitro*. Після введення *L. acidophilus* IMB B-7279 на першу добу спостерігалася тенденція до підвищення титрів інтерферону-а у супернатантах активованих спленоцитів ($6,05 \pm 0,36 \log_2$ Од/мл; у контролі $5,00 \pm 0,01 \log_2$ Од/мл), тоді як на третю добу вони зростали суттєво – до $8,00 \pm 0,23 \log_2$ Од/мл проти $6,00 \pm 0,01 \log_2$ Од/мл ($P < 0,001$) у контролі. На шосту та 12-ту добу титри інтерферону-а зменшувалися до рівня контрольних показників – відповідно, до $5,06 \pm 0,09$ та $4,10 \pm 0,06 \log_2$ Од/мл.

За впливу *L. casei* IMB B-7280 продукція інтерферону-а клітинами селезінки *in vitro* на першу добу вірогідно не змінювалася ($5,1 \pm 0,08 \log_2$ Од/мл), але незначно підвищувалася на третю добу ($6,4 \pm 0,21 \log_2$ Од/мл; $P > 0,05$).

Титри інтерферону-а у супернатантах стимульованих спленоцитів не відрізнялися від показників контролю на шосту та 12-ту добу (відповідно, $4,1 \pm 0,09$ та $4,00 \pm 0,01 \log_2$ Од/мл).

Висновки

Пробіотичні штами *L. casei* IMB B-7280, *L. acidophilus* IMB B-7279, *B. animalis* VKL та *B. animalis* VKB за інтрагастрального введення інтактним мишам у дозі 1×10^6 кл. на тварину один раз на добу протягом 7 діб проявляли імуномодулювальні властивості. Так, усі ці пробіотичні штами, за умов фізіологічної норми, у різні терміни спостереження посилювали інтерфероноутворення. Введення мишам *B. animalis* VKL, *L. acidophilus* IMB B-7279, *L. casei* IMB B-7280 призводило до підвищення здатності спленоцитів продукувати інтерферон-а *in vitro* у відповідь на адекватну індукцію ридостином на першу та третю добу. Отже, досліджені штами лакто- та біфідобактерій надалі можна буде рекомендувати як пробіотичні препарати з імуномодулювальною активністю.

Список літератури

1. Антибактеріальні й імуномодулювальні властивості штамів лакто- та біфідобактерій за експериментальної стафілококової інфекції / В. В. Мокрозуб, Я. М. Лазаренко, Л. П. Бабенко [та ін.] // Біотехнологія. – 2012. – Т. 5, № 2. – С. 98–104.
2. Бондаренко В. М. Иммуностимулирующее действие лактобактерий, используемых в качестве препаратов пробиотиков / В. М. Бондаренко, Э. И. Рубакова, В. А. Лаврова // ЖМЭИ. – 1998. – № 5. – С.107–112.
3. Иммунологические методы / под ред. Г. Фримеля ; пер. с нем. А. П. Тарасова. – М. : Медицина, 1987. – 472 с.
4. Інтерфероногенна активність лактобактерій / С. О. Старовойтова, Н. О. Тимошок, М. Я. Співак, В. Ю. Горчаков // Імунологія та алергологія. – 2007. – № 4. – С. 24–27.
5. Лимфоциты: методы : пер. с англ. / под ред. Дж. Клауса. – М. : Мир, 1990. – 395 с.
6. Николаева Т. Е. Роль цитокинов в модуляции иммунореактивности организма бактериями рода *Lactobacillus* / Т. Е. Николаева, В. В. Зорина, В. М. Бондаренко // ЖМЭИ. – 2004. – № 6. – С.101–106.
7. Папіломовірусна інфекція та система інтерферону / [Л. М. Лазаренко, М. Я. Співак, О. М. Михайленко, Г. Т. Сухих]. – К. : Фітосоціоцентр, 2005. – 288 с.
8. Поиск штаммов бактерий родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*, перспективных для создания пробиотиков / С. А. Старовойтова [та ін.] // Науковий вісник Ужгородського університету. Серія «Біологія». – 2009. – Вип. 26. – С. 216–219.
9. Потапнев М. П. Апоптоз клеток иммунной системы и его регуляция цитокинами / М. П. Потапнев // Иммунология. – 2002. – № 4. – С. 237–243.
10. Ширококов В. П. Микробная экология человека / В. П. Ширококов, Д. С. Янковский, Г. С. Дьмент – К. : Червона рута-Турс, 2010. – 340 с.
11. Ярилин А. А. Система цитокинов и принципы ее функционирования в норме и при патологии / А. А. Ярилин // Иммунология. – 1997. – № 5. – С.7–14.
12. Ericsson K.L. Probiotic immunomodulation in health and disease / K. L. Ericsson, N. E. Hubbard // J. Nutr. – 2000. – Vol.130, № 2. – P. 403–409.
13. Maldonado Galdeano C. The probiotic bacteria *Lactobacillus casei* induces activation of the gut mucosal immune system through the innate immunity / Maldonado Galdeano C., G. Perdigon // Clin. Vaccine Immunol. – 2005. – 13. – P. 219–226.
14. Perdigon G., Lactic acid bacteria and their effect on the immune system / G. Perdigon, R. Fuller, R. Raya // Curr. Issues.Intest.Microbiol. – 2001. – № 2 (1). – P. 27–42.

Определены интерфероногенные свойства пробиотических штаммов *L. casei* IMB B-7280, *L. acidophilus* IMB B-7279, *B. animalis* VKL и *B. animalis* VKB при исследовании их влияния на показатели иммунитета. Пробиотические штаммы *L. casei* IMB B-7280, *L. acidophilus* IMB B-7279, *B. animalis* VKL и *B. animalis* VKB при интрагастральном введении интактным мышам в дозе 1×10^6 кл. на животное один раз в сутки в течение 7 суток проявляли иммуномодулирующие свойства. Все эти пробиотические штаммы, в условиях физиологической нормы, в разные

сроки наблюдения усиливали интерферонообразование. Исследованные штаммы являются перспективными для коррекции показателей иммунореактивности организма, нарушенных вследствие течения инфекционно-воспалительных заболеваний.

Пробиотические штаммы, лактобактерии, бифидобактерии, интерферон, иммуномодулирующие свойства.

The immunomodulatory properties of L. casei IMB B-7280, L. acidophilus IMB B-7279, B. animalis VKL and B. animalis VKB probiotic strains were studied and their effects on indicators of immunity were determined. Probiotic strains of L. casei IMB B-7280, L. acidophilus IMB B-7279, B. animalis VKL and B. animalis VKB under their intragastric injection in intact mice at a dose of 1×10^6 cells per animal once a day for 7 days had immunomodulatory properties. was strengthened All of these probiotic strains potentized interferonogenesis under conditions of physiological norm in different periods of observation. The investigated strains are promising for of body immunoreactivity correction affected due to infectious and inflammatory diseases.

Probiotic strains, lactobacilli, bifidobacteria, interferon immunomodulating properties.