

С.О.Старовойтова^{*}, Н.О. Тимошок^{}, В.Ю. Горчаков^{*}, М.Я. Співак^{**}**

^{*}Національний технічний університет України «КПІ», пр-т Перемоги, 37, м.Київ, 03056,

^{**}Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України, вул. акад. Заболотного, 154, м. Київ, 03143, Україна.

ІНТЕРФЕРОНОГЕННА АКТИВНІСТЬ ЛАКТОБАКТЕРІЙ

Досліджено здатність стимулювати продукцію інтерферону та фактору некрозу пухлин in vivo та in vitro під впливом композиції лактобактерій, що складається з 5 штамів живих бактерій. Показано, що спленоцити та макрофаги перитоніального ексудату під впливом дослідної композиції лактобактерій здатні продукувати інтерферон та фактор некрозу пухлин і синтез цих цитокінів майже не відрізняється від значень отриманих при застосуванні препарату порівняння - Лактобактерин.

Ключові слова: лактобактерій, інтерферон, фактор некрозу пухлин, імуномодуючі властивості.

Окрім захисту організму хазяїна від колонізації екзогенними патогенними мікроорганізмами та пригнічення росту вже існуючих в кишечнику патогенних мікроорганізмів нормальна мікрофлора макроорганізму взагалі та лактобактерії зокрема здатні реалізовувати імунологічні захисні реакції [1, 2].

В останні роки особливу увагу направлено на вивчення механізмів модулюючого впливу лактобактерій на імунні реакції організму. Асоційовані із слизовою оболонкою кишечника лактобактерії володіють універсальними імуномодуючими властивостями, що включають як імуностимуляцію, так і імуносупресію [3-5]. Стимуляційні ефекти лактобактерій проявляються в механізмах активації ретикуло-ендотеліальної системи кишкового тракту та продукції низки цитокінів, що забезпечують баланс між гуморальним та клітинно-опосередкованим імунітетом [4, 6-13].

Найважливішим механізмом взаємодії лактобактерій та взагалі представників облигатної мікрофлори з організмом хазяїна, що направлено на підтримку гомеостазу, є стимуляція продукції низки цитокінів [14-16].

Традиційно цитокіни поділяють на декілька груп: інтерлейкіни (ІЛ) – фактори взаємодії між лейкоцитами; інтерферони (ІФН) – цитокіни противірусної активності; фактори некрозу пухлин (ФНП) – цитокіни з цитотоксичною активністю; колонієстимулюючі фактори (КСФ) – гемопоетичні цитокіни та хемокини (ХК) – хемотаксичні цитокіни [14, 16-18].

Звичайно виділяють три відносно автономні групи клітин – продуцентів цитокінів, що відрізняються за характером відповіді на активуючий вплив, набором цитокінів, що вони продукують та тими процесами, реалізацію яких вони забезпечують: стромальні клітини (фібробласти, ендотеліальні клітини), клітини мієлоїдно-моноцитарного походження, лімфоцити (Th1 та Th2) [7, 16, 19, 20].

Бактерії роду *Lactobacillus* здатні стимулювати продукцію цитокінів трьома групами клітин за рахунок комплексного впливу. Слід зазначити, що стимуляція продукції цитокінів можлива не лише в присутності живих клітин лактобактерій, а і різноманітних бактеріальних компонентів. Встановлено, що до основних модуляторів вивільнення цитокінів клітинами імунної системи відносять компоненти грампозитивних бактерій, в тому числі лактобактерій, (ліпотейхоева кислота, протеїн А, фосфатидилінозитол маннозиди, мікобактеріальні білки теплового шоку); компоненти грамнегативних бактерій (ліпополісахарид, ліпід А, ліпід-А-зв'язані білки, поріни, пермеази) та компоненти характерні для обох груп бактерій: білки зовнішньої мембрани, фімбріальні білки, ліпо- та глікопротеїни, капсулярні полісахариди, мураміддипептид (МДП), пептидоглікан, а також низка позаклітинних продуктів, в тому числі, протеази [7, 17, 18, 21].

До задачі досліджень входило вивчення впливу композиції бактерій роду *Lactobacillus* – перспективної основи пробіотичного препарату, на продукцію імунорегуляторних цитокінів – ІФН та ФНП *in vivo* та *in vitro*.

Матеріали і методи. Об'єктом дослідження виступала композиція потенційного пробіотичного препарату створена на основі п'яти штамів-симбіонтів бактерій роду *Lactobacillus* отриманих з музею культур кафедри

промислової біотехнології НТУУ «КПІ»: *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* LB86 ВКІІМ-В-5788, *L. delbrueckii subsp. delbrueckii* DSM20074, *L. rhamnosus* LB3 ІМВ В-7038, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* V[®].

Імуномодуючі властивості розробленої композиції лактобактерій вивчали на білих безпородних лабораторних мишах масою 14-16 г. Тварини було поділено за принципом аналогів на 3 груп по 15 голів. Мишам першої групи протягом 5 діб з інтервалом 24 години вводили перорально за допомогою голки з наплавленою оливою по 0,5 мл суспензії композиції лактобактерій у фізіологічному розчині з концентрацією 10^9 кл/мл за стандартом мутності. Миші другої групи отримували по 0,5 мл суспензії препарату Лактобактерин (препарат порівняння) в концентрації 10^9 кл/мл. Третя група мишей, контрольна, отримувала по 0,5 мл фізіологічного розчину.

Перерахунок концентрації препаратів для мишей робили за методом [22].

Продукцію цитокінів: інтерферону (ІФН) та фактору некрозу пухлин (ФНП) визначали мікрометодом [22] у інтактних та дослідних мишей через 8, 24 та 72 години після початку введення препаратів. Для цього по декілька мишей із кожної групи забивали методом цервікальної дислокації та одержували сироватку крові тварин [22], селезінку [23], з якої отримували спленоцити [24], а також макрофаги перитонеального ексудату (МФПЕ) [25].

Інтерфероновий статус організму тварин під впливом композиції лактобактерій та препарату порівняння – Лактобактерин визначали за трьома основними показниками: а) рівнем циркулюючого в крові ІФН (сироватковий ІФН); б) рівнем продукції ІФН- α *in vitro* при його індукції Вірусом хвороби Н'юкасла (ВХН, штам Н) з множинністю інфекції у титрі $10,0$ ТЦД₅₀/ 0,1 мл; в) рівнем продукції ІФН- γ при його індукції *in vitro* мітогеном – фітогемаглютиніном (ФГА) у концентрації 40 мкг/мл [26].

Поряд з продукцією інтерферонів визначали продукцію прозапального цитокіну – ФНП- α , що супроводжує перебіг багатьох захворювань інфекційного та неінфекційного генезу. ФНП- α *in vitro* індукували ліпополісахаридом (ЛПС) *E. coli* 026:В6 L-2654 у концентрації 40 мкг/мл [22].

Для підбору оптимальної дози композиції лактобактерій та Лактобактерину при індукції імунорегуляторних цитокінів *in vitro* у спленоцитах і МФПЕ дослідних та інтактних мишей дослідні препарати використовували у кінцевих концентраціях $1 \cdot 10^3$ та $1 \cdot 10^6$ кл/мл.

Результати та їх обговорення. Внаслідок проведених експериментів на мишах було встановлено, що пероральне введення композиції лактобактерій та препарату порівняння Лактобактерину призводило до утворення інтерференоподібної активності, яку тестували по затримці цитопатичної дії вірусу везикулярного стоматиту (ВВС) штам Індіана у культурі фібробластних клітин мишей L₉₂₉. Обробка сироватки, що містила інтерферон, трипсином призводила до зникнення в ній противірусної активності. Так, одноразове введення живих культур композиції лактобактерій викликало суттєве зростання рівня інтерферону в сироватці крові. Максимум ІФН визначався на 6 годину після введення композиції лактобактерій і становив $3,7 \log_2$. Протягом 24 годин рівень ІФН в сироватці крові був досить помітним, тоді як у інтактних тварин його утворення не реєструвалось.

Внесення ВХН до спленоцитів мишей, які отримували живі культури лактобактерій викликало 2 кратне зростання інтерференової відповіді, порівняно з клітинами інтактних тварин ($2,5 - 3,5 \log_2$ та $1,8 \log_2$ відповідно). Здатність до підвищеної продукції α -ІФН під впливом вірусного індуктора ІФН спостерігалась у спленоцитів тварин, як через 6, так і через 24 години після введення композиції лактобактерій.

В подальшому досліджували інтерференогенну здатність препарату порівняння Лактобактерин. Пероральне введення препарату Лактобактерин мишам призводило до підвищення циркулюючого ІФН (табл.1).

Інтерференогенну активність одержаних сироваток тестували по затримці цитопатичної дії ВВС у культурі гомологічних клітин L₉₂₉. Так, одноразове пероральне введення препарату Лактобактерин у дозах від 0,5 до 5,0 мг/кг

Таблиця 1

Титри ІФН у сироватці крові мишей після одноразового введення композиції лактобактерій та препарату Лактобактерин

Дослідні препарати	ТИТР СИРОВАТКОВОГО ІФН	
	6 год.	24 год.
композиція лактобактерій 0,5 мл ($1 \cdot 10^9$ кл/мл)	$3,7 \log_2$	$3 \log_2$
Лактобактерин 0,5 мл ($1 \cdot 10^9$ кл/мл)	$3,9 - 4,0 \log_2$	$3,3 \log_2$
Контроль	$1 \log_2$	$1 \log_2$

тваринам, викликало суттєве зростання рівня інтерферону в сироватці крові мишей. Максимум ІФН визначався на 6 годину після введення препарату і становив $3,7 \log_2 - 4 \log_2$. Протягом 24 годин рівень ІФН в сироватці крові був досить помітним, тоді як у інтактних тварин його утворення не реєструвалось.

Прогрівання зразків сироватки тварин, що одержали композицію лактобактерій та Лактобактерин протягом 30 хв. при температурі 60°C або експонування при рН 2,5 протягом доби частково відміняло їх здатність затримувати репродукцію вірусу (ВВС) в культурі клітин L₉₂₉. Дослідження фізико-хімічних властивостей ІФН у сироватках крові мишей свідчило, що за своїми властивостями одержаний ІФН належить до α/β та γ інтерферону [27].

Пероральне введення композиції лактобактерій в дозі 0,5 мл ($1 \cdot 10^9$ кл/мл) приводило до утворення ендogenous ФНП. Так, Індекс цитотоксичності сироваткового ФНП незалежно від представлених доз композиції лактобактерій сягав 0,7 нг/мл після одноразового перорального введення дослідних культур. Препарат порівняння Лактобактерин в дозі 0,5 мл ($1 \cdot 10^9$ кл/мл) також викликав стимуляцію циркулюючого ФНП, індекс цитотоксичності у сироватці крові сягав 0,9 нг/мл, у контролі 0,3 нг/мл ($P < 0,05$).

Таким чином, введення в організм живих культур лактобактерій стимулює як продукцію ІФН, так і ФНП та сприяє підвищенню ефективності інших індукторів інтерферогенезу.

Наступним етапом було дослідження інтерфероногенної активності даних культур в системі *in vitro*. В першій серії експериментів були використані МФПЕ інтактних мишей. Внесення дослідної композиції лактобактерій в дозах $1,0 \times 10^3$ кл./мл або $1,0 \times 10^6$ кл./мл до МФПЕ інтактних мишей викликало синтез ІФН. Слід зазначити, що інтерфероногенна активність супернатантів залежала від дози композиції лактобактерій, що були внесені до макрофагів так кінцева концентрація 10^6 кл./мл сильніше стимулювала накопичення ІФН, ніж в концентрація 10^3 кл./мл (табл. 2).

Таблиця 2

Інтерфероногенна активність композиції лактобактерій та Лактобактерину в культурі МФПЕ інтактних мишей

Дослідні препарати	концентрація, кл./мл	Титр ІФН	
		24 год.	48 год.
Контроль		$1 \log_2$	$1 \log_2$
композиція лактобактерій	$1,0 \times 10^6$	$>2 \log_2$	$1 \log_2$
	$1,0 \times 10^3$	$>1 \log_2$	$2 \log_2$
Лактобактерин	$1,0 \times 10^6$	$4 \log_2$	$1 \log_2$
	$1,0 \times 10^3$	$>2 \log_2$	$2 \log_2$

Слід зауважити, що МФПЕ одержані від інтактних мишей менш інтенсивно продукували ІФН порівняно з макрофагами одержаними від дослідних мишей (табл.2, 3).

Таблиця 3

Інтерфероногенна активність композиції лактобактерій та Лактобактерину в культурі МФПЕ дослідних мишей

Дослідні препарати в дозі $1,0 \times 10^6$ кл./мл	Титр ІФН	
	24 год.	48 год.
Контроль	$2 \log_2$	$1 \log_2$
композиція лактобактерій	$>3,9 \log_2$	$2 \log_2$
Лактобактерин	$>4,8 \log_2$	$2 \log_2$

Тобто макрофаги одержані від дослідних тварин більш інтенсивно продукували ІФН у відповідь на внесення дослідної композиції лактобактерій та Лактобактерину.

В експериментах *in vitro* встановлено, що внесення культур композиції лактобактерій та Лактобактерину до МФПЕ вело до утворення ендогенного ФНП.

Як видно з табл.4 інкубування клітин МФПЕ інтактних мишей з культурами композиції лактобактерій та Лактобактерину в дозі 1×10^6 кл/мл призводило до індукції ФНП у незначній кількості (1,1 та 1,0 нг/мл) відповідно, проти 0,15 нг/мл у контролі.

Таблиця 4

Продукція ФНП під дією різних концентрацій композиції лактобактерій та Лактобактерину в культурі МФПЕ інтактних мишей.

Дослідні препарати	концентрація, кл./мл	Концентрація ФНП нг/мл	
		6 год.	24 год.
Контроль		0,15	0,15
композиція лактобактерій	$1,0 \cdot 10^6$	1,1	0,8
	$1,0 \cdot 10^3$	1,1	0,7
Лактобактерин	$1,0 \cdot 10^6$	1,0	0,8
	$1,0 \cdot 10^3$	1,0	0,7

Тобто в системі *in vitro* дослідні препарати виявили здатність до продукції ФНП макрофагами перитонеального ексудату. Рівень стимуляції ФНП як при концентрації 10^6 кл/мл так і при 10^3 кл/мл був однаковим для композиції лактобактерій та Лактобактерину.

Таким чином, досліджена композиція лактобактерій здатна стимулювати продукцію імунорегуляторних цитокінів інтерферону та фактору некрозу пухлин *in vivo* та *in vitro* і синтез цих цитокінів майже не відрізняється від даних отриманих із застосуванням препарату порівняння – Лактобактерин. Отже, досліджену композицію лактобактерій в подальшому можна буде рекомендувати як пробіотичний препарат з м'якою імуномодулюючою активністю.

Роботу виконано за кошти гранту Президента України для обдарованої молоді

1. Orrhange K., Nord C.E. Factors controlling the bacterial colonization of the intestine in breast-fed infants // Acta Pediatr.-1999.-suppl.430.-P.47-57.

2. Хавкин А.И. Микробиоценоз кишечника и иммунитет // РМЖ.-2003.-Т.11, №3.-С.122-126.
3. Николаева Т.ЕН., Зорина В.В., Бондаренко В.М. Роль цитокинов в модуляции иммунореактивности организма бактериями рода *Lactobacillus* // ЖМЭИ.-2004.-№6.-С.101-106.
4. Бондаренко В.М., Рубакова Э.И., Лаврова В.А. Иммуностимулирующее действие лактобактерий, используемых в качестве препаратов пробиотиков // ЖМЭИ.-1998.-№5.-С.107-112.
5. Perdigon G., Fuller R., Raya R. Lactic acid bacteria and their effect on the immune system // Curr. Issues.Intest.Microbiol.-2001.-№2(1).-P.27-42.
6. Петров Л.Н. Витафлор. Бактериальный препарат нового поколения для лечения и профилактики дисбактериозов.СПб.-2003.
7. Ericsson K.L., Hubbard N.E. Probiotic immunomodulation in health and disease // J. Nutr.-2000.-Vol.130, №2.-P.403-409.
8. Hosoda M., Hashimoto H., He F. et al. Effect of administration of milk fermented with *Lactobacillus acidophilus* LA-2 on fecal mutagenicity and microflora in human intestine // J.Dairy Sci.-1996.-Vol.79, №5.-P.745-749.
9. Matsuzaki T., ShimizuY., Yokokura T., Augmentation of antimetastatic effect of Lewis lung carcinoma in C57B1/6 mice by promoting with *Lactobacillus casei* // Med.Microbiol.Immunol.-1990.-Vol.79.-P.161-162.
- 10.Pool-Zobel B.L., Nendecker C., Domistall I. et al. *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* – mediated antigenotoxicity in the colon of rats // Nutr.Cancer.-1996.-Vol.26,№3.-P.365-380.
- 11.Roos M.N., Katan M.B. Effects of probiotic bacteria on diarrhea. Lipid metabolism. And carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998 // AJCN.-2000.-Vol.71, №2.-P.405-411.
- 12.Takano T., Arai K., Mirota I. et al. Effect of feeding sour milk on longevity and tumorogenesis in mice and rats // Bifidobact.Microflora.-1985.-Vol.4, №1.-P.31-37.

13. Yasutake N., Ohwahi M., Yokokura T. et al. Comparison of antitumor activity of *Lactobacillus casei* with other bacterial immunopotentiators // *Med. Microbiol. Immunol.*-1983.-Vol.173.-P.113-125.
14. Ершов Ф.И. Эра цитокинов или язык клеток // *Вестник РАЕН.*-2002.-Т.2, №3.-С.24-26.
15. Потапнев М.П. Апоптоз клеток иммунной системы и его регуляция цитокинами // *Иммунология.*-2002.-№4.-С.237-243.
16. Ярилин А.А. Система цитокинов и принципы ее функционирования в норме и при патологии // *Иммунология.*-1997.-№5.-С.7-14.
17. Henderson B., Poole S., Wilson M. Bacterial modulins: a novel class of virulence factors which cause host tissue pathology by inducing cytokine synthesis // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*-1996.-Vol.60. №2.-P.316-341.
18. Moteleone I., Vavassori P., Biancone L. et al. Immunoregulation in the gut: success and failures in human disease // *Gut.*-2002.-Vol.50, №3.-P.60-64.
19. Кетлинский С.А. Роль Т-хелперов типов 1 и 2 в регуляции клеточного и гуморального иммунитета // *Иммунология.*-2002.-№2(3).-С.77-80.
20. Bengmark S. Ecological control of the gastrointestinal tract. The role of probiotic flora // *Gut.*-1998.-Vol.42, №1.-P.2-7.
21. Mosmann T.R., Coffmann R.L. Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties // *Annu. Rev. Immunol.*-1989.-Vol.7.-P.145-173.
22. Лазаренко Л.М., Співак М.Я., Михайленко О.М., Сухих Г.Т. Папіломовірусана інфекція та система інтерферону.-К.: Фітосоціоцентр, 2005.-288с.
23. Лимфоциты: Методы: Пер. с англ./ Под ред. Дж. Клауса. - М.: Мир, 1990.- 395с.
24. Иммунологические методы / Под ред. Г. Фримеля, Пер с нем. А.П. Тарасова.-М.: Медицина, 1987.-472с.
25. Учитель И.Я. Макрофаги в иммунитете.-М.: Медицина, 1978.-175с.

26.Рыболовлев Ю.Р., Рыболовлев Р.С. Дозирование веществ для млекопитающих по константам биологической активности // Доклады академии наук СССР.-1979.-т.247, №6.-С.1513-1517.

27.Соловьев И.В., Бектимиров Т.А. Интерфероны в теории и практике медицины // М.: Медицина, 1981. — 400 с.

С.А. Старовойтова, Н.А. Тимошок, Н.Я. Спивак, В.Ю. Горчаков

ИНТЕФЕРОНОГЕННАЯ АКТИВНОСТЬ ЛАКТОБАКТЕРИЙ

Резюме

Изучена способность стимулировать продукцию интерферона и фактора некроза опухолей *in vivo* и *in vitro* под влиянием композиции лактобактерий, состоящей из 5 штаммов живых бактерий. Показано, что спленоциты и макрофаги перитонеального экссудата под влиянием исследованной композиции лактобактерий способны продуцировать интерферон и фактор некроза опухолей и синтез этих цитокинов практически не отличается от значений полученных при применении препарата сравнения – Лактобактерин. Ключевые слова: лактобактерии, интерферон, фактор некроза опухолей, иммуномодулирующие свойства.

S Starovoitova, N. Timoshok, N. Spivak, V. Gorchakov

INTEFERONOGENIC ACTIVITY OF LACTOBACTERIA

Summery

Ability of stimulation of production interferon and tumor necrosis factor in vitro and in vivo by the composition of lactobacteria consist of five living strains have been studied. It have been shown that splenocytes and macrophages produce interferon and tumor necrosis factor but the production this cytokines was the same according to comparative drug Lactobacterin. It was shown immunomodulating activity of investigated composition of lactobacteria.

Key words: lactobacteria, interferon, tumor necrosis factor, immunomodulation property.