

## ІМУНОМОДУЛЮЮЧІ ТА ПРОТИПУХЛИННІ ВЛАСТИВОСТІ СПОРОВОГО ПРОБІОТИКУ

**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

*Встановлено, що введення пробіотика ендоспорину мишам з дисбактеріозом сприяє нормалізації стану імунної системи у тварин.*

*На експериментальній моделі пухлинного процесу карциноми легень Льюїс показано, що використання ендоспорину сприяє збільшенню цитотоксичної активності лімфоцитів і макрофагів, гальмує ріст первинного пухлинного вузла та продовжує життя піддослідних тварин.*

***Ключові слова:** пробіотик ендоспорин, дисбактеріоз, карцинома легенів Льюїс, цитотоксична активність, лімфоцити, макрофаги*

Пробіотичні препарати сприяють досягненню ряду фізіологічних ефектів в організмі господаря завдяки досить різноманітним механізмам дії. Одним із основних є коригуючий вплив на порушені показники гуморального, клітинного і неспецифічного імунітету.

Останнім часом пробіотичні препарати все частіше включають в комплексну терапію різних патологічних станів, що мають місце на фоні порушення мікробіоценозу кишківника. Це захворювання шлунково-кишкового тракту, дихальних шляхів, сечостатевої системи, інфекційні процеси різної етіології та інші [11].

З усіх біотопів організму мікробіоценоз шлунково-кишкового тракту має найбільше функціональне значення і є найскладнішим за будовою. Кишківник – важливий імунологічний орган, у слизовій оболонці якого локалізовано близько

80% усіх імунокомпетентних клітин організму (Т-, В-клітини, лімфоцити, плазматичні клітини) [1].

Онкозахворювання є однією із найважчих патологій, за якої застосовуються пробіотики. Встановлено, що біопрепарати сприяють покращенню стану онкологічних хворих – відновлюють нормальний склад мікрофлори кишківника, запобігають розвитку у них можливих інфекційних ускладнень, нормалізують імунний статус і мають протипухлинну активність [4, 10].

Найбільш дослідженою групою мікроорганізмів з пробіотичною дією є лакто- та біфідобактерії, однак більшої популярності набувають препарати на основі аеробних спороутворювальних бактерій роду *Bacillus*. Це пов'язано з накопиченням наукових даних, що демонструють їхню профілактичну і терапевтичну ефективність при захворюваннях шлунково-кишкового тракту, порушеннях імунного статусу та обміну речовин [8]. Багато питань, щодо їхнього багатофакторного механізму дії і впливу на організм, залишаються недостатньо дослідженими і вимагають подальшого вивчення [12].

Одним із ефективних спорових пробіотиків є ендоспорин для профілактики і лікування дисбактеріозів, кишкових інфекцій, гнійних ран та післяпологових ендометритів у сільськогосподарських тварин [6,7].

**Метою роботи** було вивчення імуномодулюючих і протипухлинних властивостей ендоспорину за хімічно індукованого дисбактеріозу та експериментального канцерогенезу.

**Матеріали та методи досліджень.** Досліди проводили на мишах-самцях 2-місячного віку лінії Valb/c, вагою 18-20 г.

*Вивчення імуномодулюючих властивостей ендоспорину за хімічно індукованого дисбактеріозу.*

Дисбактеріоз кишківника у піддослідних тварин формували пероральним введенням ампіокса із розрахунку 0,004 г/тварину протягом п'яти діб. На третю добу після останнього введення антибіотика починали курс біотерапії, який тривав 10 діб.

Для дослідження сформували три групи:

1. Контроль – інтактні тварини;
  2. Тварини з індукованим дисбактеріозом, що отримали ендоспорин у дозі  $10^8$  КУО/мишу на одне введення протягом 10 діб;
  3. Тварини з індукованим дисбактеріозом, які не отримали ендоспорину.
- Імунологічні показники визначали на 3-тю та 21-шу добу після закінчення курсу біотерапії.

