

УДК 579.852 : 579.222

ВПЛИВ ПРОБІОТИКА ЕНДОСПОРИНУ НА ПОКАЗНИКИ СИСТЕМИ ІМУНІТЕТУ У ІНТАКТНИХ ТВАРИН.

Л. А. САФРОНОВА, старший науковий співробітник

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,

Г. В. ДІДЕНКО, старший науковий співробітник

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є.

Кавецького НАН України

Пробіотик ендоспорин при пероральному введенні в інтактний організм сприяє синтезу гуморальних факторів імунітету, що значно посилюють цитотоксичний ефект ефекторних клітин, стимулюють активність клітин макрофагального ряду і мало впливають на активність клітин лімфоцитарного ряду. Введення ендоспорину не призводить до розвитку реакцій запального типу в організмі піддослідних тварин.

Ключові слова: *пробіотик ендоспорин, показники системи імунітету, лімфоцити, макрофаги*

Пробіотики - це препарати на основі живих мікроорганізмів, які при використанні в адекватних кількостях виявляють позитивний вплив на здоров'я організму-господаря [9]. За останні 15 років значно зріс інтерес до пробіотиків із бактерій роду *Bacillus* [11, 4]. Це пов'язано з накопиченням наукових даних, що демонструють їх профілактичну і терапевтичну ефективність при захворюваннях шлунково-кишкового тракту, порушеннях імунного статусу та обміну речовин [7].

Одним із головних факторів механізму лікувально-профілактичної ефективності пробіотиків є їх здатність позитивно впливати на імунологічну реактивність макроорганізму. Дія препаратів спричиняє активацію макрофагів і

лімфоцитів, індукцію вироблення ендogenous інтерферону, збільшення вмісту гамма-глобулінової фракції крові [8, 13].

Проведені раніше дослідження виявили здатність штамів-продуцентів ендоспорину - лікувально-профілактичного препарату [6] для ветеринарії, стимулювати деякі імунологічні реакції макроорганізму. Встановлено, що не лише пероральне, а також одноразове внутрівагінальне і внутрічеревне введення бактеріальних культур мишам стимулює функціональну активність макрофагів перитонеального ексудату (бактерицидну, міграційну та поглинальну) і індукцію сироваткового α - інтерферону [2]. Ці дані підтвердили доцільність застосування біопрепаратів на основі аеробних бацил під час лікування та профілактики не лише шлунково-кишкового тракту, але й запальних процесів різної локалізації. Отримані результати є підставою для проведення подальших досліджень впливу пробіотика ендоспорину на імунний статус організму.

Мета роботи - вивчення впливу ендоспорину на показники системи імунітету організму за одноразового перорального введення його інтактним лабораторним тваринам (ендоспорин 1) та із застосуванням пробіотика у п'ять підходів (ендоспорин 5).

Матеріали і методи досліджень. Досліди проводили на нелінійних мишах-самцях 2-місячного віку, масою 18-20 г. Тварин розділили на три групи: 1- контрольні тварини, отримували перорально по 0,5 мл фізіологічного розчину протягом 5 діб; 2 – група дослідних тварин, одноразово перорально отримували 0,5 мл ендоспорину; 3 – група дослідних тварини, протягом 5 діб отримували перорально по 0,5 мл ендоспорину.

Показники імунореактивності організму тварин визначали на 7-му, 14-ту та 21-шу добу після початку введення ендоспорину. Доза препарату, яку отримували тварини за один прийом, становила $1 \cdot 10^8$ КУО / тварину.

Критеріями оцінки ендоспорину слугували такі показники: цитотоксична активність лімфоцитів і макрофагів, антитілозалежна цитотоксичність лімфоцитів і макрофагів, функціональна активність макрофагів, кооперативна цитотоксичність лімфоцитів і макрофагів, антитілозалежна кооперативна цитотоксичність лімфоцитів і макрофагів, вміст циркулюючих імунних комплексів.

Цитотоксичну активність досліджували з використанням МТТ-тесту, як описано [10, 12] в модифікації [1]. Клітинами-мішенями (КМ) слугували гомологічні пухлинні клітини штабів, які використовували як моделі експерименту, клітинами-ефекторами (КЕ) - лімфоцити (ЛЦ) селезінки і макрофаги (Мф) перитонеальної порожнини. Бактеріцидну активність перитонеальних макрофагів визначали у НСТ-тесті, вміст циркулюючих імунних комплексів (ЦК) у сироватці крові - методом преципітації в 4,5%-ному розчині поліетиленгліколю-6000 (ПЕГ-6000) [5].

