

# Цитотоксичність структурно-метаболітних комплексів *Lactobacillus rhamnosus* GG та *Saccharomyces boulardii*

О.Ю. Ісаєнко<sup>1</sup>, О.В. Книш<sup>1</sup>, О.В. Фалько<sup>2</sup>, В.Ю. Прокопюк<sup>2</sup>, О.С. Прокопюк<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Державна установа «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова НАМН України», Харків;

<sup>2</sup>Інститут проблем кріобіології та кріомедицини Національної академії наук України, Харків;  
e-mail: el\_isaenko@ukr.net

Досліджено вплив структурно-метаболітних комплексів *Lactobacillus rhamnosus* та *Saccharomyces boulardii* на життєздатність тест-клітин – фібробластів ембріонів миші і спленоцитів миші – за їхньою метаболічною активністю. Дезінтегранти, що являють собою структурні компоненти, одержано завдяки низькочастотній ультразвуковій обробці пробіотичних клітин *Lactobacillus rhamnosus* GG або *Saccharomyces boulardii*. Метаболіти отримано за авторською методикою культивуванням лактобактерій та сахароміцетів у власних дезінтегратах, а їхня комбінація – в дезінтегратах лактобактерій. Цитотоксичність дезінтегратів та метаболітів вивчали за допомогою тестів *in vitro*. Вміст фільтратів у середовищі інкубації у концентрації 5 % не змінював метаболічну активність обох досліджених видів тест-клітин при використанні різних редокс-індикаторів (MTT і Alamar Blue®). Підвищення вмісту фільтратів у середовищі інкубації до 20 % супроводжувалося статистично достовірним пригніченням метаболічної активності ембріональних фібробластів (від  $56,19 \pm 1,4$  до  $88,73 \pm 8,6\%$ ) та спленоцитів миші (від  $52,63 \pm 0,7$  до  $80,5 \pm 6,8\%$ ) залежно від активності безклітинного продукту. Отримані результати дослідження цитотоксичності й визначення концентраційнозалежного характеру впливу дезінтегратів та метаболітів *Lactobacillus rhamnosus* та *Saccharomyces boulardii*, одержаних без використання традиційних живильних середовищ, можуть бути застосовані для створення протимікробних засобів нового покоління.

Ключові слова: ембріональні фібробласти; спленоцити миші; MTT; Alamar Blue®; метаболічна активність.

## ВСТУП

У зв'язку з катастрофічним поширенням антибіотикорезистентності серед потенційних та облігатних патогенних збудників людини впродовж останніх років виникла гостра необхідність пошуку терапевтичних засобів, альтернативних антибіотикам. Одним з перспективних напрямків вважають застосування природних ворогів патогенних бактерій – пробіотиків. Вони здатні діяти проти збудників захворювань, підвищувати загальну резистентність макроорганізму, впливати на функції імунокомпетентних клітин, стимулювати та відновлювати корисну мікрофлору тощо [1]. Ще одна серйозна проблема – недо-

статня ефективність традиційних клітинних пробіотиків, теж потребує якнайшвидшого вирішення. Оскільки їх ефекти переважно досягаються завдяки метаболітам, доцільною є розробка препаратів на їхній основі. Згідно з сучасними вимогами кожна хімічна сполука або біологічно активна речовина, що застосовується при створенні нового лікарського препарату, повинна отримати токсико-гігієнічну оцінку. Впровадження методів дослідження цитотоксичності хімічних сполук та препаратів *in vitro*, альтернативних класичним дослідженням *in vivo*, окрім вирішення етичних проблем, дає змогу значно знизити вартість та скоротити тривалість досліджень [2]. Найбільш популярною стала група з ви-

© О.Ю. Ісаєнко, О.В. Книш, О.В. Фалько, В.Ю. Прокопюк, О.С. Прокопюк

користанням клітинних культур. В їх основі – визначення метаболічної активності клітин за допомогою МТТ (безбарвної солі тетразолію 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразолію броміду) та резазурину (натрієвої солі 7-гідрокси-3Н-феноксазин-3-ОН-10-оксиду) [3, 4].

МТТ- та резазурин-тести передбачають використання клітинних суспензій або адгезованих до стінок планшетів клітин. Живі клітини з активним метаболізмом перетворюють розчинний безбарвний МТТ у забарвлений фіолетовий нерозчинний продукт – формазан. Мертві клітини не здатні до такого перетворення. Таким чином, утворення забарвленого продукту у вигляді преципітатів слугує корисним і зручним маркером життєздатності клітин.

Alamar Blue – один з найбільш вживаних реагентів, що використовуються для аналізу цитотоксичності речовин за рівнем життєздатності різних клітин – бактерій, грибів, фібробластів, лімфоцитів, нейтроцитів та ракових клітин різного походження. Alamar Blue® містить резазурин та додаткові компоненти для запобігання його відновлення у нефлюоресцентний продукт. Він відновлюється як мітохондріальними, так і цитоплазматичними дегідрогеназами та цитохромами живих клітин у рожевий флюоресцентний продукт – резоруфін. Кількість виробленого резоруфіну пропорційна кількості життєздатних клітин і може бути визначена за допомогою мікропланшетного флюориметра [3].

