

МОДЕЛЮВАННЯ *IN VITRO* ВПЛИВУ МЕТАБОЛІТІВ ЛАКТОБАКТЕРІЙ НА СИСТЕМНУ ВІДПОВІДЬ ОРГАНІЗМУ ПРИ КИШКОВІЙ ВІРУСНІЙ ІНФЕКЦІЇ

С.О. Соловйов^{1,2}, О.П. Трохименко^{1,2}, В.Ю. Поліщук², В.В. Піць^{2*}, В.Ю. Василенко³, Є.Ю. Василенко³, І.О. Голь³, А.А. Симчук⁴, О.В. Костюк⁵

¹Національний університет охорони здоров'я України імені П.Л. Шупика, Київ, Україна

²КПІ ім. Ігоря Сікорського, Київ, Україна

³Університет Вітовта Великого, Каунас, Литва

⁴Шпиталь клінічний імені Кароля Йонхшера Університету медичного імені Кароля Марцинковського, Познань, Польща

⁵Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, Київ, Україна

*Corresponding author: vadimpitsofficial@gmail.com

Received 15 January 2024; Accepted 22 May 2024

Проблематика. Вірусні інфекції залишаються вагомою причиною захворюваності та смертності населення в усьому світі. Відсутність ефективних етіотропних препаратів для лікування вірусних гастроентеритів підкреслює актуальність різних форм комбінованої терапії, включаючи збалансоване харчування та застосування пробіотиків.

Мета. Верифікація *in vitro* гіпотези про вплив метаболітів пробіотичних штамів лактобактерій на системну відповідь організму при кишковій вірусній інфекції.

Методика реалізації. Об'єктами дослідження були фільтрати культуральних рідин пробіотичних штамів лактобактерій *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* LE та *L. rhamnosus* LB3. Як біологічні системи використано культури клітин Namalwa, HEp-2, а також вірус везикулярного стоматиту. В дослідженні виконувався спектрофотометричний і цитофлюориметричний аналіз.

Результати. Виявлено відсутність прямого протизапального ефекту в зразків фільтратів культуральних рідин лактобактерій. Найбільш виражені властивості ко-індуктора інтерферону проявляє фільтрат культуральної рідини лактобактерій штаму *L. delbrueckii subsp. lactis* LE. Аналіз проліферативного індексу (ПІ) клітин культури HEp-2 за різних впливів виявив, що при інкубації клітин із фільтратом культуральної рідини лактобактерій (LE) ПІ зростає для молодих клітин, зменшується для середньозрілих клітин і зростає для пізньозрілих клітин. Комбінований вплив фактора некрозу пухлин альфа та фільтрату культуральної рідини лактобактерій LE відзначався стимуляцією ПІ середньозрілих клітин і значним пригніченням ПІ пізньозрілих клітин.

Висновки. Синергічна дія фільтратів культуральних рідин лактобактерій і фактора запалення сприятиме прискореній елімінації з кишківника пізньозрілих і уражених клітин та стимулюватиме до проліферації молоді та середньозрілі клітини на їх заміну, що сприятиме регенерації епітелію кишківника та прискорить одужання. Разом із тим пробіотичні штами лактобактерій можуть сприяти підсиленню інтерфероногенних властивостей вірусів-збудників гастроентеритів і в кінцевому результаті стимулюватимуть формування специфічного імунітету при цих захворюваннях.

Ключові слова: пробіотичні штами; лактобактерії; вірусний гастроентерит, інтерферон; фактор запалення; проліферація.

Вступ

Вірусні інфекційні захворювання в сучасному світі мають великий вплив на людство. Вони є суттєвою складовою причин захворюваності та смертності, відповідно, негативно впливають на здоров'я населення в цілому та завдають значних економічних втрат [1]. Гострі респіраторні вірусні інфекції є однією з основних причин смертності в усьому світі – вони призводять до понад 4 млн смертей щороку [2]. Яскравим прикладом цієї глобальної загрози є коронавірусна інфекція COVID-19, яка була

викликана новим коронавірусом SARS-CoV-2 і яка під час пандемії 2019–2023 рр. уразила мільйони людей у всьому світі [3]. Не менш важливою проблемою залишаються інфекції шлунково-кишкового тракту, зокрема вірусні гастроентерити, етіологічними агентами яких є ротавіруси, норовіруси, кишкові аденовіруси, астровіруси. Вірусні гастроентерити особливо вражають дітей до п'яти років [4]. Наразі відсутні препарати етіотропної дії, які можуть бути ефективними для лікування вірусних гастроентеритів, тому актуальною залишається комбінована симптоматична та патогенетична те-

рапія як для дітей, так і для дорослих [5, 6]. Додатковим підходом до лікування пацієнтів із вірусними гастроентеритами є збалансоване харчування, що містить поживні речовини або компоненти, які підсилюють імунну відповідь. Одним зі стратегічних напрямів харчування, який використовується в останні роки для підвищення імунітету при вірусних інфекціях, є споживання пробіотиків [7].

Кишківник є складним мікробіоценозом, який складається з мільярдів різноманітних мікроорганізмів [8]. Ці мікроорганізми утворюють мікробіоту [9, 10], деякі з них можуть позитивно впливати на імунологічні та метаболічні процеси в організмі людини. Продовольча та сільськогосподарська організація ООН та Всесвітня організація охорони здоров'я визначили "пробіотичними" саме "живі мікроорганізми, які, спожиті у відповідних кількостях, чинять корисний вплив на хазяїна" [11]. Захисний ефект пробіотиків може проявлятися безпосередньо, запобігаючи розвитку інфекції, або опосередковано, підвищуючи імунну відповідь господаря. Споживання пробіотиків сприяє нормалізації мікробіоценозу кишківника, впливаючи на нормалізацію імунітету макроорганізму та підвищуючи захист від зовнішніх патогенів [12–14].

Згідно з результатами деяких клінічних досліджень, застосування пробіотиків може сприяти швидшому одужанню при ротавірусній інфекції [15]. Припускається, що механізмами такого захисту є покращення якості слизового бар'єра, баланс мікробіоти кишечника та модуляція імунної відповіді [16]. У дослідженнях *in vitro* показано, що ротавірусна інфекція ефективно пригнічується застосуванням пробіотичних препаратів на основі штамів *Lactobacillus acidophilus* (LA) та *Bifidobacterium langum* (IBG), хоча механізм цього захисту залишається невідомим [17]. Гіпотетично, білкові речовини, що синтезуються цими штамми, регулюють кількість внутрішньоклітинного ротавірусного ентеротоксину NSP4. Крім того, концентрація іонів кальцію також може регулюватися цими метаболітами, тим самим запобігаючи його вивільненню з ендоплазматичної сітки ентероцитів і зменшуючи їх пошкодження [18].

Відомо, що перекис водню виробляється деякими пробіотичними штамми лактобактерій як складова механізму природнього захисту. Більшість мікроорганізмів є чутливими до органічних кислот, які входять до складу метаболітів лактобактерій. Вони руйнуються за до-

помогою специфічного механізму, при якому нерозкладені молекули іонізуються всередині власної клітинної мембрани. Таким чином, вивільняючи іони водню, клітини негайно реагують, знижуючи рН, і, відповідно, завдають шкоди клітинам інших мікроорганізмів [19]. Виробництво молочної кислоти є ключовим механізмом стійкості, який запобігає росту мікроорганізмів, чутливих до кислоти, включаючи ті, що викликають інфекційні захворювання [20]. Відомо про прямий вплив різних непротеїнових сполук, зокрема поліфенолів [21] або тафлавінів [22], на ротавіруси. Лактоферин є найбільш добре дослідженою білковою речовиною в складі материнського молока, що має опосередковані противірусні властивості [23] і пригнічує ротавіруси завдяки здатності зв'язуватися з частинками вірусу [24, 25]. Бактеріоцини є антимікробними пептидами, що синтезуються в рибосомах. Хоча антибактеріальна дія бактеріоцинів була частково описана, їх антивірусна дія ще не зрозуміла. Для низки бактеріоцинів підтверджена їх антивірусна дія на різних моделях, хоча механізм такої дії залишається досі невідомим [26–28].

Разом із тим відома противірусна дія інтерферонів першого типу при неспецифічній відповіді на вірусну інфекцію. Вона починається через декілька годин після інфікування, проявляється блокуванням синтезу вірусоспецифічної мРНК і є першою ланкою імунної відповіді, яка ефективно діє ще до початку утворення специфічних антитіл [7]. Заслужують на увагу протизапальні властивості пробіотиків, що можуть проявлятися через вплив на прозапальні цитокіни, прискорену утилізацію інфікованих клітин кишківника, регенерацію кишкового епітелію, зменшення наслідків ензимопатій [29].

Таким чином, метою нашої роботи була верифікація в модельних умовах *in vitro* гіпотези про наявність комплексних захисних властивостей метаболітів пробіотичних штамів лактобактерій, важливих при вірусних гастроентеритах.

Матеріали і методи

Об'єктами дослідження були фільтрати культуральних рідин пробіотичних штамів лактобактерій *L. delbrueckii subsp. lactis* LE та *L. rhamnosus* LB3. Як тест-об'єкти в дослідженні було використано субстратзалежну епітеліальну клітинну лінію карциноми гортані людини HEp-2, штам *Cincinnati*, суспензійну клітин-

ну лінію лімфоми Беркіта Namalwa та вірус везикулярного стоматиту (ВВС), штам Індіана.

