

С.В. Гоголь,
П.А. Вірич,
Н.І. Федосова,
Н.Л. Черемшенко,
К.Д. Тарнопольська,
І.М. Восійкова,
В.Ф. Чехун

Інститут експериментальної
патології, онкології і радіобіології
ім. Р.Є. Кавецького НАН України,
Київ, Україна

Ключові слова: пухлинний
процес, *B. animalis subsp. lactis*
BB-12, *L. rhamnosus GG*,
макрофаги, поляризаційний
стан

DOI: <https://doi.org/10.15407/oncology.2025.02.129>

ІМУНОМОДУЛЮЮЧИЙ ЕФЕКТ ПРОБІОТИКІВ *B. ANIMALIS* *SUBSP. LACTIS BB-12* ТА *L. RHAMNOSUS GG* В УМОВАХ ПУХЛИННОГО ПРОЦЕСУ

Мета: експериментальне дослідження впливу *B. animalis subsp. lactis BB-12* та *L. rhamnosus GG* на функціональну активність макрофагів інтактних тварин та тварин з модельним пухлинним процесом. **Об'єкт і методи:** дослідження проведені на мишах-самках лінії Balb/c. В якості експериментальної моделі використана аденокарцинома Ерліха (АКЕ). Проведено 2 серії експериментів: I — пробіотики *B. animalis subsp. lactis BB-12* або *L. rhamnosus GG* вводили інтактним тваринам; II — пробіотики вводили тваринам з перещепленою пухлиною. Схеми введення препаратів були однаковими — протягом 28 днів, щоденно, *per os*, по 7×10^5 КУО/мишу. Параметри функціональної активності макрофагів (Мф) визначали за рівнем продукції NO, аргіназною (Arg) активністю, продукцією цитокінів TNF- α та IL-10. У тварин з модельною пухлиною додатково визначали рівні продукції активних форм кисню (АФК) та фагоцитарну активність Мф. Статистичну обробку результатів проводили за загально прийнятими методами варіаційної статистики. **Результати:** за відсутності пухлинного процесу застосування *B. animalis subsp. lactis BB-12* призводило до незначного зниження рівнів продукції NO (в 1,1 раза) та суттєвого зростання активності Arg (в 1,8 раза, $p < 0,05$). За умови застосування *L. rhamnosus GG* ці показники статистично достовірно не відрізнялись від таких у інтактних тварин. Напрямок змін продукованих Мф цитокінів залежав від використаного пробіотика: відмічали суттєве зростання рівнів IL-10 і зниження TNF- α при застосуванні біфідобактерій та збереження продукції цитокінів на рівні показників інтактного контролю при застосуванні *L. rhamnosus GG*. Аналогічні результати отримані при дослідженні впливу даних пробіотиків на поляризаційний стан Мф тварин з модельним пухлинним процесом. За показниками метаболізму L-аргініну, рівнями продукції АФК, спектром продукованих цитокінів, фагоцитарною активністю продемонстровано, що бактерії штаму *B. animalis subsp. lactis BB-12* сприяють поляризації Мф до клітин з фенотипом M2, які необхідні для обмеження надмірного запального процесу, проте мають пропухлинні властивості. Використання бактерій штаму *L. rhamnosus GG* мало протилежний ефект — відмічали тривале збереження поляризаційного стану Мф M1 навіть на віддалених термінах росту пухлини, що є важливим для підтримання протипухлинної імунної відповіді. **Висновок:** можливість цілеспрямованої зміни поляризаційного стану і, відповідно, функціональних властивостей, макрофагів за умови використання пробіотичних засобів з визначеними заздалегідь властивостями може бути корисною при лікуванні пацієнтів з різними патологічними станами.

Мікробіоту кишківника розглядають сьогодні як окремий функціональний орган, який має велике значення для підтримки гомеостазу. Її дисбаланс може призводити до розвитку широкого спектра захворювань — від інфекційно-запальних патологій до нейродегенеративних порушень та раку. У цьому контексті пробіотики виступають

не лише як корисні симбіонти, а й як біоактивні агенти, що беруть участь у регуляції імунної відповіді, метаболізму, забезпеченні бар'єрної функції епітелію, а також у міжбактеріальній взаємодії через механізми перехресного живлення [1].

Штами *Bifidobacterium* широко використовують в якості пробіотиків. Вивчення властивостей та

ефективності використання біфідобактерій привертають увагу дослідників завдяки їх потенційним імунорегуляторній [2] та протипухлинній активності [3]. Взаємодія біфідобактерій з організмом людини чи тварин є багаторівневою. Представники родини *Bifidobacterium* пов'язані із захистом слизової оболонки від адгезії патогенів, посиленням бар'єрної функції епітелію кишківника, покращенням місцевої та загальної імунної відповіді [4, 5].

Показана здатність представників різних штамів *Bifidobacterium* стимулювати як лімфоцити (природні кілери, Т-клітини), так і макрофаги (Мф) для виділення широкого спектра медіаторів, які відіграють ключову роль в контролі запалення та регуляції процесів активації / супресії імунної відповіді [6]. Колонізація кишківника біфідобактеріями сприяє дозріванню Т-лімфоцитів, збільшує популяцію $CD4^+CD45RO^+$ Т-клітин пам'яті і приймає участь в посиленні мітоген-індукованої відповіді за рахунок продукції цитокінів (IL-13, IL-5, IL-6, TNF) мононуклеарними клітинами [7, 8]. Також дослідники вказують на те, що різні штами *Bifidobacterium* здатні впливати на фенотип і функцію Мф, можуть модулювати їх прозапальну реакцію після стимуляції ліпополісахаридами та сприяти проліферації і фагоцитозу [9].

L. rhamnosus GG є одним із найбільш широко вивчених та описаних у науковій літературі пробіотичних штамів. Його потенціал у лікуванні і профілактиці діареї, дитячих інфекцій, алергії та атипової екземи клінічно задокументований. Лактобактерії відіграють важливу роль у фізіологічних процесах, що відбуваються в кишківнику. Їх застосування асоційоване зі зменшенням апоптозу кишкового епітелію, збереженням цілісності цитоскелета, покращенням стану кишкових крипт. Експериментальне дослідження показало, що застосування як власне лактобактерій, так і продуктованих ними розчинних факторів призводило до збільшення експресії Toll-подібних рецепторів (TLR) антигенпрезентуючими клітинами та активації імунної відповіді по Th1-типу, про що свідчить значне збільшення секреції прозапальних цитокінів: IL-1 α , інтерферону-гамма (IFN γ), фактору некрозу пухлин-альфа (TNF α) [10].

