

DOI: 10.26693/jmbs05.03.290

УДК 615.372:[579.864.1+579.873.13]:612.017.11

Книш О. В., Погоріла М. С.

ВПЛИВ БЕЗКЛІТИННИХ ЕКСТРАКТІВ *BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM* ТА *LACTOBACILLUS REUTERI* НА ПОКАЗНИКИ ВРОДЖЕНОГО ІМУНІТЕТУ *IN VIVO*

ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова
Національної академії медичних наук України», Харків, Україна

knysh_oksana@ukr.net

Робота присвячена дослідженню здатності безклітинних екстрактів з культур *Bifidobacterium bifidum* 1 і *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 впливати на показники вродженого імунітету *in vivo* на моделі генералізованого інфекційного процесу у мишей. Безклітинні екстракти були отримані шляхом культивування пробіотиків у власних дезінтегратах і містили їх структурні компоненти та метаболіти.

Дослідження проводили із залученням мишей лінії СВА обох статей, віком 2 місяці, вагою 19,0±2,0 г. Дослідні безклітинні екстракти вводили інтраперитонеально в дозах 1000, 100 та 10 мкг в 0,2 мл стерильного фізіологічного розчину впродовж трьох діб. Після ініціації летального генералізованого інфекційного процесу інтраперитонеальним введенням 0,5 мл суспензії *Escherichia coli* ATCC 25922 (3×10^8 КУО/мл) спостереження за клінічним перебігом захворювання і реєстрацію кількості загинув тварин здійснювали протягом 10 діб. Після введення зазначеної інфікуючої дози відсоток тварин, які загинули впродовж 36 годин, склав 90,9%. Попереднє введення *Bifidobacterium bifidum* 1 і *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 забезпечувало більш ніж 60% виживання тварин.

Сублетальний генералізований інфекційний процес викликали інтраперитонеальним введенням 0,5 мл суспензії *Escherichia coli* ATCC 25922 (3×10^4 КУО/мл), яка забезпечувала загибель 30% тварин. На 2-у, 7-у і 14-у добу здійснювали забір крові і досліджували фагоцитарну активність нейтрофілів. Інфекційний процес характеризувався значним зниженням поглинальної здатності нейтрофілів. Застосування *Bifidobacterium bifidum* 1 і *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 призводило до значного підвищення фагоцитарного індексу нейтрофілів. Найменше зниження фагоцитарного індексу нейтрофілів на 7-у добу спостерігалось після введення безклітинних екстрактів в дозі 100 мкг.

Результати дослідження свідчать про здатність безклітинних екстрактів значно впливати на показники вродженого імунітету та відкривають перспек-

тиви їх застосування як імуномодуляторів в комплексній терапії інфекційних захворювань, засобів неспецифічної профілактики рецидивів і зниження ризику хронізації інфекційного процесу.

Ключові слова: безклітинні екстракти, вроджений імунітет, інфекційний процес, фагоцитарна активність нейтрофілів, *Escherichia coli*.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дослідження є фрагментом НДР лабораторії профілактики краплинних інфекцій ДУ «ІМІ НАМН» «Мікробіологічна характеристика нових структурно-метаболітичних комплексів лакто- та біфідопробіотиків», № державної реєстрації 0119U100686.

Вступ. Імунна система здійснює захист від патогенів, які потенційно здатні викликати інфекційні захворювання. Провідну роль у забезпеченні функціонування вродженої імунної системи, яка першою контактує з патогеном, відіграють сегментоядерні нейтрофіли. Саме сегментоядерні нейтрофіли опосередковують імунні реакції, що є вирішальними при мікробних інфекціях. Зокрема, антибактеріальна функція нейтрофілів реалізується процесом фагоцитозу, якому передують серія складних подій: їх адгезії до ендотеліоцитів, трансендотеліального проникнення, міграції та опсонізації бактерій. Порушення їх функції або виснаження кількісного резерву через імунодефіцит служить патогенетичним підґрунтям виникнення рецидивів бактеріальних інфекцій.