Метою нашої роботи було вивчення впливу структурно-метаболітичних комплексів *Lactobacillus rhamnosus* та *Saccharomyces boulardii* на життєздатність тест-клітин – фібробластів ембріонів миші і спленоцитів миші – за їхньою метаболічною активністю для можливості створення протимікробних засобів нового покоління.

## МЕТОДИКА

*Матеріалом для досліджень були:* фільтрати ультразвукових дезінтегратів лактобактерій

(L) і сахароміцетів (S), (містять структурні компоненти бактеріальних клітин);

фільтрати культур лактобактерій (ML), сахароміцетів (MS), вирощених у власних ультразвукових дезінтегратах (містять структурно-метаболітичні комплекси бактеріальних клітин або грибів);

фільтрати спільних культур лактобактерій із сахароміцетами (MLS), вирощених в ультразвукових дезінтегратах лактобактерій (містять структурно-метаболітичні комплекси бактеріальних клітин і грибів);

фільтрати культур сахароміцетів (LS), вирощених в ультразвукових дезінтегратах лактобактерій (містять структурно-метаболітичні комплекси бактеріальних клітин і грибів).

*Біологічно активні структурні компоненти лактобактерій і сахароміцетів отримували* опроміненням низькочастотними ультразвуковими хвилями суспензій грибів *Saccharomyces boulardii* з пробіотичного препарату BULARDI® («Schonen», Швейцарія) та бактерій пробіотичного штаму *Lactobacillus rhamnosus* GG із симбіотика PREEMA® («Schonen», Швейцарія). Перед опроміненням ліофілізати мікроорганізмів суспендували в 0,9%-му розчині хлориду натрію, субкультивували протягом 20–24 год при  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  у рідкому живильному середовищі [5]. Отримані мікробні маси піддавали трикратному відмиванню від середовища та готували суспензії клітин з оптичною густиною 10,0 од. за шкалою МакФарланда за допомогою приладу Densi-La-Meter («Lachema», Чехія). Для опромінення застосовували генератор ГЗ-109, навантажений на кільцеві п'єзокерамічні перетворювачі типу ЦТС: (Зовнішній×Внутрішній×h) мм. Обробку здійснювали в діапазонах частот  $\Delta f_1 = 10\text{--}20\text{ кГц}$  ( $f_{\text{max}} = 12,2\text{ кГц}$ ) і  $\Delta f_2 = 35\text{--}50\text{ кГц}$  ( $f_{\text{max}} = 40,0\text{ кГц}$ ) при амплітуді збудження  $U = 15\text{ В}$  на навантаженні  $R = 50\ \Omega$  ( $P = 5\text{ Вт}$ ). Коефіцієнт перетворення електричної в акустичну потужність становив  $\eta \approx 5\%$ , тобто середня потужність акустичних коливань у місці розташування біологічних

об'єктів сягала (0,25–0,5) Вт. Пробірки з бактеріальною суспензією мікроорганізмів перебували в ближній зоні перетворювача, розташованого у водному середовищі. Отримані дезінтеграсти надалі застосовували для вирощування культур лактобактерій і грибів та вивчення цитотоксичності. Перед дослідженням дезінтеграсти центрифугували при 1000 g упродовж 30 хв та фільтрували супернатант з використанням мембранних фільтрів «Владіпор» МФАС-Б № 4 (діаметр пор 0,2 мкм).

Для отримання метаболітів *Lactobacillus rhamnosus* та *Saccharomyces boulardii* в ультразвуковий дезінтеграст, що містить клітинні структури *Lactobacillus rhamnosus* або *Saccharomyces boulardii*, вносили суспензії грибів, лактобактерій або суміші суспензій грибів і лактобактерій (1:1) з оптичною щільністю 10,0 од. за шкалою МакФарланда у співвідношенні 9:1. Культивування здійснювали при  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  протягом 3 діб. Потім центрифугували при 1000 g упродовж 30 хв та фільтрували супернатант з використанням мембранних фільтрів «Владіпор» МФАС-Б № 4 (діаметр пор 0,2 мкм) [6, 7].

Експерименти на лабораторних тваринах проводили з дотриманням Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447–IV від 21.02.2006 р.) та відповідно до вимог Комітету з біоетики Інституту, узгоджених із положенням «Європейської конвенції захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, 1986).

Культуру ембріональних фібробластів миші отримували за стандартною методикою з їх ембріонів [8].