Вірус везикулярного стоматиту (ВВС), штам Індіана, отримано з музею кафедри вірусології Національного університету охорони здоров'я України імені П.Л. Шупика.

Культури клітин HEp-2 і Namalwa, одержані з банку клітинних культур Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України у вигляді кріоконсервованого зразка, розморожували стандартним методом і культивували, з метою стабілізації культури, впродовж 3-х послідовних пасажувань у ростовому живильному середовищі на основі середовища DMEM (Sigma, США) з додаванням 10 % фетальної сироватки крові корів (Sigma, США) й антибіотиків. Якість одержаних клітинних моношарів культури HEp-2 визначали при макро- і мікроскопічному дослідженні.

При макроскопічному дослідженні візуально визначали зміну забарвлення ростового живильного середовища, його прозорість, відсутність сторонніх частинок і контамінантів. Мікроскопічне дослідження клітинного моношару проводили під інвертованим мікроскопом Primo-Vert (Carl Zeiss, Німеччина). При цьому клітинний моношар, придатний для проведення досліджень, складався з однакових за морфологією і розмірами прозорих клітин, які відповідали паспортним характеристикам культури HEp-2 – цілісні, рівномірні, без осередків дегенерації клітини.

Культуру клітин знімали з поверхні росту 0,02 % розчином Версена, після чого їх суспендували в ростовому живильному середовищі DMEM (Sigma, США) із додаванням 10 % фетальної сироватки крові корів (Sigma, США). Визначали концентрацію живих клітин у отриманій суспензії з використанням мортального барвника трипанового синього та готували їх суспензію в ростовому середовищі в посівній концентрації $5 \cdot 10^5$ клітин/мл. Одержану суспензію вносили по 0,1 мл у лунки 96-лункового культурального планшета і по 1,0 мл у лунки 24-лункового планшета та культивували 24–72 год за 37 °С в атмосфері 5 % CO₂. Якість клітинних моношарів контролювали під інвертованим мікроскопом.

Суспензійну культуру Namalwa культивували в живильному середовищі RPMI-1640 (Sigma, США) з додаванням 10 % фетальної сироватки й антибіотиків. При пасажуванні клітини відділяли від культуральної рідини центрифугуван-

ням за параметра 450 g на дні пробірки, після чого ресуспендували в ростовому живильному середовищі, визначали концентрацію живих клітин у суспензії стандартним методом з використанням мортального барвника трипанового синього.

Культивування ВВС проводили у культурі клітин HEp-2. Вірус культивували за 37 °С упродовж 24–48 год до повного прояву цитопатичної дії (ЦПД) вірусу – повної дегенерації клітинного моношару. Одержану вірусмісну рідину аліквотували та зберігали за –40 °С.

Визначення інфекційного титру ВВС проводили мікрометодом у культурі клітин HEp-2, яку попередньо культивували в 96-луноковому планшеті. З планшета з культурою клітин видаляли ростове живильне середовище, клітинні моношари в лунках відмивали розчином Хенкса, після чого розчин видаляли. Готували серійні десятиразові розведення суспензії ВВС у підтримуючому середовищі без сироватки від 10^{-1} до 10^{-7} , щоразу змінюючи наконечник мікропіпетки. В кожну лунку планшета на відмиті клітинні моношари, починаючи з найбільшого розведення (10^{-7}), одним наконечником вносили по 100 мкл вірусомісної рідини у відповідному розведенні, використовуючи по 4 тест-об'єкти на кожне. В лунки планшета, призначені для контролю клітин, вносили по 100 мкл підтримуючого живильного середовища. Вірус культивували за 37 °С в атмосфері 5 % CO₂. Облік результатів титрування тест-вірусу ВВС проводили через 24–48 год від моменту інфікування клітинних моношарів. Інфекційний титр вірусу розраховували за методом Кербера [30]. Інфекційний титр вірусу відповідав найбільшому розведенню вірусомісної рідини, яке викликає цитопатичну дію в половині інфікованих моношарів, і визначався у тканинних цитопатичних дозах (ТЦД₅₀/0,1 мл). Інфекційний титр вірусу завжди дорівнює його одній інфекційній дозі.

Визначення цитотоксичної дії культуральних рідин лактобактерій проводили в перерахунку на концентрацію білка в культуральній рідині кожного зразка, попередньо визначену за методом Лоурі [31]. Готували послідовні десятиразові серійні розведення досліджуваної культуральної рідини лактобактерій у підтримуючому середовищі в концентрації від 10^{-1} до 10^{-11} . Починаючи з найбільшого розведення, препарати наносили на клітинні моношари по 0,1 мл у кожну лунку мікропланшета. Цитотоксичну дію зазначених зразків визначали при аналізі

життєздатності клітин із використанням МТТ-тесту відповідно до інструкції із застосування Cell Proliferation Kit I (MTT) Roshe [32]. При визначенні цитотоксичної дії експеримент був проведений у двох повторностях. Оптичну густину розчину в лунках планшетів вимірювали за допомогою мікроспектрофотометра Microplate Reader MR 700 (Німеччина) за довжини оптичної хвилі 550 нм, що відповідає максимуму поглинання розчину формазану за наявності референс-фільтра 650 нм. Концентрація досліджуваних зразків, за якої спостерігалась життєздатність клітин вище 80 % від контролю, була обрана як максимальна нетоксична концентрація (МНК) [33].

Дослідження властивостей фільтратів культуральних рідин лактобактерій як ко-індукторів інтерферону проводили із застосуванням суспензійної клітинної лінії Namalwa, яку культивували впродовж 48 год за 37 °С. Одержані клітини осаджували центрифугуванням при 450 g і ресуспендували в мінімальному об'ємі середовища RPMI-1640 із додаванням фетальної сироватки (Sigma, USA) до 10 %. Визначали концентрацію клітин у суспензії за допомогою гемцитометра стандартним методом та готували суспензію клітин в концентрації $4 \cdot 10^6$ клітин/мл. По 0,8 мл цієї суспензії вносили в пробірки, додавали по 0,1 мл відомого індуктора інтерферону рідостину – двоспиральної рибонуклеїнової кислоти *Saccharomyces cerevisiae* [34] у концентрації 0,01 мг/мл і по 0,1 мл досліджуваних препаратів у концентрації 10 МНК до їх кінцевої концентрації 1 МНК за білком. У контрольному зразку проводили індукцію інтерферону тільки рідостином: 0,9 мл суспензії клітин Namalwa + 0,1 мл розчину рідостину. Індукцію інтерферону проводили за 37 °С упродовж 24 год. Після цього клітини відцентрифугували і відбирали надосадову рідину. Для визначення інтерферонних властивостей проводили 4 повтори дослідження.

Титр інтерферону в надосадовій рідині визначали за повним пригніченням цитопатичної дії 100 інфекційних доз ВВС. У стерильному мікропланшеті готували послідовні дворазові серійні розведення зразків спернатантів у ростовому середовищі від 1:2 до 1:256, титруючи їх послідовно відповідно від 2^{-1} до 2^{-8} . Із планшета з 48-годинною культурою клітин видаляли ростове середовище і вносили послідовні 2-разові розведення проб інтерферону в об'ємі 0,1 мл із планшета для розведення. Для визначення противірусної дії інтерферону використовували

по 2 лунки на кожне розведення. Після внесення досліджуваних препаратів у всі лунки, за винятком лунок із контролем клітин, вносили по 100 інфекційних доз тест-вірусу в об'ємі 0,1 мл. У контролі об'єм вирівнювали аналогічною кількістю підтримуючого середовища. Мікропланшет інкубували 24 год за 37 °С в атмосфері з 5 % CO_2 до повного прояву цитопатичної дії ВВС у лунках контролю вірусу. Облік результатів проводили під інвертованим мікроскопом після повного прояву ЦПД тест-вірусу в лунках контролю вірусу та при збереженні цілісності моношару клітин у лунках контролю клітин. Остаточний облік результатів проводили за умови повного прояву ЦПД вірусу в контрольних лунках, де клітини були інфіковані тест-вірусом у дозі 100 ЦПД₅₀. Облік результатів проводили за методом Кербера [30]. Титр інтерферону в пробі надосадової рідини дорівнював найбільшому її розведенню, що повністю нейтралізувала 100 інфекційних доз ВВС.