У цьому ракурсі дані клітини виступають важливим та пріоритетним таргетом на шляху дослідження імунотропних властивостей новостворених фармакологічних засобів. У разі виявлення таких ефектів, як підвищення поглинальної здатності фагоцитів, сприяння завершеності фагоцитозу стимуляцією синтезу реактивних форм кисню (РФК) та інших молекулярних факторів антибактеріальної програми нейтрофілів, новостворені лікувальні засоби будуть мати пріоритет для подальших

досліджень. Зазначені властивості дуже вигідно акомпанують протимікробній терапії, знижують ризик хронізації інфекційного процесу та/або зменшують частоту її рецидивів.

У даному аспекті представляють інтерес потенційно імунотропні похідні бактерій пробіотичних штамів. Серія досліджень демонструє роль бактеріальної складової мікробіому кишечника в формуванні та підтримці архітектури та функції вродженого й адаптивного видів імунітету [1, 2, 3, 4].

Показано, що представники родів *Lactobacillus* та *Bifidobacterium* беруть участь у активації синтезу лізоциму, компонентів комплексу, пропердину, в активації фагоцитозу та стимуляції синтезу секреторного імуноглобуліну А (slgA), модуляції секреції цитокінів та медіаторів запалення (зниження продукції С-реактивного білка, IL-6 тощо) [5]. Показано, що *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) мають здатність модулювати секрецію цитокінів, зокрема, IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α , TGF- β , здійснюючи регуляцію про- та антизапальних системних та місцевих імунних реакцій. Відомо, що локальне порушення мікробіому призводять до системних запальних процесів внаслідок стимуляції активації шляху NF- κ B [6]. В свою чергу, здатність пробіотичних штамів до модуляції синтезу цитокінів, як регуляторної ланки, дозволяють використовувати пробіотикомісні препарати в терапії як локальних, так і системних запальних процесів в гастроентерології, нефрології, гінекології тощо [7, 8]. Під дією LGG відбувається також опосередкована індукція продукції slgA шляхом стимуляції синтезу IFN- γ мононуклеарами периферичної крові, який в свою чергу, посилює захоплення антигенів в пєрових бляшках, що є скупченнями, зокрема, плазматичних імуноглобулін-продукуючих клітин. Відомо, що корисні ефекти пробіотичних мікроорганізмів реалізуються завдяки біологічній активності їх структурних компонентів та метаболітів [9]. Різний хімічний склад структурних компонентів та варіабельність спектрів метаболітів лежить в основі штамоспецифічності біологічних ефектів пробіотичних бактерій.

Мета роботи – дослідити здатність безклітинних екстрактів з культур *Bifidobacterium bifidum* 1 і *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 впливати на показники вродженого імунітету *in vivo* на моделі генералізованого інфекційного процесу у мишей.

Матеріал та методи дослідження. Експерименти з використанням лабораторних тварин проводили у відповідності до Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447–IV від 21.02.2006 р.) із дотриманням вимог Комітету з біоетики Інституту, узгоджених із положенням «Європейської конвенції захисту хребетних тварин, які використовуються в експеримен-

тальних та інших наукових цілях» (Страсбург, 1986). Дослідження проводили із залученням мишей лінії СВА обох статей, віком 2 місяці, вагою 19,0 \pm 2,0 г. Тварини дослідних та контрольних груп отримували стандартну дієту і утримувались в умовах віварію, встановлених нормативними документами.