Визначення цитотоксичності фільтратів, що містять структурно-метаболітні комплекси лактобактерій та сахароміцетів за МТТ-тестом. Суспензію фібробластів з густиною 100 000 клітин/мл вносили у лунки 96-лункового планшета («Tecan Genios»,

Австралія) по 100 мкл, культивували до отримання конфлюентного шару, додавали досліджувані фільтрати – 5 та 20 мкл на 100 мкл середовища DMEM/F12, у контрольні – середовище без досліджуваного фільтрату (негативний контроль – К), інкубували протягом 24 год. МТТ-реагент («Sigma Chemical Co», США) додавали в лунки по 15 мкл, інкубували з ним клітини впродовж 4 год та вносили 100 мкл диметилсульфоксиду (ДМСО) для солюбілізації формагану.

За допомогою планшетного рідера визначали оптичну густину кожної лунки при 530 нм, віднімали виміряне фонове поглинання при 620 нм. Результати розраховували за формулою ( $\text{RAU} = \text{оптична густина зразка з клітинами} - \text{оптична густина зразка без клітин}$ ) і представляли у відсотках від значень, отриманих для контрольного зразка.

Спленоцити миші отримували з їх селезінки (3 самця віком 6–8 тиж, масою 18–20 г) за стандартною методикою [2–4]. Концентрацію клітин визначали за допомогою гемоцитометра Marienfeld.

Вивчення цитотоксичності фільтратів, що містять структурно-метаболітні комплекси лактобактерій та сахароміцетів за резазурин-тестом. Суспензію спленоцитів з концентрацією 70 000 клітин/лунку вносили у пластиковий планшет по 200 мкл. У дослідні лунки додавали досліджувані фільтрати, кінцева концентрація яких становила 5 та 20%. Контрольні лунки містили спленоцити у середовищі культивування. Клітинні суспензії культивували впродовж 24 год. Alamar Blue («Serotec Ltd», США) вводили у лунки в концентрації 0,15 мг/мл. Визначали кількість відновленого флюоресцентного барвника у зразках за інтенсивністю флюоресценції при довжині хвилі збудження 550 нм і емісії 590 нм. Результати вимірювань, були розраховані за формулою ( $\text{RFU} = \text{інтенсивність флюоресценції зразка з клітинами} - \text{інтенсивність флюоресценції зразка без клітин}$ ) і представ-

лені у відсотках стосовно контролю.

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програми Statistica 6.0. Для кожної концентрації тестових речовин експерименти були виконані в дев'яти повторях. Перевірку розподілу на нормальність здійснювали за допомогою критерію Пірсона. При відповідності нормальному розподілу порівняння проводили з використанням критерію t Стюдента. Значення визнані статистично значущими при  $P < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати дослідження впливу фільтратів, що містять структурні компоненти та продукти метаболізму лактобактерій і сахароміцетів, на метаболічну активність ембріональних фібробластів миші, визначену за МТТ-тестом показали, що інтенсивність змін залежить від концентрації дослідних речовин (рис. 1, а; 2, а). Введення до середовища інкубації фільтратів, що містять структурні компоненти (L) та метаболіти лактобактерій (ML), у концентрації 5% не викликає достовірного зниження метаболічної активності фібробластів (див. рис. 1, а). Спостерігається тенденція до підвищення відновлювальної здатності фібробластів за умов введення до середовища інкубації у концентрації 5% фільтратів, що містять метаболіти, отримані при спільному культивуванні лактобактерій із сахароміцетами у дезінтеграції лактобактерій (MLS). Додавання до середовища культивування всіх вищезазначених фільтратів у концентрації 20% супроводжується вірогідним зниженням метаболічної активності тест-клітин (див. рис. 1, а).

Слід зазначити, що вміст у середовищі інкубації фільтратів ML у концентрації 20% викликає найбільші зміни метаболічної активності ембріональних фібробластів миші за результатами МТТ-тесту ( $56,19 \pm 1,37\%$ ). Отримані результати добре узгоджуються з даними попередніх власних досліджень [9–11]. Наявність в інкубаційному середо-

вищі метаболітів лактобактерій спричиняє найбільшу статистично достовірну протимікробну, протибіоплівкову дію відносно грампозитивних та грамнегативних мікроорганізмів порівняно з контролем та з усіма