Статистичний аналіз проводили з використанням загальноприйнятих методів варіаційної статистики [3].

Результати досліджень. Дослідження цитотоксичної активності макрофагів показали (рис.1), що в групі тварин, які одержували препарат ендоспорин протягом п'яти діб, спостерігали суттєве і достовірне збільшення цитотоксичності макрофагів порівняно з контрольною групою (на 14-ту добу 32% лізису пухлинних клітин, в той час як в контрольній групі лише 17%; $p < 0,01$). На 21-шу добу число лізованих клітин досягло вже 46%, а в контрольній групі лишилось без змін. На всіх етапах дослідження не спостерігали різниці щодо цитотоксичної активності макрофагів між групами тварин, які отримували ендоспорин одноразово та контрольною ($p < 0,01$).

Додавання сироватки до тест-системи (макрофаги/пухлинні клітини) призводило до значного підвищення цитотоксичної активності перитонеальних макрофагів в обох дослідних групах на 7-му добу дослідження (рис.2.). Число лізованих пухлинних клітин у дослідних групах досягало 30% ($p < 0,01$), тоді як у попередньому тесті лише 15%. Однак на 14-ту і 21-шу добу від початку

введення препарату, в групі тварин, які разово одержували ендоспорин, показники активності макрофагів не відрізнялися від показників інтактних тварин ($p < 0,01$).

