# ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ДЕЯКИХ МЕХАНІЗМІВ ПРОТИЗАПАЛЬНОЇ ДІЇ ПРЕПАРАТІВ МЕТАБОЛІТІВ ЛАКТОБАКТЕРІЙ

**Піць В.В.[1], Соловйов С.О.[1,2], Трохименко О.П. [1,2]**
**[1]КПІ ім. Ігоря Сікорського, vadimpitsofficial@gmail.com**
**[2] Національний університет охорони здоров'я України імені П.Л. Шупика**

**Вступ.** Нормальна мікрофлора кишечника людини виконує ряд найважливіших функцій [1], однією з яких є створення колонізаційної резистентності, свого роду бар'єру на слизовій оболонці травного тракту. При виникненні і розвитку дісбіотічних порушень в кишечнику відбувається зниження колонізаційної резистентності, що приводить до підвищення сприйнятливості до інфекційних захворювань. Провідним підходом в корекції цих порушень є вживання препаратів, виготовлених на основі пробіотичних штамів лактобактерій – характерних представників нормальної мікрофлори кишечника, які володіють здатністю позитивно впливати на організм людини, відновлюючи і стабілізуючи збалансований склад мікробіоценозу шлунково-кишкового тракту. Останнім часом з'явилось досить підстав розглядати кишечник як частину імунної системи [2], оскільки значна частина лімфоїдної тканини зосереджена в кишечнику. Після потрапляння чужорідних антигенів в шлунково-кишковий тракт імунокомпетентні клітини відповідають викидом прозапальних цитокінів, таких як фактор некрозу пухлини (ФНП) [3], що здійснюють подальшу регуляцію імунної відповіді. Саме тому актуальним є дослідження зміни клітинного циклу під впливом препаратів лактобактерій в умовах викиду ФНП в клітинній моделі in vitro. Метою дослідження було з’ясування принципового характеру впливу продуктів метаболізму пробіотичних штамів лактобактерій на параметри клітинного циклу клітин в присутності фактору запалення.

**Матеріали і методи**. Об’єктом дослідження були екзогенні метаболіти (культуральні рідини) штамів лактобактерій *L. delbrueckii subsp. lactis LE* (далі - LE), з музею мікробіологічних культур кафедри промислової біотехнології та біофармації КПІ імені Ігоря Сікорського. Для створення клітинної моделі in vitro було використано поверхнево-залежну клітинну лінію карциноми гортані людини Нер-2. Для моделювання запальної дії використовували фактор некрозу пухлин ФНП. Для вивчення параметрів клітинного циклу використовували реагенти пропідій йодид, акридиновий помаранчевий та Анексин V, які входять до складу стандартних наборів для вивчення клітинного циклу.

Вивчення цитотоксичної дії препаратів метаболітів лактобактерій проводили в перерахунку на концентрацію білку в культуральній рідині кожного зразка. Для дослідження впливу пробіотичних препаратів метаболітів лактобактерій на параметри клітинного циклу в моделі in vitro готували суспензію клітин Нер-2 в посівній концентрації $5 \cdot 10^5$ клітин/мл. По 1 мл суспензії клітин вносили в кожну лунку культурального 24-лункового планшету і культивували впродовж 24 годин при 37°С в атмосфері 5% $CO_2$ до формування

моношару. Через 24-72 години культивування вносили по 0,1 мл розчину ФНП (500 нг/мл), розчин пробіотичних препаратів метаболітів лактобактерій та їх комбінації. Клітини інкубували впродовж 24 годин при 37°С в атмосфері $CO_2$. Оцінку параметрів клітинного циклу проводили методом проточної цитофлюориметрії на цитофлюориметрі Partec Pas.

**Результати та обговорення.** В результаті дослідження було показано, що при дії ФНП, препарату метаболітів лактобактерій та цих речовин разом на молоду культуру клітин, відносна кількість живих клітин була значно вищою за контроль, що свідчить про стимуляцію життєздатності молодої культури. За тих самих умов впливу, всі досліджувані препарати не впливали на життєздатність зрілої популяції епітеліальних клітин та пригнічували життєздатність старіючих клітин.

При інкубуванні культури одночасно з ФНП та препаратами метаболітами лактобактерій, кількість клітин в G1-фазі як в молодій культурі, так і в зрілій та старіючій практично співпадала з контролем. При спільній дії ФНП та препаратів метаболітів лактобактерій на клітини культури, не залежно від ступеня їх зрілості, відносна кількість клітин у цій фазі циклу не відрізняється від аналогічних значень в контролі (табл. 1).

