

*О.Ф. МЕЛЬНИКОВ, С.В. ТИМЧЕНКО, М.Д. ТИМЧЕНКО, Д.Д. ЗАБОЛОТНА,
Т.В. СМАГІНА, В.І. НЕСТЕРЧУК, І.М. МУСІЧ*

ВПЛИВ ПРОБІОТИКІВ НА ФАГОЦИТАРНУ АКТИВНІСТЬ ПОЛІМОРФНОЯДЕРНИХ ЛЕЙКОЦИТІВ КРОВІ

*ДУ «Інститут отоларингології ім. проф. О.С. Коломійченка НАМН України»
(дир. – академік НАМНУ, проф. Д.І. Заболотний)*

Широке застосування антибіотиків та антимікотиків обумовило появу резистентних до них умовнопатогенних мікроорганізмів, що, у свою чергу, спонукало до пошуку альтернативних підходів до проведення лікування з риводу викликаних ними захворювань. Одним із шляхів боротьби з такими інфекціями є застосування пробіотиків – живих мікробів, зокрема лактобактерій (ЛБ), які можуть поставати як альтернатива або як доповнення до антимікробних препаратів. Останнім часом одержано ряд нових пробіотичних продуктів. ЛБ, що входять до їх складу, добре виживають *in vivo* і мають антагоністичні властивості відносно ряду важливих патогенів [10], зокрема термофільних стафілококів. При цьому вони також здатні впливати на продукцію цитокінів [13], активність фагоцитів та природних кілерних клітин [14], місцевий і системний антитілоутворюючий потенціал [11, 12] організму.

Мета даного дослідження – порівняння впливу нових вітчизняних пробіотиків на основі лактобацил (LE та LB3) та імпортного препарату виробництва фірми «Rosell» на фагоцитарну активність лейкоцитів крові у ЛОР-хворих та дослідних тварин з експериментально індукованою імуносупресією.

Матеріал і методи

Дослідження дії пробіотиків *in vitro* проведені на поліморфноядерних лейкоцитах (ПЯЛ), одержаних з венозної крові у 15 хворих на алергічний риніт (АР), з яких 7 страждали на цілорічну, а 8 – на сезонну форми АР, а також у 10 пацієнтів з хронічним тонзилітом (ХТ). Вплив препаратів, застосованих *per os*, визначався на 48 білих статевозрілих лабораторних щурах Wistar обох статей, які складали 8 рівних у кількісному відношенні груп, котрі у свою чергу, були розподілені між двома аналогічними серіями експериментів. Різниця між серіями полягала в тому, що в одній були

здіяні інтактні щури, а в іншій – тварини, яким за добу до початку введення пробіотиків внутрішньочеревинно була зроблена ін'єкція 2% розчину циклофосфану з розрахунку 40 мг на 1 кг маси тіла для індукції у них «м'якої» імуносупресії, при якій спостерігається зниження активності природних клітин-кілерів [5,6], а також пригнічення мітотичної активності, зокрема, лімфоцитів [9].

Дослідним тваринам відповідних груп у обох серіях зондом *per os* вводились однакові препарати ЛБ з розрахунку: 5·10¹⁰ мікробних тіл на 1 кг маси тіла. Використовувались вітчизняні пробіотики LE, LB3 та імпортний засіб фірми «Rosell». Контрольним щурам вводився 0,9% розчин NaCl у відповідному об'ємі. Всього протягом 2 тижнів з дводенною перервою щурам усіх груп було зроблено по 9 введень ЛБ або фізіологічного розчину. Тварини виводились з досліду шляхом декапітації. З отриманої при цьому крові одержували ПЯЛ.

Реакція фагоцитозу інертних часточок латексу проводилась за раніше описаним методом [3] з тою різницею, що при використанні ПЯЛ від хворих у дослідні проби додатково вносилося по 50 мкл суспензії ЛБ у фізіологічному розчині в двох концентраціях (А та Б), а до контрольних – 50 мкл 0,9% розчину NaCl. Розведення А складало 2,4 млн., а розведення Б – 24 тис. мікробних тіл на 1 мл суспензії. Результат визначався, при вираховуванні розраховуючи фагоцитарного показника (ФП) – кількості фагоцитуючих клітин на 100 підрахованих фагоцитів, а також фагоцитарного індексу (ФІ) – середньої кількості часточок латексу, захоплених однією фагоцитуючою клітиною. Одержані дані були статистично оброблені з урахуванням рекомендацій Е.В. Гублера [2] та Э.В. Мальцева [4] за допомогою однобічного непараметричного критерію «U» Манна-Уїтні з використанням пакету програмного забезпечення для біометричних досліджень WinPEPI.