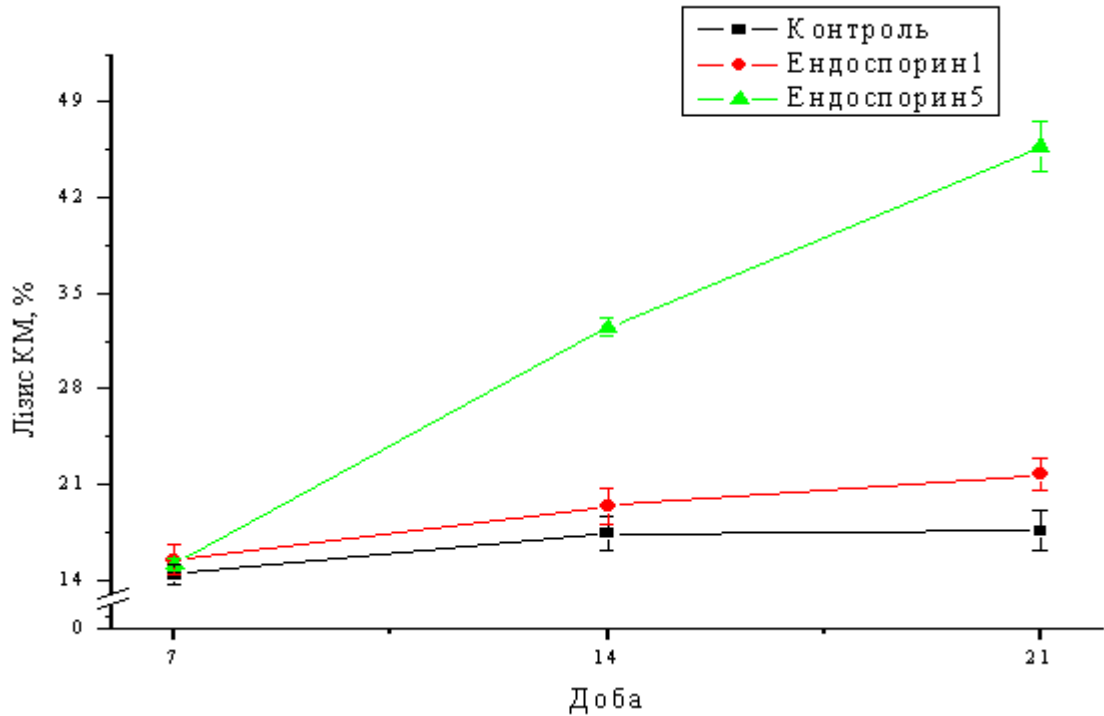


Рис.1. Вплив ендоспорину на цитотоксичну активність макрофагів

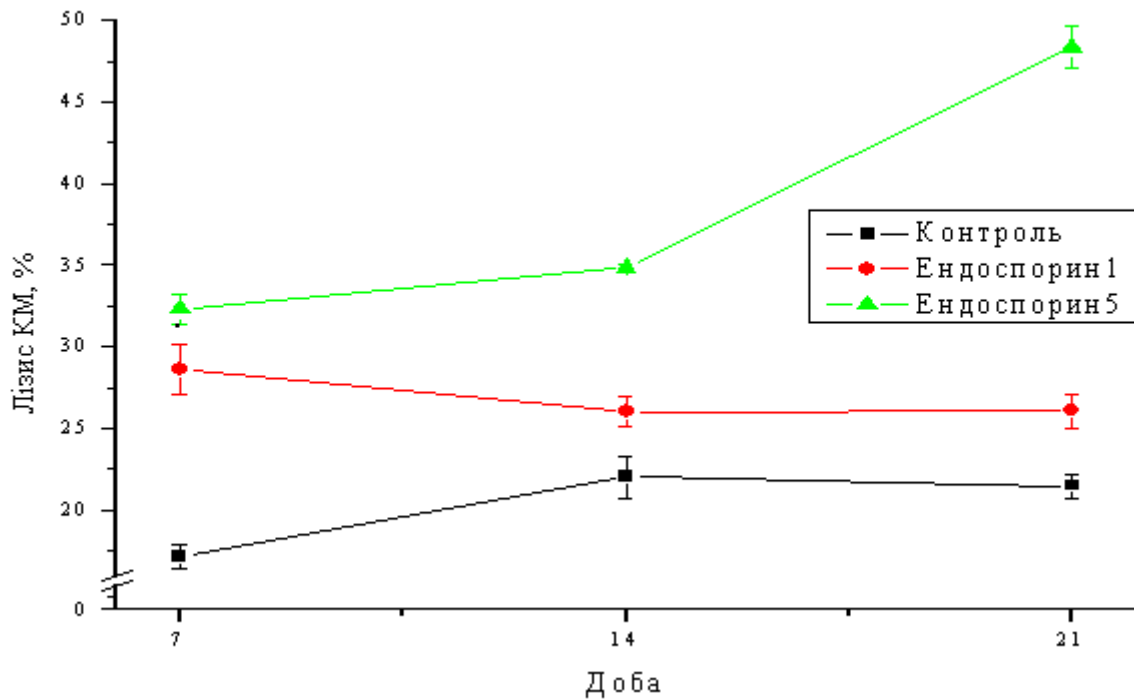


Рис.

2. Вплив ендоспорину на антитілозалежну цитотоксичну активність макрофагів

У групі тварин, які одержували ендоспорин упродовж п'яти діб, активність макрофагів лишалась високою до кінця експерименту (35% лізису пухлинних клітин на 14-ту добу, 48% лізису – на 21-шу добу; $p < 0,01$). Зниження цитотоксичної активності макрофагів спостерігали на 14-ту і 21-шу добу в групі тварин, які отримували ендоспорин одноразово ($p < 0,01$), і вказує на те, що на 7-му добу відбувається заключний етап формування імунних реакцій клітинами макрофагального ряду, тоді як за п'ятиразового введення ендоспорину 7-ма доба є початковою або середньою фазою формування імунних реакцій клітинами макрофагального ряду. Тому прояви активності клітин добре виражені на 14-ту і 21-шу добу дослідження (дія більш пролонгована).