**Таблиця 1. Зміна параметрів циклу культури клітин Hep-2 протягом часу під дією різних чинників.**

| Препарат / Параметр | LE | | | ФНП | | | LE(к)+ФНП | | | Контроль | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 24 год. | 48 год. | 72 год. | 24 год. | 48 год. | 72 год. | 24 год. | 48 год. | 72 год. | 24 год. | 48 год. | 72 год. |
| Кількість клітин в клітинному циклі, % | 84.64 | 70.88 | 48.18 | 85.94 | 83.16 | 43.14 | 87.1 | 78.12 | 45.94 | 88 | 82.3 | 66.18 |
| G1-фаза, % | 78.59 | 66.47 | 64.26 | 77.84 | 80 | 65.53 | 76.6 | 74.84 | 67.64 | 75.34 | 73.68 | 63.6 |
| s-фаза, % | 7.65 | 15.44 | 15.52 | 6.94 | 5.3 | 17.42 | 5.5 | 8.2 | 15.06 | 6.24 | 8.19 | 14.1 |
| G2/M-фаза, % | 13.76 | 18.09 | 20.22 | 15.22 | 14.7 | 17.05 | 17.9 | 16.96 | 17.3 | 18.42 | 18.13 | 22.3 |
| Цитокінетичний параметр $\frac{G1}{s+G2/M}$ | 3.671 | 1.982 | 1.749 | 3.513 | 4.0 | 1.901 | 3.27 | 2.974 | 2.09 | 3.055 | 2.8 | 1.747 |
| Живі клітини, % | 73.30 | 60.34 | 35.53 | 65.37 | 67.28 | 34.08 | 68.68 | 57.82 | 34.52 | 57.3 | 60.40 | 57.2 |

Оскільки збільшення відносної кількості клітин в G1-фазі циклу характеризує зниження проліферативної активності культури, блокування переходу клітин у фазу синтезу ДНК, одержані результати свідчать про відновлення проліферативної активності всієї популяції клітин під впливом препаратів метаболітів лактобактерій і внаслідок цього про зменшення негативного впливу ендотоксинів. Проведені дослідження можна розглядати як моделювання впливу ендотоксинів і запальних процесів на епітелій кишечника.

З огляду на зазначене вище можна передбачити, що під впливом ФНП, тобто при запаленні, ендотоксикозі тощо, шар епітеліальних клітин кишечнику стає більш уразливим до дії чужорідних агентів. Можна передбачити, що під впливом препарату метаболітів лактобактерій кількість чутливих клітин знижується і разом з тим, що дуже важливо, нормалізується проліферативна активність всієї клітинної популяції кишечнику. Вплив ФНП також помітно пригнічується при дії досліджуваних препаратів лактобактерій. Це означає, що застосування препаратів метаболітів лактобактерій потенційно може зменшувати запальні процеси в кишечнику.

**Висновки**.

Досліджено вплив одержаного препарату метаболітів лактобактерій *L. delbrueckii subsp. lactis LE* на клітинний цикл в клітинній моделі in vitro на прикладі культури клітин Нер-2 різного ступеня зрілості. Встановлено збільшення проліферативної активності клітин під впливом даного препарату. Показано, що порівняно з контрольною культурою кількість проліферуючих клітин під дією ФНП знижувалась, а при спільній дії ФНП та препарату метаболітів лактобактерій кількість проліферуючих клітин нормалізувалась не залежно від віку культури. Встановлено, що метаболіти стимулюють проліферативну активність молодих, зрілих та старих клітин, як окремо так і в спільній дії з прозапальним цитокіном ФНП. Отримані дані дозволяють розробити та надалі використати універсальну модель життєвого циклу клітин епітелію кишечника при використанні препаратів на основі пробіотичних штамів лактобактерій в майбутніх системних дослідженнях протизапальної дії пробіотиків.

**Список використаної літератури:**

1. Смотрова, Н.Г., Несміян, В.С., Громов, М.О. Вплив мікрофлори шлунково-кишкового тракту на загальний стан здоров'я людини. / Неперервна освіта для сталого розвитку: філософсько-теоретичні контексти та педагогічна практика: Матеріали IV Міжнародної науково-практичної конференції. 03-04 грудня 2021 р., м. Дніпро, КЗВО «ДАНО» ДОР». СПД «Охотнік», Дніпро, 2021, С. 353-356.

2. Marushko, Y., Hyshchak, T., & Chabanovich, O. (2021). The Main Mechanisms of the Effect of Intestinal Microflora on the Immune System and Their Importance in Clinical Practice. Family Medicine, (4), 19–27. https://doi.org/10.30841/2307-5112.4.2021.249409

3. The Role of Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF-α) in Autoimmune Disease and Current TNF-α Inhibitors in Therapeutics / D.-i. Jang та ін. International Journal of Molecular Sciences. 2021. Т. 22, № 5. С. 2719. URL: https://doi.org/10.3390/ijms22052719.