Імунологічні дослідження проводили з використанням МТТ-тесту як описано [14] в модифікації [3]. Клітинами мішенями (КМ) слугували гомологічні пухлинні клітини (ПК) штамів, що були використані як моделі експерименту. Клітинами ефекторами (КЕ) – лімфоцити(Лц) селезінки і макрофаги (Мф) перитонеальної порожнини.

*Вивчення протипухлинної активності ендоспорину.*

Як тест-клітини використовували клітини карциноми легень Льюїс, лімфоцити селезінки і перитонеальні Мф. Клітини для тестування були в таких концентраціях: пухлинні–  $0,3 \times 10^6$  кл/мл; Лц і Мф  $2 \times 10^6$  кл/мл. Цитотоксичну дію препарату визначали в МТТ-тесті.

*In vivo* препарат перевіряли на здатність затримувати ріст первинного пухлинного вузла та виживання мишей. Препарат в об'ємі 0,5 мл і концентрації  $10^8$  КУО/мишу вводили тваринам протягом 10 діб. Введення ендоспорину починали в період, коли діаметр пухлинного вузла становив 4-5 мм. Після закінчення експерименту оцінювали функціональну активність імунних клітин в МТТ-тесті.

**Результати досліджень.** При оцінці цитотоксичної активності лімфоцитів (рис. 1) на 15-ту добу після закінчення введення антибіотика (3-тя доба після закінчення біотерапії) було встановлено, що в усіх тварин з індукованим дисбактеріозом спостерігали тенденцію до активації цитотоксичного ефекту. В групі тварин, яких лікували від дисбактеріозу ендоспорином, стимуляція цитотоксичної активності лімфоцитів була достовірно вищою ( $p < 0,05$ ) і становила  $67,09 \pm 3,21\%$  проти  $50,50 \pm 4,18\%$  в

інтактному контролі. У тварин без лікування активність лімфоцитів не відрізнялась від контрольного варіанта і становила  $54,81 \pm 1,35\%$ . На 21-шу добу після закінчення введення пробіотика цитотоксична активність лімфоцитів в експериментальних групах не відрізнялась від інтактного контролю (ЦАЛц= $53,60 \pm 2,84\%$ ) і становила  $54,29 \pm 1,49\%$  у тварин, що не лікувались і  $55,29 \pm 2,59\%$  - у тварин, що отримували ендоспорин.

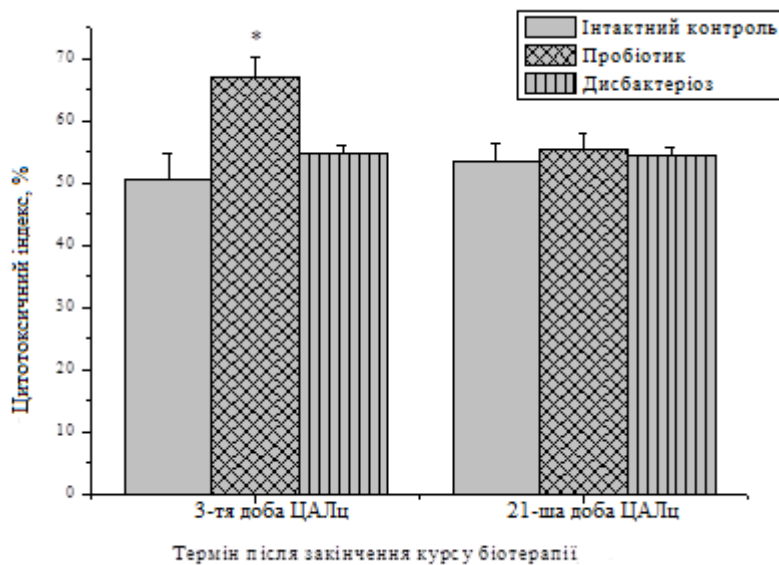


Рис. 1. Цитотоксична активність лімфоцитів мишей з індукованим дисбактеріозом і проведеною біотерапією

Цитотоксична активність макрофагів у всіх групах протягом періоду спостереження достовірно не відрізнялась від показників інтактного контролю ( $p < 0,05$ ).

