

**Доклінічне вивчення противірусної активності пробіотичних препаратів
Калініченко С.В., Зверєва Н.В., Мелентьєва Х.В., Торяник І.І.,
Попова Н.Г., Попова Л.А., Скляр А.І.**

*Державна установа «Інститут мікробіології імунології ім. І.І. Мечникова
Національної академії медичних наук України»,
м. Харків, Україна,
Національний фармацевтичний університет,
м. Харків, Україна
mkv0908@ukr.net*

Вступ. В останні роки багато публікацій присвячено висвітленню взаємозв'язку між мікробіоценозом людини та станом його імунної системи [4]. Особливо це стосується таких представників нормофлори, як лакто- і біфідобактерії та пробіотичних препаратів на їх основі. Проведені за кордоном мультицентрові подвійні сліпі контрольовані дослідження з використанням плацебо продемонстрували, що курсовий прийом пероральних пробіотиків, що містять лактобацили, допомагає підвищити стійкість організму людини до захворювань не тільки бактеріальної, а й вірусної етіології [1, 5].

Відомо, що протиінфекційна дія пробіотичних препаратів обумовлена, в першу чергу, антагоністичними взаємовідносинами між пробіотичним штамом і патогенним агентом. Антагонізм пробіотичних штамів забезпечується продукуванням біологічно активних речовин (метаболітів), які інгібують розвиток патогенів [3].

Для вивчення противірусної активності пробіотичних препаратів як модель доклінічного тестування лікарських засобів, біологічно активних речовин тощо, привертають увагу клітинні культури, оскільки вони здатні специфічно реагувати на вплив біотичних чинників. Специфічність, як правило, проявляється у вигляді цитотоксичного ефекту, який оцінюють за ступенем морфологічних змін, порушень морфологічного апарату та проліферативних властивостей клітин. Метою роботи було дослідження противірусної активності метаболітів пробіотичного штаму *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG або ATCC 53103) відносно клінічних штамів ентеровірусів (Коксакі В-5, ЕСНО-21), виділених з калу хворих на кишкові інфекції.

Матеріали та методи. Об'єктом дослідження були субстратзалежні культури клітин ліній HeLa, Vero, Hep-2, які за морфологією є епітеліальними клітинами.

Вірусологічні методи. Титр вірусу визначали за наявністю в інфікованих вірусом моношарах клітин чіткої цитопатичної дії (ЦПД), яка проявляється появою округлених клітин, відділенням більшості клітин від скла та руйнуванням моношару. Титрування вірусу за ЦПД ґрунтується на визначенні найбільшого розведення вірусвмісного матеріалу, в якому вірус може спричинити ЦПД у 50% інфікованих культур клітин (ТЦД₅₀). Інтенсивність ЦПД оцінювали за системою плюсів (4+).

Для визначається ТЦД₅₀ в об'ємі матеріалу, взятого для зараження одного моношару з культурою клітин використовували аналітичний спосіб Кербера.

Мікробіологічні методи дослідження. Як метаболіти використовували безклітинні фільтрати культуральної рідини, які було отримано при культивуванні пробіотичного штаму *L.rhamnosus GG*.

Біохімічні методи дослідження. В отриманих метаболітах визначали рівень білкового азоту (PNU) згідно Фармокопейної статті «Определение белкового азота с реактивом Несслера с предварительным осаждением белкового материала в иммунобиологических лекарственных препаратах».

Методи статистичної обробки результатів. Кожний експеримент повторювали від 3-х до 5-ти разів. Статистична обробка даних здійснювалась у відповідності з правилами рядової і альтернативної варіаційної статистики [2].