Безклітинні екстракти (БКЕ) – біотехнологічні продукти, що містять похідні (структурні компоненти та метаболіти) пробіотичних бактерій *Bifidobacterium bifidum* 1 і *Lactobacillus reuteri* DSM 17938, були отримані шляхом культивування пробіотиків у власних дезінтегратах і подальшого видалення клітин та клітинного дебрису центрифугуванням і фільтруванням. Методика одержання БКЕ описана раніше [10]. Досліджували імунотропні властивості двох видів екстрактів: БКЕ Bb – з культури *B. bifidum*, що культивувалася у дезінтеграті *B. bifidum*; БКЕ Lr - з культури *L. reuteri*, що культивувалася у дезінтеграті *L. reuteri*. Застосування БКЕ здійснювали в однаковий час. Враховуючи те, що LD50 для БКЕ пробіотичних штамів бактерій не встановлена та відсутні дані щодо їх терапевтичної дози, були застосовані рекомендовані дози 1000 мкг, 100 мкг та 10 мкг на мишу [11].

Оцінка впливу БКЕ на неспецифічну резистентність організму *in vivo*. Вплив БКЕ на неспецифічну резистентність організму досліджували на моделі летального генералізованого інфекційного процесу у мишей. 44 тварини, які були задіяні в експерименті, були поділені на 4 групи: 2 дослідні і 2 контрольні (позитивна і негативна), по 11 тварин у кожній. Для оцінки здатності стимулювати клітини вродженого імунітету тваринам дослідних груп інтраперитонеально вводили БКЕ в дозах 1000, 100 та 10 мкг в 0,2 мл стерильного фізіологічного розчину протягом трьох діб. Мишам позитивної та негативної контрольних груп вводили тим же способом по 0,2 мл стерильного фізіологічного розчину. Через 72 год мишей дослідних та позитивної контрольної групи інфікували інтраперитонеальним введенням 0,5 мл суспензії *Escherichia coli* ATCC 25922 (3 \times 10⁸ КУО/мл). За даними літератури, зазначена доза *Escherichia coli* забезпечує загибель усіх тварин впродовж 36 год, DCL (dosis certa letalis) [12]. Тваринам негативної контрольної групи інтраперитонеально вводили стерильний фізіологічний розчин по 0,5 мл. У дослідних та позитивній контрольній групах тварин реєстрували клінічний перебіг захворювання та кількість загиблих тварин. Спостереження за тваринами здійснювали протягом 10 діб. Присутність *E. coli* підтверджували висівами мікроорганізмів із крові тварин з наступною їх ідентифікацією.

Оцінка впливу БКЕ на поглинальну активність фагоцитів *in vivo*. Вплив БКЕ на поглинальну

активність нейтрофілів крові оцінювали *in vivo* на моделі сублетального генералізованого інфекційного процесу у мишей. Тварини були поділені на групи, по 11 тварин у кожній, як описано вище. Тваринам дослідних груп вводили інтраперитонеально БКЕ у дозах 1000, 100 та 10 мкг у 0,2 мл стерильного фізіологічного розчину. Тваринам позитивної і негативної контрольних груп тим же способом вводили по 0,2 мл стерильного фізіологічного розчину. Через 72 години у тварин дослідних і позитивної контрольної групи інфекційний процес викликали інтраперитонеальним введенням 0,5 мл суспензії *Escherichia coli* ATCC 25922 (3×10^4 КУО/мл). Зазначена доза (LD30) в експерименті забезпечувала загибель 30% тварин у позитивній контрольній групі. Тваринам негативної контрольної групи інтраперитонеально вводили 0,5 мл стерильного фізіологічного розчину. За клінічним перебігом захворювання у мишей спостерігали протягом 14 діб, після чого тварин виводили із експерименту із застосуванням хлороформу. Проводили оцінку фагоцитарної активності та бактеріологічне дослідження крові дослідних тварин з метою виявлення *E. coli*. Збір крові у мишей здійснювали на 2-у, 7-у та 14-у добу у пробірку з антикоагулянтом гепарином (10 од/мл), центрифугували впродовж 5 хв при 1,5 тис об/хв. Відбирали зваж лейкоцитів. До зважу лейкоцитів додавали об'єкт фагоцитозу у співвідношенні 1:50, інкубували в термостаті за температури 37 °С протягом 30 хв при постійному помішуванні. Виготовляли мазки на предметних скельцях, фіксували фіксатором Май-Грюнвальда й фарбували за Романовським-Гімза. Підрахунок фагоцитарного індексу (%) проводили з використанням світлового мікроскопу Primo Star та імерсійного об'єктиву 90x. Як об'єкт фагоцитозу використовували стандартизовану суспензію латексу (10% полістирольна суспензія діаметром 1,5 мкм «ДиазМ» (РФ)) [13].