Здатність пробіотичних бактерій модулювати імунну відповідь зумовлює ефективність їх використання в клінічній практиці, зокрема у пацієнтів із хронічними запальними захворюваннями. Проте, потрібно зазначити, що представники мікроорганізмів, які належать до різних родів, або навіть штамів часто мають протилежний вплив на імунну систему. Важливою особливістю *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 є його властивість змінювати цитокіновий профіль, зокрема знижувати рівень продукції прозапальних цитокінів та стимулювати продукцію макрофагами IL-10 — одного з клю-

зових регуляторних факторів імунної відповіді. Тобто представники цього штаму біфідобактерій демонструють здатність до зміщення поляризації Мф у напрямку M2-фенотипу, що обумовлює терапевтичний ефект при станах, пов'язаних з хронічним запаленням кишківника [11]. У свою чергу, LGG активує сигнальні шляхи, характерні при формування імунної відповіді, опосередкованої Т-лімфоцитами хелперами 1 та 17 (Th1 та Th17), що дозволяє ефективно активувати неспецифічний імунітет, підвищувати фагоцитарну активність Мф, стимулювати продукцію імунними клітинами прозапальних медіаторів [12].

Хоча позитивні властивості представників різних штамів *Bifidobacterium* spp. та *Lactobacillus* spp. добре відомі, їх участь реалізації протипухлинної імунної відповіді достатньо не досліджена. Попри численні клінічні підтвердження ефективності використання пробіотичних штамів, залишаються відкритими багато питань щодо механізмів їх дії, особливостей впливу на реакції специфічного та адаптивного імунітету в нормі та при патологічних станах (зокрема і при злоякісних процесах). Враховуючи, що Мф одними з перших клітин імунної системи реагують на розвиток будь-яких патологічних процесів, важливим є дослідження змін показників їх функціональної активності внаслідок введення пробіотиків. Як імунорегуляторні клітини, Мф можуть як активувати і підтримувати запалення, так і гальмувати його за рахунок такої властивості як пластичність — здатність змінювати свій поляризаційний стан у відповідь на сигнали зовнішнього середовища. Взаємодія бактеріальних антигенів із Мф може призводити до зміни поляризаційного стану останніх, впливати на рівні продукції та спектр цитокінів, здатних регулювати не тільки місцеву, а й системну імунну відповідь [13–15].

Враховуючи сказане вище нами було проведене експериментальне дослідження впливу *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 та *L. rhamnosus* GG на функціональну активність макрофагів інтактних тварин та тварин із модельним пухлинним процесом.

ОБ'ЄКТ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

В дослідженні використані миші лінії Balb/c (самки, віком 2,0–2,5 міс., масою 19,0–22,0 г), які були одержані з розплідника віварію Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології (ІЕПОР) ім. Р.Є. Кавецького НАН України. Тварини перебували у стандартних умовах віварію з природним режимом освітлення на повноцінному раціоні харчування. Утримання мишей та робота з ними здійснювались відповідно до стандартних міжнародних правил з біологічної етики та Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях [16].

В якості моделі пухлинного росту використана солідна аденокарцинома Ерліха (АКЕ), визнана експериментальною моделлю раку молочної залози людини [17]. Пухлинні клітини одержували з Банку клітинних ліній з тканин людини та тварин ІЕПОР ім. Р.Є. Кавецького НАН України. Для перещеплення пухлин клітини АКЕ вводили внутрішньом'язево в стегно (5×10^5 клітин/мишу).

Штами бактерій. В якості пробіотичних препаратів використані ліофілізовані клітини *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 (Lek Pharmaceuticals, Любляна, Словенія) та *L. rhamnosus* GG (Probiotical S.p.A., Швейцарія). Пробіотики вводили per os, по 7×10^5 КУО/мишу на введення, щоденно, протягом 28 діб.

Схема експерименту. На першому етапі дослідження оцінювали вплив біфідо- і лактобактерій на функціональні властивості перитонеальних макрофагів (пМф) інтактних мишей лінії Balb/c. Експериментальні тварини ($n = 15$) були розподілені на 3 групи: “*B. animalis*” — миші, яким протягом 28 діб per os вводили *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 ($n = 5$); “*L. rhamnosus*” — миші, яким протягом 28 діб вводили *L. rhamnosus* GG ($n = 5$); “Інтактний контроль, ІК” — миші, яким аналогічним чином вводили фізіологічний розчин 0,9% NaCl ($n = 5$). Дослідження функціонального стану пМф проводили через 24 год. після останнього введення пробіотичних препаратів. Визначали наступні показники: неспецифічну цитотоксичну активність, рівень продукції оксиду азоту (NO), активність аргінази (Arg), продукцію цитокінів TNF- α та IL-10.

Другий етап дослідження включав оцінку впливу пробіотиків на функціональну активність пМф мишей лінії Balb/c з перещепленою АКЕ. Сформовано 4 групи експериментальних тварин ($n = 20$): “АКЕ + *B. animalis*” — миші з пухлинами, яким з 2-ї доби після трансплантації АКЕ вводили біфідобактерії ($n = 5$); “АКЕ + *L. rhamnosus*” — миші з АКЕ, яким аналогічно вводили лактобактерії ($n = 5$); “АКЕ” — миші з АКЕ, яким вводили 0,9% NaCl ($n = 5$); “Інтактний контроль, ІК” — миші, яким лише вводили 0,9% NaCl ($n = 5$). На 14- та 28-му доби пухлинного росту визначали показники функціональної активності Мф перитонеальної порожнини: фагоцитарну активність, рівні продукції NO та активності Arg, рівні активних форм кисню (АФК), продукцію цитокінів TNF- α , IL-10.

Цитотоксичну активність Мф по відношенню до пухлинних клітин визначали in vitro з використанням МТТ-тесту [18]. За отриманими даними розраховували індекси цитотоксичності (%).

Рівні продукції NO вимірювали за стандартною реакцією Гріса [19]. Рівень NO представляли в ммоль $\text{NO}^{2-}/10^6$ клітин.

Активність Arg визначали за швидкістю утворення сечовини [19]. Дані представлені в од./ 10^6 клітин. Одна одиниця аргіназної активності дорівнює кількості ферменту, що гідролізує 1 мкмоль аргініну за 1 хв.

Рівні продукції цитокінів TNF- α та IL-10 визначали за допомогою комерційних тест-систем BD OptEIA Set Mouse TNF- α та BD OptEIA Set Mouse IL-10 (BD Biosciences, США) згідно інструкції. Вимірювання оптичної густини проводили при $\lambda = 450$ нм проти $\lambda = 570$ нм на автоматичному рідері StatFax 2100 (США). Рівень TNF- α та IL-10 в пг/мл визначали за калібрувальними кривими.