Для визначення протизапальних властивостей культуральних рідин лактобактерій був використаний спектрофотометричний аналіз за встановленим протоколом оцінки активності ліпоксидози, який документовано в науковій літературі [35]. Метод базується на визначенні кількісного переходу ізольованих подвійних зв'язків у молекулі лінолевої кислоти в кон'югуванні з утворенням пероксиду лінолевої кислоти. Аналітично чисті реагенти використовували виключно для досліджень і розробки. Готували буферний розчин із рН 7,4, використовуючи фосфат калію дигідрогенату (99 %, партія МКСТ2758), гідрофосфат динатрію (99 %, партія STBJ3140) та хлорид натрію (99,5 %, партія STBJ9544) (Sigma-Aldrich, Німеччина). У ферментативній реакції використовували лінолеву кислоту в концентрації 100 μM (Sigma-Aldrich, 99 %, партія SLCK9383) та ініціювали ліпоксидазою соєвого бобу за концентрації 50 U/мл (Sigma-Aldrich, партія SLCC1530). Спектрофотометричні вимірювання проводили за допомогою Shimadzu UV-1900i із подвійним каналом за довжини хвилі 234 нм. Розчини зразків тестували за трьох різних концентрацій, кожен у потрібному виконанні, з п'ятьма послідовними концентраціями субстрату для ініціації окисної реакції. Молекулярну поглибленість вимірювали кожні 0,5 с протягом 75 с за контрольної температури 22 ± 1 °С із використанням буферного розчину як контролю. Аналіз даних виконували відповідно до кінетики Міхаеліса–Ментен із використанням програмного забезпечення MatLab

для генерації графіків Ліневера–Бурка, щоб мати можливість інтерпретувати кінетичну інформацію шляхом взаємної побудови.

Вивчення проліферативної дії культуральної рідини лактобактерій за наявності факторів запалення проводили із застосуванням клітинної моделі *in vitro*. Готували суспензію клітин НЕР-2 у посівній концентрації $5 \cdot 10^5$ клітин/мл. По 1 мл суспензії клітин вносили в кожну лунку культурального 24-лункового планшета і культивували впродовж 24 год за 37 °С в атмосфері 5 % CO₂ до формування моношару. Через 24, 48 і 72 год культивування у відповідні лунки планшета вносили по 0,1 мл розчину фактора некрозу пухлин (ФНП-α) у концентрації 500 пг/мл як фактора запалення, розчину пробіотичних препаратів метаболітів лактобактерій у концентрації 10 МНК, а також ці речовини спільно. У всі лунки планшета додавали 0,9 мл підтримуючого середовища (ПС). При цьому кінцева (фізіологічна) концентрація ФНП-α становила 50 пг/мл [36], препаратів метаболітів лактобактерій – 1 МНК. Клітини інкубували впродовж 24 год за 37 °С в атмосфері CO₂ (табл. 1).

Таким чином, тривалість впливу досліджуваних речовин на клітини різного ступеня зрілості становила 24 год. Після закінчення інкубування суміші з лунок видаляли, клітини промивали фізіологічним розчином і знімали з поверхні росту розчином Версена. Одержані клітини двічі відмивали фосфатно-сольовим буферним розчином (ФСБ) (рН 7,4) і відділяли цен-

трифугуванням. Клітини фіксували, додаючи 0,7 мл охолодженого на льоду 100 % етанолу до суспензії $1 \cdot 10^6$ клітин у 0,3 мл холодного ФСБ, витримували за –20 °С протягом 30 хв у темряві, центрифугували та видаляли надосадову рідину. Додавали 250 мкл розчину РНКзи з концентрацією 500 од/мл у ФСБ з 1,12 % цитрату натрію. Суміш обережно перемішували на вортексі та інкубували за 37 °С протягом 30 хв. Додавали 250 мкл розчину пропідію йодиду в концентрації 50 мг/мл, інкубували за кімнатної температури 1 год у темряві та проводили цитофлюориметричні дослідження на Partec Pas у каналі FL3 (650 нм) для детекції флуоресценції пропідію йодиду.

ДНК-гістограми розподілу клітин за фазами циклу інтерпретували таким чином, що інтервал одиниць флуоресценції від 20 до 150 у.о. відповідав апоптозу, від 150 до 250 у.о. – стадії G₀/G₁, від 250 до 350 у.о. – стадії S та від 350 до 450 у.о. – стадії G₂/M клітинного циклу [37]. Проліферативний індекс (ПІ) за побудованими ДНК-гістограмами розраховувався за формулою

$$PI = (S + G_2/M) / (G_0/G_1 + S + G_2/M),$$

де G₀/G₁, S та G₂/M – частки клітин у відповідній фазі клітинного циклу.

Середнє значення при розрахунку кінетичних характеристик реакції при визначенні протизапального ефекту розраховувалось як середнє арифметичне, а саме сума обраних значень була поділена на кількість елементів вибірки:

Таблиця 1: Схема інкубації культури клітин НЕР-2 із препаратами метаболітів лактобактерій і ФНП-α

Час культивування		Варіант інкубації		
24 год (молоді клітини)	1,0 мл ПС (контроль)	0,9 мл ПС	0,9 мл ПС	0,8 мл ПС
		0,1 мл 10 МНК фільтрату культу- ральних рідин лактобактерій	0,1 мл 10 МНК ФНП-α	0,1 мл 10 МНК ФНП-α фільтрату культуральних рідин лактобактерій
48 год (середньозрілі клітини)	1,0 мл ПС (контроль)	0,9 мл ПС	0,9 мл ПС	0,8 мл ПС
		0,1 мл 10 фільтрату культуральних рідин лактобактерій	0,1 мл 10 МНК ФНП-α	0,1 мл 10 МНК препарату ФНП-α 0,1 мл 10 МНК фільтрату культуральних рідин лактобактерій
72 год (пізньозрілі клітини)	1,0 мл ПС (контроль)	0,9 мл ПС	0,9 мл ПС	0,8 мл ПС
		0,1 мл 10 МНК фільтрату культу- ральних рідин лактобактерій	0,1 мл 10 МНК ФНП-α	0,1 мл 10 МНК препарату ФНП-α 0,1 мл 10 МНК фільтрату культуральних рідин лактобактерій

$$M = \left(\sum_{i=1}^n x_i \right) / n,$$

де x_i – значення i -го варіанту вибірки, n – об’єм вибіркової сукупності.

Середнє квадратичне відхилення вибірки було розраховане за формулою

$$\sigma = \sqrt{\left(\sum_{i=1}^n (x_i - M)^2 \right) / (n - 1)},$$

де x_i – значення i -го варіанту вибірки, M – середнє значення, n – об’єм вибіркової сукупності.

Середнє значення та середнє квадратичне відхилення при розрахунку кінетичних характеристик реакції при визначенні протизапального ефекту розраховувались для відображення параметрів зразків між собою. Розрахунок середнього значення та середнього квадратично-

го відхилення для титрів інтерферону в культуральній рідині проводився для кожного зразка окремо.

Результати

На першому етапі досліджень було встановлено, що цитотоксичний ефект фільтратів культуральних рідин лактобактерій у культурі клітин HEp-2 був дозозалежним і подібним для обох штамів. Було визначено, що МНК культуральних рідин як *L. delbrueckii subsp. lactis* LE, так і *L. rhamnosus* LB3, стандартизованих за білком, становила відповідно 0,16 і 0,17 мг/мл (рис. 1 і 2 відповідно). Ці концентрації було обрано як робочі в подальших дослідженнях.

Результати біохімічного аналізу за інгібуванням активності ліпооксидази свідчать про відсутність прямого протизапального ефекту при

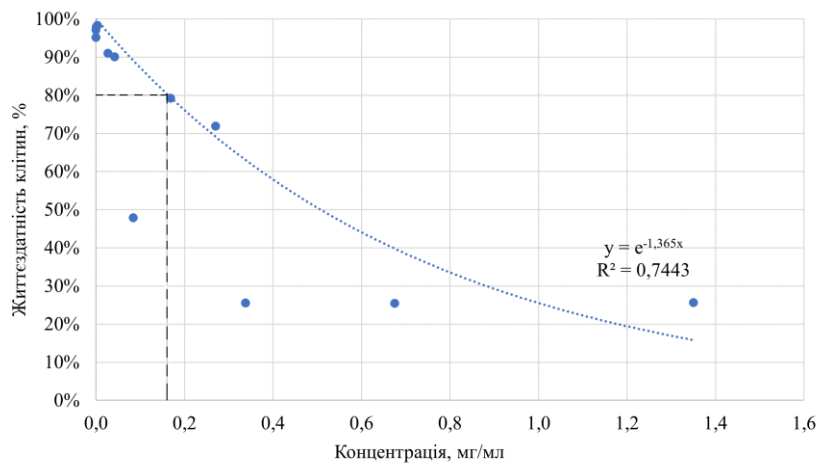


Рисунок 1: Залежність життєздатності клітин культури HEp-2 від концентрації культуральної рідини *L. delbrueckii subsp. lactis* LE, стандартизованої за білком

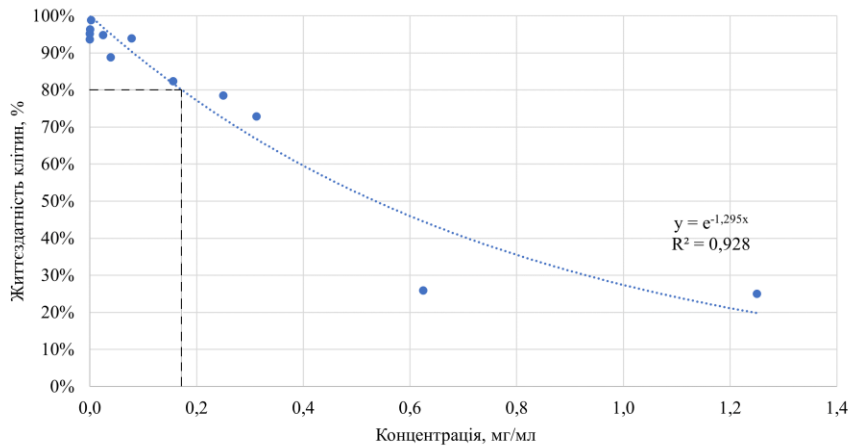


Рисунок 2: Залежність життєздатності клітин культури HEp-2 від концентрації культуральної рідини *L. rhamnosus* LB3, стандартизованої за білком

застосуванні досліджуваних зразків культуральних рідин лактобактерій. Виявлені варіації в максимальній швидкості (V_{\max}) реакції та константі Міхаеліса (K_m) (табл. 2) лежали в межах стандартної аналітичної похибки, яка, за даними літератури, становить 5,5 % [35].