Під час дослідження змін цитотоксичної активності імунних клітин за впливу аутологічної сироватки крові (антитілозалежні реакції лімфоцитів, макрофагів (АЗЦЛц, АЗЦМф), антитілозалежна кооперативна цитотоксична активність макрофагів і лімфоцитів (АЗЦ «Лц+Мф»)) відзначено, що на 3-тю добу після закінчення курсу біотерапії введення аутологічної сироватки в ефektorні клітини у мишей експериментальних груп призводило до незначного зниження цитотоксичної активності лімфоцитів, стимулювало активність

макрофагів і відчутно не впливало на кооперативну цитотоксичність лімфоцитів і макрофагів. На 21-шу добу після закінчення курсу біотерапії, в групі з дисбактеріозом введення аутологічної сироватки призводило до значного зменшення цитотоксичності ефektorних клітин у всіх тестах (таблиця). Це вказує на накопичення гуморальних факторів, які блокують цитотоксичність імунних клітин і як результат призводять до вираженої імуносупресії. Введення пробіотика експериментальним тваринам значно зменшувало блокуючу дію аутологічної сироватки.

### **Вплив аутологічної сироватки на прояв цитотоксичності імунними клітинами**

| Тест        | Період після останнього введення пробіотика, дів | Індекс модуляції,% |           |              |
|-------------|--|--------------------|-----------|--------------|
|             |  | Інтактний контроль | Пробіотик | Дисбактеріоз |
| АЗЦЛц,      | 3-тю   | 22,33              | 20,30     | 15,10        |
|             | 21-шу  | 20,43              | -3,76     | -59,67       |
| АЗЦМф       | 3-тю   | 2,62               | 9,10      | 11,08        |
|             | 21-шу  | 1,61               | -2,77     | -77,94       |
| АЗЦ «Лц+Мф» | 3-тю   | 13,21              | 13,78     | 10,09        |
|             | 21-шу  | 12,77              | -3,89     | -33,80       |

На 3-тю добу після курсу біотерапії, під час дослідження лізуючої властивості сироватки (рис. 2) було встановлено, що в групі, де тварини не лікувались, сироватка крові стимулювала проліферацію пухлинних клітин ( $7,32 \pm 1,34$  % порівняно з  $14,03 \pm 4,80$  % в інтактному контролі), що підтверджує наявність запального процесу і як результат синтезу гуморальних факторів, супроводжуваних запальним процесом і одночасно стимулюючих проліферацію клітин-мішеней. У тварин, які отримували пробіотик, лізуюча властивість сироватки становила  $15,68 \pm 2,13$  % і не відрізнялась від інтактного контролю. Така сама закономірність спостерігалась і на 21-шу добу після закінчення лікування ендоспорином. Це свідчить про те, що введення пробіотика

запобігало виникненню запального процесу, який активується на фоні дисбактеріозу.

У тварин, хворих на дисбактеріоз, сироватка достовірно ( $p < 0,05$ ) стимулювала проліферацію клітин-мішеней. При цьому показник лізису становив  $16,78 \pm 3,15$  %, що свідчить про наявність хронічного запального процесу.