Визначення **фагоцитарної активності Мф** проводили за методикою, яка наведена в [20]. Перитонеальні Мф вносили в мікропробірки по $0,5 \times 10^6$ клітин, додавали латексні мікросфери з аміномодифікованого полістиролу з червоною флуоресценцією (Sigma-Aldrich, США) у співвідношенні 50 кульок на клітину та інкубували при 37°C протягом 2 год. Зразки промивали 1,5 мл фосфатно-сольового буфера та центрифугували при 400 g протягом 5 хв. Клітини ресуспендували в 0,5 мл фосфатно-сольового буфера та одразу аналізували на проточному цитофлуориметрі (DxFlex, Beckman Coulter, США). Інтенсивність забарвлення клітин аналізували за каналом PI (світлофільтр 647/20 нм BP). Середнє значення флуоресценції (Mean PI) розраховували за гістограмами розподілу флуоресценції з використанням лінійного сегменту. Для врахування фонові аутофлуоресценції досліджували рівень флуоресценції клітин не оброблених препаратом. В подальшому при розрахунках для кожного зразка зі значення середньої інтенсивності флуоресценції PI віднімали показник середньої фонові флуоресценції контрольних клітин. Для кожного зразка було проаналізовано не менше 10000 подій. Аналіз отриманих даних проводили за допомогою програми CytExpert for DxFlex.

Визначення рівня активних форм кисню в клітинах. Перитонеальні Мф вносили в мікропробірки по $0,5 \times 10^6$ клітин, додавали 0,5 мл 15 мкМ розчину 2',7'-дихлорфлуоресцеїн діацетату (Sigma-Aldrich, США) та інкубували 40 хв при 37°C. Після забарвлення клітини промивали в 1,5 мл фосфатно-сольового буфера, центрифугували при 400 g протягом 5 хв, ресуспендували в 0,5 мл фосфатно-сольового буфера та одразу аналізували на проточному цитофлуориметрі (DxFlex, Beckman Coulter, США). Інтенсивність забарвлення клітин 2',7'-дихлорфлуоресцеїн діацетатом аналізували за каналом FITC (світлофільтр 525/40 нм BP). Середнє значення флуоресценції (Mean FITC-A) розраховували за гістограмами розподілу флуоресценції з використанням лінійного сегменту. Для врахування фонові аутофлуорес-

ценції досліджували рівень флуоресценції клітин не оброблених препаратом. У подальшому при розрахунках для кожного зразка зі значення середньої інтенсивності флуоресценції FITC-A віднімали показник середньої фонові флуоресценції контрольних клітин. Для кожного зразка було проаналізовано не менше 10000 подій. Аналіз отриманих даних проводили за допомогою програми CytExpert for DxFlex[21].

Статистичну обробку результатів проводили за загальноприйнятими методами варіаційної статистики з використанням GraphPad Prism 8.0.1 (Graphpad Software Inc., США). Вірогідність різниці між контрольними та дослідними групами оцінювали за *t*-критерієм Стьюдента. Вірогідною вважали різницю між порівнюваними показниками при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Як відомо, Мф є важливими регуляторними клітинами, які відіграють центральну роль як у вроджених, так і в набутих імунних реакціях. Вони виконують широкий спектр функцій, включаючи розпізнавання та презентацію антигенів, імунну регуляцію шляхом вивільнення цитокінів та шляхом міжклітинної взаємодії. Традиційно Мф розділяють на класично активовані прозапальні (М1) та альтернативно активовані імуносупресорні (М2) [22]. Простим інформативним методом у визначенні напрямку поляризації М1/М2 є оцінка рівня продукції NO та активності Arg, оскільки відомо, що в Мф М1 та М2 метаболізм аргініну відбувається різним шляхом. Мф М1 за допомогою iNOS метаболізують аргінін до NO та цитруліну, в той час як аргіназа, яка експресується в Мф М2, гідролізує аргінін до орнітину і сечовини та обмежує доступність аргініну для синтезу NO. Обидва метаболічні шляхи перехресно інгібують один одного. Тому визначення рівня

продукції NO та аргіназної активності зумовлює коректність оцінки поляризаційного статусу М1 або М2 [23].

Результати визначення рівня продукції NO та аргіназної активності в зразках перитонеальних макрофагів інтактних тварин після введення пробіотичних препаратів представлені на *рис. 1*. Як показали результати дослідження, пМф інтактних мишей лінії Balb/c характеризувалися високим рівнем продукції NO ($28,3 \pm 1,7$ NO²-/10⁶ клітин) та низькою аргіназною активністю ($1,4 \pm 0,02$ од./10⁶ клітин). Показник співвідношення NO/Arg становив $20,1 \pm 1,6$ ум.од.

Тривале введення пробіотичних препаратів призводило до змін досліджуваних показників. У тварин, яким вводили *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12, відмічали незначне зниження порівняно з інтактним контролем рівнів продукції NO (до $26,2 \pm 1,9$ NO²-/10⁶ клітин), проте суттєво ($p < 0,05$) збільшувалась активність Arg (до $2,6 \pm 0,1$ од./10⁶ клітин). За рахунок таких змін співвідношення NO/Arg складало $10,2 \pm 1,1$ ум.од., тобто знижувалось порівняно з показником інтактних тварин у 2 рази ($p < 0,05$). Такі дані свідчать про М2 поляризацію макрофагів.

В групі тварин, яким вводили *L. rhamnosus* GG (див. *рис. 1*), рівень продукції NO та аргіназної активності в зразках пМф статистично достовірно не відрізнялись від показників інтактних тварин та складали відповідно $29,4 \pm 2,0$ NO²-/10⁶ клітин та $1,6 \pm 0,1$ од./10⁶ клітин, співвідношення NO/Arg становило $18,7 \pm 1,2$ ум.од.

Як відомо, Мф за рахунок продукції ряду цитокінів здатні регулювати імунну відповідь, посилюючи або пригнічуючи активність інших клітин-ефекторів неспецифічного і специфічного імунітету. За даними літератури, імуностимулюючі властивості Мф М1 обумовлені, зокрема, продукцією прозапальних факторів (IL-1, IL-6, IL-23;

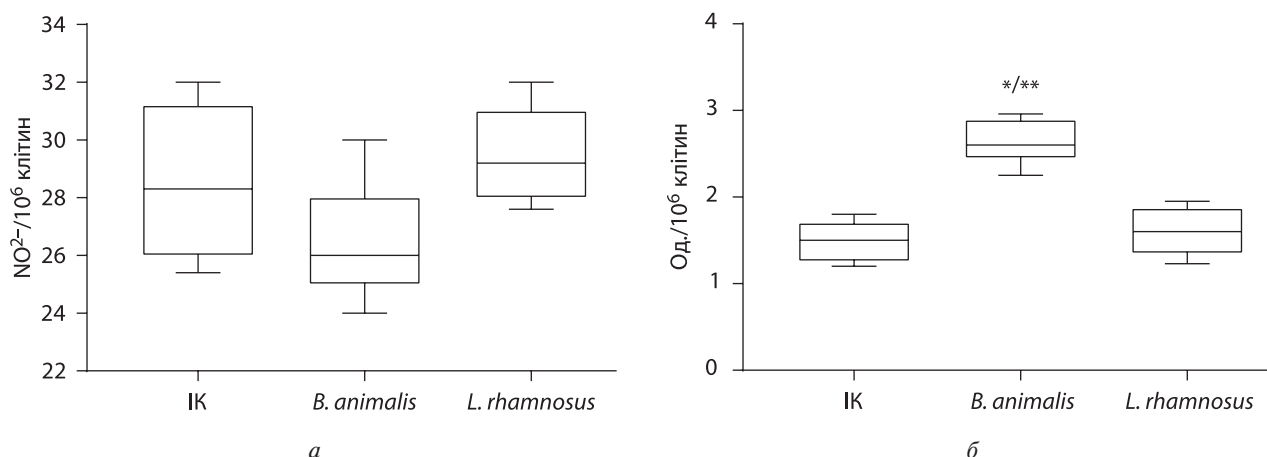


Рис. 1. Особливості метаболізму L-аргініну в зразках пМф інтактних мишей лінії Balb/c після введення пробіотиків: *а* — рівень продукції NO; *б* — активність аргінази. * — $p < 0,05$ порівняно з показником інтактного контролю, ** — $p < 0,05$ порівняно з показниками групи "*L. rhamnosus*"