Дані щодо середнього значення та середнього квадратичного відхилення розраховані та наводяться для відображення відношення параметрів кожного з трьох зразків між собою, а не як міра визначення точності. В контексті цього дослідження значення відхилень вказують на взаємне розсіювання точок перетину графіків функцій із осями координат.

За результатами вірусологічних досліджень визначено, що найбільш виражені властивості ко-індуктора інтерферону проявляє культуральна рідина штаму *L. delbrueckii subsp. lactis* LE (табл. 3). Інкубування культури Namalwa з культуральною рідиною лактобактерій без індуктора показало низький титр інтерферону, що свідчило про відсутність їх впливу на інтерферогенез.

При дослідженні апоптичних змін у культурах клітин Нер-2 різного ступеня зрілості було показано, що в контролі спостерігалася динаміка постійного зростання відносної кількості апоптичних клітин, яка досягала значного підвищення для пізньозрілих клітин. Разом із цим при старінні культури клітин Нер-2 спостерігалось збільшення клітин у фазах G_0/G_1 і G_2/M і водночас зменшення клітин у S-фазі

циклу, що вказує на гальмування проліферативних процесів у популяції зрілих клітин (рис. 3). Це свідчить про природну тенденцію в популяції клітин субстратзалежної культури Нер-2 до програмованої смерті під час культивування, обумовлену зменшенням концентрації поживних речовин, накопиченням молочної кислоти, контактним інгібуванням проліферації.

Культуральна рідина лактобактерій (LE) у нетоксичній концентрації викликає значний спостережний апоптоз на моделі епітеліальних клітин Нер-2, особливо у середньо- та пізньозрілих клітинах, що свідчить про прискорення утилізації клітин, які виконали свої біологічні функції. Разом із цим відзначається також істотне збільшення клітин у фазі S клітинного циклу, підкреслюючи його стимулюючий вплив на клітинну проліферацію (рис. 4).

Для клітин, інкубованих разом із ФНП- α , відзначалось підвищення рівня апоптозу молодих клітин, що згодом супроводжувалося зменшенням цього показника. Це може мати активний вплив ФНП- α на ініціацію апоптотичних шляхів, але з подальшим послабленням відгуку клітин із часом (рис. 5).

При інкубації клітин із фільтратом культуральної рідини лактобактерій та ФНП- α спостерігався унікальний паттерн збільшення апоптозу для молодих клітин, але зменшення для зрілих. Це може свідчити про синергетичний характер взаємодії обох компонентів, де спочатку спостерігається активна індукція апопто-

Таблиця 2: Розраховані кінетичні характеристики реакції при визначенні протизапального ефекту

Кінетична характеристика	Зразок		
	Контроль	<i>L. rhamnosus</i> LB3	<i>L. delbrueckii subsp. lactis</i> LE
V_{\max} , $\mu\text{M/s}$	0,0291	0,0286	0,0289
K_m , μM	0,044	0,041	0,046

Примітки. Середнє значення $V_{\max} = 0,0289 \mu\text{M/s}$, $K_m = 0,044 \mu\text{M}$; середнє квадратичне відхилення $V_{\max} = 0,0003 \mu\text{M/s}$, $K_m = 0,0025 \mu\text{M}$

Таблиця 3: Титри інтерферону в культуральній рідині культури клітин Namalwa після експозиції з фільтратами пробіотичних штамів лактобактерій як ко-індукторами

Досліджуваний препарат	Титр інтерферону, при якому спостерігалось повне інгібування 100 інф. доз тест-вірусу (\log_2), $n = 4$				Титр інтерферону, середнє значення	Середнє квадратичне відхилення	Збільшення титру інтерферону (\log_2) відносно контролю рідостину
	10	11	11	9			
<i>L. delbrueckii subsp. lactis</i> LE + рідостин	10	11	11	9	10,25	0,9574	4,88
<i>L. rhamnosus</i> LB3 + рідостин	6	5	5	5,5	5,375	0,4787	Немає
Контроль рідостину	5,5	5	6	5	5,375	0,4787	Немає

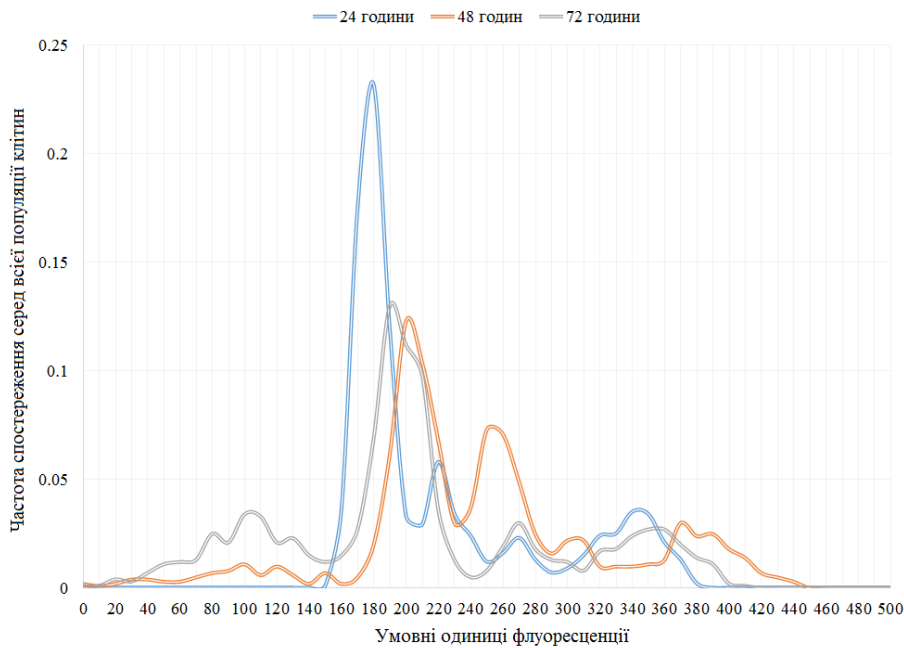


Рисунок 3: ДНК-гістограма розподілення клітин HEp-2 за фазами циклу (контроль)

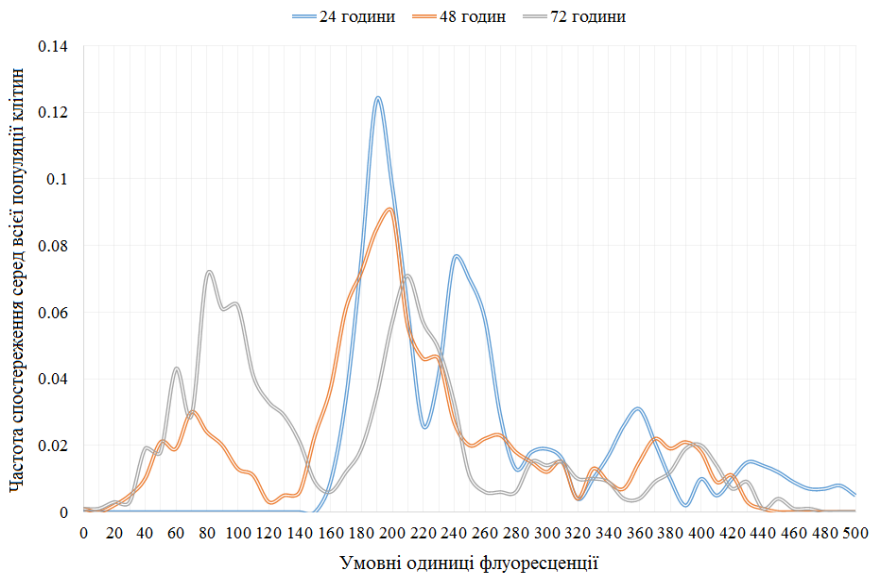


Рисунок 4: ДНК-гістограма розподілення клітин HEp-2, інкубованих із метаболітами лактобактерій

зу, а згодом можливе гальмування цього впливу. Також відзначається збільшення кількості клітин у фазі G_0/G_1 серед молодих і середньозрілих клітин, але зменшення цього показника для пізнозрілих клітин, що може свідчити про зміни в динаміці клітинного циклу (рис. 6).