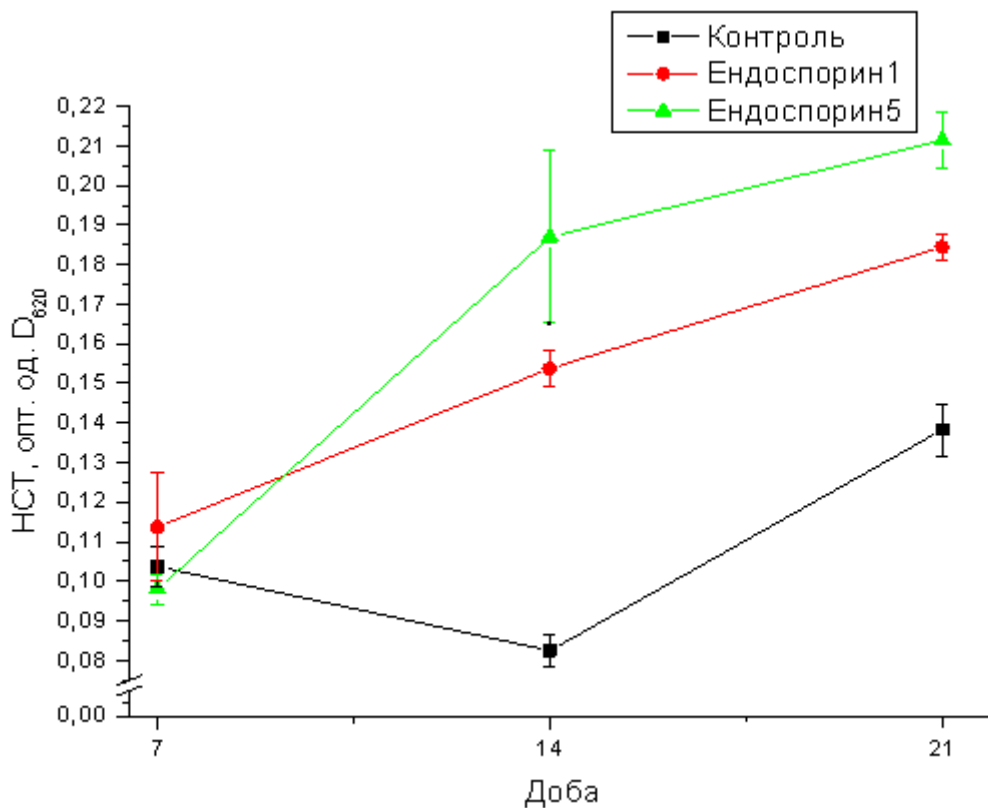
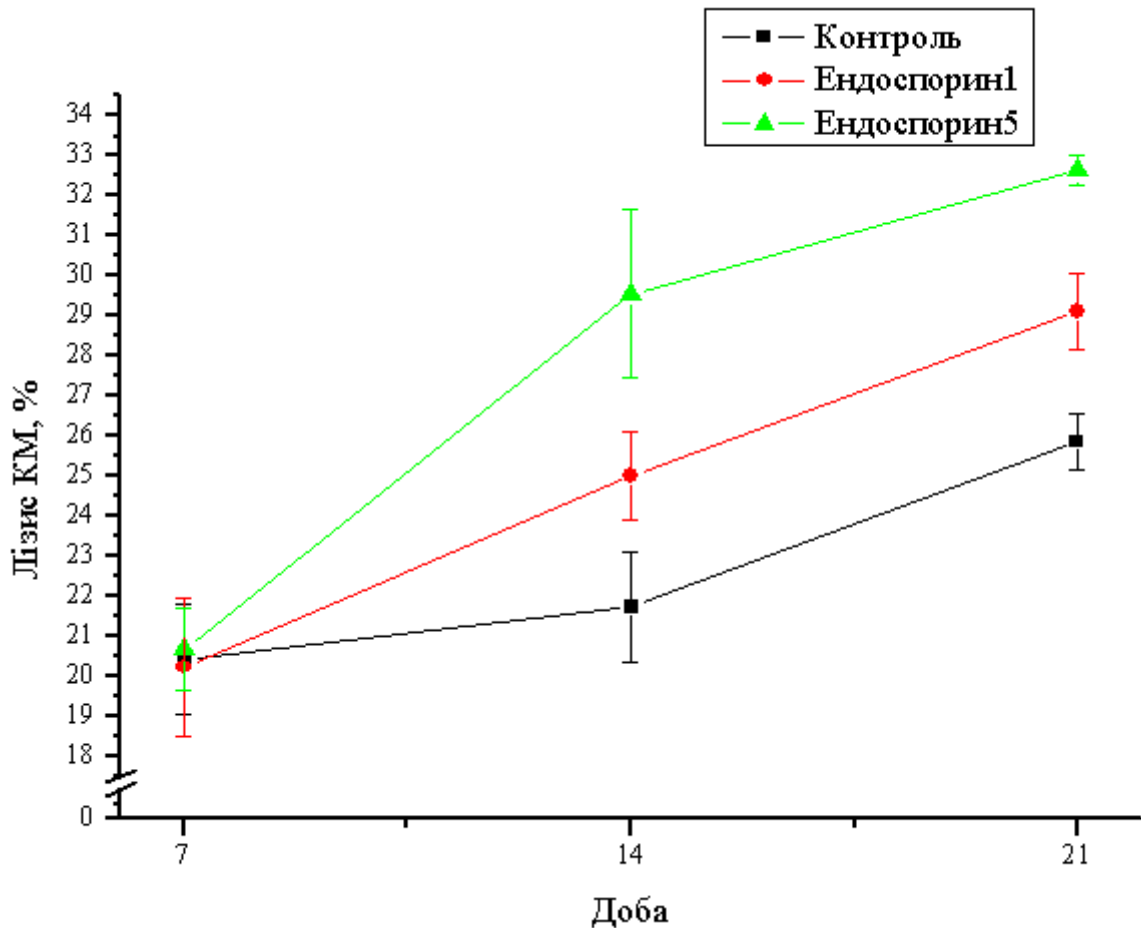


