

АНТИБАКТЕРІАЛЬНІ Й ІМУНОМОДУЛЮВАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ ШТАМІВ ЛАКТО- ТА БІФІДОБАКТЕРІЙ ЗА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ СТАФІЛОКОКОВОЇ ІНФЕКЦІЇ

В. В. Мокрозуб
Л. М. Лазаренко
Л. П. Бабенко
Л. М. Шинкаренко
М. Я. Співак

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

E-mail: Spivak@serv.imv.kiev.ua

Отримано 08.09.2011

Визначено антибактеріальні й імуномодулювальні властивості штамів *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* IMB B-7281*, *Lactobacillus casei* IMB B-7280*, *Lactobacillus acidophilus* IMB B-7279*, *Bifidobacterium longum* VK1 та *Bifidobacterium bifidum* VK2 на моделі експериментальної стафілокової інфекції у мишей. Встановлено, що під впливом цих штамів суттєво зменшувалась кількість колоній *Staphylococcus aureus*, які висівали з нирок інфікованих мишей. Водночас після введення інфікованим стафілококом мишам окремих пробіотичних штамів лакто- та біфідобактерій спостерігали підвищення імунорегуляторного індексу CD₄/CD₈, а також кількості CD₁₉⁺- та CD₂₅⁺-клітин у селезінці. Штами *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* IMB B-7281, *Lactobacillus casei* IMB B-7280, *Lactobacillus acidophilus* IMB B-7279, *Bifidobacterium bifidum* VK2 і *Bifidobacterium longum* VK1 є перспективними для створення пробіотиків, ефективних проти стафілокової інфекції, та для корекції імунітету.

Ключові слова: імунітет, інтерферон, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Staphylococcus aureus*, миші.

Створення групи новітніх біотехнологічних препаратів — імунобіотиків — на основі попередньо відібраних і охарактеризованих представників нормальної мікрофлори людини, зокрема штамів лакто- та біфідобактерій, є важливою проблемою сучасної біотехнології, адже сфери застосування цих препаратів значно розширюються, і пробіотичну терапію дедалі частіше ставлять на противагу антимікробній [1, 2]. На сьогодні доведено високу терапевтичну ефективність пробіотиків при інфекційних, аутоімунних, алергічних захворюваннях, злоякісних новоутвореннях, імунодефіцитних станах тощо [3]. Слід зазначити, що пробіотичну терапію широко використовують під час лікування пацієнтів з «найпоширенішими» інфекційними захворюваннями, які часто спровоковані агресивними умовно-патогенними коменсальними мікроорганізмами, у тому числі стафілококами, а також супроводжуються розвитком імунодефіцитних станів [4].

Для того щоб пробіотик був ефективним, бактеріям, які входять до його складу, має бути притаманний певний спектр біологічної активності. Насамперед, вони мають бути адаптовані до умов мікробіоценозу, виявляти антагоністичну дію щодо широкого спектра патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів, мати антитоксичні, антиоксидантні, антимутогенні властивості, а також здатність балансувати імунну відповідь організму за різних форм імунодефіциту тощо [3]. У зв'язку з цим для виявлення оптимальних пробіотичних штамів цільового призначення доцільним є проведення комплексних досліджень їхньої біологічної дії.

Раніше нами було виділено з біологічного матеріалу й охарактеризовано штами лакто- і біфідобактерій: *Lactobacillus casei* IMB B-7280, *L. acidophilus* IMB B-7279, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* IMB B-7281, *Bifidobacterium longum* VK1 та *B. bifidum* VK2. Ці штами мали високу антагоністичну активність стосовно патогенних бактерій та

* — Штами знаходяться в депозитарії Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України

адгезивні властивості до епітеліоцитів, а на моделі інтактних мишей ефективно індукували продукцію ендogenous інтерферону (ІФН) й активували клітини фагоцитарної системи, не впливаючи на продукцію прозапального цитокіну — фактора некрозу пухлин- α [5–9].

У зв'язку з вищенаведеним метою роботи було визначення антибактеріальних та імунomodulatory властивостей штамів *L. casei* IMB B-7280, *L. acidophilus* IMB B-7279, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281, *B. longum* VK1 і *B. bifidum* VK2 на експериментальній моделі стафілокової інфекції у мишей дослідженням їхнього впливу на персистенцію стафілокока, а також на показники клітинного і гуморального імунітету за зміною фенотипового складу лімфоцитів селезінки.

Матеріали і методи

Експериментальні дослідження проведено на мишах лінії BALB/c (18–20 г), самицях віком 6–8 тижнів, отриманих із розплідника Інституту молекулярної біології та генетики НАН України. Усі дослідження проводили з урахуванням норм Європейської конвенції із захисту хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та наукових цілей, від 20.09.1985, та Закону України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» [10].