Результати та їх обговорення. Для стандартизації дослідів в метаболітах лактобацил визначали вміст білкового азоту (PNU – protein nitrogen unit) та концентрували або розводили метаболіти до вмісту PNU від 0,1 до 0,3 мг/мл. Ці дози були вибрані тому, що при дослідженні їх сенсibiliзуючих властивостей на лабораторних тваринах (кролі вагою 1,5 – 2,0 кг) доза 0,1 мг/мл викликала сумнівну місцеву алергічну реакцію (гіперемія шкіри), а доза 0,3 мг/мл викликала слабо позитивну реакцію (поява пухирця з гіперемією шкіри навколо нього). Застосування доз метаболітів лактобацил з більшим вмістом білкового азоту призводило до утворення некрозу в місці введення, що є неприпустимим.

Нами була проведена оцінка можливості застосовування різних ліній клітинних культур за ступенем морфологічних змін для визначення цитотоксичної дії пробіотичних штамів.

Першим етапом дослідження стало дослідження впливу цукрового бульйону, на якому було отримано метаболіти, на адгезивні властивості та наявність/відсутність порушень цілісності моношару клітинних культур ліній HeLa, Vero, Hep-2.

Встановлено, що додавання цукрового бульйону в кількості від 0,00625 мл до 0,5 мл на 1,0 мл ростового середовища не впливало на адгезивні властивості клітин ліній HeLa, Vero, Hep-2 та не викликало порушення цілісності їх моношару.

Наступним етапом стало вивчення дії метаболітів пробіотичного штаму *L. rhamnosus GG* на культури клітин.

Порівняльний аналіз результатів показав, що після 24-х годинної експозиції, ефективність прикріплення клітин HeLa, Vero, Hep-2 до субстрату достовірно не змінювалося. Через 48 та 72 години інкубування всі контрольні культури клітин утворювали моношар без ознак дегенерації. Щодо ступеню дегенерації клітинного моношару культур дослідних ліній, то найбільш стійкими до дії метаболітів лактобацил були клітини лінії Vero (табл. 1).

Клітини лінії HeLa проявляли помірну чутливість до дії метаболітів лактобацил. Найбільш чутливими до дії метаболітів *L.rhamnosus GG* виявились клітини лінії Hep-2. Так, поодинокі клітини з ознаками деструкції при

культивуванні клітин у ростовому середовищі з додаванням метаболітів в кількості 0,3 мг/мл і 0,2 мг/мл були відмічені вже через 24 години інкубації.

Навіть при додаванні метаболітів лактобацил в кількості 0,025 мг/мл, були відмічені поодинокі клітини з ознаками руйнування.

Таблиця 1

Ступінь дегенерації клітинного моношару при культивуванні культури клітин в ростовому середовищі з додаванням метаболітів *L. rhamnosus* GG

Клітини лінії	Час спостереження, год.	Кількість метаболітів, мг/мл PNU						
		0,3	0,2	0,1	0,05	0,025	0,0125	0,00625
HeLa	24	-	-	-	-	-	-	-
	48	+	+	±	-	-	-	-
	72	++	++	++	±	-	-	-
Vero	24	-	-	-	-	-	-	-
	48	-	-	-	-	-	-	-
	72	±	-	-	-	-	-	-
Herp-2	24	±	±	-	-	-	-	-
	48	+++	++	+	+	±	-	-
	72	++++	+++	++	++	+	±	-

Експериментально визначено, що maximum tolerated dose (MTD) для всіх культур клітинних ліній становила 0,3 мкг/мл. Інгібуюча доза, що зменшувала кількість життєздатних клітин на 50% (ID₅₀) для клітин лінії Vero склала 0,6 мкг/мл, лінії HeLa та лінії Herp-2 – 0,5 мкг/мл.

Таким чином визначено, що взяті до дослідів клітинні лінії (HeLa, Vero, Herp-2) проявляють різну чутливість до дії метаболітів лактобацил. Чутливими до дії метаболітів лактобацил виявились клітини ліній Herp-2 та HeLa. Встановлено дозозалежний цитотоксичний ефект впливу метаболітів лактобацил. Зазначене свідчить про можливість використовувати клітинні культури для доклінічного тестування метабіотичних засобів.