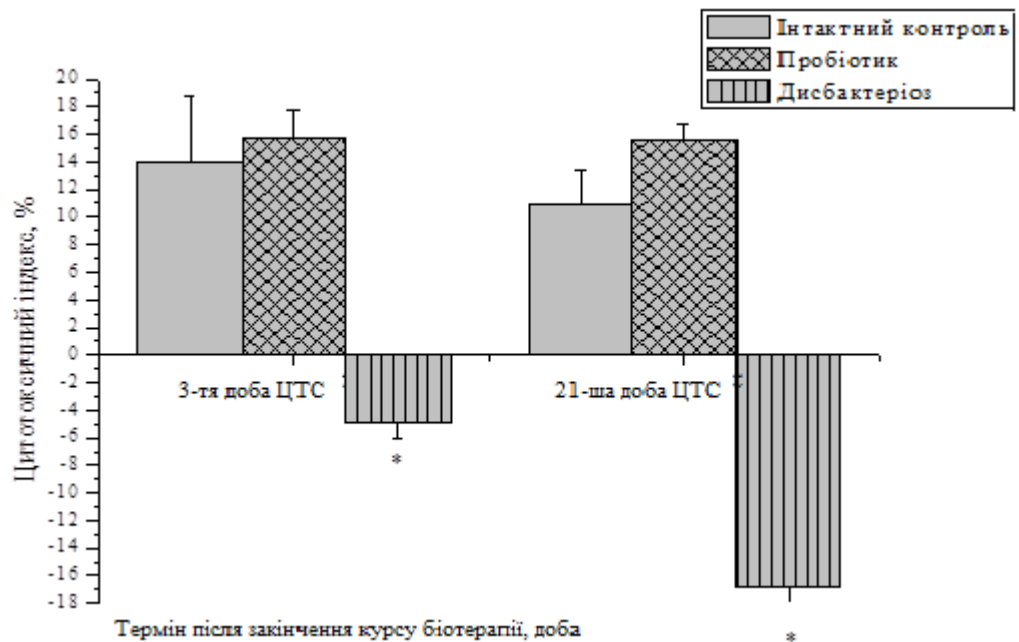


Рис.2. Лізуюча активність сироватки крові мишей з дисбактеріозом та після проведення біотерапії

Отримані дані вказують на те, що на фоні дисбактеріозу розвиваються реакції запального типу, які призводять до накопичення у сироватці крові гуморальних факторів імунітету і блокують реакції, опосередковані лімфоцитами чи макрофагами за збереження їх властивостей до проявлення цитотоксичної активності. Наші дані підтверджують результати, отримані іншими авторами, стосовно того, що запальні захворювання кишківника супроводжуються порушенням внутріпросвітних і проєктивних механізмів тканин, які призводять до пошкодження кишкового бар'єру з одночасним підвищенням проникності слизової оболонки. Цей ефект пов'язують з посиленням утворення протизапальних цитокінів (фактор некрозу пухлини- $\alpha$ ,

інтерферону- $\gamma$ , інтерлейкіну-1 (ІЛ-1, ІЛ-6, ІЛ-12), відсутніх в умовах природної толерантності, що ускладнює прямий цитотоксичний вплив, а також знижує синтез протизапальних цитокінів (ІЛ-4, ІЛ-10, ІЛ-11), і призводить в результаті до агресивної імунної відповіді [2].

Таким чином, пробіотик ендоспорин сприяє нормалізації стану імунної системи при дисбактеріозі.

Подальші дослідження впливу ендоспорину на імунологічний статус макроорганізму були проведені на моделі експериментального канцерогенезу. На 10-у добу після перещеплення пухлини (діаметр пухлинного вузла становив 4-5мм) починали лікування тварин ендоспорином. На 30-ту добу після перещеплення пухлин проводили оцінку протипухлинних ефектів, спричинених застосуванням препарату.

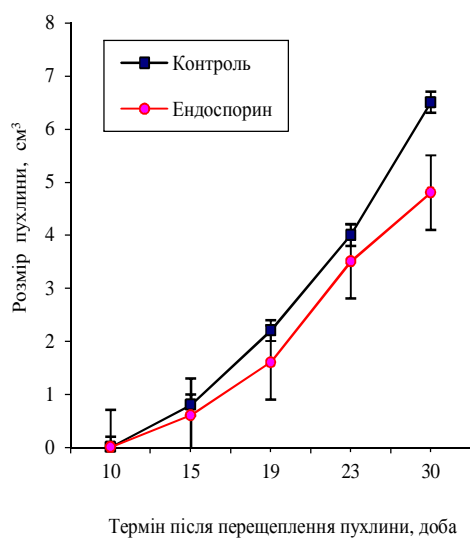


Рис.3. Ріст пухлинного вузла у тварин з перещепленою карциномою легень Льюїс.