Стафілокову інфекцію моделювали внутрішньочеревним уведенням мишам добової культури *S. aureus* штам 8325-4 (наданий проф. Зуєвою В. С., Інститут епідеміології і мікробіології ім. Н. Ф. Гамалеї, Російська Федерація) у дозі $1 \cdot 10^9$ кл. на тварину. Цей штам має плазмиду стійкості до гентаміцину, внаслідок чого його можна було відділити від інших штамів стафілококів, висіваючи на елективне середовище (BAIRD-PARKER-Agar, Мерск, Німеччина) із цим антибіотиком (у концентрації 15 мкг/мл). У інфікованих мишей спостерігали такі клінічні прояви інфекційного процесу: підвищення температури тіла, млявість, зниження апетиту.

Використовували ліофілізовані бактерії *L. casei* IMB B-7280, *L. acidophilus* IMB B-7279, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281, *B. longum* VK1 та *B. bifidum* VK2. Перед кожним експериментом перевіряли життєздатність пробіотичних бактерій, контролюючи їх ріст на середовищі Man-Rogosa-Sharpe (MRS) при 37 °C упродовж 48 год. Через 24 год після інфікування мишам вводили *per os* суспензію пробіотичних

культур у фізіологічному розчині в дозі $1 \cdot 10^6$ кл. на тварину один раз на добу протягом 7 діб. Штами вводили кожен окремо або в комбінації — *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281 — *L. acidophilus* IMB B-7279 (у рівному співвідношенні). В окрему групу порівняння увійшли інфіковані миші, які не отримували жодної пробіотичної культури, а натомість їм вводили *per os* фізіологічний розчин. Групу контролю становили інтактні миші. Усі експериментальні дослідження проводили у трьох повторах.

На 1-шу, 3-тю, 6-, 9- та 12-ту добу після початку введення пробіотичних культур від декапітованих мишей отримували нирки, аліквоти гомогенатів яких висівали на елективне середовище для стафілококів із гентаміцином з метою виявлення гентаміциностійкого *S. aureus* 8325-4.

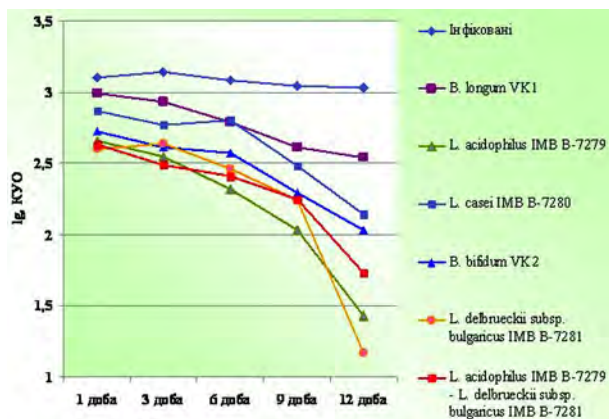
Зміну фенотипового складу лімфоцитів селезінки визначали, досліджуючи поверхневі антигени Т- та В-лімфоцитів, а також активованих CD₂₅⁺-клітин за допомогою методу прямої імуофлюоресценції. У роботі використовували моноклональні антитіла до CD₃⁺, CD₄⁺, CD₈⁺, CD₁₉⁺ та CD₂₅⁺-антигенів лімфоцитів (MACS, Miltenyi Biotec, Німеччина). Підрахунок кількості Т- та В-лімфоцитів, CD₂₅⁺-клітин, а також аналіз результатів проводили на цитофлуориметрі FACStar Plus (Becton-Dickinson, США).

Усі отримані цифрові дані опрацьовували за допомогою комп'ютерної програми Epi Info (версія 6.0) методом варіаційної статистики. Нульову гіпотезу для контрольної та дослідних груп порівняння перевіряли за допомогою непараметричних критеріїв Вілкоксона–Мана–Уїтні (U) і Колмогорова–Смирнова. Відмінності між групами вважали статистично значущими при $P < 0,05$.

Результати та обговорення

У результаті проведених досліджень встановлено, що *L. casei* IMB B-7280, *L. acidophilus* IMB B-7279, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281, *B. longum* VK1 і *B. bifidum* VK2 (окремо) та в комбінації *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281 — *L. acidophilus* IMB B-7279 виявляли антистафілокову дію *in vivo* на моделі експериментальної стафілокової інфекції у мишей. Однак антистафілокова ефективність цих штамів була різною. Як видно з даних, наведених на рисунку, з гомогенату нирок інфікованих мишей, які не отримували пробіотичних культур, *S. aureus* 8325-4 висівався у великій кількості протягом усього терміну

спостереження — з 1-ї по 12-ту добу. Після введення інфікованим мишам *L. acidophilus* IMB B-7279, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281 або *B. bifidum* VK2, окремо чи композиції *L. acidophilus* IMB B-7279 — *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281 кількість колоній *S. aureus* 8325-4, який висівався з гомогенату нирок, зменшувалась починаючи з 1-ї доби і впродовж наступних 12 діб. Разом з тим під впливом *B. longum* VK1 або *L. casei* IMB B-7280, окремо, на 1-шу добу кількість колоній *S. aureus* 8325-4, що висівався з нирок, зменшувалась неістотно, тому різниця порівняно з показниками для інфікованих мишей, які не отримували пробіотичні культури, була невірогідною. Із гомогенату нирок інфікованих мишей, яким вводили ці штами окремо, *S. aureus* 8325-4 висівався у значно меншій кількості лише на 3-тю, 6-, 9- та 12-ту добу. Слід зазначити, що на 1-шу, 3-тю, 6- та 9-ту добу антистафілококова дія була ефективнішою у *L. acidophilus* IMB B-7279, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281 або *B. bifidum* VK2, окремо та в композиції *L. acidophilus* IMB B-7279 — *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281, ніж у *B. longum* VK1 або *L. casei* IMB B-7280.