Рис. 3. Вплив ендоспорину на функціональну активність перитонеальних макрофагів.

При дослідженні активності перитонеальних макрофагів у спонтанному НСТ-тесті на 7-му добу від початку введення пробіотика різниці в показниках дослідної і контрольної груп не виявили ($p < 0,01$) (рис.3). Але на 14-ту і 21-шу добу дослідження спостерігали підвищення активності перитонеальних

макрофагів у дослідних групах, які одержували ендоспорин як одноразово, так і впродовж п'яти діб ($p < 0,01$). Крім того, встановлено, що п'ятиразове введення ендоспорину сприяє більш вираженій стимуляції активності перитонеальних макрофагів порівняно з його одноразовим введенням.



Ри

с.4. Вплив ендоспорину на цитотоксичну активність лімфоцитів

Введення ендоспорину експериментальним тваринам не змінило цитотоксичної активності лімфоцитів на 7-му добу досліджень. Помітну різницю в дії препарату можна було спостерігати лише на 14-ту і 21-шу добу ($p < 0,01$) (рис.4.). На кривих динаміки розвитку цитотоксичної реакції лімфоцитів спостерігали поступове підвищення активності клітин. Як і в НСТ-тесті простежується закономірність, яка підтверджує, що кількість разів введення препарату має вирішальний вплив на ступінь виявлення цитотоксичного ефекту. Так, цитотоксична активність лімфоцитів у групі тварин, які отримували ендоспорин упродовж п'яти діб, була вищою, ніж у

групі інтактних тварин і в групі тварин, які одержували препарат одноразово ($p < 0,01$).