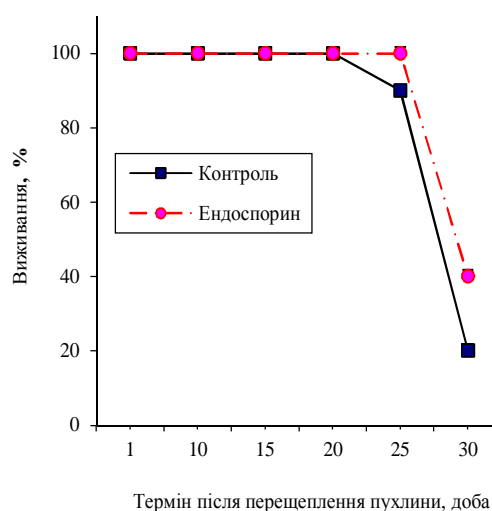
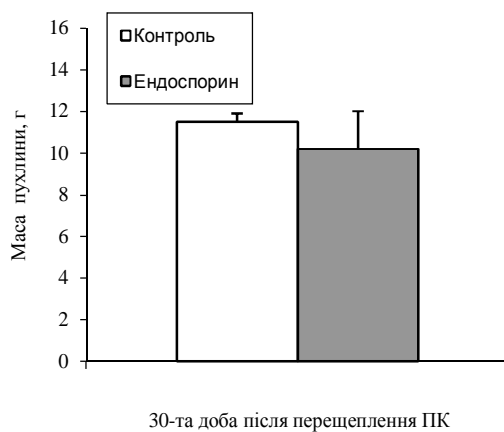


Рис.4. Виживання тварин з перещепленою карциномою легень Льюїс.

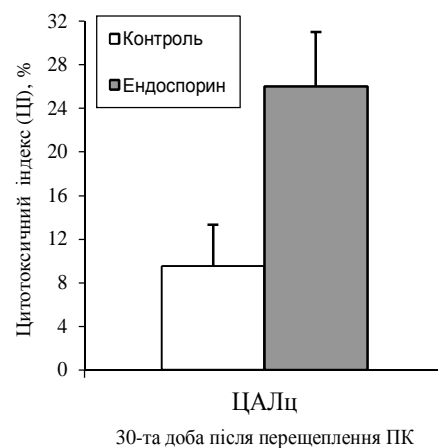
При аналізі розвитку первинного пухлинного вузла на 19-ту добу після перещеплення пухлин спостерігали різницю в об'ємі пухлинного вузла в контрольній і експериментальній групах (рис.3). Розмір пухлини на цей період дослідження

становив: у контролі -  $2,31 \pm 0,24 \text{ см}^3$ , у групі тварин, що отримували едоспорин -  $1,71 \pm 0,27 \text{ см}^3$ . На 23-тю добу спостереження об'єм пухлин був: у контролі -  $4,00 \pm 0,28 \text{ см}^3$ , у групі тварин, які отримували едоспорин -  $3,50 \pm 0,43 \text{ см}^3$ . На 30-ту добу спостереження (точка забою) різниця в розмірах пухлинного вузла була більшою: у контролі  $6,37 \pm 0,00 \text{ см}^3$ , у групі тварин, що отримували едоспорин -  $4,88 \pm 0,69 \text{ см}^3$ . Отже, застосування едоспорину сприяє гальмуванню розвитку пухлинного процесу у мишей.

Показник виживання на 19-ту добу (рис. 4) після перещеплення пухлин в групі тварин, що отримали едоспорин, не відрізнявся від контролю (100 %), на 23-тю добу різниця між показниками була такою: у групі з едоспорином – 100 % і у контрольній – 90%, на 30-у добу відповідно – 40 % і 20 %.