Кількість колоній *S. aureus* 8325-4, що їх висівали з гомогенату нирок інфікованих мишей після перорального введення пробіотичних штамів

На 12-ту добу антистафілококова активність окремих пробіотичних культур та композиції може бути оцінена таким чином: *L. acidophilus* IMB B-7279 / *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281 > *L. acidophilus* IMB B-7279 — *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281 > *B. bifidum* VK2 / *L. casei* IMB B-7280 > *B. longum* VK1. Композиція *L. acidophilus* IMB B-7279 — *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281 також продемонстру-

вала високу антистафілококову активність, проте вона вірогідно не відрізнялась від активності у *L. acidophilus* IMB B-7279 або *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281, окремо.

Результати проведених нами раніше досліджень [11] стосовно антагоністичної властивості цих пробіотичних культур *in vitro* стосовно *S. aureus* 8325-4, були такі: *L. acidophilus* IMB B-7279 > *B. bifidum* VK2 > *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281 > *B. longum* VK1 / *L. casei* IMB B-7280. Отже, *in vivo* деякі штами, зокрема *B. bifidum* VK2, справляли менш ефективну антистафілококову дію, ніж *in vitro*, порівняно з іншими штамами. Імовірно, це можна пояснити тим, що пробіотичні бактерії можуть виявляти різні механізми антистафілококової дії *in vitro* та *in vivo* [3].

Відомо, що антибактеріальна дія пробіотичних штамів лакто- та біфідобактерій *in vivo* опосередковано пов'язана з їхніми імуномодулювальними властивостями. Встановлено [12], що з розвитком ефективної імунної відповіді на стафілокок спостерігається активація як клітинної, так і гуморальної ланок імунітету, оскільки в патогенезі захворювань, спричинених стафілококами, певну роль відіграють як бактеріальні клітини, так і їхні екзотоксини. Тому далі проводили дослідження фенотипового складу селезінки інфікованих стафілококом мишей, які отримували штами лакто- та біфідобактерій.

Одержані нами дані показали, що за стафілококової інфекції кількість CD_3^+ , CD_8^+ , CD_{19}^+ -клітин у селезінці не змінювалась порівняно з показниками контролю протягом усього терміну спостереження (таблиця). Однак на 3-тю добу спостерігали зменшення кількості CD_4^+ -клітин, що призводило до зниження імунорегуляторного індексу CD_4/CD_8 . На 1-шу, 6- та 9-ту добу кількість CD_4^+ -клітин у селезінці інфікованих мишей та імунорегуляторний індекс CD_4/CD_8 залишались у межах контрольних величин. Кількість CD_{25}^+ -клітин підвищувалась на 1-шу добу, але в інші терміни зменшувалась до рівня контролю.

Фенотиповий склад лімфоцитів селезінки змінювався під впливом пробіотичних культур. Так, спостерігалось незначне підвищення кількості CD_3^+ -клітин у селезінці інфікованих мишей, які отримували *B. longum* VK1 на 9-ту добу, *L. acidophilus* IMB B-7279 або *L. casei* IMB B-7280 окремо — на 1-шу добу, *B. bifidum* VK2 — на 6-ту добу, або композицію *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281 — *L. acidophilus* IMB B-7279 — на 6-ту добу, проте різниця стосовно показників для інфікованих мишей, які

не отримували пробіотичні штами, та в контролі була невірною. Встановлено, що порівняно з показниками для інфікованих мишей, які не одержували пробіотичні штами, кількість CD_4^+ -клітин на 3-тю добу підвищувалась лише під впливом композиції *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281 — *L. acidophilus* IMB B-7279. Разом з тим кількість CD_4^+ -клітин була нижчою, ніж у контролі (інтактні миші), у селезінці інфікованих мишей, які отримували *B. longum* VK1 на 3-тю та 6-ту добу, або *B. bifidum* VK2 — на 3-тю, або *L. acidophilus* IMB B-7279 — на 9-ту добу, або *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281 — на 6-ту добу.