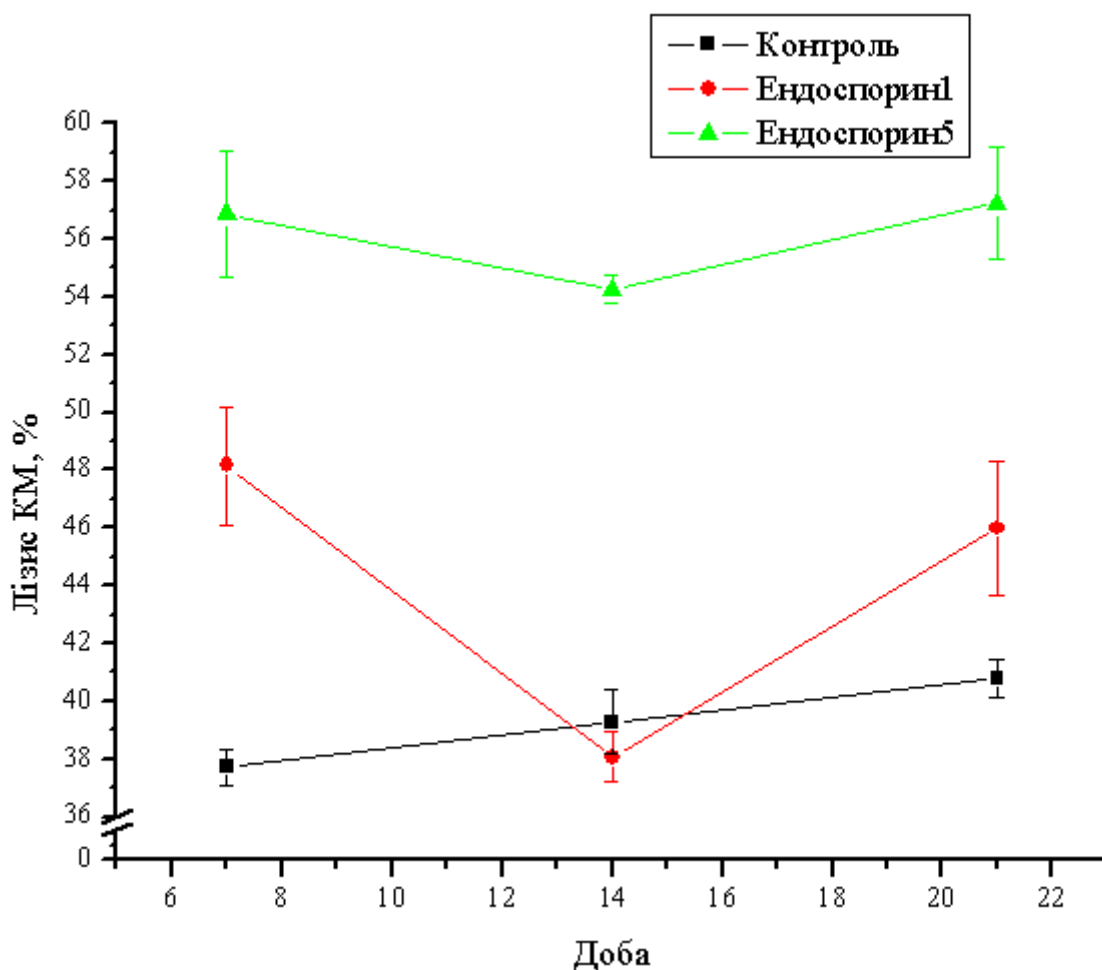
Додавання до тест-системи (лімфоцити/пухлинні клітини) аутологічної сироватки не призвело до виражених змін у прояві цитотоксичної активності лімфоцитів. Вона впродовж усього періоду спостереження у тварин інтактної і дослідної групи була однаковою. Різницю 2-3% у лізисі клітин спостерігали між експериментальною і контрольною групами лише на 21-шу добу ($p < 0,01$).

Під час дослідження кооперативного цитотоксичного ефекту клітин макрофагального ряду і лімфоцитів встановлена майже така сама закономірність розвитку реакцій, що і в тестах за дослідження цитотоксичного ефекту макрофагів. Так, у групі тварин, які отримували ендоспорин упродовж п'яти діб, спостерігали суттєве і достовірне збільшення прояву цитотоксичної дії макрофагів і лімфоцитів порівняно з групою мишей, які не одержували пробіотик: на 14-ту добу 40% лізису пухлинних клітин у експериментальній групі, 27% - у контрольній, на 21-шу добу відповідно - 55% і 40% лізису клітин ($p < 0,01$). У групі тварин, які отримували препарат одноразово, різниці в прояві цитотоксичного ефекту макрофагів і лімфоцитів між дослідною і контрольною групою не спостерігали на всіх етапах дослідження ($p < 0,01$).

Результати, одержані в цьому експерименті, дозволяють зробити висновок, що п'ятиразове введення ендоспорину, в основному, стимулює клітини макрофагального ряду.

Додавання до тест-системи (лімфоцити, макрофаги/пухлинні клітини) аутологічної сироватки сприяє значному збільшенню цитотоксичної активності на 7-му і 21-шу добу після введення мишам препарату в дослідних групах ($p < 0,01$), що збігається із стандартними піками синтезу антитіл (рис.5.). Показники прояву кооперативного цитотоксичного ефекту лімфоцитів і макрофагів у групі тварин, які одержували ендоспорин упродовж п'яти діб, протягом всього періоду спостережень були високими і значно перевищували показники для інтактної групи і тварин, які отримували ендоспорин одноразово ($p < 0,01$). Результати цього експерименту корелюють з даними,

отриманими під час дослідження антитілозалежної цитотоксичної активності макрофагів.



Рис

.5. Вплив ендоспорину на кооперативну взаємодію клітин макрофагального і лімфоїдного ряду з додаванням аутологічної сироватки

При дослідженні вмісту циркулюючих імунних комплексів різної молекулярної маси, що є показником розвитку різних запальних процесів в організмі, в сироватці крові піддослідних тварин на 7-му добу концентрація циркулюючих імунних комплексів у всіх групах реєструвалась на одному рівні (рис. 6). На 14-ту і 21-шу добу спостереження вміст ЦІК різної молекулярної маси в сироватці крові дослідних тварин виявився нижчим, ніж у контрольній групі, а в групі тварин, які одержували ендоспорин п'ятиразово, їх рівень на 21-шу добу був самим низьким ($p < 0,01$). Результати цього тесту свідчать, що введення ендоспорину не призводить до розвитку реакцій запального типу.