Статистичний аналіз даних. Отримані в ході експериментів числові дані були піддані дисперсійному аналізу (ANOVA), виражені у вигляді середнього арифметичного значення зі стандартним відхиленням ($\bar{x} \pm SD$). Статистичний аналіз проводився за допомогою Windows® XP Professional OEM Software, Excel 2003 (ліцензія № 74017-640-0000106-57973). Для порівняння числових даних, отриманих в дослідних та контрольних групах, застосовували тест Фішера. Довірчий інтервал – 95% ($p < 0,05$).

Результати дослідження та їх обговорення. Серед тварин негативної контрольної групи загибелі тварин не спостерігалось. В позитивній контрольній групі тварин, інфікованих *E. coli* в дозі $1,5 \times 10^8$ КУО на мишу, відсоток тварин, які загинули впродовж 36 годин, склав 90,9%. На 10-ту добу у дослідних групах тварин, яким перед інфікуванням вво-

дили БКЕ *B. bifidum* та *L. reuteri*, спостерігали значне зменшення кількості загиблих мишей. Після введення БКЕ*Bb* в дозі 1000 мкг відсоток тварин, які вижили, склав 81,6%. Після введення того ж екстракту у дозі 100 мкг виживаність тварин становила 63,6%, а після введення 10 мкг – 72,7%. У групі тварин, яким вводили БКЕ*Lr* в дозі 1000 мкг, вижило 63,6%, в дозі 100 мкг – 81,6%, а в дозі 10 мкг – 72,7% тварин. Таким чином, навіть у дозах 10 та 100 мкг на мишу БКЕ*Bb* та БКЕ*Lr*, забезпечували більш ніж 60% виживаність тварин у кожній дослідній групі (рисунк).

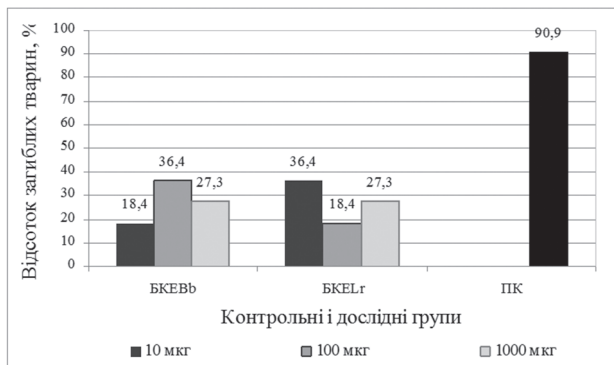


Рисунок. Вплив БКЕ*Bb* та БКЕ*Lr* на виживаність мишей із генералізованою інфекцією, спричиненою інтраперитонеальним введенням *E. coli* в дозі $1,5 \times 10^8$ КУО на мишу, ($n=11$)

У мишей позитивної контрольної групи на 7-у добу перебігу інфекційного процесу спостерігалось зниження поглинальної здатності нейтрофілів майже удвічі ($45,18 \pm 2,0\%$) порівняно з поглинальною здатністю нейтрофілів у мишей негативної контрольної групи ($70,2 \pm 2,8\%$) (таблиця). На 14-у добу після індукції інфекційного процесу зберігалися достовірні відмінності між поглинальною здатністю нейтрофілів крові тварин позитивної і негативної контрольних груп.