Наступним етапом стало визначення наявності або відсутності противірусної активності метаболітів пробіотичного штаму *L.rhamnosus* GG.

Противірусну активність вивчали на культурах клітин Vero, HeLa та Herp-2 з посівною концентрацією $0,5 \times 10^6$ /мл. Різними концентраціями метаболітів LGG (0,3; 0,2; 0,1 мг/мл) обробляли моношар клітин та через 24 години вносили клінічні штами ентеровірусів (клінічні штами Коксакі В-5 і ЕСНО-21).

Стан клітин на наявність цитопатичної дії контролювали кожні 24 години в інвертованому мікроскопі, а через 96 годин визначали титр інфекційної активності вірусів в дослідних і контрольних лунках.

Встановлено, що клінічні штами ентеровірусів викликали деструкцію у 50 % клітин всіх взятих у дослідження культуральних ліній (HeLa, Vero, Herp-2) вже через 24 год спостереження (табл. 2,3).

Таблиця 2

Стан клітин на наявність цитопатичної дії за умов внесення метаболітів LGG та клінічного штаму ЕСНО-21

Клітини лінії	ЦПД, час спостереження, год.	Кількість метаболітів, мг/мл PNU			
		К (ЕСНО-21)	0,3	0,2	0,1
HeLa	24	++	-	-	+
	48	+++	±	+	++
	72	++++	++	++	+++
Vero	24	++	-	+	+
	48	+++	-	++	++
	72	++++	±	+++	+++
Hep-2	24	++	+	+	++
	48	+++	++	++	+++
	72	++++	+++	+++	+++

Таблиця 3

Стан клітин на наявність цитопатичної дії за умов внесення метаболітів LGG та клінічного штаму Коксакі В-5

Клітини лінії	ЦПД, час спостереження, год.	Кількість метаболітів, мг/мл PNU			
		К(Коксакі В-5)	0,3	0,2	0,1
HeLa	24	++	-	-	±
	48	+++	±	+	++
	72	++++	++	++	+++
Vero	24	++	-	+	+
	48	+++	±	++	++
	72	++++	±	+++	+++
Hep-2	24	++	±	±	+
	48	+++	+	+	++
	72	++++	++	++	++

При обробці моношару клітинної лінії HeLa метаболітами LGG в кількості 0,3 мг/мл і 0,2 мг/мл PNU перші ознаки ЦПД ентеровірусів (руйнування поодиноких клітин) проявлялись через 48 год, а через 72 год. деструкцію спостерігали у 50 % клітин проти 100 % в контролі. При обробці моношару цієї клітинної лінії метаболітами LGG в кількості 0,1 мг/мл PNU деструкцію 50 % клітин спостерігали вже через 48 год інкубації з клінічними штамами ентеровірусів.

Обробка моношару клітинної лінії Vero метаболітами LGG в кількості 0,3 мг/мл PNU призводила до того, що перші ознаки ЦПД ентеровірусів (руйнування поодиноких клітин) проявлялись через 48 годин при дії вірусу Коксакі В-5 і через 72 год при дії вірусу ЕСНО-21, тоді як обробка клітин цієї лінії метаболітами 0,2 мг/мл і 0,1 мг/мл PNU призводила до того, що перші ознаки ЦПД ентеровірусів з'являлись вже через 24 год.

При обробці моношару клітинної лінії Hep-2 метаболітами LGG в кількості 0,3 мг/мл і 0,2 мг/мл PNU перші ознаки ЦПД ентеровірусів

(руйнування поодиноких клітин) проявлялись через 24 – 48 годин, а через 72 години деструкцію спостерігали у 50 % клітин при дії вірусу ЕСНО-21 і 75 % при дії вірусу Коксакі В-5 (проти 100 % в контролі). При обробці моношару цієї клітинної лінії метаболітами LGG в кількості 0,1 мг/мл PNU через 24 години спостерігали деструкцію 50 % клітин при дії вірусу Коксакі В-5 і 75 % клітин при дії вірусу ЕСНО-21.