Кількість CD_8^+ -клітин у селезінці інфікованих мишей зменшувалась під впливом *B. longum* VK1 на 1-шу добу, *L. acidophilus* IMB B-7279 або *L. casei* IMB B-7280, або *B. bifidum* VK2 — на 3-тю добу стосовно показників для інфікованих мишей, які не одержували пробіотичні штами, та в контролі. Протягом усього терміну кількість цих клітин зберігалась на рівні контролю в селезінці інфікованих мишей, які отримували *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281 або композицію *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281 — *L. acidophilus* IMB B-7279.

Фенотиповий склад лімфоцитів селезінки інфікованих мишей, які отримували пробіотичні бактерії

Групи мишей/ термін спостереження		Відносна кількість клітин, %					CD_4/CD_8 , ум. од.
		CD_3^+	CD_4^+	CD_8^+	CD_{19}^+	CD_{25}^+	
Інтактні	—	56,3±3,4	41,5±2,3	26,3±2,3	8,8±3,4	9,1±1,2	1,60±0,13
Інфіковані	1-ша доба	57,8±2,3	42,2±3,4	24,8±3,3	6,7±1,3	12,1±2,3 [*]	1,70±0,11
	3-тя доба	56,2±0,9	36,0±1,4 [*]	25,9±2,3	11,5±1,3	9,2±1,3	1,39±0,09 [*]
	6-та доба	55,2±3,5	40,6±2,3	25,4±2,4	5,2±1,4	6,4±1,4	1,60±0,10
	9-та доба	57,4±2,5	43,0±2,3	23,0±1,4	9,5±1,4	9,0±2,3	1,87±0,14
Отримували: <i>B. longum</i> VK1	1-ша доба	52,3±4,5	40,9±2,4	18,6±1,4 [*]	13,1±1,3 •	8,5±1,2	2,20±0,19 [*]
	3-тя доба	54,1±5,4	33,5±1,4 [*]	21,3±2,5	5,8±1,2 •	5,7±2,3	1,57±0,17
	6-та доба	51,8±1,4	32,7±1,5 [*]	20,5±2,3	13,9±0,9 •	11,3±2,3	1,60±0,16
	9-та доба	64,6±2,6	42,2±2,4	24,6±2,3	7,5±1,4	9,7±2,3	1,72±0,15
<i>L. acidophilus</i> IMB B-7279	1-ша доба	63,1±3,5	40,4±3,4	25,6±3,3	11,3±2,4 •	7,0±1,4	1,58±0,16
	3-тя доба	53,4±4,4	37,2±2,3	18,1±2,4 [*]	11,4±1,3	10,2±2,4	2,06±0,20 •
	6-та доба	52,4±5,4	37,5±1,4	26,0±3,4	10,6±2,4 •	9,2±3,4	1,44±0,19
	9-та доба	51,3±3,4	35,8±1,4 [*]	22,5±2,3	11,3±2,3	10,0±2,3	1,59±0,11
<i>L. casei</i> IMB B-7280	1-ша доба	64,9±4,6	43,1±2,3	24,5±1,4	9,4±1,3	9,9±2,3	1,76±0,20
	3-тя доба	58,7±5,3	38,5±3,3	19,6±1,5 [*]	7,6±1,4	7,7±3,4	1,96±0,16 •
	6-та доба	58,5±4,5	41,7±3,5	23,4±2,4	7,8±2,4	7,3±1,4	1,78±0,20
	9-та доба	62,7±5,5	42,4±2,5	26,1±2,3	11,2±1,3	6,7±1,3	1,62±0,16
<i>B. bifidum</i> VK2	1-ша доба	61,0±3,4	38,5±3,4	22,2±1,4	11,9±1,4 •	15,6±1,3 [*]	1,73±0,16
	3-тя доба	52,0±4,4	35,6±2,3 [*]	17,1±2,3 [*]	6,5±2,2	14,5±1,3 [*]	2,08±0,21 •
	6-та доба	64,3±1,6	39,5±2,4	26,1±2,3	13,2±2,4 •	14,4±2,4 [*]	1,51±0,13
	9-та доба	55,9±3,5	36,5±3,4	25,5±2,3	11,9±1,3	9,1±2,4	1,43±0,14 •
<i>L. delbrueckii subsp.</i> <i>bulgaricus</i> IMB B-7281	1-ша доба	58,9±4,5	36,8±3,5	23,0±1,4	10,3±1,3 •	16,2±2,3 [*]	1,60±0,16
	3-тя доба	60,6±4,4	37,8±2,5	22,3±3,4	9,8±2,4	5,4±3,3	1,70±0,14
	6-та доба	52,5±3,4	34,5±1,4 [*]	21,7±2,3	11,4±2,4 •	12,9±1,3 [*]	1,59±0,14
	9-та доба	58,3±4,6	43,3±1,4	22,4±2,3	14,6±3,4 •	10,1±2,4	1,93±0,16
<i>L. delbrueckii subsp.</i> <i>bulgaricus</i> IMB B-7281 — <i>L. acidophilus</i> IMB B-7279	1-ша доба	59,3±3,5	41,6±1,5	22,8±1,4	10,2±2,3 •	10,0±2,3	1,82±0,15
	3-тя доба	62,2±4,4	40,9±1,2 •	20,0±2,4	7,8±3,4	6,0±1,3	2,07±0,13 •
	6-та доба	57,0±2,5	37,6±3,4	22,4±3,4	12,9±1,3 •	15,7±2,3 [*]	1,59±0,12
	9-та доба	59,5±3,6	40,6±2,3	27,4±1,3	13,0±2,3	14,9±3,4 [*]	1,48±0,15

Примітка: * — $P < 0,05$ стосовно показників для інтактних мишей; • — $P < 0,05$ стосовно показників для інфікованих мишей, які не отримували пробіотичні культури.

Імунорегуляторний індекс CD_4/CD_8 на 3-тю добу підвищувався після введення інфікованим мишам *L. acidophilus* IMB B-7279, *L. casei* IMB B-7280, *B. bifidum* VK2 окремо (через зменшення кількості CD_8^+ -клітин) або композиції *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281 — *L. acidophilus* IMB B-7279 (через підвищення кількості CD_4^+ -клітин) порівняно з показниками для інфікованих мишей, які не отримували пробіотичних культур. Під впливом *B. longum* VK1 імунорегуляторний індекс CD_4/CD_8 підвищувався на 1-шу добу (унаслідок зменшення кількості CD_8^+ -клітин) стосовно як показників для інфікованих мишей, які не отримували пробіотичних культур, так і контролю.

Кількість CD_{19}^+ -В-лімфоцитів у селезінці інфікованих мишей, які отримували пробіотичні культури, не змінювалась порівняно з показниками контролю. Однак на 1-шу та 6-ту добу кількість цих клітин підвищувалась після введення інфікованим мишам *B. longum* VK1, *L. acidophilus* IMB B-7279, *B. bifidum* VK2, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281, кожний окремо, або композиції *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281 — *L. acidophilus* IMB B-7279 порівняно з інфікованими мишами, які не отримували пробіотичні культури.

Звертає на себе увагу те, що під впливом *B. bifidum* VK2 (на 1-шу, 3-тю та 6-ту добу), *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281 (на 1-шу і 6-ту добу), а також композиції *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281 — *L. acidophilus* IMB B-7279 (на 6- та 9-ту добу) у селезінці інфікованих мишей суттєво зростала кількість CD_{25}^+ -клітин. Це може свідчити про активацію Т-, В-лімфоцитів чи макрофагів або підвищення експресії на поверхні клітини рецепторів інтерлейкіну-2 — цитокіну Th1-клітин, який спрямовує розвиток імунної відповіді за клітинним типом. Під впливом інших пробіотичних культур кількість CD_{25}^+ -клітин у селезінці інфікованих мишей зберігалася на рівні контролю. Отже, зростання імунорегуляторного індексу CD_4/CD_8 , а також кількості у селезінці CD_{19}^+ - і CD_{25}^+ -клітин після введення інфікованим стафілококом мишам окремих пробіотичних штамів лакто- та біфідобактерій, які досліджували, у різні терміни спостереження опосередковано може свідчити про активацію як клітинної, так і гуморальної ланок імунітету.

Таким чином, встановлено, що штамми *L. casei* IMB B-7280, *L. acidophilus* IMB B-7279, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281, *B. longum* VK1 та *B. bifidum* VK2, та-

кож композиція *L. acidophilus* IMB B-7279 — *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281 на моделі експериментальної стафілококової інфекції у мишей виявляли антибактеріальну й імунотулювальну дію. Усі штами продемонстрували антистафілококову ефективність *in vivo*, однак найефективнішою вона була у *L. acidophilus* IMB B-7279 та *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281, кожен штам окремо. Слід зазначити, що *L. acidophilus* IMB B-7279 мав високу антагоністичну активність щодо *S. aureus* 8325-4 *in vitro* [11], а штам *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281 — виявився активатором фагоцитів [7], активність яких внаслідок перебігу стафілококової інфекції порушувалась [13]. Однак введення мишам композиції *L. acidophilus* IMB B-7279 — *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281 не призвело до очікуваного поліпшення антистафілококової дії цієї композиції порівняно з монокультурами. Показано, що багато різних штамів лакто- та біфідобактерій пригнічували ріст *S. aureus*, зокрема, *L. acidophilus* EP317/402 [14], *L. acidophilus* CL1285(®) і *L. casei* LBC80R [15]; *L. plantarum* 8P-A3, *L. casei* DN-114001, *L. reuteri* [16], *B. longum* Z4, *B. bifidum* Г1 [17] та деякі інші штами *Bifidobacterium* [18]. Здійснюється пошук інших штамів молочнокислих бактерій, які б мали високу ефективність проти стафілококів і виявляли здатність до балансування імунної відповіді, порушеної внаслідок перебігу патологічного процесу. Водночас завжди має бути пробіотичний препарат вибору, оскільки в різних хворих один і той самий штам або штами у складі композицій можуть по-різному адаптуватись до умов мікробіоценозу, що буде визначати їхню ефективність.

Одержані дані свідчать, що після введення інфікованим стафілококом мишам пробіотичних штамів лакто- та біфідобактерій, які ми досліджували, спостерігалася зміна деяких показників, що характеризують стан клітинного й гуморального імунітету. Зауважимо, що ці штами на моделі експериментальної стафілококової інфекції у мишей справляли різну імунотулювальну дію. Так, на 3-тю добу підвищувався до рівня контролю імунорегуляторний індекс CD_4/CD_8 під впливом *L. acidophilus* IMB B-7279, *L. casei* IMB B-7280, *B. bifidum* VK2 окремо або композиції *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281 — *L. acidophilus* IMB B-7279 порівняно з інфікованими мишами, які не отримували пробіотичні культури. Втім, зростання цього показника відбувалося за

рахунок підвищення у селезінці кількості CD₄⁺-клітин лише після введення інфікованим стафілококом мишам композиції *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281 — *L. acidophilus* IMB B-7279. Водночас кількість CD₄⁺-клітин у різні терміни спостереження виявилась нижчою, ніж у контролі (інтактні миші), у селезінці інфікованих мишей, які отримували *B. longum* VK1, *B. bifidum* VK2, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281 або *L. acidophilus* IMB B-7279, окремо. Під впливом *L. acidophilus* IMB B-7279, *L. casei* IMB B-7280, *B. bifidum* VK2, *B. longum* VK1, окремо, імунорегуляторний індекс CD₄/CD₈ підвищувався за рахунок зменшення кількості CD₈⁺-клітин у селезінці інфікованих мишей. Про активацію гуморальної ланки імунітету опосередковано свідчило підвищення у селезінці кількості CD₁₉⁺-В-лімфоцитів у різні терміни спостереження після введення інфікованим мишам *B. longum* VK1, *L. acidophilus* IMB B-7279, *B. bifidum* VK2, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281, окремо, або композиції *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281 — *L. acidophilus* IMB B-7279. Під впливом *B. bifidum* VK2 (на 1-шу, 3-тю та 6-ту добу), *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281 (на 1-шу та 6-ту добу), а також композиції *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281 — *L. acidophilus* IMB B-7279 (на 6- та 9-ту добу) у селезінці інфікованих стафілококом мишей підвищувалась кількість клітин, які експресували антиген CD₂₅⁺. Інші штами пробіотичних бактерій, які ми вивчали, не впливали на кількість CD₂₅⁺-клітин у селезінці інфікованих мишей. Аналізуючи отримані дані, можна зробити припущення, що на моделі експериментальної стафілококової інфекції ефективніший імунomodulatory вплив на показники клітинного та гуморального імунітету мала композиція *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281 — *L. acidophilus* IMB B-7279, оскільки під її впливом підвищувалась на 3-тю добу кількість CD₄⁺-Т-лімфоцитів, що призвело як до зростання величини імунорегуляторного індексу CD₄/CD₈, так і CD₁₉⁺- та CD₂₅⁺-клітин (у різні терміни спостереження).

Підвищення кількості Т- та В-лімфоцитів, а також їхньої проліферативної активності та продукування ними низки імунорегуляторних цитокінів, зокрема Th1- та Th2-типу, спостерігалось під впливом багатьох інших штамів лакто- та біфідобактерій при різних патологічних процесах [19–23]. Характер впливу на активність Т- та В-лімфоцитів і спектр цитокінів відрізнялись у різних

штамів молочнокислих бактерій, а результати окремих досліджень показали, що дія залежала від дози. Результати проведених нами досліджень і дані літературних джерел свідчать, що імунomodulatory властивості окремих культур лакто- та біфідобактерій суттєво відрізняються між собою, це є їх індивідуальною характеристикою. Тому, створюючи препарати на основі лакто- та біфідобактерій з підвищеним рівнем імунomodulatory активності — імунобіотики — доцільно забезпечити виконання всіх умов максимальної реалізації закладеного в цих бактеріях біологічного потенціалу.

Отримані нами дані підтверджують вимоги Європейського регуляторного законодавства в галузі пробіотиків щодо необхідності проведення всебічних досліджень біологічної активності як окремих пробіотичних культур, так і їх поєднань при створенні пробіотичних препаратів на основі монокультур лакто- та/або біфідобактерій чи їх різних комбінацій.

Отже, пробіотичні штами *L. casei* IMB B-7280, *L. acidophilus* IMB B-7279, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281, *B. longum* VK1 та *B. bifidum* VK2 мали антагоністичні властивості стосовно стафілокока *in vivo*, про що свідчило прискорення елімінації *Staphylococcus aureus* 8325-4 з нирок інфікованих мишей.

Імунomodulatory властивості пробіотичних штамів *L. casei* IMB B-7280, *L. acidophilus* IMB B-7279, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281, *B. longum* VK1 та *B. bifidum* VK2, окремо, або композиції *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281 — *L. acidophilus* IMB B-7279 на моделі експериментальної стафілококової інфекції у мишей підтверджувало підвищення в різні терміни спостереження величини імунорегуляторного індексу CD₄/CD₈, кількості в селезінці CD₄⁺-клітин (під впливом композиції *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281 — *L. acidophilus* IMB B-7279), CD₁₉⁺-В-лімфоцитів, а також CD₂₅⁺-клітин (під впливом *B. bifidum* VK2, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281, окремо, або композиції *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281 — *L. acidophilus* IMB B-7279).

Пробіотичні штами *L. casei* IMB B-7280, *L. acidophilus* IMB B-7279, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281, *B. longum* VK1 та *B. bifidum* VK2 є перспективними для створення імунобіотиків, ефективних щодо *Staphylococcus aureus*, а також для корекції показників імунореактивності організму, порушених унаслідок перебігу інфекційно-запальних захворювань.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Кругликов В. Д., Цураева Р. И., Рыжков И. В. и др.* Возможность приживления *Lactobacillus acidophilus* в кишечнике белых мышей на фоне бактериальной терапии // Журн. микробиол. — 1997. — № 1. — С. 67–69.
2. *Банникова Л. А., Королева Н. С., Семенихина В. Ф.* Микробиологические основы молочного производства. — М.: Агропромиздат, 1987. — 400 с: ил.
3. *Широбоков В. П., Янковский Д. С., Дымент Г. С.* Микробная экология человека. — К.: ООО «Червона Рута-Турс», 2010. — 340 с.
4. *Шендеров Б. А.* Значение колонизационной резистентности в патогенезе инфекционных заболеваний / Иммунология инфекционного процесса. Под ред. В.И. Покровского и др. — М.: Медицина, 1994. — 246 с.
5. *Spivak M. Ya., Pidgorsky V. S., Lazarenko L. M. et al.* *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* influence on the indices of immune influence on the indices of immune response of the organism showed on experimental model // Microbiology @ Biotechnology. — 2009. — N 1(5). — P. 39–46.
6. *Старовойтова С. А., Лазаренко Л. Н., Авдеева Л. В. и др.* Поиск штаммов бактерий родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*, перспективных для создания пробиотиков // Наук. вісник Ужгород. ун-ту (Сер. Біол.). — 2009. — Т. 26. — С. 216–219.
7. Пат. № 93133. Штам *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* ІМВ В-7281 — активатор фагоцитов / Співак М. Я., Шинкаренко Л. М., Підгорський В. С. та ін. — Заявл. 11.07.2010; Опубл. 10.01.2011, Бюл. № 1.
8. Пат. № 93132. Штам *Lactobacillus acidophilus* ІМВ В-7279 — індуктор ендогенного інтерферону І типу / Співак М. Я., Підгорський В. С., Шинкаренко Л. М. та ін. — Заявл. 11.07.2010; Опубл. 10.01.2011, Бюл. № 1.
9. Пат. № 93133. Штам *Lactobacillus casei* ІМВ В-7280 — індуктор «пізнього» інтерферону та активатор макрофагів / Співак М. Я., Шинкаренко Л. М., Підгорський В. С. та ін. — Заявл. 11.07.2010; Опубл. 10.01.2011, Бюл. № 1.
10. *Резніков О. Г.* Проблеми етики при проведенні експериментальних медичних і біологічних досліджень на тваринах // Вісник НАНУ. — 2001. — № 1. — С. 5–7.
11. *Старовойтова С. А., Лазаренко Л. Н., Авдеева Л. В. и др.* Поиск штаммов бактерий родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*, перспективных для создания пробиотиков // Наук. вісник Ужгород. ун-ту (Сер. Біол.). — 2009. — Т. 26. — С. 216–219.
12. *Белобородов В. Б., Митрохин С. Д.* Стафилококковые инфекции / Инф. антибакт. тер. — 2003. — Т. 5, № 1. — С. 28–35.
13. *Спивак Н. Я., Лазаренко Л. Н., Михайленко О. Н.* Интерферон и система мононуклеарных фагоцитов. — К.: Фитосоцицентр. — 2002. — 164 с.
14. *Старовойтова С. А.* Розробка композиції поліштаммового пробіотику на основі бактерій роду *Lactobacillus*: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. — Київ, 2008. — 21 с.
15. *Karska-Wysocki B, Bazo M, Smoragiewicz W.* Antibacterial activity of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) // Microbiol Res. — 2010. — V. 165 (8). — P. 674–686.
16. *Ермоленко Е. И., Исаков В. А., Ждан-Пушкина С. X.* Количественная характеристика антагонистической активности лактобацилл // Микробиол. журн. — 2004. — № 5. — С. 94–98.
17. *Коршунов В. М., Уртаева З. А., Смянов В. В. и др.* Изучение антагонистической активности бифидобактерий *in vitro* и *in vivo* с использованием гнотобиологической технологии // Журн. микробиол. эпидемиол. иммунобиол. — 1999. — № 5. — С. 72–77.
18. *Lahtinen S. J., Jalonen L., Ouwehand A. C., Salminen S. J.* Specific *Bifidobacterium* strains isolated from elderly subjects inhibit growth of *Staphylococcus aureus* // Int. J. Food Microbiol. — 2007. — V. 117(1). — P. 125–128.
19. *D'Arienzo R., Maurano F., Luongo D. et al.* Adjuvant effect of *Lactobacillus casei* in a mouse model of gluten sensitivity // Immunol. Lett. — 2008. — V. 119(1–2). — P. 78–83.
20. *Ko E. J., Goh J. S., Lee B. J. et al.* *Bifidobacterium bifidum* exhibits a lipopolysaccharide-like mitogenic activity for murine B lymphocyte. // J. Dairy Sci. — 1999. — V. 82(9). — P. 1869–1876.
21. *Mane J., Pedrosa E., Loren V. et al.* A mixture of *Lactobacillus plantarum* CECT 7315 and CECT 7316 enhances systemic immunity in elderly subjects: A dose-response, double-blind, placebo-controlled, randomized pilot trial // Nutr. Hosp. — 2011. — V. 26(1). — P. 228–235.
22. *Walsh M. C., Gardiner G. E., Hart O. M. et al.* Predominance of a bacteriocin-producing *Lactobacillus salivarius* component of a five-strain probiotic in the porcine ileum and effects on host immune phenotype. // FEMS Microbiol. Ecol. — 2008. — V. 64(2). — P. 317–327.
23. *Yasui H., Ohwaki M.* Enhancement of immune response in Peyer's patch cells cultured with *Bifidobacterium breve*. // J. Dairy Sci. — 1991. — V. 74(4). — P. 1187–1195.

**АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ
И ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА
ШТАММОВ ЛАКТО- И БИФИДОБАКТЕРИЙ
ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ
СТАФИЛОКОККОВОЙ ИНФЕКЦИИ**

*В. В. Мокрозуб
Л. Н. Лазаренко
Л. П. Бабенко
Л. Н. Шинкаренко
Н. Я. Спивак*

Институт микробиологии и вирусологии
им. Д. К. Заболотного НАН Украины, Киев

E-mail: Spivak@serv.imv.kiev.ua

Определены антибактериальные и иммуномодулирующие свойства штаммов *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281, *Lactobacillus casei* IMB B-7280, *Lactobacillus acidophilus* IMB B-7279, *Bifidobacterium longum* VK1 и *Bifidobacterium bifidum* VK2 на модели экспериментальной стафилококковой инфекции у мышей. Установлено, что под влиянием этих штаммов существенно уменьшалось количество колоний *Staphylococcus aureus*, которые высевались из почек инфицированных мышей. Вместе с тем после введения инфицированным стафилококком мышам отдельных пробиотических штаммов лакто- и бифидобактерий наблюдалось повышение иммунорегуляторного индекса CD₄/CD₈, а также количества CD₁₉⁺- и CD₂₅⁺-клеток в селезенке. Штаммы *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281, *Lactobacillus casei* IMB B-7280, *Lactobacillus acidophilus* IMB B-7279, *Bifidobacterium bifidum* VK2 и *Bifidobacterium longum* VK1 являются перспективными для создания пробиотиков, эффективных против стафилококковой инфекции, и для коррекции иммунитета.

Ключевые слова: иммунитет, интерферон, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Staphylococcus aureus*, мыши.

**ANTIBACTERIAL
AND IMMUNOMODULATING PROPERTIES
OF LACTO- AND BIFIDOBACTERIA
STRAINS AT EXPERIMENTAL
STAPHYLOCOCCAL INFECTION**

*V. V. Mokrozub
L. M. Lazarenko
L. P. Babenko
L. M. Shinkarenko
M. Ya. Spivak*

Zabolotny Institute of Microbiology
and Virology of National Academy of Sciences
of Ukraine, Kyiv

E-mail: Spivak@serv.imv.kiev.ua

Antibacterial and immunomodulating properties of *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* IMV B-7281, *Lactobacillus casei* IMV B-7280, *Lactobacillus acidophilus* B-7279 IMV, *Bifidobacterium longum* VK1 and *Bifidobacterium bifidum* VK2 strains were determined at the experimental model of staphylococcal infection of mice. It was established that under the influence of these strains it was significantly reduced the number of *Staphylococcus aureus* colonies, which were seeded out from kidneys of infected mice. At the same time after introduction by mice with staphylococcal infection of separate probiotic strains of lacto- and bifidobacteria it was observed increasing of the CD₄/CD₈ immunoregulatory index, and also the number of CD₁₉⁺- and CD₂₅⁺-cells in spleen. *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* IMV B-7281, *Lactobacillus casei* IMV B-7280, *Lactobacillus acidophilus* B-7279 IMV, *Bifidobacterium bifidum* VK2 and *Bifidobacterium longum* VK1 strains found to be perspective for probiotics creation, that could be effective against staphylococcal infection and for the immunity correction.

Key words: immunity, interferon, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Staphylococcus aureus*, mice.