Результати та їх обговорення

Ще за часів І.І. Мечникова було відомо, що лейкоцити ссавців достатньо чутливі до хімічних подразників, при цьому найбільш вірулентні мікроби, а також така сполука, як молочна кислота, «відштовхують лейкоцити» [7]. Саме тому нами досліджувався вплив присутності в інкубаційному середовищі різних препаратів ЛБ на фагоцитоз ПЯЛ часточок латексу.

В нормі фагоцитарна активність нейтрофілів крові у людини по відношенню до часточок латексу становить 47,5-79,1 %, а фагоцитарне число – 6-9 [8]. Тому можна констатувати, що у пацієнтів з АР в середньому має місце незначне збільшення як кількісного, так і якісного показника фагоцитарної активності, про що свідчать дані, отримані в контрольній групі: ФП=81,93, а ФІ=9,61. Аналогічне твердження стосується і хворих на ХТ.

Оцінка дії різних препаратів ЛБ *in vitro* на ПЯЛ крові у осіб з АР показала, що ЛБ «Rosell» у розведенні Б на рівні тенденції, а у розведенні А – суттєво ($pU < 0,05$) зменшують ФП і ФІ ПЯЛ (ФП=69,75, ФІ=6,36). ЛБ LB3 у таких пацієнтів, навпаки, у розведенні А посилюють поглинаючу здатність ПЯЛ лише на рівні тенденції, а у розведенні Б – достовірно збільшують ФП ($pU < 0,05$), і знов-таки на рівні тенденції, але в більшій мірі – ФІ (табл. 1). Під впливом різних концентрацій LE функціональна активність ПЯЛ у хворих на АР *in vitro* помітно не змінюється.

Варто уваги те, що препарат LB3 *in vitro* у розведенні Б суттєво ($pU < 0,05$) підвищує ФП порівняно з таким у розведенні А, тобто цей лікарський засіб у меншій концентрації більш ефективно стимулює фагоцитоз.

Оскільки додавання до ПЯЛ у обстежуваних з АР препарату фірми «Rosell» у розведенні А призводить до достовірного зниження значень ФП та ФІ порівняно з контролем, але поглинаюча здатність ПЯЛ при цьому все одно залишається у межах фізіологічної норми, такий результат скоріш за все свідчить про нормалізуючу дію даного пробіотика.

При дослідженні впливу ЛБ *in vitro* на фагоцитарну активність ПЯЛ крові у хворих на ХТ виявлено дозозалежну дію препарату LB3, який у розведенні А пригнічує поглинаючу здатність ПЯЛ на рівні тенденції, а в розведенні Б суттєво зменшує її. Показники функціональної активності ПЯЛ при цьому не виходять за межі фізіологічної норми, тому одержаний результат також варто розцінювати як нормалізуючу дію. Препарат LE виявляє аналогічну дозозалежну дію, але стосовно лише ФП ПЯЛ, який він утримує на рівні тенденції до зменшення. Будь-яких закономірностей впливу на ПЯЛ крові у пацієн-

тів з ХТ *in vitro* у пробіотика фірми «Rosell» не визначається.

Таким чином, дослідження впливу різних зразків ЛБ на фагоцитарну активність ПЯЛ крові у хворих на АР та ХТ *in vitro* показало, що, незалежно від використаного препарату, ЛБ не чинять негативної дії на фагоцитарну функцію ПЯЛ. В той же час вітчизняний пробіотик LB3 може суттєво модулювати активність цих клітин. Напрямок змін активності ПЯЛ під впливом ЛБ якимось чином пов'язаний із захворюванням, на яке страждають донори фагоцитів. Так на відміну від препарату фірми «Rosell», LB3 діє на ПЯЛ у пацієнтів з різною ЛОР-патологією, а не лише з АР, до того ж LB3 є більш ефективним при використанні його в низьких концентраціях.

Цей факт можна пояснити зв'язком, який існує між імунодефіцитними станами та алергією. Так відомо, що більшість імунодефіцитів має, поряд з класичними, і алергічні прояви. Найчастіше на них не звертають відповідної уваги, однак вони є природним наслідком принципу саморегуляції імунної системи. Характеризуючи зв'язок між алергією та імунодефіцитом, можна констатувати, що гіперчутливість та імунодефіцит, аж ніяк, не є протилежностями [1].