Результати експерименту детально вказують на вплив різних досліджуваних біологічно активних речовин на параметри клітинного циклу в клітинах HEp-2 різного ступеня зрілості. Отже, фільтрат культуральної рідини лактобактерій (LE) та ФНП- α впливають на пара-

метри клітинного циклу клітин HEp-2 і викликають зміни в апоптозі та різних фазах клітинного циклу (табл. 4).

Було проаналізовано ПІ клітин HEp-2 при різних впливах. У контролі спостерігалось зростання ПІ для молодих і середньозрілих клітин, що свідчить про активний клітинний ріст, але для пізнозрілих клітин відзначалося зниження ПІ, що може вказувати на сповільнення проліферації клітин HEp-2 упродовж культивування. Клітини, інкубовані з фільтратом культуральної рідини лактобактерій (LE), демонстрували

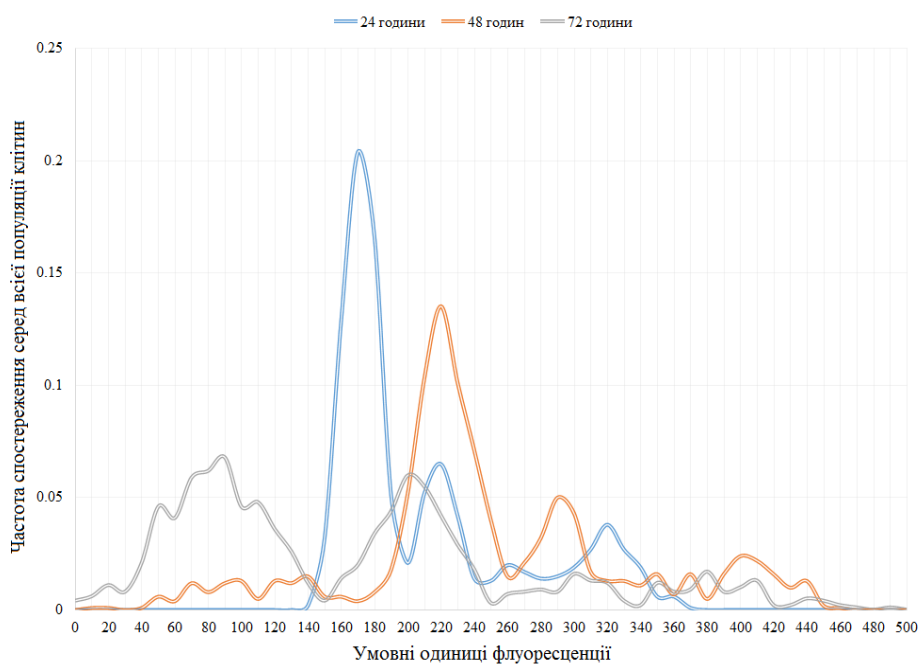


Рисунок 5: ДНК-гістограма розподілення клітин HEp-2, інкубованих із ФНП-α

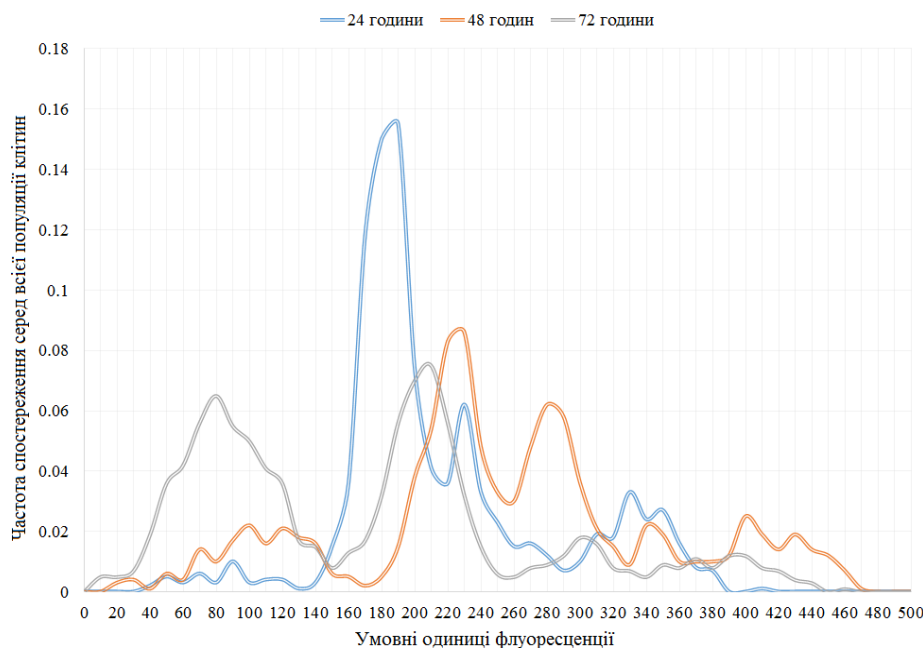


Рисунок 6: ДНК-гістограма розподілення клітин HEp-2, інкубованих із ФНП-α і метаболітами лактобактерій

зростання ПІ для молодих клітин, зменшення для середньозрілих клітин і зростання для пізньозрілих клітин, вказуючи на складний вплив LE на проліфераційну активність. Не виявлено впливу ФНП-α на ПІ клітин у застосованій у дослідженнях концентрації, оскільки при цьому, як і в контролі, спостерігалось зростання ПІ для молодих і середньозрілих клітин із подаль-

шим зниженням його для пізньозрілих клітин. Комбінований вплив ФНП-α і LE відзначався різким зростанням ПІ для середньозрілих клітин, але значним спадом для пізньозрілих, що може вказувати на взаємодію цих чинників і зміну проліфераційної активності клітин HEp-2 із плином часу (табл. 5).

Таблиця 4: Профіль клітинного циклу досліджуваних об'єктів

Об'єкт	Частка клітин у стані апоптозу			Частка клітин у фазі G_0/G_1 клітинного циклу			Частка клітин у фазі S клітинного циклу			Частка клітин у фазі G_2/M клітинного циклу		
	Час зрілості клітин, год											
	24	48	72	24	48	72	24	48	72	24	48	72
HEp-2 (контроль)	0,00	0,08	0,24	0,75	0,52	0,51	0,20	0,25	0,19	0,04	0,14	0,08
HEp-2 + <i>L. delbrueckii subsp. lactis</i> LE	0,00	0,19	0,44	0,62	0,54	0,35	0,21	0,14	0,10	0,13	0,12	0,10
HEp-2 + ФНП- α	0,03	0,11	0,50	0,76	0,54	0,32	0,20	0,23	0,09	0,01	0,13	0,08
HEp-2 + ФНП- α + <i>L. delbrueckii subsp. lactis</i> LE	0,06	0,16	0,46	0,73	0,37	0,37	0,18	0,32	0,10	0,03	0,15	0,07

Таблиця 5: Проліферативний індекс досліджуваних об'єктів

Об'єкт	Рівень зрілості клітин		
	Молоді	Середньозрілі	Пізнозрілі
HEp-2 (контроль)	0,24	0,43	0,35
HEp-2 + LE	0,35	0,33	0,36
HEp-2 + ФНП- α	0,22	0,40	0,35
HEp-2 + ФНП- α + LE	0,22	0,56	0,31

Обговорення

Виконання досліджень у застосованому дизайні мало на меті дослідити вплив фільтратів культуральних рідин лактобактерій на продукцію інтерферону клітинами Namalwa спільно з відомим індуктором інтерферону рідостином для перевірки гіпотези про наявність у них коіндукуючих властивостей. Разом із цим досліджено вплив фільтратів культуральних рідин лактобактерій на проліферативні процеси й апоптоз в епітеліальних клітинах культури HEp-2 однієї генерації, але різного ступеня зрілості як клітинної моделі епітелію кишківника за наявності прозапального цитокіна ФНП як компонента запалення при кишкових вірусних захворюваннях. Попередньо визначали параметри цитотоксичної дії культуральних рідин, стандартизованих за білком для обґрунтування вибору їхніх робочих концентрацій. Дослідження цитотоксичної дії культуральних рідин лактобактерій у культурі клітин HEp-2 показало, що вона є дозозалежною і подібною в обох штамів. Визначено МНК, яка забезпечує виживання 80 % оброблених клітин. Встановлено, що МНК культуральних рідин як *L. delbrueckii subsp. lactis* LE, так і *L. rhamnosus* LB3, становить 0,16 і 0,17 мг/мл відповідно, тобто фільтрати культуральних рідин лактобактерій мають низьку токсичність для культур клітин і застосовані в нетоксичних

концентраціях при проведенні основних досліджень. Саме в цих концентраціях культуральні рідини використовувались для дослідження властивостей як коіндукторів інтерферогенезу разом із рідостином – дволанцюговою дріжджовою РНК, яка є стандартним індуктором інтерферонів I типу [38]. Обґрунтованість проведення таких досліджень обумовлена тим, що останнім часом кишківник розглядають як суттєву складову імунної системи організму. Кишкова імунна система є найбільшим відділом імунної системи, оскільки її поверхня, знаходячись усередині тіла, є набагато більшою за поверхню шкіри та слизових оболонок і постійно зазнає впливу величезної кількості подразників, включаючи бактерії, віруси й антигени, отримані з їжі тощо. Вважається, що певна кількість імунних клітин у різних типах лімфоїдних структур підтримує гомеостаз і функції імунної системи кишківника. Ці кишково-специфічні лімфоїдні структури, розташовані в пристінковому епітелії, включають Пейєрові пляшки як найбільш структуровані лімфоїдні органи в кишківнику, а також ізольовані лімфоїдні фолікули, лімфоїдні клітини вродженого імунитету, що продукують інтерферони, тощо [38]. В кишківнику інтерферони першого типу (ІФН-1) продукуються у відповідь на мікробні продукти принаймні частково, мононуклеарними фагоцитами і стромальними клітинами. ІФН-1 сприяє

роботі кишкового бар'єра, стимулює продукцію IgA проти коменсальних бактерій і регулює функцію кишкових макрофагів, може бути необхідним для підтримки кишкового імунного гомеостазу шляхом посилення вроджених реакцій на бактерії та віруси, кишкових бар'єрних функцій і створення факторів, які запобігають кишковому дисбіозу [39, 40].