При застосуванні обох екстрактів: БКЕ*Bb* і БКЕ*Lr* спостерігалася менша амплітуда зниження досліджуваного показника на 7-у добу від початку інфекції. Тобто, за умов застосування БКЕ*Bb* та БКЕ*Lr* зниження поглинальної здатності фагоцитів на тлі інфекції, спричиненої *E. coli*, на 7-у добу від початку спостереження було не таким значним, як у групі позитивного контролю без застосування БКЕ ($45,18 \pm 2,0\%$, ($p \leq 0,05$)). Найефективнішою за впливом на поглинальну здатність нейтрофілів виявилася доза БКЕ 100 мкг на мишу. При застосуванні екстрактів в дозі 100 мкг фагоцитарний індекс був найбільшим в критичній точці перебігу інфекційного процесу (на 7-у добу) і склав ($61,55 \pm 2,0\%$) для БКЕ*Bb* та ($65,77 \pm 4,0\%$) для БКЕ*Lr* на противагу рівню фагоцитарного індексу в групах

Таблиця – Вплив БКЕ*Vb* та БКЕ*Lr* на поглинальну здатність нейтрофілів крові мишей, інфікованих *E. coli*, в дозі $1,5 \times 10^4$ КУО на мишу, (n=11), ($\bar{x} \pm SD$)

Екстракт	БКЕ <i>Vb</i>			БКЕ <i>Lr</i>		
	2 доба	7 доба	14 доба	2 доба	7 доба	14 доба
Доза екстракту, мкг						
<i>E. coli</i> + 10	79,02±5,9 ^{1,2}	50,03±4,4 ^{1,2,3}	59,10±3,3 ^{1,2,3}	74,05±4,8 ^{1,2}	48,91±3,5 ^{1,2,3}	60,23±3,0 ^{1,2}
<i>E. coli</i> + 100	73,57±3,4 ^{1,2}	61,55±2,0 ^{1,2}	68,09±4,8 ^{1,2}	77,29±5,3 ^{1,2}	65,77±4,0 ^{1,2}	63,15±3,8 ^{1,2}
<i>E. coli</i> + 1000	78,18±2,9 ¹	53,18±2,9 ^{1,2,3}	69,22±2,7 ¹	71,10±2,4 ¹	58,54±2,0 ^{1,2,3}	70,07±5,1 ¹
ПК (<i>E. coli</i>)	80,18±2,0 ¹	45,18±2,0 ¹	64,18±2,0 ¹	80,18±2,0 ¹	45,18±2,0 ¹	64,18±2,0 ¹
НК	70,2±2,8					

Примітки: ¹ – достовірність відмінності числових даних від НК, ($p \leq 0,05$); ² – достовірність відмінності числових даних від ПК ($p \leq 0,05$); ³ – достовірність відмінності числових даних від групи «*E. coli* + 100», ($p \leq 0,05$)

із застосуванням нижчої (10 мкг) і вищої (1000 мкг) доз досліджуваних екстрактів.

Обговорюючи результати дослідження, слід зазначити, що застосування постбіотиків, також відомих як метабіотики, вже широко пропонується як додаткова або навіть альтернативна терапія запальних процесів та як підхід до підтримки мукозальної імунної системи [14]. Даний клас лікувальних засобів дає надію на можливість уникнення проблем, пов'язаних із застосуванням клітинних пробіотиків – недостатньої безпечності та ефективності через низький рівень приживлення [15].

Ефекти, що були виявлені в даному дослідженні, можна пояснити низкою метаболічних подій, що відбуваються під впливом БКЕ в імунних клітинах. Зокрема, існують дані щодо здатності пробіотичних похідних, поряд із активацією внутрішньоклітинних каскадів цитокінів, до підвищення антимікробної активності гранулоцитів через індукцію РФК. Як відомо, підвищення внутрішньоклітинної продукції РФК призводить до посилення фагоцитозу та безпосередньо до внутрішньоклітинного кілінгу бактерій. Отримані дані, а саме, підвищення виживання дослідних тварин під час генералізованого інфекційного процесу та підвищення фагоцитарної функції клітин вродженого імунітету дає змогу говорити про імунотропні властивості безклітинних екстрактів, отриманих на основі *B. bifidum* 1 та *L. reuteri* DSM 17938.