Базуючись на цьому положенні та результатах, отриманих при визначенні впливу ЛБ, а особливо LB3, на ПЯЛ у осіб з різною ЛОР-патологією, ми зробили спробу оцінити дію пробіотиків при їх застосуванні *per os* на тварин з експериментально індукованою імуносупресією.

Результати досліджень на щурах показали, що на тлі імуносупресії, обумовленої ін'єкцією циклофосфану, у них відбувається посилення поглинаючої активності ПЯЛ. Про це свідчать суттєве зростання у них, порівняно з нормальними тваринами, ФП ($pU < 0,05$) та помітна тенденція до збільшення ФІ (табл. 2). Менш чіткі зрушення спостерігаються у щурів, що на тлі імуносупресії отримували *per os* ЛБ фірми «Rosell» або LE. В них ФП та ФІ збільшуються лише на рівні тенденції. Між тим ЛБ LB3 чітко посилюють активність ПЯЛ у щурів з імуносупресією. Це виявляється не лише тому, що у таких тварин і ФП ($pU2 < 0,01$) і ФІ ($pU2 < 0,05$) в середньому суттєво перевищують норму, але і тим, що їх ФП достовірно ($pU1 < 0,05$), а ФІ на рівні тенденції є більшими ніж у контрольних щурів з імуносупресією.

Особливістю дії LB3 є те, що стимулюючий вплив цих ЛБ на поглинаючу здатність ПЯЛ *in vivo* виявляється тільки у тварин з порушеннями у роботі імунної системи, оскільки у нормальних щурів LB3 суттєво не впливає на функціональну активність цих клітин так само, як і інші розглянуті у роботі лікувальні засоби.

Таким чином, при пригніченні функціональної активності лімфоїдних клітин в організмі щурів відбувається активізація філогенетично більш давнього захисного механізму – фагоцитозу, яка скоріш за все має компенсаторний характер. При цьому ЛБ фірми «Rosell» та LE суттєво на нього не впливають, тоді як LB3 – достовірно посилює його. Тому є підстави вважати, що даний пробіотик реалізує свій модулюючий ефект тільки на вже стимульованих клітинах, тобто його дія є не прямою, а опосередкованою.

Висновки

Вітчизняний пробіотик LB3, на відміну від препарату фірми «Rosell», при застосуванні як *in vivo* на тваринах з індукованою імуносупресією, так і *in vitro* на клітинах крові у хворих на АР обумовлює збільшення фагоцитарної активності ПЯЛ.

Препарат LB3 виявляє свої модулюючі властивості по відношенню до фагоцитуючих клітин крові у меншій концентрації більш виражено, ніж препарат фірми «Rosell».

За своїм впливом на ПЯЛ крові пробіотик LB3 є значно ефективнішим ніж LE, або імпортований лікувальний засіб фірми «Rosell».

Таблиця 1

Вплив пробіотиків *in vitro* на фагоцитарну активність ПЯЛ крові ЛОР-хворих по відношенню до часток латексу

Діагноз	Показник	Контроль		Препарат LE				Препарат LB3				Препарат фірми Rosell			
		ФП	ФІ	розведення А		розведення Б		розведення А		розведення Б		розведення А		розведення Б	
				ФП	ФІ	ФП	ФІ	ФП	ФІ	ФП	ФІ	ФП	ФІ	ФП	ФІ
АР	СЗ	81,93	9,61	84,08	8,89	83,62	ФІ	85,09	10,44	90,27	11,32	69,75	6,36	77,50	7,76
	МК	54,00-96,00	4,15-20,94	60,00-98,00	5,30-12,54	60,00-97,00	9,53	75,00-97,00	5,08-21,08	80,00-97,00	7,40-22,71	65,00-79,00	4,71-8,20	68,00-95,00	4,85-
	n	15	15	13	13	13	5,22-14,05	11	11	11	11	4	4	4	11,50
	p _{U1}			>0,05	>0,05	>0,05	13	>0,05	>0,05	<0,05	>0,05	<0,05	<0,05	>0,05	4
	p _{U2}			-	-	>0,05	>0,05	-	-	<0,05	>0,05	-	-	>0,05	>0,05
ХТ	СЗ	85,70	9,34	80,30	12,20	76,30	>0,05	77,00	8,27	63,70	6,30	88,30	11,60	76,00	>0,05-
	МК	64,00-95,00	5,03-14,02	39,00-98,00	4,36-19,55	33,00-96,00	10,90	55,00-94,00	4,64-12,62	47,00-76,00	5,21-6,81	84,00-94,00	9,72-13,57	48,00-93,00	9,04
	n	9	9	6	6	6	5,97-17,95	6	6	3	3	3	3	3	3,62-13,84
	p _{U1}			>0,05	>0,05	>0,05	6	>0,05	>0,05	<0,05	<0,05	>0,05	>0,05	>0,05	3
	p _{U2}			-	-	>0,05	>0,05	-	-	>0,05	>0,05	-	-	>0,05	>0,05