TNF- α) та подальшою активацією Th1. Мф М2 мають імуносупресорні властивості; ці клітини сприяють диференціюванню Th2, секретуючи протизапальні цитокіни (IL-10, TGF- β , Arg-1 і PGE2) [24, 10].

Тому наступним етапом нашого дослідження стало визначення рівнів продукції IL-10 та TNF- α пМф інтактних мишей і тварин, яким вводили пробіотики. Отримані дані представлені на *рис. 2*.

Застосування *L. rhamnosus* GG не мало суттєвого впливу на продукцію TNF- α , середній вміст якого складав $1015,6 \pm 50,0$ pg/mL (у інтактних тварин — $1079,4 \pm 28,3$ pg/mL). В той же час, у мишей, які отримували *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12, вміст TNF- α був суттєво нижчим — $880,8 \pm 64,5$ pg/mL ($p < 0,05$ порівняно з показниками обох інших груп). Зміни в продукції IL-10 пМф мишей різних груп мали зворотній напрям. Відмічали суттєве зростання продукції IL-10 за умови застосування *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 та його збереження на рівні показників інтактного контролю при введенні *L. rhamnosus* GG. Тобто, зміни спектру продукуваних цитокінів можна модифікувати шляхом стимуляції Мф мікробними компонентами. Такий ефект, зокрема, може пояснити різноспрямованість імунomodуючих функцій (прозапальна / імуностимулююча або протизапальна / імуносупресивна), які демонструють представники різних пробіотичних штамів.

Отримані нами результати узгоджуються з даними наукової літератури. Зокрема, повідомляється, що *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 здатний індукувати поляризацію Мф М2, яка супроводжується зниженням продукції IL-6 та IL-12 з одночасним підвищенням продукції IL-10 [9]. В той же час, пробіотичні штами *Lactobacillus* навпаки, здатні посилювати секрецію цитокінів, які беруть участь у природному імунітеті (IFN- γ , TNF- α , IL-18 та

IL-12) та частіше стимулюють Мф і дендритні клітини до секреції цитокінів М1 (IL-12, TNF- α) [13, 14, 25].

Таким чином, отримані нами результати свідчать про різноспрямований вплив використаних в дослідженні бактеріальних препаратів на процес поляризації Мф інтактних тварин. Зокрема, за всіма досліджуваними показниками продемонстрована здатність підтримувати поляризацію Мф М1 представниками штаму *L. rhamnosus* GG. В той же час, пробіотичний штам *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 володів здатністю змінювати поляризацію Мф в напрямку М2.

В другій серії нашого дослідження було проведено вивчення впливу пробіотичних препаратів на функціональний стан Мф тварин з модельним пухлинним процесом. На *рис. 3* представлені результати оцінки процесів метаболізму L-аргініну в зразках пМф тварин дослідних та контрольних груп на різні терміни росту пухлини.

Як показали результати дослідження, пМф мишей лінії Balb/c з АКЕ, яким не вводили пробіотичні препарати, характеризувалися прогресуючим зниженням рівнів продукції NO та підвищенням активності Arg: на 14-ту добу росту пухлини показник співвідношення NO/Arg становив $14,2 \pm 1,7$ ум.од., на 28-му — $7,4 \pm 0,9$ ум.од. За умови введення *B. animalis* *lactis* BB-12 або *L. rhamnosus* GG на 14-ту добу росту АКЕ рівні співвідношення NO/Arg практично не відрізнялися від показників нелікованих тварин і були суттєво меншими ніж у інтактних мишей (див. *рис. 3*). Однак, у подальшому (28-ма доба росту пухлини) на тлі тривалого введення пробіотичних препаратів спостерігали різноспрямовані зміни досліджуваних показників. Якщо застосування *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 не впливало на процес поляризації Мф (які проявляли характерні властивості М2), то у тварин, яким вводили *L. rhamnosus* GG, відмі-

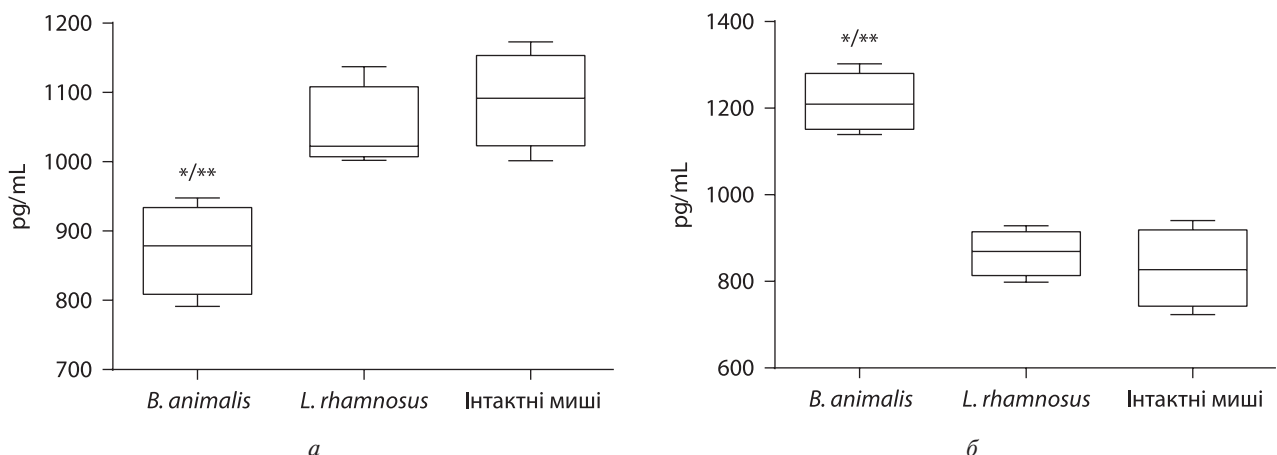


Рис. 2. Рівні продукції TNF- α та IL-10 пМф мишей лінії Balb/c після завершення курсу введення пробіотиків: а — TNF- α ; б — IL-10. * — $p < 0,05$ порівняно з показником інтактного контролю, ** — $p < 0,05$ порівняно з показниками групи “*L. rhamnosus*”