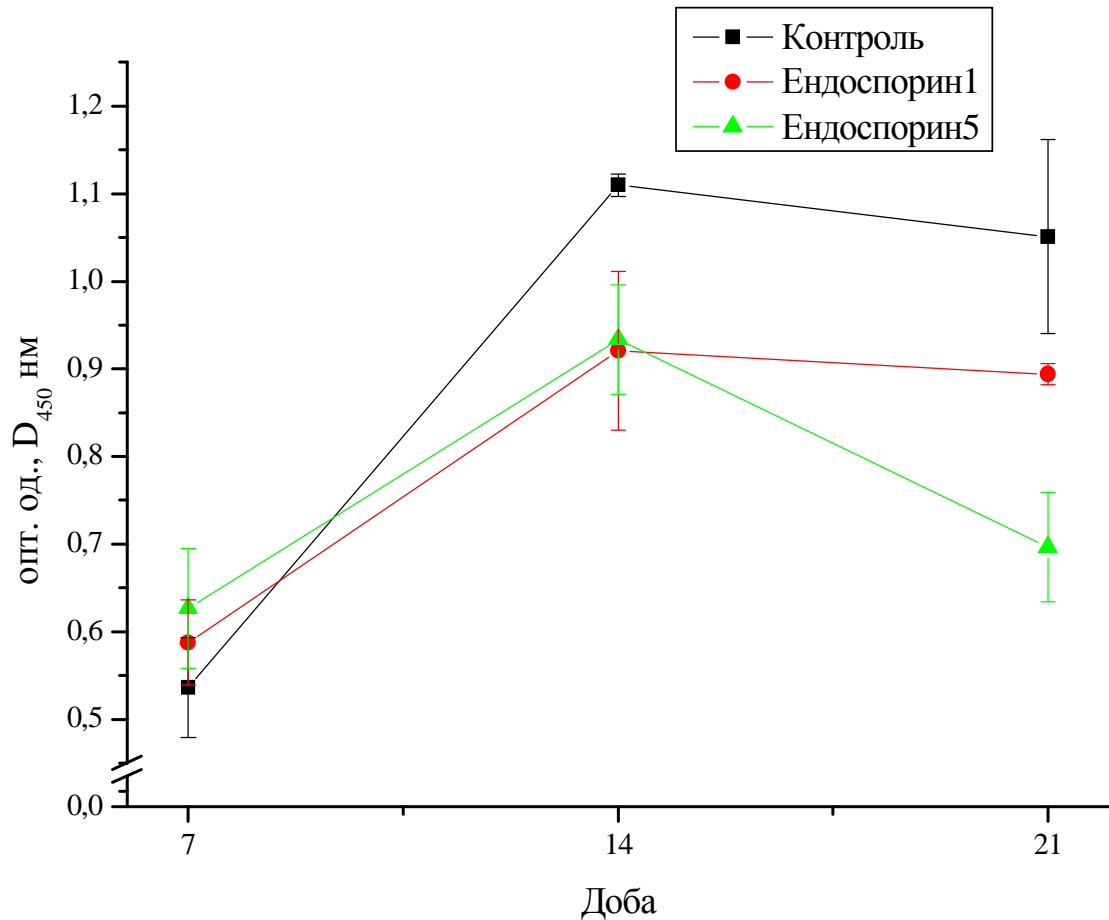


Рис. 6. Вплив ендоспорину на вміст середньомолекулярних ЦК в сироватці крові.

Висновки

1. Введення ендоспорину не призводить до розвитку запальних процесів в організмі піддослідних тварин.
2. Пробіотик сприяє синтезу гуморальних факторів, які підвищують активність ефektorних клітин, стимулює активність клітин макрофагального ряду і слабо впливає на активність клітин лімфоцитарного ряду.
3. П'ятиразове введення ендоспорину призводить до більш вираженого і пролонгованого імуностимулюючого ефекту в організмі піддослідних тварин порівняно з разовим введенням пробіотику.

Список літератури

1. Дворщенко О. С. Моделювання ксеношенних клітинних схем на твердих фазах з використанням пухлиноасоційованих та ембріональних антигенів та їх застосування в протипухлинній терапії/О. С. Дворщенко, О. В. Діденко, О. І. Чередарчук//Доповіді НАН України.-2007.-№12.-С.155-161.
2. Влияние живых культур *Bacillus subtilis* на неспецифическую резистентность организма /[В. А. Кудрявцев, Л. А. Сафронова, А. И. Осадчая и др.]// Микробиол.журн. -1996. - Т.58.- №2. – С.46-54.
3. Лакин Г. Ф. Биометрия / Г. Ф. Лакин – М.: Высшая школа, 1980. – 293с
4. Похиленко В. Д. Пробиотики на основе спорообразующих бактерий и их безопасность / В. Д.Похиленко, В. В.Перелыгин //Химическая и биологическая безопасность. - 2007. - № 2-3. - С.20-41.
5. Фролов В. М. Ефективність аналізу циклоферину у хворих з тяжким перебігом епідемічного паротиту /В. М. Фролов, І. В. Лоскутова.// Проблеми епідеміології, діагностики, клініки, лікування та профілактики інфекційних хвороб– К: Наукова думка. – 2002. – С. 414-417
6. Пат.14569 Украина, А61К35/74,С12 N1/20. Биопрепарат эндоспорин для лечения и профилактики эндометритов животных / В. В. Смирнов, В. А. Кудрявцев, А. И. Осадчая, Г. Н. Калиновский, Л. А. Сафронова. – Оpubл.11.10.99, Бюл.№6
7. Cutting S. M. Bacillus probiotics [S. M. Cutting] / Food Microbiology. – 2011. –Vol. 28. – P. 214-220.
8. Duc Le.H. Characterization of Bacillus Probiotics available for human use [/Le. H. Duc, Huynh A. Hong, T. M. Barbosa, A. O. Henriques] //Appl. and Environ. Microbiol. – 2004. - Vol. 70. –№ 4. – P. 2161–2171.
9. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in 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.
10. Ohno M. Rapid colorimetric assay for the quantification of leukemia

inhibitory factor (LIF) and interleukin-6 (IL-6) / M. Ohno, T. Abe // J. Immunol. Methods. – 1991. – № 145. – P. 199-203.

11. Sanders M. E. Sporeformers as Human Probiotics: *Bacillus*, *Sporolactobacillus* and *Brevibacillus*/ M. E. Sanders, L. Morelli, T. A. Tompkins //Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.— 2003. - Vol. 2. - P.101-110

12. Stanojkovic T. P. The antitumor immune response in HER-2 positive, metastatic breast cancer patients / T. P. Stanojkovic, Z. Zizak, T. Srdic // J. Transl. Med. – 2005. – № 3. – P.13.

13. Sun P. Effects of *Bacillus subtilis* natto on performance and immune function of preweaning calves/P. Sun, J. Q. Wang , H. T. Zhang //J Dairy Sci. – 2010. –Vol. 93. - № 12. – P. 5851-5855.

ВЛИЯНИЕ ПРОБИОТИКА ЭНДОСПОРИН НА ПОКАЗАТЕЛИ ИММУНИТЕТА У ИНТАКТНЫХ ЖИВОТНЫХ

Сафронова Л. А., Диденко Г. В.

Пробиотик эндоспорин при пероральном введении в интактный организм способствует синтезу гуморальных факторов иммунитета, которые значительно усиливают цитотоксический эффект эффекторных клеток, стимулируют активность клеток макрофагального ряда и слабо влияют на активность клеток лимфоцитарного ряда. Введение эндоспорина не приводит к развитию реакций воспалительного типа в организме подопытных животных.

Ключевые слова: пробиотик эндоспорин, показатели системы иммунитета, лимфоциты, макрофаги

EFFECT OF PROBIOTIC ENDOSPORIN ON INDICATORS OF THE IMMUNE SYSTEM OF INTACT ANIMALS.

Safronova L.A., Didenko G.V.

Probiotic endosporin in case of orally introducing to intact organism stimulates synthesis of humoral immunity factors which significantly increasing the cytotoxic effect of the effector cells, stimulating macrophage cell activity, and have little effect on the activity of lymphocytic cells. Introduction endosporin not lead to the development of inflammatory reactions in experimental animals.

Key words: *probiotic endosporin, indicators of immune system, lymphocytes, macrophages*