Примітки:

СЗ – середнє значення; МК – межі коливань; n – кількість досліджень; p_{U1} – достовірність розбіжностей значень у контрольній і відповідній дослідній групі за однобічним критерієм Манна-Уїтні; p_{U2} – достовірність розбіжностей значень, отриманих при використанні різних розведень одного і того ж самого дослідного штаму лактобацил, за однобічним критерієм Манна-Уїтні.

Таблиця 2

Вплив прийому пробіотиків *in vivo* на фагоцитарну активність ПЯЛ крові у нормальних щурів та тварин з імуносупресією

Група		Препарат фірми Rosell			
		без імуносупресії		з імуносупресією, обумовленою циклофосфаном	
		ФП	ФІ	ФП	ФІ
0,9% розчин NaCl (контроль)	СЗ МК n	77,17 43,00-94,00 6	10,70 5,02-19,90 6	91,17* 81,00-97,00 6	13,43 5,75-19,60 6

«Rossel»	СЗ МК n	80,50 56,00-94,00 6 $p_{U1}>0,05$	12,32 4,20-22,32 6 $p_{U1}>0,05$	86,50 79,00-95,00 6 $p_{U1}>0,05$ $p_{U2}>0,05$	12,72 8,22-17,90 6 $p_{U1}>0,05$ $p_{U2}>0,05$
LE	СЗ МК n	78,17 69,00-88,00 6 $p_{U1}>0,05$	10,86 4,13-18,90 6 $p_{U1}>0,05$	87,83* 75,00-96,00 6 $p_{U1}>0,05$ $p_{U2}>0,05$	14,00 5,60-21,60 6 $p_{U1}>0,05$ $p_{U2}>0,05$
LB3	СЗ МК n	82,83 74,00-93,00 6 $p_{U1}>0,05$	9,76 5,87-20,41 6 $p_{U1}>0,05$	96,00** 90,00-99,00 6 $p_{U1}<0,05$ $p_{U2}<0,01$	16,98* 14,13-21,56 6 $p_{U1}>0,05$ $p_{U2}<0,05$

Примітки:

СЗ – середні значення; МК – межі коливань; n – кількість досліджень; p_{U1} – достовірність розбіжностей між дослідними групами та відповідним контролем; p_{U2} – достовірність розбіжностей між дослідною групою тварин з імуносупресією та нормальним контролем за однобічним критерієм Манна-Уїтні; * – $p_U < 0,05$; ** – $p_U < 0,01$ – достовірність розбіжностей між відповідними групами тварин з імуносупресією та без неї за однобічним критерієм Манна-Уїтні