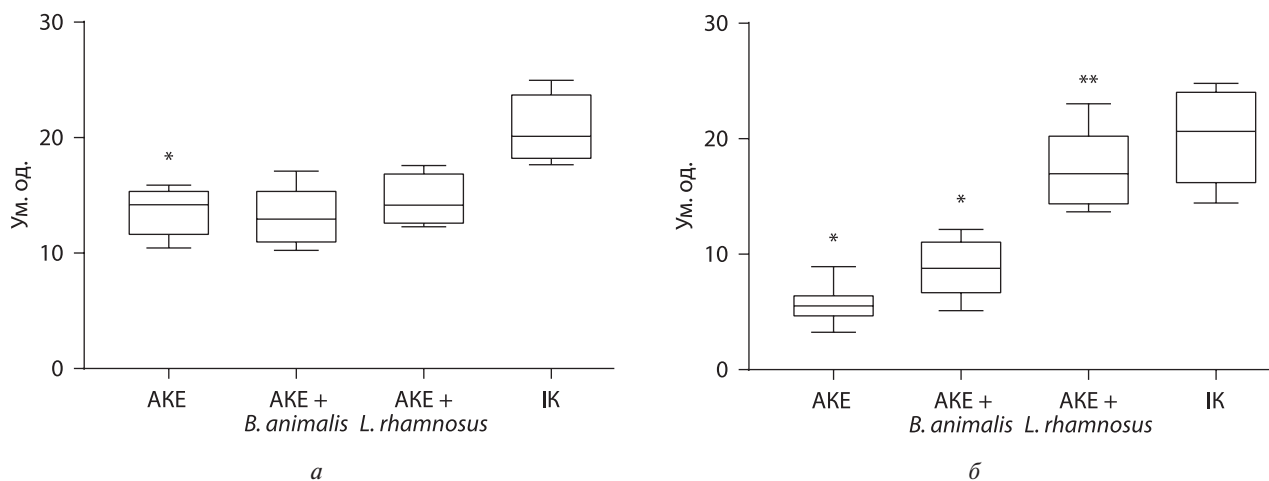


Рис. 3. Рівень співвідношення NO/Arg в зразках пМф мишей з АКЕ за умови введення *B. animalis* та *L. rhamnosus*: а — 14-та доба пухлинного росту; б — 28-ма доба пухлинного росту. * — $p < 0,05$ порівняно з показником інтактного контролю; ** — $p < 0,05$ порівняно з показником групи “АКЕ”

чали збільшення рівня продукції NO та зменшення активності Arg порівняно з показниками нелікованих тварин. За рахунок таких змін співвідношення NO/Arg складало $17,3 \pm 1,7$ ум.од., тобто підвищувалось ($p < 0,05$) порівняно з показником групи “АКЕ” в 2,3 раза, наближуючись до показника інтактних тварин ($20,1 \pm 1,6$ ум.од.), що свідчить про збереження M1 поляризації пМф у тварин цієї групи.

Іншим показником, який відображає функціональні властивості Мф, є продукція АФК. На 14-ту добу росту АКЕ пМф мишей лінії Balb/c характеризувалися підвищеним рівнем продукції АФК (на 48% порівняно з інтактними тваринами). Після введення *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 показники рівня АФК практично не відрізнялися від таких у нелікованих тварин і були вищими (на 41,9%) ніж у інтактних мишей (рис. 4). Після за-

стосування *L. rhamnosus* GG виявлене підвищення рівня АФК: порівняно з нелікованими тваринами в 1,6 раза ($p > 0,05$); інтактними тваринами — в 3,1 раза ($p < 0,05$).

На 28-у добу спостерігали зниження рівня АФК у нелікованих тварин порівняно з інтактними на 23,3%. В той же час, після тривалого введення *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 і *L. rhamnosus* GG в пМф виявлено значне підвищення рівня АФК — в 1,6 раза та 2 рази ($p < 0,05$) відповідно порівняно з показниками тварин групи “АКЕ”. Підвищення рівня АФК в пМф асоційоване з поляризацією Мф M1 типу.

Як відомо, про напрямок поляризації Мф свідчить і спектр продукованих ними цитокінів. На рис. 5 представлені результати визначення рівнів TNF- α та IL-10, які асоційовані відповідно з Мф M1 та M2 типів.

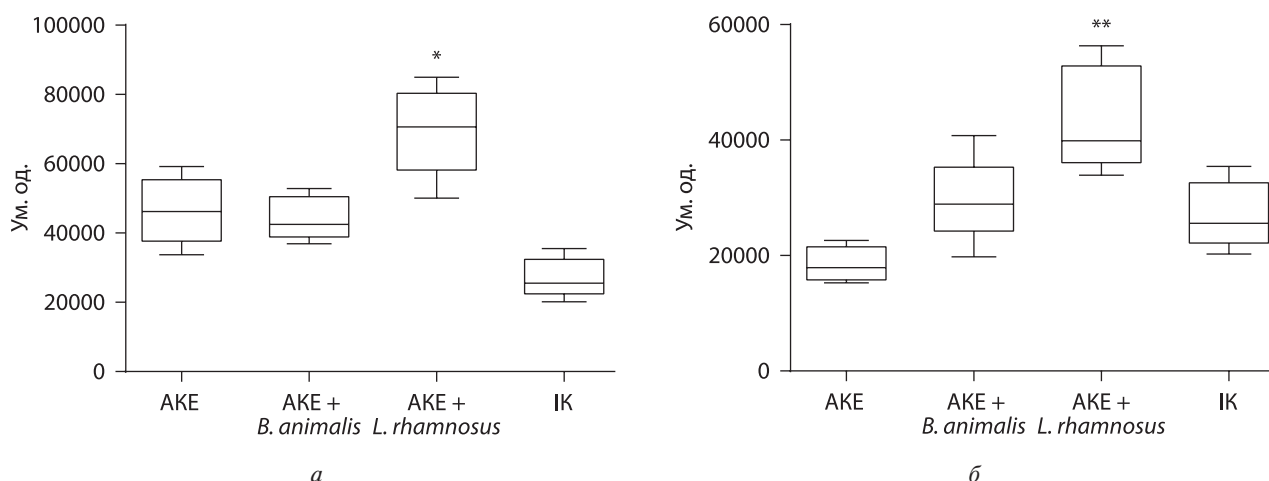


Рис. 4. Рівень продукції АФК пМф мишей з АКЕ за умови введення *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 та *L. rhamnosus* GG: а — 14-та доба пухлинного росту; б — 28-ма доба пухлинного росту. * — $p < 0,05$ порівняно з показником інтактного контролю; ** — $p < 0,05$ порівняно з показником групи “АКЕ”