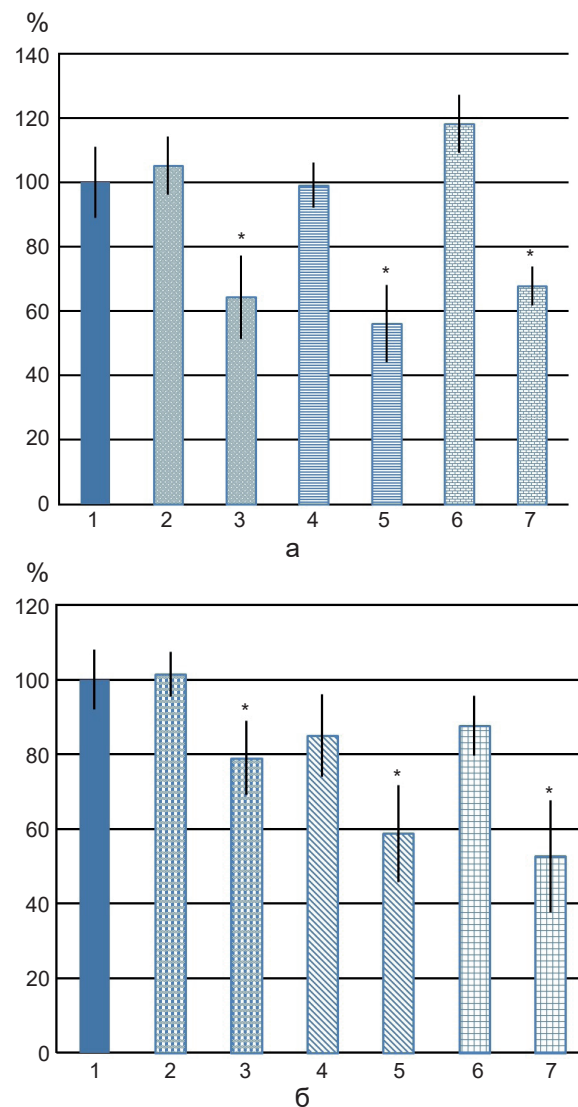


Рис. 1. Вплив фільтратів, що містять структурні компоненти та продукти метаболізму лактобактерій, на метаболічну активність ембріональних фібробластів і спленоцитів миші, визначену за МТТ- (а) та резазурин-тестами (б): 1 – контроль, 2, 3 – фільтрати дезінтеграції лактобактерій, 5 і 20% відповідно, 4, 5 – фільтрати метаболітів лактобактерій, отриманих при культивуванні продуцентів у власних дезінтегратах, 5 і 20% відповідно, 6, 7 – фільтрати метаболітів лактобактерій і сахароміцетів, отриманих при культивуванні мікроорганізмів у дезінтегратах лактобактерій, 5 і 20% відповідно



дослідними фільтратами.

Наші результати підтверджують дані Maghsood із співавт. [12], які досліджували вплив супернатанта культуральної рідини *Lactobacillus rhamnosus* GG (1, 2, 5, 10, 15, 20 та 50%) на проліферацію макрофагів моноцитарного походження (THP-1) за допомогою МТТ-тесту. Інгібування метаболічної активності тест-клітин (50%) спричиняла наявність у середовищі культивування супернатанту зазначених лактобактерій у концентрації 14% та лактату у відповідній концентрації. Тому автори пов'язали це з кислотністю, зумовленою дією лактату [12].

В інших дослідженнях на клітинних лініях раку товстої кишки (Caco-2 та HT-29) і нормальних клітин (L-929) вивчали антипроліферативну активність термічно інактивованих клітин (оптична густина при  $\lambda = 620$  нм: 0,025; 0,05; 0,1) та безклітинного супернатанту (2,5; 5 і 10 мг/мл) комерційного штаму *Lactobacillus rhamnosus* GG, використовуючи МТТ-тест. Результати показали: як «убиті» клітини, так і безклітинний супернатант пригнічують ріст ракових та нормальних клітин [13].

Одержані результати щодо концентраційнозалежного впливу фільтратів дезінтегратів та метаболітів лактобактерій на метаболічну активність тест-клітин подібні до даних інших авторів. Так, Orlando з співавт. [14] дослідили вплив екстрактів клітинних стінок та цитоплазми *Lactobacillus rhamnosus* GG на ріст і проліферацію клітин раку шлунка HGC-27 та аденокарциноми товстої кишки людини DLD-1 за МТТ-тестом. Незважаючи на суттєві відмінності між цими клітинами, вони виявили однакову чутливість до досліджуваних структур лактобактерій. Обидва види тест-клітин були стійкими до фракцій стінки бактеріальної клітини, тоді як збільшення концентрації фракцій цитоплазми викликало очевидний антипроліферативний ефект щодо них. Також було показано, що лізат *Lactobacillus rhamnosus* GG (отриманий з  $10^8$  КУО/мл бактерій) не впливає на життєздатність

нормальних епідермальних кератиноцитів людини, визначену за допомогою МТТ-тесту [15]. Концентрація клітин пробіотичних штамів, від яких отримані метаболіти, відповідала обраний в нашому експерименті.

Фільтрати дезінтегратів сахароміцетів та метаболітів сахароміцетів, при додаванні до середовища інкубації у концентрації 5% не змінюють метаболічну активність тест-клітин, що збігається з впливом дослідних фільтратів лактобактерій, які представлені на рис. 2, а. У разі підвищення вмісту фільтратів сахароміцетів у середовищі інкубації до 20% показано відмінні результати, які залежали від досліджуваної біологічно активної речовини. За однакового вмісту в інкубаційному середовищі (20%) фільтрати дезінтегратів сахароміцетів не спричиняли достовірного пригнічення метаболічної активності фібробластів, а їхні метаболіти призводили до статистично значущого пригнічення тест-клітин. Так, фільтрати MS знижували рівень метаболічної активності ембріональних фібробластів миші до  $80,67 \pm 6,8\%$ , а метаболіти LS – до  $75,94 \pm 5,7\%$ .

Відсутність пригнічення активності тест-клітин за концентрації в середовищі культивування фільтратів сахароміцетів 5% узгоджуються з даними аналогічних досліджень. При застосуванні МТТ-тесту фрагменти клітинних стінок та цитоплазматичні компоненти *Saccharomyces boulardii* з препарату Bioflor® не впливали на життєздатність і проліферативну активність ракових клітин кишкового епітелію (HT-29) [16].

Протилежні дані отримано іншими авторами: дослідження цілих клітин *Saccharomyces boulardii* в МТТ-тесті виявили, що концентрація пробіотика близько 8 мкг/мл викликає 50%-ве пригнічення метаболізму «безсмертних» клітин раку шийки матки HeLa [17]. Також інгібуючий вплив різних концентрацій фрагментів клітинних стінок та компонентів цитоплазми *Saccharomyces boulardii*, отриманих за допомогою ультразвукової дезінтеграції, на клітини хронічного

мієлолейкозу (K562) з використанням МТТ-тесту було виявлено Boniadi із співавт. [18].

Таким чином, значення активності метаболітів збігаються з літературними даними: інтенсивність впливу речовин *Lactobacillus rhamnosus* та *Saccharomyces boulardii* на тест-

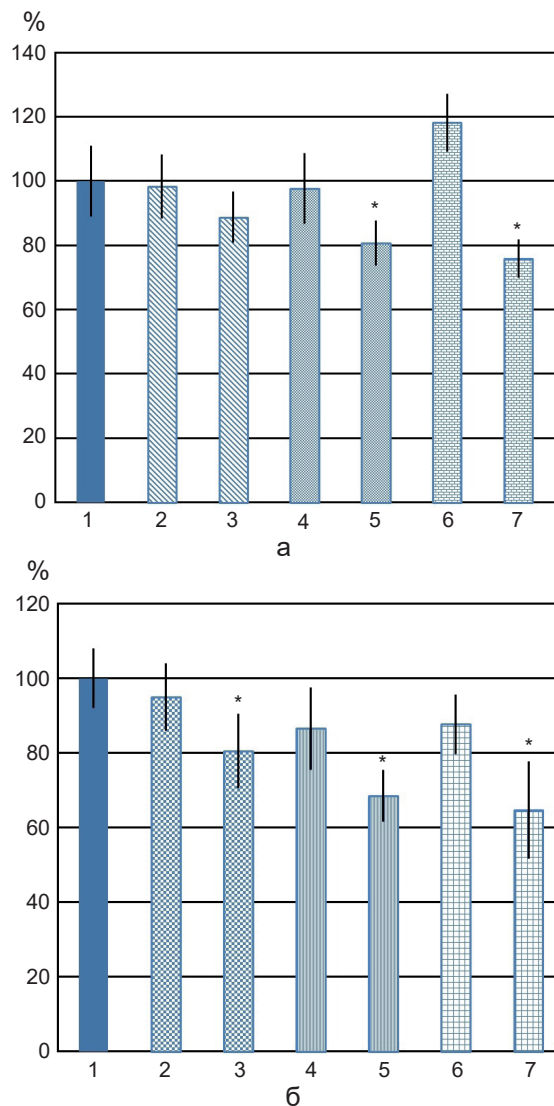


Рис. 2. Вплив фільтратів, що містять структурні компоненти та продукти метаболізму сахароміцетів, на метаболічну активність ембріональних фібробластів і спленоцитів миші, визначену за МТТ- (а) та резаурин-тестами (б): 1 – контроль, 2, 3 – фільтрати дезінтегратів сахароміцетів, 5 і 20% відповідно, 4, 5 – фільтрати метаболітів сахароміцетів, отриманих при культивуванні продуцентів у власних дезінтегратах, 5 і 20% відповідно, 6, 7 – фільтрати метаболітів сахароміцетів, отриманих при культивуванні продуцентів у дезінтегратах лактобактерій, 5 і 20% відповідно

клітини залежить від концентрації досліджуваних продуктів пробіотичного походження.

Вміст у середовищі інкубації фільтрату дезінтеграту лактобактерій (5%) не змінює метаболічної активності спленоцитів, визначеної у резаурин-тесті (див. рис. 1, б). Додавання до середовища інкубації фільтратів, що містять метаболіти лактобактерій та сахароміцетів супроводжується появою тенденції до пригнічення цього показника. Збільшення вмісту всіх видів фільтратів у середовищі інкубації до 20% викликає вірогідне зниження життєздатності спленоцитів: L до  $79 \pm 6,4\%$ , ML до  $58,8 \pm 1,9\%$ , MLS до  $52,6 \pm 0,6\%$ .

Метаболічна активність спленоцитів миші, визначена за резаурин-тестом, збігається з результатами МТТ-тесту, й доводить, що вираженість пригнічуючого ефекту має концентраційнозалежний характер. Відмінні дані одержано Bauer із співавт. [19], які проводили дослідження *in vitro* для визначення активації спленоцитів під дією бактеріальних екстрактів, що містять компоненти клітин *Lactobacillus rhamnosus* 71.38. Збільшення метаболічної активності клітин селезінки миші після обробки екстрактом спостерігали за допомогою Alamar Blue-аналізу. Отримані різними способами екстракти ефективно стимулювали метаболізм клітин при розведенні 1:300 [19]. Такий протилежний ефект пояснюється застосуванням авторами дослідних речовин у низьких концентраціях. Згідно з літературними даними малі дози біологічно активних речовин стимулюють біологічні показники, а великі – інгібують [20].

Фільтрати ультразвукового дезінтеграту сахароміцетів та культур сахароміцетів і лактобактерій, вирощених у дезінтегратах, у концентрації 5% не викликали достовірного зниження метаболічної активності спленоцитів (див. рис. 2, б). Підвищення їх вмісту до 20% призводило до вірогідного пригнічення метаболізму спленоцитів. MS спричиняли зниження тест-клітин до  $68,5 \pm 4,1\%$  та LS – до  $64,7 \pm 3,3\%$ , що підтверджує дані впливу досліджуваних речовин на метаболічну ак-

тивність ембріональних фібробластів миші із застосуванням МТТ-тесту.

Незважаючи на однаковий вміст фільтратів дезінтегратів сахароміцетів в інкубаційному середовищі (20%), достовірного пригнічення метаболічної активності ембріональних фібробластів миші за МТТ-тестом не спостерігалось, а за резаурин-тестом вона значно пригнічувалася до  $80,5 \pm 6,8\%$  (див. рис. 2). Такі відмінності можна пояснити більшою чутливістю резаурин-тесту порівняно з МТТ-тестом. Відсутність пригнічення проліферації спленоцитів встановлено Farkuddin із співавт. [21] при введенні пробіотичного штаму сахароміцетів – *Saccharomyces cerevisiae* IFST062013 мишам.

МТТ- та резаурин-тести передбачають застосування клітин різного походження. Вони можуть бути як прикріплені до підкладки, так і знаходитися в суспензії [2–4]. Єдиним загальним недоліком визначення метаболічної активності із застосуванням тетразолію та резаурину є необхідність інкубації субстрату з життєздатними клітинами при 37°C протягом певного часу, що підвищує ймовірність виникнення артефактів внаслідок хімічних взаємодій реагентів, досліджуваних сполук та біохімічно активних компонентів клітин [3, 4].

Відновлення МТТ відображає метаболізм живих клітин, а не специфічну проліферацію. Беручи до уваги його цитотоксичність, такий тест розглядають як кінцевий. Основні переваги тесту відновлення резаурину полягають у тому, що він відносно недорогий, більш чутливий, ніж МТТ-тест і дає змогу використовувати клітини у наступних дослідженнях. Крім того, його можна поєднувати у мультиплексному дослідженні з іншими методами, як, наприклад, вимірювання активності каспази для отримання додаткової інформації щодо механізмів цитотоксичності [3, 4].

Таким чином, ефективність похідних пробіотичних мікроорганізмів залежить від штаму продуцента та способу отримання біологічно активного продукту, а вираженість

пригнічуючого ефекту має концентраційно-залежний характер. У результаті проведених досліджень встановлено, що ембріональні фібробласти і спленоцити миші виявили майже однакову чутливість до фільтратів лактобактерій та сахароміцетів, а інтенсивність впливу досліджуваних біологічно активних речовин залежить від їхньої концентрації. Вміст фільтратів у середовищі інкубації у концентрації 5% не змінює метаболічну активність обох видів тест-клітин при використанні різних редокс-індикаторів (МТТ- та резаурин-тести). Підвищення вмісту досліджуваних фільтратів у середовищі інкубації до 20% супроводжується вірогідним пригніченням метаболічної активності ембріональних фібробластів та спленоцитів миші. Отримані результати дослідження цитотоксичності дезінтегратів та метаболітів *Lactobacillus rhamnosus* та *Saccharomyces boulardii*, одержаних за авторською методикою без використання традиційних поживних середовищ, можуть бути використані для створення протимікробних засобів нового покоління. Такий напрямок є актуальним та перспективним і потребує додаткових досліджень.