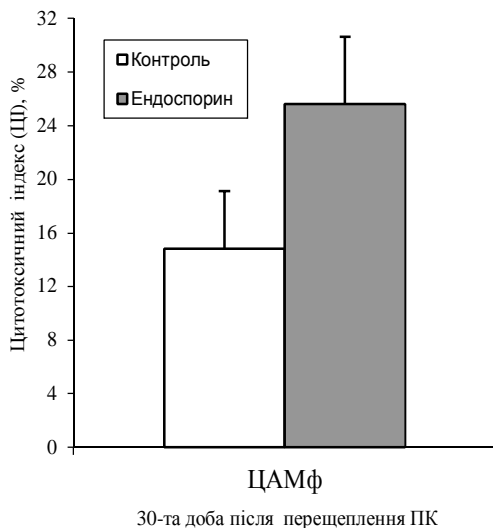
**Рис 5.** Середня маса первинного пухлинного вузла на момент забою.



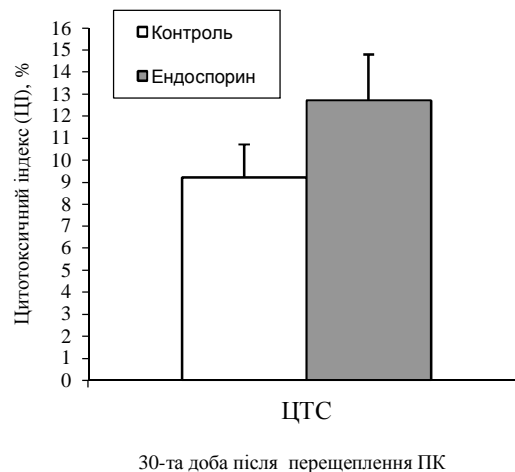
**Рис.6.** Цитотоксична активність лімфоцитів у тварин з перещепленою карциномою легені Льюїс.

На момент забою мишей середня маса первинного пухлинного вузла становила: в контролі –  $11,53 \pm 0,58 \text{ г}$ , у групі тварин, що отримували едоспорин –  $10,1 \pm 1,7 \text{ г}$  (рис.5).





**Рис.7.** Цитотоксична активність макрофагів у тварин з перещепленою карциномою легені Льюїс.



**Рис.8.** Цитотоксична активність сироватки крові тварин з перещепленою карциномою легені Льюїс

При оцінці імунологічних ефектів (рис.6 - 8), спричинених застосуванням ендоспорину, встановлено, що його використання стимулювало пряму цитотоксичність лімфоцитів, макрофагів і сироватки крові експериментальних тварин. Антитілозалежні реакції у всіх випадках не відрізнялись від контролю і значно перевищували показники прямої цитотоксичності.

Імуномодулююча активність штамів, що складають ендоспорин, може бути результатом експресії деяких позаклітинних та / або пов'язаних з клітинною стінкою сполук, що беруть участь в імуностимуляції [9], а також з їх здатністю до синтезу біологічно активних речовин, наприклад, деяких пептидів, які стимулюють ріст імунокомпетентних клітин, збільшують синтез імуноглобулінів, інтерферону, цитокінів і збільшують активність лізоциму [5]. Серед бактерій роду *Bacillus* відомі продуценти антибіотичних речовин, наприклад, сурфатину, макролактину, що характеризуються протипухлинними властивостями [13,15].

### **Висновки.**

1. При дисбактеріозі кишківника в організмі експериментальних тварин відбувається накопичення гуморальних факторів, які блокують цитотоксичність

імунних клітин і призводять до вираженої імуносупресії. Введення пробіотика ендоспорину сприяє нормалізації стану імунної системи у тварин, хворих на дисбактеріоз.

2. На експериментальній моделі пухлинного процесу карциноми легень Льюїс показано, що використання ендоспорину підвищує цитотоксичну активність лімфоцитів і макрофагів, гальмує зростання первинного пухлинного вузла і подовжує термін життя піддослідних тварин.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Александрова В. А. Основы иммунной системы желудочно-кишечного тракта./ В. А. Александрова – Метод. пособие.- Санкт-Петербург:МАПО, 2006. – 44с

2. Бондаренко В. М. Иммунорегуляция численности грамотрицательной микрофлоры кишечника / В. М. Бондаренко, В. Г. Лиходед, А. А. Воробьев // Журн. микробиол.- 2004. - №4. – С.90–93.