У дослідженнях [39–41] показано, що певні коменсальні бактерії, зокрема лактобактерії, здатні індукувати продукцію ІФН-1 кишковими моноцитарними клітинами, індукувати диференціацію місцевих $CD4^+$ Т-лімфоцитів, дозрівання дендритних клітин. Механізм інтерферогенної дії лактобактерій сьогодні досить добре з'ясований, описаний у науковій літературі та здійснюється через активацію сигнальних шляхів системи інтерферогенезу [40, 41], проте питання про наявність ко-індукуючих властивостей у пробіотиків раніше не обговорювалося.

З метою вивчення ко-індукуючих властивостей фільтратів культуральних рідин лактобактерій *L. delbrueckii subsp. lactis* LE використовували культуру клітин Namalwa, яка відома як продуцент інтерферону І типу (ІФН-1) у відповідь на синтетичні або природні індуктори, зокрема віруси, дволанцюгову РНК, синтетичні полінуклеотиди, рідостин [39].

За результатами проведених вірусологічних досліджень було визначено, що фільтрат культуральної рідини лактобактерій штаму *L. delbrueckii subsp. lactis* LE проявляє найбільш виражені властивості саме ко-індуктора інтерферогенезу, який може підсилювати інтерферогенну дію його індукторів: вірусів, бактерій, фармацевтичних препаратів тощо. Встановлено, що при застосуванні культуральної рідини титр ІФН-1, який продукується клітинами Namalwa, збільшується на $4,88 \log_2$ порівняно з контролем рідостину, що є позитивним результатом. Одержані дані підтверджують гіпотезу про те, що фільтрати культуральних рідин лактобактерій є нетоксичними природними ко-індукторами інтерферону, підсилюючи дію його індукторів, і можуть позитивно впливати на формування місцевого імунітету, зокрема в кишківнику. Слід зазначити, що природні рівні ІФН-1 у всіх тканинах, включаючи кишківник, зазвичай дуже низькі [42]. Однак вони мають серйозний вплив на гомеостатичний баланс у багатьох клітинах і тканинах. Саме ко-індукуючі властивості пробіотичних препаратів здатні підсилювати дію слабких інтерферогенів, спри-

ючи формуванню неспецифічного, а потім і специфічного, імунітету у відповідь на чужорідні антигени, зокрема й вірусної природи.

Зразок культуральної рідини лактобактерій штаму *L. delbrueckii subsp. lactis* LE, що був найбільш активним ко-індуктором інтерферогенезу, використаний нами при дослідженні впливу на популяцію епітеліальних клітин культури НЕР-2 у контрольованих умовах – на клітинах однієї генерації, але різного ступеня зрілості.

Наші дослідження показали, що в інтактній проліферуючій культурі клітин НЕР-2 у процесі старіння спостерігалось зростання відносної кількості апоптичних клітин у всі три часових зрізи (для молодих – 24 год, середньозрілих – 48 год і зрілих – 72 год) клітинних популяцій, найбільша відносна кількість апоптичних клітин спостерігалась у пізньозрілих культурах. Разом із цим при старінні культури поступово збільшувалась відносна кількість клітин у фазах G_0/G_1 і G_2/M і водночас зменшувалась у S-фазі циклу, що вказує на гальмування проліферативних процесів у популяції пізньозрілих клітин. У цій же модельній системі культуральна рідина лактобактерій (*L. delbrueckii subsp. lactis* LE) у нетоксичній концентрації викликала значні апоптичні зміни, особливо в середньо- та пізньозрілих клітинах, прискорюючи утилізацію клітин, що виконали свої біологічні функції. Разом із цим відзначається також істотне збільшення в S-фазі циклу відносної кількості клітин, що мають значний проліферативний потенціал для оновлення клітинної популяції. Таким чином, фільтрат культуральної рідини лактобактерій може сприяти “омолодженню” клітин у кишківнику за рахунок прискорення утилізації зрілих і старих клітин шляхом апоптозу.

Відомо, що прозапальний цитокін ФНП- α відіграє вирішальну роль у патогенезі запальних захворювань кишківника, інфекційних захворювань, загоєння кишкових ран, утворення пухлин, виступаючи регулятором балансу мітозу й апоптозу [43]. Відповідний баланс між клітинною проліферацією в основі крипт і клітинною загибеллю на верхівках ворсинок кишкового епітелію, прискорене руйнування якого відбувається при гострих кишкових вірусних інфекціях, повинен бути збережений і є необхідним для підтримки кишкового гомеостазу. ФНП- α виробляється багатьма різними типами клітин в організмі людини, однак основними продуцентами є клітини моноцитарної лінії, наприклад макрофаги, зокрема кишкові макрофаги [42]. Після вивільнення з макрофагів,

які становлять першу лінію неспецифічного імунного захисту, ФНП- α активує інші імунні клітини та опосередковує виробництво додаткових прозапальних цитокінів під час запалення, тому ФНП- α переважно описується як прозапальний цитокін. Крім бактерій, патологічні запальні процеси в кишківнику викликають також віруси. Наприклад, відомо, що ротавірус є найпоширенішим збудником вірусного гастроентериту в усьому світі, особливо у дітей молодше 5 років [44]. Ротавірусна інфекція була пов'язана з підвищенням рівня ФНП- α *in vitro*, а діти, хворі на ротавірусну діарею, мали значно підвищений рівень ФНП- α у сироватці крові порівняно зі здоровими особами в контролі [45, 46]. При застосуванні ФНП- α як компонента моделі кишкової вірусної інфекції в культурі клітин було показано, що ФНП- α в інфікованих ротавірусом епітеліальних клітинах кишківника *in vitro* значно знижував загальні рівні вірусної РНК. Відповідно ФНП- α чинив потужну антиротавірусну дію. Водночас вона не залежала від продукції інтерферону I типу [45].

У проведених нами дослідженнях було показано, що ФНП- α як відомий прозапальний цитокін викликав підвищення рівня апоптозу молодих клітин культури Нер-2, що згодом супроводжувалось зменшенням цього показника. Це може свідчити про активний вплив ФНП- α на ініціацію апоптотичних шляхів, але з подальшим послабленням відгуку клітин із часом. Проте ФНП- α у застосованій концентрації суттєво не впливав на ПІ культури, зберігаючи тенденції змін цього показника при старінні клітин, як у контролі. Якщо розглядати вплив ФНП- α на популяцію клітин культури Нер-2 як модель запалення при ротавірусній інфекції, то слід вважати, що цей цитокін стабілізує клітинну популяцію, сприяє накопиченню ранньозрілих і зрілих епітеліальних клітин. Саме зрілі епітеліоцити тонкого кишківника є найбільш чутливими до ротавірусів у патогенезі ротавірусної інфекції, а ФНП- α , за даними літератури [45], чинить виражену антиротавірусну дію. Біохімічним методом за інгібуванням ліпооксигенази була показана відсутність прямого протизапального ефекту при застосуванні досліджуваних зразків фільтратів культуральних рідин лактобактерій.

При інкубації клітин із ФНП- α та культуральної рідини лактобактерій *L. delbrueckii subsp. lactis* LE спостерігався унікальний паттерн збільшення апоптозу для молодих, але зменшення для зрілих клітин. Це може свідчити про си-

нергетичний характер взаємодії обох компонентів, де спочатку спостерігається активна індукція апоптозу, а згодом можливе гальмування цього впливу. Також відзначається збільшення кількості клітин у фазі G_0/G_1 серед молодих і середньозрілих клітин, але зменшенням цього показника для пізньозрілих клітин, що може свідчити про зміни в динаміці клітинного циклу. ФНП- α у поєднанні з *L. delbrueckii subsp. lactis* LE пришвидшують утилізацію молодих клітин, утворення яких стимулюється лактобактеріями, та захищають зрілі клітини, але цей процес триває недовго.