*The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.*

**Е. Ю. Исаенко, О. В. Кныш, О. В. Фалько,  
В. Ю. Прокопюк, О. С. Прокопюк**

#### **ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ СТРУКТУРНО-МЕТАБОЛИТНЫХ КОМПЛЕКСОВ *LACTOBACILLUS RHAMNOSUS* GG И *SACCHAROMYCES BOULARDII***

Исследовано влияние структурно-метаболитных комплексов *Lactobacillus rhamnosus* и *Saccharomyces boulardii* на жизнеспособность тест-клеток – фибробластов эмбрионов мыши и спленоцитов мыши – по их метаболической активности. Дезинтеграты, представляющие собой структурные

компоненты, получены благодаря низкочастотной ультразвуковой обработки пробиотических клеток *Lactobacillus rhamnosus* GG или *Saccharomyces boulardii*. Метаболиты получены по авторской методике путем культивирования лактобактерий и сахаромикетов в собственных дезинтегратах, а их комбинация – в дезинтегратах лактобактерий. Цитотоксичность дезинтегратов и метаболитов изучали с помощью тестов *in vitro*. Содержание фильтратов в среде инкубации в концентрации 5% не меняет метаболической активности исследованных видов тест-клеток при использовании различных редокс-индикаторов (MTT и Alamar Blue®). Повышение содержания фильтратов в среде инкубации до 20% сопровождается достоверным угнетением метаболической активности эмбриональных фибробластов (от  $56,19 \pm 1,4$  до  $88,73 \pm 8,6\%$ ) и спленоцитов мыши (от  $52,63 \pm 0,7$  до  $80,5 \pm 6,8\%$ ) в зависимости от активности бесклеточного продукта. Полученные результаты исследования цитотоксичности и определения концентрации независимого характера влияния дезинтегратов и метаболитов *Lactobacillus rhamnosus* и *Saccharomyces boulardii*, полученных по авторской методике без использования традиционных питательных сред, могут быть использованы для создания противомикробных средств нового поколения.

Ключевые слова: эмбриональные фибробласты; спленоциты мыши; MTT; Alamar Blue®; метаболическая активность.

**O. Y. Isayenko<sup>1</sup>, O. V. Knysh<sup>1</sup>, O. V. Falko<sup>2</sup>, V. Y. Prokopyuk<sup>2</sup>, O. S. Prokopyuk<sup>2</sup>**

# **CYTOTOXICITY STRUCTURAL-METABOLITIC COMPLEXES OF LACTOBACILLUS RHAMNOSUS GG AND SACCHAROMYCES BOULARDII**

The effect of the structural-metabolic complexes of *Lactobacillus rhamnosus* and *Saccharomyces boulardii* on the viability of test cells – mouse embryo fibroblasts and mouse splenocytes – was investigated by their metabolic activity. Disintegrates, which are structural components, obtained through the low-frequency ultrasonic treatment of the probiotic cells of *Lactobacillus rhamnosus* GG or *Saccharomyces boulardii*. Metabolites obtained by the author's method by cultivating lactobacilli and saccharomycetes in their own disintegrate, and their combination - in the disintegrate of lactobacilli. The cytotoxicity of disintegrate and metabolites was studied using tests *in vitro* characterizing the metabolic activity of cells. The content of the filtrate in the incubation medium at a concentration of 5% does not alter the metabolic activity of both studied types of test cells using different oxidative indicators (MTT and Alamar Blue®). The increase in the content of the studied filtrate in the incubation medium to 20% is accompanied by statistically significant inhibition of the metabolic activity of embryonic fibroblasts (from  $56.19 \pm 1.4$  to  $88.73 \pm 8.6\%$ ) and mouse splenocytes (from  $52.63 \pm$

$0.7$  to  $80.5 \pm 6.8\%$ ) depending on active cell-free product. The obtained results of the study of cytotoxicity and determination of the concentration-dependent nature of the influence of disintegrates and the metabolites of *Lactobacillus rhamnosus* and *Saccharomyces boulardii*, obtained by the author's method without using traditional nutrient media, can be used to create antimicrobial agents of the new generation.

Key words: embryonic fibroblasts; mouse splenocytes; MTT; Alamar Blue®; metabolic activity.

<sup>1</sup>SE "I. Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology of NAMS of Ukraine", Kharkiv;

<sup>2</sup>Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv; e-mail: el\_isaenko@ukr.net

## **REFERENCES**

1. Virchenko OV, Falalyeyeva TM, Beregova TV, Spivak MY, Lazarenko LM, Demchenko OM. Effects of mono-, poly- and composite probiotics on the ulceration caused by restraint stress. Fiziol Zh. 2015;61(1):35-41. [Ukrainian].
2. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, Minor L. Cell viability assays. USA: Eli Lilly & Co and National Centre for Advancing Translational Sciences; 2016.
3. Anikina LV, Pukhov SA, Dubrovskaya ES. Comparative determination of cell viability using MTT and resazurin. Basic Res. 2014;12(7):1423-7. [Russian].
4. Präbst K, Engelhardt H, Ringgeler S, Hübner H. Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin. Methods Mol Biol. 2017;1601:1-17.
5. Atlas RM. Handbook of Microbiological Media. – 4th edition. – London New York: Boca Raton: CRC Press; 2010.
6. Isayenko OYu, Knysh OV, Babych YeM, Kivva FV, Horbach TV, Balak OK. inventor; DU«IMI NAMN», assignee. Method of producing metabolites of probiotic bacterial strains. Ukrainian patent UA 123122.2018 Feb. 12. [Ukrainian].
7. Isayenko OYu, Knysh OV, Babych YeM, Vashchenko V, Zachepko SV, Polyanska VP, Kovalenko OI, Balak OK. inventor; DU«IMI NAMN», assignee. A method of obtaining a combination of metabolites of probiotic strains of fungi and bacteria. Ukrainian patent. UA 126603. 2018 Jun. 25. [Ukrainian].
8. Jozefczuk J, Drews K, Adjaye J. Preparation of mouse embryonic fibroblast cells suitable for culturing human embryonic and induced pluripotent stem cells. J Vis Exp. 2012;64:3854.
9. Isayenko YeYu, Knysh OV, Babych YeM, Kivva FV, Balak AK, Naboychenko YeA. The influence of metabolic products of *Lactobacillus rhamnosus* GG on the test-culture of *Staphylococcus* and *Corynebacterium*. Bull Probl Biol Med. 2017;2(136):246-51. [Ukrainian].
10. Isayenko OYu, Knysh OV, Babych YeM, Kompaniyets



- AM, Osetsyky OI, Polyanska VP, Zacheplyo SV. Influence of storage of probiotic broth culture filtrates on their antimicrobial activity. *Probl Kriobiol Kriomed.* 2017;27(4):311-21. [Ukrainian].
11. Isayenko OY, Knysh OV, Babych YM, Ryzhkova TN, Dyukareva GI. Effect of disintegrates and metabolites of *Lactobacillus rhamnosus* and *Saccharomyces boulardii* on biofilms of antibiotic resistant conditionally pathogenic and pathogenic bacteria. *Regul Mech Biosyst.* 2019;10(1):3-8. [Ukrainian].
12. Maghsood F, Mirshafiey A, Farahani MM, Modarressi MH, Jafari P, Motevaseli E. Dual Effects of cell free supernatants from *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus rhamnosus* GG in regulation of MMP-9 by up-regulating TIMP-1 and down-regulating CD147 in PMA differentiated THP-1 cells. *Cell J.* 2018;19(4):559-68.
13. Sadeghi-Aliabadi H, Mohammadi F, Fazeli H, Mirlohi M. Effects of *Lactobacillus plantarum* A7 with probiotic potential on colon cancer and normal cells proliferation in comparison with a commercial strain. *Iran J Basic Med Sci.* 2014;17(10):815-19.
14. Orlando A, Messa C, Linsalata M, Cavallini A, Russo F. Effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG on proliferation and polyamine metabolism in HGC-27 human gastric and DLD-1 colonic cancer cell lines. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2009;31(1):108-16.
15. Sultana R, McBain, AJ, O'Neill CA. Strain-dependent augmentation of tight-junction barrier function in human primary epidermal keratinocytes by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* lysates. *Appl Environ Microbiol.* 2013;79(16):4887-894.
16. Lee SK, Kim HJ, Chi SG, Jang JY. Bioflor suppresses expression of Interleukin-8 in HT-29 cell. *Intestinal Res.* 2004;2(2):96-101.
17. Aishwarya R, Jennifer Joseph. Anti-cancer activity of the microorganism *Saccharomyces boulardii* in probiotics. *Ind J Sci.* 2016;23(87):818-22.
18. Boniadi F, Tukmechi A, Nejati V. Comparative study on the effect of obtained cell wall and cytoplasmic fraction from *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces boulardii* on k562 cell line. *Pharmaceut Sci.* 2012;18(1):69-78.
19. Jacques AB. inventor; Bauer. Immunomodulatory extracts from lactobacillus bacteria and methods of manufacturing and use thereof. US patent. US 20100055082 A1. 2008.
20. Shafran LM, Mokienko AV, Petrenko NF, Gozhenko AI, Nasibulin BA. To the substantiation of hormesis as fundamental biomedical paradigm (review of literature data and results of own researches). *Modern Probl Toxicol.* 2010;49-50(2-3):13-23. [Russian].
21. Fakruddin M, Hossain MN, Ahmed MM. Antimicrobial and antioxidant activities of *Saccharomyces cerevisiae* IFST062013, a potential probiotic. *BMC Compl Alternative Med.* 2017;17:64.

Матеріал надійшов  
до редакції 06.02.2019