Висновки

1. В моделі летального генералізованого інфекційного процесу, ініційованого у мишей введенням *Escherichia coli* ATCC 25922, безклітинні екстракти, отримані з *Bifidobacterium bifidum* 1 та *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 в дозах 1000, 100 та 10 мкг, забезпечують більш ніж 60% виживаність тварин.
2. В моделі сублетального генералізованого інфекційного процесу у мишей, спричиненого введенням DL30 *Escherichia coli*, застосування безклітинних екстрактів, що містять деривати *Bifidobacterium bifidum* та *Lactobacillus reuteri*, в дозах 10, 100 та 1000 мкг призводить до підвищення фагоцитарного індексу нейтрофілів крові.
3. Найменше зниження фагоцитарного індексу нейтрофілів в критичній точці перебігу інфекційного процесу (на 7-у добу) спостерігається при введенні безклітинних екстрактів в дозі 100 мкг на мишу.
4. Результати дослідження свідчать про здатність безклітинних екстрактів з *Bifidobacterium bifidum* 1 та *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 значно впливати на показники вродженого імунітету та відкривають перспективи їх застосування як імунотропників в комплексній терапії інфекційних захворювань, засобів неспецифічної профілактики рецидивів і зниження ризику хронізації інфекційного процесу.

Перспективи подальших досліджень. Отримані дані спонукають до подальшого поглибленого вивчення імунотропних властивостей безклітинних екстрактів, отриманих з *Bifidobacterium bifidum* 1 та *Lactobacillus reuteri* DSM 17938.

References

1. Rooks MG, Garrett WS. Gut microbiota, metabolites and host immunity. *Nature Reviews Immunology*. 2016 May 27; 16(6): 341–52. doi: 10.1038/nri.2016.42
2. Belkaid Y, Naik S. Compartmentalized and systemic control of tissue immunity by commensals. *Nature Immunology*. 2013 Jun 18; 14(7): 646–53. doi: 10.1038/ni.2604
3. Strauch UG. Influence of intestinal bacteria on induction of regulatory T cells: lessons from a transfer model of colitis. *Gut*. 2005 Nov 1; 54(11): 1546–52. doi: 10.1136/gut.2004.059451
4. Mazmanian SK, Liu CH, Tzianabos AO, Kasper DL. An Immunomodulatory Molecule of Symbiotic Bacteria Directs Maturation of the Host Immune System. *Cell*. 2005 Jul; 122(1): 107–18. doi: 10.1016/j.cell.2005.05.007