Визначення в культуральній рідині інфекційної активності ентеровірусів показало, що у пробах з метаболітами LGG інфекційна активність клінічних штамів ентеровірусів знижувалась через 24 години, в 1,5 – 1,7 ($p < 0,05$) рази, а через 96 годин – в 3,6 – 5,7 разів ($p < 0,01$). Кращі результати було отримано при застосуванні maximum tolerated dose: обробка клітинних культур метаболітами в кількості 0,3 мг/мл сприяла зниженню титру вірусів на $2,77 \pm 0,11 \text{ lg ТЦД}_{50}/\text{см}^3$, $2,83 \pm 0,11 \text{ lg ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ та $2,94 \pm 0,13 \text{ lg ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ відповідно для клітин ліній Vero, HeLa та Hep-2 вже через 24 год (рис. 1).

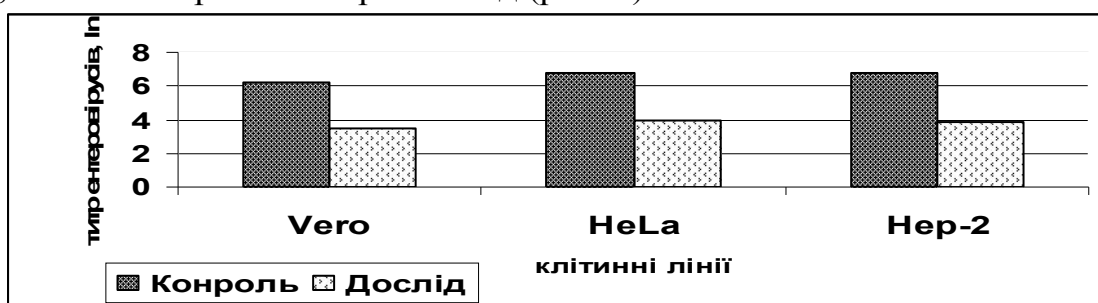


Рис. 1. Титри ентеровірусів на різних клітинних лініях через 24 год після зараження

Таким чином експериментально встановлено захисну (доза 0,1 мг/мл PNU) та противірусну (0,3 мг/мл PNU) дію метаболітів пробіотичного штаму *Lactobacillus rhamnosus* GG щодо клітинних ліній культур HeLa, Vero, Hep-2 при їх зараженні клінічними штамми ентеровірусів Коксакі В-5 і ЕСНО-21.

Література

1. Ершова, И. Б. Особенности кишечного микробиоценоза при вирусных гепатитах и возможности его коррекции [Текст] / И. Б. Ершова // Актуальная инфектология. – 2014. - № 2. – С. 7-11.
2. Лапач, С. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel [Текст] / С.Н. Лапач, А.В. Чубенко, П.Н. Бабич. – К.: Морион, 2000. – 320 с. – ISBN 966-7632-16-4.
3. Сучасні напрямки створення та удосконалення пробіотиків [Текст] / С. В. Калініченко, О. О.Коротких, І. Ю. Тіщенко// Український біофармацевтичний журнал. – 2016. - №1 (42). – С. 4-10.
4. Immunomodulatory effects of a probiotic drink containing *Lactobacillus casei* Shirota in healthy older volunteers [Text] / Н. Dong, I. Rowland, L.V. Thomas, P. Yaqoob // European journal of nutrition – 2013. - V. 52(8) – P.1853-1863.
5. Vrese, M. Effect of *Lactobacillus gasseri* PA 16/8, *Bifidobacterium longum* SP 07/3, *B. bifidum* MF 20/5 on common cold episodes: a double blind, randomized, controlled trial [Text] / M. Vrese, P. Winkler, P. Rautenberg // Clin Nutr. – Vol.24. – 2005. – P.481-491.