Таким чином, за результатами вірусологічних досліджень визначено, що найбільш виражені властивості ко-індуктора інтерферону проявляв фільтрат культуральної рідини лактобактерій штаму *L. delbrueckii subsp. lactis* LE. Він збільшував титр ІФН-1, який продукується клітинами Namalwa, на $4,88 \log_2$ порівняно з контролем рідостину, що є позитивним результатом. Було проаналізовано ПІ клітин культури Нер-2 при різних впливах. У контролі спостерігалось зростання ПІ у молодих і середньозрілих клітин у фазі логарифмічного росту, що свідчить про їх активну проліферацію, але для пізньозрілих клітин відзначалося зниження ПІ, що вказує на закономірне збільшення апоптозу і сповільнення проліферативних процесів, пов'язане з переходом культури у фазу стабілізації. Клітини, інкубовані з фільтратом культуральної рідини лактобактерій (LE), демонстрували зростання ПІ для молодих клітин, зменшення для середньозрілих клітин і зростання для пізньозрілих клітин, вказуючи на активацію проліферативних процесів у культурі клітин *in vitro*. Не виявлено впливу ФНП- α на ПІ клітин у застосованій у дослідженнях концентрації, оскільки при цьому, як і в контролі, спостерігалось зростання ПІ для молодих і середньозрілих клітин із подальшим зниженням його для пізньозрілих клітин. Комбінований вплив ФНП- α і фільтрату культуральної рідини лактобактерій LE відзначався стимуляцією ПІ для середньозрілих клітин і значним пригніченням ПІ пізньозрілих клітин, що може опосередковано вказувати на їх прискорену елімінацію за наявності ФНП- α . Із застосуванням біохімічних методів показано відсутність прямого протизапального ефекту в зразків фільтратів культуральних рідин лактобактерій. Виявлені варіації в максимальній швидкості реакції та константі Міхаеліса були в межах стандартної аналітичної похибки 5,5 %.

Висновки

Пробіотичні препарати на основі лактобактерій, зокрема фільтрати культуральних рідин лактобактерій, не мають протизапальних властивостей, але виступають ко-індукторами інтерферогенезу у відповідь на його стимуляцію стандартним індуктором рідостіном. У той же час за наявності прозапального цитокіну ФНП- α , що продукується у відповідь на кишкову вірусну інфекцію, вони стимулюють проліферацію молодих і середньозрілих епітеліальних клітин та сприяють елімінації пізньозрілих клітин. І якщо розглядати таку модельну систему *in vitro*, що гіпотетично може мати місце при запальних процесах, стимульованих ФНП- α у кишківнику при вірусних гастроентеритах, синергічна дія фільтратів культураль-

них рідин лактобактерій і фактора запалення сприятиме прискореній елімінації з кишківника пізньозрілих і уражених клітин та стимулюватиме до проліферації молоді й середньозрілі клітини на їх заміну, що сприятиме регенерації епітелію кишківника та прискорить одужання. Разом із тим ко-індукуючі інтерферон властивості пробіотичних штамів лактобактерій можуть сприяти підсиленню інтерферогенних властивостей вірусів-збудників гастроентеритів, які є слабкими індукторами інтерферонів, і в кінцевому результаті стимулюватимуть формування специфічного імунітету при цих захворюваннях.

Розкриття інтересів

Конфлікт інтересів відсутній.

References

- [1] Villena J, Shimosato T, Vizoso-Pinto MG, Kitazawa H. Editorial: nutrition, immunity and viral infections. *Front Nutr*. 2020;7:125. DOI: 10.3389/fnut.2020.00125
- [2] Lehtoranta L, Latvala S, Lehtinen MJ. Role of probiotics in stimulating the immune system in viral respiratory tract infections: a narrative review. *Nutrients*. 2020;12(10):3163. DOI: 10.3390/nu12103163
- [3] Betthäuser BA, Bach-Mortensen AM, Engzell P. A systematic review and meta-analysis of the evidence on learning during the COVID-19 pandemic. *Nat Hum Behav*. 2023;7(3):375-85. DOI: 10.1038/s41562-022-01506-4
- [4] Soloviov SO, Todosiichuk TS, Kovaliuk OV, Filippelli GM, Trokhymenko OP, Dziublyk IV, et al. Rotaviruses and noroviruses as etiological agents of acute intestinal diseases of ukrainian children. *Int J Environ Res Public Health*. 2022;19(8):4660. DOI: 10.3390/ijerph19084660
- [5] Dennehy PH. Viral gastroenteritis in children. *Pediatr Infect Dis J*. 2011;30(1):63-4. DOI: 10.1097/inf.0b013e3182059102
- [6] Bányai K, Estes MK, Martella V, Parashar UD. Viral gastroenteritis. *Lancet*. 2018;392(10142):175-86. DOI: 10.1016/s0140-6736(18)31128-0
- [7] Kanauchi O, Andoh A, AbuBakar S, Yamamoto N. Probiotics and paraprobiotics in viral infection: clinical application and effects on the innate and acquired immune systems. *Curr Pharm Des*. 2018;24(6):710-7. DOI: 10.2174/1381612824666180116163411
- [8] Lopez-Santamarina A, Miranda JM, Mondragon AD, Lamas A, Cardelle-Cobas A, Franco CM, et al. Potential use of marine seaweeds as prebiotics: a review. *Molecules*. 2020;25(4):1004. DOI: 10.3390/molecules25041004
- [9] Colbère-Garapin F, Martin-Latil S, Blondel B, Mousson L, Pelletier I, Autret A, et al. Prevention and treatment of enteric viral infections: possible benefits of probiotic bacteria. *Microbes Infect*. 2007;9(14-15):1623-31. DOI: 10.1016/j.micinf.2007.09.016
- [10] Libertucci J, Young VB. The role of the microbiota in infectious diseases. *Nat Microbiol*. 2018;4(1):35-45. DOI: 10.1038/s41564-018-0278-4
- [11] Probiotics in food: health and nutritional properties and guidelines for evaluation. Rome: World Health Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2006. 56 p. Available at: <https://www.fao.org/3/a0512e/a0512e.pdf>
- [12] Ishizuka T, Kanmani P, Kobayashi H, Miyazaki A, Soma J, Suda Y, et al. Immunobiotic bifidobacteria strains modulate rotavirus immune response in porcine intestinal epitheliocytes via pattern recognition receptor signaling. *Plos One*. 2016;11(3):e0152416. DOI: 10.1371/journal.pone.0152416
- [13] Maragkoudakis PA, Chingwaru W, Gradisnik L, Tsakalidou E, Cencic A. Lactic acid bacteria efficiently protect human and animal intestinal epithelial and immune cells from enteric virus infection. *Int J Food Microbiol*. 2010;141 Suppl 1:91-7. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.12.024
- [14] Cristofori F, Dargenio VN, Dargenio C, Miniello VL, Barone M, Francavilla R. Anti-Inflammatory and immunomodulatory effects of probiotics in gut inflammation: a door to the body. *Front Immunol*. 2021;12:578386. DOI: 10.3389/fimmu.2021.578386
- [15] Grandy G, Medina M, Soria R, Terán CG, Araya M. Probiotics in the treatment of acute rotavirus diarrhoea. A randomized, double-blind, controlled trial using two different probiotic preparations in Bolivian children. *BMC Infect Dis*. 2010;10(1):1-7. DOI: 10.1186/1471-2334-10-253