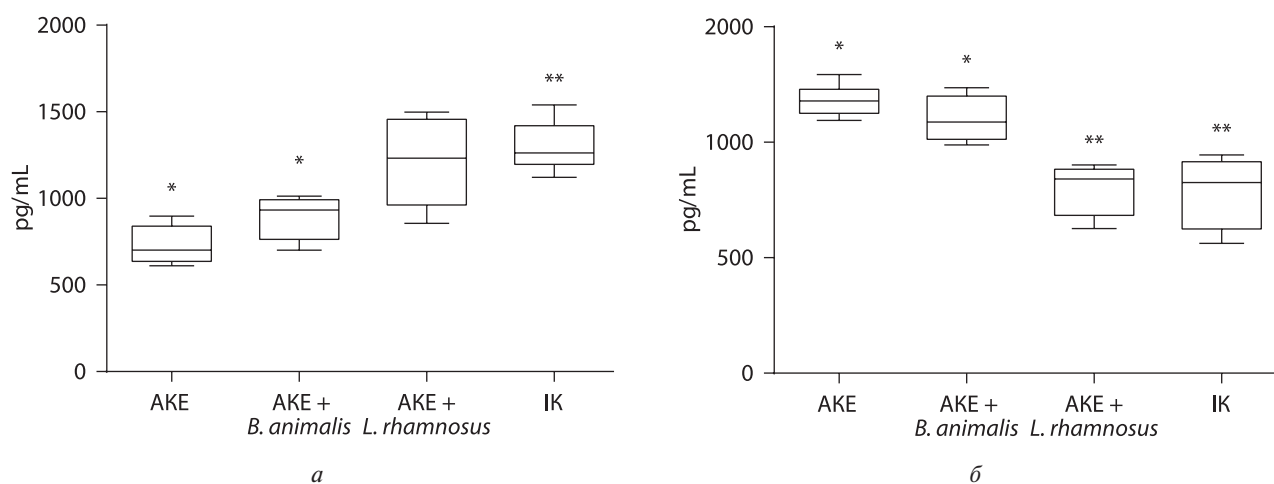


Рис. 5. Рівні продукції TNF- α та IL-10 пМф на 28-му добу росту АКЕ за умови введення *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 та *L. rhamnosus* GG: *а* — TNF- α ; *б* — IL-10. * — $p < 0,05$ порівняно з показником інтактного контролю; ** — $p < 0,05$ порівняно з показником групи “АКЕ”

На 14-ту добу росту АКЕ не було виявлено достовірних відмінностей між рівнями продукції TNF- α та IL-10 пМф тварин всіх досліджуваних груп. Проте, на 28-му добу у нелікованих тварин з пухлинами спостерігали статистично достовірне зниження продукції TNF- α з одночасним збільшенням продукції IL-10 порівняно з показниками інтактного контролю (на 39,8 та 37,3% відповідно, $p < 0,05$), що є характерним для Мф М2. Введення *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 тваринам з пухлинами не впливало на продукцію досліджуваних цитокінів. Проте, у тварин групи “АКЕ + *L. rhamnosus*” рівні продукції обох цитокінів фактично не відрізнялися від показників інтактних мишей (див. рис. 5), що також свідчить про тривале збереження пМф фенотипу М1. Тобто, наші результати підтвердили, що бактерії штаму *L. rhamnosus* GG володіють здатністю індукувати (або підтримувати протягом тривалого часу) поляризацію Мф М1, які володіють імуностимулюючими та протипухлинними властивостями, не лише у інтактних тварин, але й на тлі пухлинного процесу.

На різні терміни росту пухлини було проведено також оцінку фагоцитарної активності Мф тварин контрольних і дослідних груп. У групі “ІК” фагоцитарна активність Мф становила $19896,0 \pm 613,0$ у.о., що відображає фізіологічний рівень активності фагоцитів за відсутності пухлинного процесу. На 14-ту добу у нелікованих тварин з індукованим пухлинним ростом цей показник підвищувався до $37538,0 \pm 3812,9$ у.о., що може свідчити про активацію вроджених механізмів імунної відповіді у відповідь на пухлинний антигенний стимул. Залучення пробіотичних мікроорганізмів, зокрема *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 і *L. rhamnosus* GG, сприяло подальшому зростанню фагоцитарної активності. Так, у групі “АКЕ + *B. animalis*” показник сягнув $58192,3 \pm 3486,5$ у.о., а у групі “АКЕ +

L. rhamnosus” — $56384,2 \pm 18598,0$ у.о. (рис. 6). Це відповідає підвищенню на 55,0 та 50,2% відповідно порівняно з показниками групи “АКЕ”. Отримані дані свідчать про виражений імуностимулюючий вплив пробіотиків, зокрема на фагоцитарну ланку вродженого імунітету. Ймовірно, це зумовлено здатністю пробіотичних штамів впливати на клітинні механізми розпізнавання та елімінації пухлинних клітин [26, 27].

На 28-му добу пухлинного росту спостерігалася виражена зміна фагоцитарної активності пМф. У нелікованих тварин з пухлинами групи “АКЕ” фагоцитарна активність Мф досягла $56185,0 \pm 9086,2$ у.о., що відображає значну активацію вродженого імунітету на фоні прогресуючого пухлинного процесу. Цей рівень є найвищим серед усіх груп, що, ймовірно, зумовлено хронічною стимуляцією фагоцитів пухлинними антигенами. Натомість у групі “АКЕ + *B. animalis*” спостерігалася зниження фагоцитарної активності до $37346,0 \pm 6961,8$ у.о., а в групі “АКЕ + *L. rhamnosus*” — до $24856,0 \pm 7020,3$ у.о. (див. рис. 6). Порівняно з показниками групи “АКЕ” відбулося зниження на 33,5 та 55,8%, відповідно. Ці дані можуть свідчити про нормалізуючий ефект пробіотиків на фагоцитарну ланку імунної відповіді, за рахунок зменшення її надмірної активації, спричиненої пухлиною. Така імуномодуюча дія може бути корисною для зниження хронічного запалення, проте потребує додаткового вивчення, зокрема щодо впливу на перебіг пухлинного процесу.

Отже, фагоцитарна активність, як показник неспецифічної імунної відповіді, демонструє різну динаміку залежно від терміну пухлинного росту та застосованого пробіотика. На 14-ту добу експерименту спостерігалася зростання фагоцитарної активності у всіх групах тварин з пухлинами порівняно з інтактними. Це свідчить про виражений

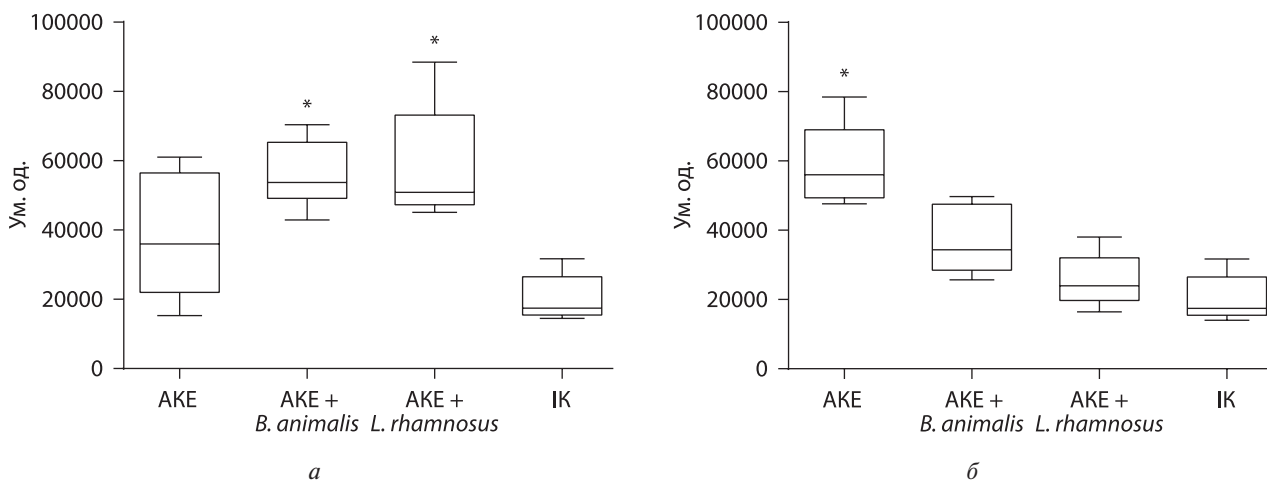


Рис. 6. Фагоцитарна активність пМф мишей з АКЕ за умови введення *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 та *L. rhamnosus* GG: а — 14-та доба пухлинного росту; б — 28-ма доба пухлинного росту. * — $p < 0,05$ порівняно з показником інтактного контролю; ** — $p < 0,05$ порівняно з показником групи “АКЕ”

імуностимулюючий ефект пробіотиків на ранньому етапі пухлинного процесу. Натомість на 28-му добу спостерігалася інша тенденція. У групі нелікованих тварин з пухлиною фагоцитарна активність зросла, демонструючи подальшу активацію неспецифічної імунної відповіді. Проте в групах тварин, яким вводили пробіотики зафіксовано зниження фагоцитарної активності Мф. Тобто, з часом дія пробіотиків набуває нормалізуючого або навіть протизапального характеру, можливо, попереджаючи надмірне стимулювання імунної системи в умовах хронічного пухлинного стресу. Загалом, можливість цілеспрямованої зміни поляризаційного стану і, відповідно, функціональних властивостей, макрофагів за умови використання пробіотичних засобів з визначеними заздалегідь властивостями безумовно може бути корисною для лікування пацієнтів з різними патологічними станами і потребує подальшого дослідження.

ВИСНОВКИ

1. За відсутності пухлинного процесу застосування *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 призводило до незначного зниження порівняно з інтактним контролем рівнів продукції Мф NO (в 1,1 раза, $p > 0,05$) та суттєвого зростання активності Arg (в 1,8 раза, $p < 0,05$). За умови застосування *L. rhamnosus* GG ці показники статистично достовірно не відрізнялись від таких у інтактних тварин.

2. Напрямок змін продукованих цитокінів відрізнявся залежно від використаного пробіотика: відмічали суттєве зростання продукції IL-10 і зниження TNF- α при застосуванні *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 та їх збереження на рівні показників інтактного контролю при введенні *L. rhamnosus* GG.

3. У тварин з модельним пухлинним процесом за показниками метаболізму L-аргініну, рівнями

продукції АФК та спектром продукованих цитокінів продемонстровано, що бактерії штаму *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 сприяють поляризації Мф M2 з пропухлинними властивостями. При використанні штаму *L. rhamnosus* GG відмічали тривале збереження поляризаційного стану Мф M1 навіть на віддалених термінах росту пухлини, що є важливим для реалізації протипухлинної імунної відповіді.

4. Результати, отримані при дослідженні фагоцитарної активності Мф, свідчать про нормалізуючий вплив пробіотиків на фагоцитарну ланку імунної відповіді, зменшуючи її надмірну активацію, спричинену пухлинним процесом.

Робота виконана в рамках НДР “Вивчення впливу представників лактобактерій, біфідобактерій та умовно-патогенних представників мікробіоти людини на особливості реалізації механізмів метаболічних порушень при пухлинному процесі” (№ держреєстрації 0121U113840).

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Thursby E, Juge N. Introduction to the human gut microbiota. *Biochem J* 2017; **474** (11): 1823–36. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160510>.
2. Mazziotta C, Tognon M, Martini F, et al. Probiotics mechanism of action on immune cells and beneficial effects on human health. *Cells* 2023; **12** (1): 184. <https://doi.org/10.3390/cells12010184>.
3. Faghfoori Z, Faghfoori MH, Saber A, et al. Anticancer effects of bifidobacteria on colon cancer cell lines. *Cancer Cell Int* 2021; **21** (1): 258. <https://doi.org/10.1186/s12935-021-01971-3>.
4. Flach J, van der Waal MB, Kardinaal AFM, et al. Probiotic research priorities for the healthy adult population: a review on the health benefits of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12. *Cogent Food Agriculture* 2018; **4**: 1452839. <https://doi.org/10.1080/23311932.2018.1452839>.
5. Yao S, Zhao Z, Wang W, Liu X. *Bifidobacterium longum*: protection against inflammatory bowel disease. *J Immu-*