3. Дворщенко О. С. Моделювання ксеношених 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.

4. Петрова Н. А. Микрофлора желудочно-кишечного тракта и возможности ее коррекции пробиотиками у больных гемобластозами:автореф. дисс. на соискание ученой степени канд. биол. наук: спец. 03.00.07"Микробиология"/ Н. А. Петрова— Москва, 2002. — 25 с.

5. Шендеров Б. А. Медицинская микробная экология и функциональное питание. Том I: Микрофлора человека и животных и ее функции/ Б. А. Шендеров // - М.: ГРАНТЬ, - 1998. - 288 с.

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 – Опубл.11.10.99, Бюл.№6.

7. Пат.76669 Україна, А61К35/74, А61Р 31/00. Біопрепарат для лікування та профілактики кишкових та гнійних інфекцій у тварин / Л. А. Сафронова, А. І. Осадча, В. О. Кудрявцев – Опубл.01.08.2006, Бюл. №8.

8. Cutting S. M. *Bacillus* probiotics / S. M. Cutting // Food Microbiology. – 2011. –Vol. 28. – P. 214-220.

9. Lawrence C. Production of interleukin-12 by murine macrophages in response to bacterial peptidoglycan / C. Lawrence, C. Nauciel // Infect. Immun. — 1998. — 66. — 4947-4949.

10. Functional aspects of pro- and prebiotics. A literature review on immune modulation and influence on cancer/ G. Mogensen, I. Rowland, T. Midtvedt, R. Fonden//Microb. Ecol. Health and Disease. - 2000. - №12. - P. 40-44.

11. Probiotics and prebiotics - World Gastroenterology Organisation Practice Guideline, 2008 [Електронний ресурс]/Режим доступу: [http://www.world-gastroenterology.org/assets/downloads/en/pdf/guidelines/19\\_probiotics\\_prebiotics.pdf](http://www.world-gastroenterology.org/assets/downloads/en/pdf/guidelines/19_probiotics_prebiotics.pdf) ].

12. 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

13. Schallmeyer M. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production / M. Schallmeyer, A. Singh, O.P. Ward //Can. J. Microbiol. – 2004. -№6. – P. 1–17.

14. 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.

15. Youra Kang. Inhibitory effects of Macrolactin A and 7-O-succinyl macrolactin A on angiogenesis and cancer cell invasion/ Youra Kang, Sumin Park, Hyun Young Kim, Dong Hee Kim and Jung-Ae Kim.//FASEB J.–2012. - April;26:48.8

## ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ И ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ СВОЙСТВА СПОРОВОГО ПРОБИОТИКА

*Л. А. Сафронова, Г. В. Диденко*

*Установлено, что введение пробиотика эндоспорина мышам с дисбактериозом способствует нормализации состояния иммунной системы у животных. На экспериментальной модели опухолевого процесса карциномы легких Льюис показано, что использование эндоспорина приводит к увеличению цитотоксической активности лимфоцитов и макрофагов, тормозит рост первичного опухолевого узла и продлевает срок жизни подопытных животных.*

***Ключевые слова:** пробиотик эндоспорин, дисбактериоз, карцинома легких Льюис, цитотоксическая активность, лимфоциты, макрофаги*

## IMMUNOMODULATORY AND ANTITUMOR PROPERTIES OF SPORE PROBIOTIC

*L. A. SAFRONOVA, G. V. DIDENKO*

*It was determined that the introduction of the probiotic endosporin to mice with dysbiosis promotes to normalize the immune system in animals. In the experimental model of the tumor process of Lewis lung carcinoma was shown that the use of endospore increases the cytotoxic activity of macrophages and lymphocytes, inhibits the growth of the primary tumor node and prolongs life's pan of experimental animals.*

***Key words:** probiotic endosporin, dysbiosis, Lewis lung carcinoma, the cytotoxic activity, lymphocytes, macrophages*