- [16] Kotzampassi K, Giamarellos-Bourboulis EJ. Probiotics for infectious diseases: more drugs, less dietary supplementation. *Int J Antimicrob Agents*. 2012;40(4):288-96. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2012.06.006
- [17] Lee DK, Park JE, Kim MJ, Seo JG, Lee JH, Ha NJ. Probiotic bacteria, *B. longum* and *L. acidophilus* inhibit infection by rotavirus in vitro and decrease the duration of diarrhea in pediatric patients. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2015;39(2):237-44. DOI: 10.1016/j.clinre.2014.09.006
- [18] Olaya Galán NN, Ulloa Rubiano JC, Velez Reyes FA, Fernandez Duarte KP, Salas Cárdenas SP, Gutierrez Fernandez MF. In vitro antiviral activity of *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium adolescentis* against rotavirus infection monitored by NSP 4 protein production. *J Appl Microbiol*. 2016;120(4):1041-51. DOI: 10.1111/jam.13069
- [19] In YW, Kim JJ, Kim HJ, Oh SW. Antimicrobial activities of acetic acid, citric acid and lactic acid against shigella species. *J Food Saf*. 2013;33(1):79-85. DOI: 10.1111/jfs.12025
- [20] Boskey ER, Telsch KM, Whaley KJ, Moench TR, Cone RA. Acid production by vaginal flora in vitro is consistent with the rate and extent of vaginal acidification. *Infect Immun*. 1999;67(10):5170-5. DOI: 10.1128/iai.67.10.5170-5175.1999
- [21] Kwon HJ, Kim HH, Ryu YB, Kim JH, Jeong HJ, Lee SW, et al. In vitro anti-rotavirus activity of polyphenol compounds isolated from the roots of *Glycyrrhiza uralensis*. *Bioorganic Amp Med Chem*. 2010;18(21):7668-74. DOI: 10.1016/j.bmc.2010.07.073
- [22] Clark KJ, Grant PG, Sarr AB, Belakere JR, Swaggerty CL, Phillips TD, et al. An in vitro study of theaflavins extracted from black tea to neutralize bovine rotavirus and bovine coronavirus infections. *Vet Microbiol*. 1998;63(2-4):147-57. DOI: 10.1016/s0378-1135(98)00242-9
- [23] van der Strate BW, Beljaars L, Molema G, Harmsen MC, Meijer DK. Antiviral activities of lactoferrin. *Antivir Res*. 2001;52(3):225-39. DOI: 10.1016/s0166-3542(01)00195-4
- [24] Superti F, Ammendolia MG, Valenti P, Seganti L. Antiroviral activity of milk proteins: lactoferrin prevents rotavirus infection in the enterocyte-like cell line HT-29. *Med Microbiol Immunol*. 1997;186(2-3):83-91. DOI: 10.1007/s004300050049
- [25] Inagaki M, Muranishi H, Yamada K, Kakehi K, Uchida K, Suzuki T, et al. Bovine κ -casein inhibits human rotavirus (HRV) infection via direct binding of glycans to HRV. *J Dairy Sci*. 2014;97(5):2653-61. DOI: 10.3168/jds.2013-7792
- [26] Qureshi H, Saeed S, Ahmed S, Rasool SA. Coliphage hsa as a model for antiviral studies/spectrum by some indigenous bacteriocin like inhibitory substances (BLIS). *Pak J Pharm Sci*. 2006;19(3):182-5.
- [27] Saeed S, Rasool SA, Ahmad S, Zaidi SZ, Rehmani S. Antiviral activity of staphylococcin 188: A purified bacteriocin like inhibitory substance isolated from staphylococcus aureus AB188. *Res J Microbiol*. 2007;2(11):796-806. DOI: 10.3923/jm.2007.796.806
- [28] Todorov SD, Wachsmann M, Tomé E, Dousset X, Destro MT, Dicks LM, et al. Characterisation of an antiviral pediocin-like bacteriocin produced by *Enterococcus faecium*. *Food Microbiol*. 2010;27(7):869-79. DOI: 10.1016/j.fm.2010.05.001
- [29] Brown AC, Valiere A. Probiotics and medical nutrition therapy. *Nutr Clin Care*. 2004;7(2):56.
- [30] Osunsanmi FO, Yotwana L, Mosa RA, Liu AL, Gao L, Du GH, et al. In vitro antiviral, antioxidant and in vivo antipyretic activity of three South Africa medicinal plants crude extracts. *Boletin Latinoam Del Caribe Plantas Medicinales Aromat*. 2022;21(5):620-30. DOI: 10.37360/blacpma.22.21.5.38
- [31] Fryer HJ, Davis GE, Manthorpe M, Varon S. Lowry protein assay using an automatic microtiter plate spectrophotometer. *Anal Biochem*. 1986;153(2):262-6. DOI: 10.1016/0003-2697(86)90090-4
- [32] Cell Proliferation Kit I (MTT) [Internet]. ROCHE – eLabDoc [cited 2024 Jan 9]. Available from: <https://elabdoc-prod.roche.com/LifeScience/Document/319a443d-d6ed-e311-98a1-00215a9b0ba8>
- [33] Terefe EM, Okalebo FA, Derese S, Muriuki J, Batiha GE. In vitro cytotoxicity and anti-hiv activity of crude extracts of croton macrostachyus, croton megalocarpus and croton dichogamus. *J Exp Pharmacol*. 2021;13:971-9. DOI: 10.2147/jep.s335104
- [34] Bulychev LE, Goncharova EP, Ryzhikov AB, Masycheva VI, P'iankova OG, Pliasunov IV, et al. Dynamics of interferon induction in albino mice by interferon inducer ridostin administered by various routes. *Antibiot i Khimioterapiia*. 1998;43(3):20-3.
- [35] Junior N. Lipoyxygenase activity determination [Internet]. protocols.io; 2020 [cited 2024 Jan 9]. Available from: <https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bhqmj5u6>
- [36] Kim Y, Kim DM, Kim JY. Ginger extract suppresses inflammatory response and maintains barrier function in human colonic epithelial caco-2 cells exposed to inflammatory mediators. *J Food Sci*. 2017;82(5):1264-70. DOI: 10.1111/1750-3841.13695
- [37] Arjmand B, Goodarzi P, Aghayan HR, Payab M, Rahim F, Alavi-Moghadam S, et al. Co-transplantation of human fetal mesenchymal and hematopoietic stem cells in type 1 diabetic mice model. *Front Endocrinol*. 2019;10:761. DOI: 10.3389/fendo.2019.00761
- [38] Geiss G, Jin G, Guo J, Bumgarner R, Katze MG, Sen GC. A comprehensive view of regulation of gene expression by double-stranded rna-mediated cell signaling. *J Biol Chem*. 2001;276(32):30178-82. DOI: 10.1074/jbc.c100137200
- [39] Lazar A, Reuveny S, Traub A, Minai M, Grosfeld H, Feinstein S, et al. Factors affecting the large scale production of human lymphoblastoid interferon. *Dev Biol Stand*. 1981;50:167-71.
- [40] Cho H, Kelsall BL. The role of type I interferons in intestinal infection, homeostasis, and inflammation. *Immunol Rev*. 2014;260(1):145-67. DOI: 10.1111/imr.12195

- [41] Wells JM. Immunomodulatory mechanisms of lactobacilli. *Microb Cell Fact.* 2011;10(Suppl 1):17. DOI: 10.1186/1475-2859-10-s1-s17
- [42] Kole A, He J, Rivollier A, Silveira DD, Kitamura K, Maloy KJ, et al. Type I ifns regulate effector and regulatory T cell accumulation and anti-inflammatory cytokine production during T cell-mediated colitis. *J Immunol.* 2013;191(5):2771-9. DOI: 10.4049/jimmunol.1301093
- [43] Parameswaran N, Patial S. Tumor necrosis factor- α signaling in macrophages. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2010;20(2):87-103. DOI: 10.1615/CritRevEukarGeneExpr.v20.i2.10
- [44] Tate JE, Burton AH, Boschi-Pinto C, Steele AD, Duque J, Parashar UD. 2008 estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2012;12(2):136-41. DOI: 10.1016/s1473-3099(11)70253-5
- [45] Hakim MS, Ding S, Chen S, Yin Y, Su J, van der Woude CJ, et al. TNF- α exerts potent anti-rotavirus effects via the activation of classical NF- κ B pathway. *Virus Res.* 2018;253:28-37. DOI: 10.1016/j.virusres.2018.05.022
- [46] Yu TH, Tsai CN, Lai MW, Chen CC, Chao HC, Lin CW, et al. Antigenemia and cytokine expression in rotavirus gastroenteritis in children. *J Microbiol Immunol Infect.* 2012;45(4):265-70. DOI: 10.1016/j.jmii.2011.11.013

S. Soloviov^{1,2}, O. Trokhimenko^{1,2}, V. Polishchuk², V. Pits², V. Vasylenko³, Y. Vasylenko³, I. Hol³, A. Symchuk⁴, O. Kostiu⁵

¹Shupyk National Healthcare University of Ukraine, Kyiv, Ukraine

²Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute, Kyiv, Ukraine

³Vytautas Magnus University, Kaunas, Lithuania

⁴Karol Jonscher's Clinical Hospital of Poznan University of Medical Sciences, Poznan, Poland

⁵Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine

IN VITRO MODELING OF THE EFFECT OF *LACTOBACILLUS* METABOLITES ON THE SYSTEMIC RESPONSE OF THE BODY IN INTESTINAL VIRAL INFECTION

Background. Viral infectious diseases remain a significant cause of morbidity and mortality worldwide. The lack of effective antiviral drugs for the treatment of viral gastroenteritis emphasizes the relevance of various forms of combination therapy, including a balanced diet and the use of probiotics.

Objective. To verify *in vitro* the hypothesis about the effect of metabolites from probiotic strains of lactobacilli on the systemic response of the body in intestinal viral infection.

Methods. The objects of study were filtrates of culture fluids from probiotic lactobacillus strains *L. delbrueckii subsp. lactis* LE and *L. rhamnosus* LB3. HEP-2 and Namalwa cell cultures and vesicular stomatitis test virus were used as biological test objects. The study employed spectrophotometric and cytofluorometric analysis.

Results. The absence of a direct anti-inflammatory effect in the samples of lactobacillus culture fluid filtrates was revealed. It was found that the culture fluid filtrate of the lactobacillus strain *L. delbrueckii subsp. lactis* LE exhibited the most pronounced properties of an interferon coinducer. The proliferative index (PI) of HEP-2 cells was analyzed under different effects. Cells incubated with lactobacillus culture fluid filtrate (LE) showed an increase in PI for young cells, a decrease for mid-mature cells, and an increase for late-mature cells. The combined effect of TNF- α and lactobacillus LE culture filtrate was characterized by stimulation of PI for medium-mature cells and significant inhibition of PI of late-mature cells.

Conclusions. The synergistic effect of lactobacillus culture filtrates and inflammatory factors will contribute to the accelerated elimination of late-mature and affected cells from the intestine and stimulate the proliferation of young and medium-mature cells to replace them, thereby promoting the regeneration of the intestinal epithelium and accelerate recovery. At the same time, probiotic strains of lactobacilli can enhance the interferonogenic properties of gastroenteritis viruses, and ultimately stimulating the formation of specific immunity in these diseases.

Keywords: probiotic; lactobacillus; viral gastroenteritis; interferon; inflammatory factor; proliferation.