- no1 Res 2021; **2021**: e8030297. 1 <https://doi.org/0.1155/2021/8030297>.
6. Cristofori F, Dargenio VN, Dargenio C, *et al.* Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of probiotics in gut inflammation: A door to the body. *Front Immunol* 2021; **12**: 578386. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.578386>.
 7. Rabe H, Lundell A-C, Sjöberg F, *et al.* Neonatal gut colonization by *Bifidobacterium* is associated with higher childhood cytokine responses. *Gut Microbes* 2020; **12** (1): 1–14. <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1847628>.
 8. Wu B-B, Yang Y, Xu X, Wang W-P. Effects of *Bifidobacterium* supplementation on intestinal microbiota composition and the immune response in healthy infants. *World J Pediatr* 2016; **12** (2): 177–82. <https://doi.org/10.1007/s12519-015-0025-3>.
 9. Zhang DY, Pan ZY, Yu XK, *et al.* *Bifidobacterium lactis* BB-12 attenuates macrophage aging induced by D-galactose and promotes M2 macrophage polarization. *J Immunol Res* 2019; **2019**: 4657928. <https://doi.org/10.1155/2019/4657928>.
 10. Fong FLY, Kirjavainen PV, El-Nezami H. Immunomodulation of *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG)-derived soluble factors on antigen-presenting cells of healthy blood donors. *Sci Rep* 2016; **6**: 22845. <https://doi.org/10.1038/srep22845>.
 11. Burns P, Alard J, Hrdý J, *et al.* Spray-drying process preserves the protective capacity of a breast milk-derived *Bifidobacterium lactis* strain on acute and chronic colitis in mice. *Sci Rep* 2017; **7**: 43211. <https://doi.org/10.1038/srep43211>.
 12. Habil N, Al-Murrani W, Beal J, Foey AD. Probiotic bacterial strains differentially modulate macrophage cytokine production in a strain-dependent and cell subset-specific manner. *Beneficial Microbes* 2011; **2** (4): 283–93. <https://doi.org/10.3920/BM2011.0027>.
 13. Al-Najjar MAA, Abdulrazzaq SB, Alzaghari LF, *et al.* Evaluation of immunomodulatory potential of probiotic conditioned medium on murine macrophages. *Sci Rep* 2024; **14**: 7126. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-56622-0>.
 14. Guo N, Lv LL. Mechanistic insights into the role of probiotics in modulating immune cells in ulcerative colitis. *Immun Inflamm Dis* 2023; **11** (10): e1045. <https://doi.org/10.1002/iid3.1045>.
 15. Wang Y, Liu H, Zhao J. Macrophage polarization induced by probiotic bacteria: a concise review. *Probiotics Antimicrob Proteins* 2020; **12** (3): 798–808. <https://doi.org/10.1007/s12602-019-09612-y>.
 16. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes ETS 123. Protection of Vertebrate Animals, 18.III.1986. <https://norecopa.no/media/2iydns5h/ets-123-original.pdf>.
 17. Radulski DR, Stipp MC, Galindo CM, Acco A. Features and applications of Ehrlich tumor model in cancer studies: a literature review. *Transl Breast Cancer Res* 2023; **4**: 22. <https://doi.org/10.21037/tbcr-23-32>.
 18. Van de Loosdrecht AA, Beelen RH, Ossenkoppele GJ, *et al.* A tetrazolium-based colorimetric MTT assay to quantitate human monocyte mediated cytotoxicity against leukemic cells from cell lines and patients with acute myeloid leukemia. *J Immunol Methods* 1994; **174**: 311–20.
 19. Reiner NE. Methods in molecular biology. Macrophages and dendritic cells. Methods and protocols. Preface. *Methods Mol Biol* 2009; **531**: v-vi. <https://doi.org/10.1007/978-1-59745-396-7>.
 20. Cai Q, Li Y, Pei G. Polysaccharides from *Ganoderma lucidum* attenuate microglia-mediated neuroinflammation and modulate microglial phagocytosis and behavioural response. *J Neuroinflammation* 2017; **14** (1): 63. <https://doi.org/10.1186/s12974-017-0839-0>.
 21. Konopelnuk VI, Kompanets IV, Svyatetska VM, *et al.* Functional polarization of macrophages of rats with progesterone-induced obesity treated with melanin from the Antarctic yeast *Nadsoniella nigra*. *Regul Mech Biosyst* 2019; **10** (4): 538–43. <https://doi.org/10.15421/021979>.
 22. Chen S, Saeed AF, Liu, Q, *et al.* Macrophages in immunoregulation and therapeutics. *Sig Transduct Target Ther* 2023; **8** (1): 207. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01452-1>.
 23. Karadima E, Chavakis T, Alexaki VI. Arginine metabolism in myeloid cells in health and disease. *Semin Immunopathol* 2025; **47** (1): 11. <https://doi.org/10.1007/s00281-025-01038-9>.
 24. Mosser DM, Hamidzadeh K, Goncalves R. Macrophages and the maintenance of homeostasis. *Cell Mol Immunol* 2021; **18** (3): 579–87. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-00541-3>.
 25. Zhao C, Chen H, Liang H, *et al.* *Lactobacillus plantarum* RS-09 induces M1-type macrophage immunity against *Salmonella Typhimurium* Challenge via the TLR2/NF- κ B signalling pathway. *Front Pharmacol* 2022; **13**: 832245. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.832245>.
 26. Lecoultré M, Dutoit V, Walker PR. Phagocytic function of tumor-associated macrophages as a key determinant of tumor progression control: a review. *J Immunother Cancer* 2020; **8** (2): e001408. <https://doi.org/10.1136/jitc-2020-001408>.
 27. Wang L, Hu Z, Zhang W, *et al.* Promoting macrophage phagocytosis of cancer cells for effective cancer immunotherapy. *Biochem Pharmacol* 2025; **232**: 116712. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2024.116712>.

IMMUNOMODULATING EFFECT OF PROBIOTICS *B. ANIMALIS* SUBSP. *LACTIS* BB-12 AND *L. RHAMNOSUS* GG DURING TUMOR GROWTH

S.V. Gogol, P.A. Virych, N.I. Fedosova, N.L. Cheremshenko, K.D. Tarnopolska, I.M. Voyeykova, V.F. Chekhun

R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology of the NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Summary. *Aim:* experimental study of the effect of *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 and *L. rhamnosus* GG on the functional activity of macrophages (Mph) in intact animals and in animals with a model tumor process. **Object and methods:** studies were conducted on female BALB/c mice. Ehrlich adenocarcinoma was used as the experimental model. Two series of experiments were conducted: Series I: Probiotics (*B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 or *L. rhamnosus* GG) were administered to intact animals. Series II: Probiotics were administered to animals with transplanted tumours. The probiotic administration scheme was the same for both series: for 28 days,

daily, per os, 7×10^5 CFU/mouse. The functional activity of macrophages (Mph) was determined based on the level of nitric oxide (NO) production, arginase (Arg) activity and the production of cytokines TNF- α and IL-10. In animals bearing the tumour model, the levels of reactive oxygen species (ROS) production and the phagocytic activity of Mph were also determined. The results were statistically processed using generally accepted variational statistical methods. **Results:** in the absence of a tumour process, the use of *B. animalis* led to a slight decrease in NO production (by 1.1 times) and a significant increase in Arg activity (by 1.8 times, $p < 0.05$). When *L. rhamnosus* GG was used, these indicators did not differ significantly from those observed in intact animals. Changes in the cytokines produced by Mph depended on the probiotic used: a significant increase in IL-10 levels and a decrease in TNF- α levels were noted in mice administered bifidobacteria, while cytokine production was maintained at intact control levels in mice treated with *L. rhamnosus* GG. Similar results were obtained when studying the effect of these probiotics on the polarisation state of Mph in animals bearing model tumours. Analysis of L-arginine metabolism, ROS levels, cytokine spectrum and phagocytic activity demonstrated that *B. animalis*

subsp. *lactis* BB-12 promotes the polarization of Mph towards the M2 type, which is necessary to limit excessive inflammation but has pro-tumour properties. The application of *L. rhamnosus* GG had the opposite effect, with long-term preservation of M1 polarization noted even at an advanced stage of tumour growth. This is important for maintaining the antitumour immune response. **Conclusion:** the possibility of targeted change in the polarization state and, accordingly, the functional properties of macrophages, using probiotics with predetermined properties may be useful in the treatment of patients with various pathological conditions.

Keywords: tumour process, *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12, *L. rhamnosus* GG, macrophages, polarization state

Адреса для листування:

Гоголь С.В.
03022, Київ, вул. Васильківська, 45
Інститут експериментальної патології, онкології
і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України
E-mail: tantattoo72@gmail.com

Одержано: 23.06.2025