5. Konstantinov SR, Smidt H, de Vos WM, Bruijns SCM, Singh SK, Valence F, et al. S layer protein A of *Lactobacillus acidophilus* NCFM regulates immature dendritic cell and T cell functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008 Dec 1; 105(49): 19474–9. doi: 10.1073/pnas.0810305105
6. Anders H-J, Andersen K, Stecher B. The intestinal microbiota, a leaky gut, and abnormal immunity in kidney disease. *Kidney International*. 2013 Jun; 83(6): 1010–6. doi: 10.1038/ki.2012.440
7. Andrade-Oliveira V, Foresto-Neto O, Watanabe IKM, Zatz R, Câmara NOS. Inflammation in Renal Diseases: New and Old Players. *Frontiers in Pharmacology*. 2019 Oct 8; 10. doi: 10.3389/fphar.2019.01192
8. Srinivasan S, Morgan MT, Fiedler TL, Djukovic D, Hoffman NG, Raftery D, et al. *Metabolic Signatures of Bacterial Vaginosis*. Huffnagle GB, editor. *mBio*. 2015 Apr 14; 6(2). doi: 10.1128/mbio.00204-15
9. Singh A, Vishwakarma V, Singhal B. Metabiotics: The Functional Metabolic Signatures of Probiotics: Current State-of-Art and Future Research Priorities—Metabiotics: Probiotics Effector Molecules. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 2018; 09(04): 147–89. doi: 10.4236/abb.2018.94012
10. Knysh OV, Isaenko OY, Babych EM, Kompaniets AM, Pakhomov OV, et al. Antimicrobial Activity of Bifidobacteria Derivatives After Storage in a Frozen State. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*. 2018 Sep 26; 28(3): 237–48. doi: 10.15407/cryo28.03.237
11. Mironov AN, Bunyatyan ND, Vasilev AN, Verstakova OL, Zhuravleva MV, Lepakhin VK, et al. *Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv*. Chast pervaya. M: Grif i K; 2012. 944 s. [Russian]
12. Shen W, Wang X, Qin W, Qiu X, Sun B. Exogenous carbon monoxide suppresses *Escherichia coli* vitality and improves survival in an *Escherichia coli*-induced murine sepsis model. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2014 Nov 17; 35(12): 1566–76. doi: 10.1038/aps.2014.99
13. Aleksandrov MT, Kudryavitskiy AI, Rumyantseva EG, Klimova LA, Larskaya MV. Metod vychisleniya absolyutnykh pokazateley fagotsitoza. *Laboratornoe delo*. 1988; 9: 30-2. [Russian]
14. Patel RM, Denning PW. Therapeutic Use of Prebiotics, Probiotics, and Postbiotics to Prevent Necrotizing Enterocolitis. *Clinics in Perinatology*. 2013 Mar; 40(1): 11–25. doi: 10.1016/j.clp.2012.12.002
15. Aguilar-Toalá JE, Garcia-Varela R, Garcia HS, Mata-Haro V, González-Córdova AF, Vallejo-Cordoba B, et al. Postbiotics: An evolving term within the functional foods field. *Trends in Food Science & Technology*. 2018 May; 75: 105–14. doi: 10.1016/j.tifs.2018.03.009

УДК 615.372:[579.864.1+579.873.13]:612.017.11

ВЛИЯНИЕ БЕСКЛЕТОЧНЫХ ЭКСТРАКТОВ BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM И LACTOBACILLUS REUTERI НА ПОКАЗАТЕЛИ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА IN VIVO

Кныш А. В., Погорелая М. С.

Резюме. Работа посвящена исследованию способности бесклеточных экстрактов из культур *Bifidobacterium bifidum* 1 и *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 влиять на показатели врожденного иммунитета *in vivo* на модели генерализованного инфекционного процесса у мышей. Бесклеточные экстракты были получены путем культивирования пробиотиков в собственных дезинтегратах и содержали их структурные компоненты и метаболиты.

Исследования проводили с использованием мышей линии СВА обоего пола в возрасте 2 месяца, весом 19,0±2,0 г. Исследуемые бесклеточные экстракты вводили интраперитонеально в дозах 1000, 100 и 10 мкг в 0,2 мл стерильного физиологического раствора в течение трех суток. После инициации летального генерализованного инфекционного процесса интраперитонеальным введением 0,5 мл суспензии *Escherichia coli* ATCC 25922 (3×10^8 КОЕ/мл) наблюдение за клиническим течением заболевания и регистрацию количества погибших животных осуществляли в течение 10 суток. После введения указанной инфицирующей дозы процент животных, погибших в течение 36 часов, составил 90,9%.

Предварительное введение *Bifidobacterium bifidum* 1 и *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 обеспечивало выживание более 60% животных. Сублетальный генерализованный инфекционный процесс вызывали интраперитонеальным введением 0,5 мл суспензии *Escherichia coli* ATCC 25922 в дозе 3×10^4 КОЕ/мл, которая обеспечивала гибель 30% животных. На 2-е, 7-е и 14-е сутки осуществляли забор крови и исследовали фагоцитарную активность нейтрофилов. Инфекционный процесс характеризовался значительным снижением поглощающей способности нейтрофилов. Применение *Bifidobacterium bifidum* 1 и *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 приводило к значительному повышению фагоцитарного индекса нейтрофилов. Наименьшее снижение фагоцитарного индекса нейтрофилов на 7-е сутки наблюдалось после введения бесклеточных экстрактов в дозе 100 мкг. Результаты исследования свидетельствуют о способности бесклеточных экстрактов оказывать значительное влияние на показатели врожденного иммунитета и открывают перспективы их применения в качестве иммуномодуляторов в комплексной терапии инфекционных заболеваний, средств неспецифической профилактики рецидивов и снижения риска хронизации инфекционного процесса.