1. Васильев А.Г., Чурилов Л.П. Иммунология и иммунопатология. – СПб.: СОТИС, 2006. – 180 с.
2. Гублер Е.В. Вычислительные методы анализа и распознавания патологических процессов. – Л.: Медицина, 1978. – 296 с.
3. Ігрунова К.М., Мельников О.Ф., Тимченко С.В., Тимченко М.Д. Коливання фагоцитарної активності лейкоцитів крові у хворих на гіпертонічну хворобу та інтактних або імунізованих щурів і її зміни у тварин під впливом іммобілізаційного стресу // Зб. наук. праць співробітників КМАПО ім. П.Л. Шупика. – Київ, 2004. – Вип. 13, Кн. 3. – С. 143-148.
4. Мальцев Э.В. Методология научного творчества в медицине: Практические аспекты. – Одесса: Астропринт, 2006. – 120 с.
5. Мельников О.Ф., Красий р.И., Кривохатская Л.Д. Экспериментальная модель дефицита нормальных цитотоксических клеток в периферической крови // VII съезд онкологов УССР (Симферополь, 2-4 окт. 1985 г.): Тез. докл. – К.: Б.и., 1985. – С. 356-358.
6. Мельников О.Ф., Красий р.И., Опанащенко Г.А. Клинико-экспериментальное обоснование применения иммуномодуляторов при коррекции недостаточности ЕК-активности // IV Всесоюз. симпозиум «Регуляция иммунного гомеостаза» (Суздаль, 5-7 мая 1986 г.): Тез. докл. – Л.: Б.и., 1986. – С. 50-51.
7. Мечников И.И. Лекции о сравнительной патологии воспаления. – М.: Медгиз, 1947. – 200 с.
8. Норма в медицинской практике. Справочное пособие. – Смоленск: Изд. СГМА, 1996. – 144 с.
9. Полетаев А.Б. Клиническая и лабораторная иммунология: Избранные лекции. – М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2007. – 184 с.
10. Элмер Г.В. Пробиотики: применение живых микробов для уменьшения использования антибиотиков // Клини. антибиотикотерапия. – 2002. – № 3 (17). – С. 31.
11. Isolauri E., Sutas E., Kankaanpää P., Asrviilommi H., Salminen S. Probiotics: effects on immunity // Am. J. Clin. Nutr. – 2001. – 73 (suppl). – P. 440-450.
12. Link-Amster H., Rocha F., Saudan K., Mignot O., Aeschliman A.M. Modulation of specific immune response & changes of intestinal flora mediated through fermented milk intakes // FEMS Immunol. MED Microbiol. – 1994. – v. 10. – P. 55-64.
13. Muscetolla M., Massai M., Tanganelli C., Grasso G. Effect of lactobacilli on interferon production // Ann. N-Y Acad. Sci. – 1994. – V. 717. – P. 226-232.
14. Schiffrin EJ., Brassart D., Servin AL. Immune modulation of blood in humans by lactic acid bacteria // Am J. Clin. Nutr. – 1997. – 66 (suppl). – P. 515-520.

Найдійшла до редакції 30.09.10.

© О.Ф. Мельников, С.В. Тимченко, М.Д. Тимченко, Д.Д. Заболотна, Т.В. Смагіна, В.І. Нестерчук, І.М. Мусіч, 2011

**ВЛИЯНИЕ ПРОБИОТИКОВ НА
ФАГОЦИТАРНУЮ АКТИВНОСТЬ
ПОЛИМОРФНОЯДЕРНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ
КРОВИ**

*Мельников О.Ф., Тимченко С.В., Тимченко М.Д.,
Заболотная Д.Д., Смагина Т.В., Нестерчук В.И.,
Мусич И.Н. (Киев)*

Резюме

Проведенный анализ показателей фагоцитарной активности полиморфноядерных лейкоцитов крови у больных аллергическим ринитом в присутствии различных штаммов лактобацилл *in vitro* показал, что препарат LB3 стимулирует их поглотительную способность в отличие от препарата фирмы «Rosell», под влиянием которого функциональная активность этих клеток снижается, оставаясь в пределах физиологической нормы. У крыс с иммуносупрессией, обусловленной введением циклофосфана, происходит активизация фагоцитирующих клеток крови. Кормление таких животных препаратом LB3 приводит к еще большему усилению у них поглотительной способности лейкоцитов крови, тогда как препараты лактобацилл LE и Rosell существенно на нее не влияют. Это дает основание утверждать, что препарат LB3 способен повышать фагоцитарную активность уже изначально активированных фагоцитов.

**EFFECT OF PROBIOTICS
ON THE PHAGOCYtic ACTIVITY
OF POLYMORPHONUCLEAR
LEUKOCYTES**

*Melnikov O.F., Timchenko S.V., Timchenko M.D.,
Zabolotnaya D.D., Smagina T.V., Nesterchuk V.I.,
Musich I.N. (Kyiv)*

S u m m a r y

Taken analysis of indicators of the phagocytic activity of polymorphonuclear leukocytes in patients with allergic rhinitis in the presence of different strains of lactobacilli *in vitro* showed that the medication LB3 stimulates their absorption ability as opposed to medication of Rosell, under whose influence the functional activity of these cells decreases, while remaining within the physiological norm. In rats with immunosuppression which is caused by the introduction of cyclophosphamide, activation of phagocytic blood cells happens. Feeding of these animals with medication LB3 leads to greater enhance of their absorptive capacity of white blood cells, whereas medications of lactobacilli LE and Rosell does not affect it considerably. This gives grounds to assert that the medication LB3 can enhance the phagocytic activity of initially activated phagocytes.