Ключевые слова: бесклеточные экстракты, врожденный иммунитет, инфекционный процесс, фагоцитарная активность нейтрофилов, *Escherichia coli*.

UDC 615.372:[579.864.1+579.873.13]:612.017.11

Influence of Bifidobacterium Bifidum and Lactobacillus Reuteri Cell-Free Extracts On Indicators of Innate Immunity in Vivo

Кныш О. В., Pogorila M. S.

Abstract. Metabiotics or postbiotics are currently being considered as an alternative to cellular probiotics in the treatment of infectious and inflammatory diseases to maintain the mucosal immune system.

The purpose of the work was to study the ability of *Bifidobacterium bifidum* 1 and *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 cell-free extracts to influence innate immunity indices *in vivo* in a model of a generalized infection process in mice.

Material and Methods. Cell-free extracts were obtained by culturing probiotics in their own disintegrates and contained their structural components and metabolites. Studies were performed using CBA mice of both sexes at the age of 2 months, weighing 19.0 ± 2.0 g. The studied cell-free extracts were administered intraperitoneally at doses of 1000, 100 and 10 μg in 0.2 ml of sterile saline solution for three days. After the initiation of a lethal generalized infectious process by the intraperitoneal administration of 0.5 ml of *Escherichia coli* ATCC 25922 (3×10^8 CFU/ml), the clinical course of the disease was monitored and the number of dead animals was recorded for 10 days.

Results and discussion. According to the literature data, the specified dose of *Escherichia coli* ensures the death of all animals within 36 hours, *dosis certa letalis*. In this study after the introduction of the indicated infectious dose, the percentage of dead animals within 36 hours was 90.9%. Preliminary administration of *Bifidobacterium bifidum* 1 and *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 ensured the survival of more than 60% of the animals. After administration of *Bifidobacterium bifidum* 1, animal survival indices were 81.6% (1000 μg), 63.6% (100 μg), and 72.7% (10 μg). In the group of animals administered *Lactobacillus reuteri* DSM 17938, animal survival indices were 63.6% (1000 μg), 81.6% (100 μg), and 72.7% (10 μg). A sublethal generalized infectious process was caused by the intraperitoneal administration of 0.5 ml of *Escherichia coli* ATCC 25922 at a dose of 3×10^4 CFU/ml, which ensured the death of 30% of the animals. On the 2nd, 7th and 14th days blood was taken and the phagocytic activity of neutrophils was examined. The infectious process was characterized by a significant decrease in the phagocytic capacity of neutrophils. The use of *Bifidobacterium bifidum* 1 and *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 led to a significant increase in the phagocytic index of neutrophils. The smallest decrease in the phagocytic neutrophil index on the 7th day was observed after administration of cell-free extracts at a dose of 100 μg per mouse. Phagocytic neutrophil indices on the 7th day of the infectious process were (61.55 \pm 2.0)% after administration of *Bifidobacterium bifidum* 1, (65.77 \pm 4.0)% after administration of *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 and (45.18 \pm 2.0) without cell-free extracts applications.

Conclusion. The results of the study indicated the ability of cell-free extracts to have a significant effect on the indices of innate immunity and open up prospects for their use as immunomodulators in the complex treatment of infectious diseases, as a means of non-specific prophylaxis of recurrence and reducing the risk of infection chronization.

Keywords: cell-free extracts, innate immunity, infectious process, phagocytic activity of neutrophils, *Escherichia coli*.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.

Стаття надійшла 11.02.2020 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування