

КУЛЬТУРА КЛЕТОК CACO-2 КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ ТЕСТИРОВАНИЯ СВОЙСТВ ПРОБИОТИКОВ

¹Чмыхало В.К., ¹Золотухин П.В., ²Рудой Д.В., ²Ермаков А.М., ²Мальцева Т.А.,
²Ольшевская А.В., ²Бабаджян А.С.

¹Академия биологии и биотехнологии, Южный федеральный университет, г. Ростов-на-Дону,
Российская Федерация

²Донской государственной технической университет, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация

Аннотация. Использование адекватных биологических тест-систем при разработке пробиотических препаратов является одним из основных этапов в исследовании и скрининге потенциальных кандидатов. В данной работе в качестве модели для анализа свойств пробиотиков рассматривается культура клеток Caco-2. Данная клеточная культура обладает всеми необходимыми характеристиками, чтобы оценить влияние пробиотических препаратов на широкий спектр как и внутриклеточных процессов, так и межклеточных взаимодействиях, перечень которых продемонстрирован в данной работе.

Ключевые слова. Caco-2, пробиотики, тест-системы, ко-культура

CACO-2 CELL CULTURE AS A MODEL FOR TESTING OF PROBIOTICS PROPERTIES

¹Chmyhalo V.K., ¹Zolotukhin P.V., ²Rudoy D.V., ²Ermakov A.M., ²Maltseva T.A.,
²Olshevskaya A.V., ²Babajanyan A.S.

¹Academy of biology and biotechnology, Southern Federal University, Rostov-on-Don, Russian Federation

²Don State Technical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

Abstract. The use of adequate biological test systems in the development of probiotic drugs is one of the main stages in the study and screening of potential candidates. In this work, a Caco-2 cell culture is considered as a model for analyzing the properties of probiotics. This cell culture has all the necessary characteristics to evaluate the effect of probiotic drugs on a wide range of both intracellular processes and intercellular interactions, a list of which is demonstrated in this paper.

Keywords. Caco-2, probiotics, test systems, co-culture.

Разработка ветеринарных пробиотических препаратов направленного модулирования здоровья животных предполагает использование иерархической совокупности методов анализа свойств таких препаратов. Иерархия методов строится так, чтобы с наиболее рациональным соотношением затрат и информативности на каждом этапе анализа отбирать наиболее перспективные кандидатные агенты. Первым биологическим уровнем скрининга является проведение тестов *in vitro* на культурах клеток. Используемые в тестах клетки должны быть максимально физиологически близки к конечному адресному объекту, позволять проводить как можно более широкий спектр исследований и по возможности создавать квази-тканевые системы для максимального снижения потребности в *in vivo*-исследованиях на уровне скрининга и отбора кандидатных агентов.

Среди эукариотических моделей указанным характеристикам соответствуют несколько линий клеток. Среди них лидирует линия эпителиальных клеток кишечника человека Caco-2. Данная линия является одной из наиболее удобных и часто используемых моделей в исследованиях влияния различных веществ и биологических агентов на состояние клеток кишечника, скорость всасывания и другие параметры [1]. Благодаря особенностям физиологии и морфологии Caco-2, использование в экспериментах этой линии позволяет быстро проводить скрининговые исследования *in vitro* и рассчитывать вероятные реакции кишечника на изучаемые агенты *in vivo* [1; 2].

Эта же линия благодаря своим особенностям подходит даже для ко-культуры и изучения взаимодействия между клетками кишечника человека и микробиотой кишечника и другими микроорганизмами [3]. Например, Hänel и соавторы исследовали взаимодействие бактерий и клеток кишечника для определения колонизационной активности бактерий в кишечнике кур. В этом случае модель Caco-2 использовалась как подтверждающий и скрининговый исследовательский объект [4; 5]. Аналогичные исследования проводились и в других лабораториях [6; 7], в том числе с целью разработки новых пробиотиков для задач сельского хозяйства [8].

Основная физиологическая особенность Caco-2, которая позволяет проводить такие исследования заключается в том, что при достижении конfluence эти клетки меняют фенотип: приобретают морфологию энтероцитов [9] и образуют плотные контакты, что в том числе важно при анализе потенциальных *in vivo*-свойств пробиотиков [10]. Именно эта особенность, лежала в основе исследования способности пробиотика MTCC-5897 нормализовать микробиоту кур [11].

Более того, благодаря такой особенности, использование клеток Caco-2 при скрининге потенциальных пробиотических агентов и их производных позволяет быстро и эффективно определять острые токсичные эффекты. С одной стороны, токсичные агенты вызывают резкое изменение общей морфологии конfluence культуры Caco-2, и с другой стороны для этой цели применимы стандартные методы оценки острой токсичности, в том числе окрашивание трипановым синим [12].

Так как Caco-2 - малигнизированные клетки человека, их использование позволяет не только проводить цитофлуориметрию и флуоресцентную микроскопию для изучения их физиологической функции при воздействии пробиотиков и биологически-активных веществ, но и для молекулярно-генетических и системно-биологических исследований [10] без дополнительных затрат.

Независимо от используемой клеточной модели (но в том числе это справедливо и для Caco-2) проточная цитофлуориметрия позволяет проводить исследование большого количества ключевых клеточных параметров, количественно характеризующих влияние биологически активных веществ и межклеточных взаимодействий (между бактериями и клетками кишечника). Для достаточно полной информативной оценки такого влияния подходят такие параметры как функционирование лизосом и митохондрий, содержание липидов в клетке, скорость импорта глюкозы, скорость деления клеток, генерация активных форм кислорода и клеточные тиолы. Рассмотрим эти параметры подробнее.

Лизосомальная функция (оценивается, например, с помощью Lysotracker yellow) - суперпозиция количества и активности лизосом, характеризующая интенсивность эндоцитоза и сигнализацию клеток в ответ на поступающие биологически активные вещества [13].

Как и лизосомальная функция, функция митохондрий это интегральный параметр, зависящий и от количества, и от активности митохондрий. Классическим примером красителя для анализа этого параметра является Rhodamine 123 [14].

С помощью красителя Nile red возможно одновременно определять содержание в клетках фосфолипидов и триглицеридов. Эти два параметра позволяют охарактеризовать интенсивность синтетических процессов в клетках, а также степень активации или характер взаимодействия сигнальных каскадов mTOR, Akt и HIF1A и, соответственно, косвенно - интенсивность аутофагических процессов [15].

Исследования влияния пробиотиков наиболее информативны при применении красителя 6-NBDG - неметаболизируемого флуоресцентного производного глюкозы [16]. Этот физиологический параметр успешно использовался в том числе для изучения взаимодействий между клетками кишечника и микрофлорой [17], и в том числе на курах [18].

Скорость деления клеток. Это важнейший параметр, характеризующий тканевую и органную функцию кишечника [19]. Один из удобнейших красителей для этой цели - CellTrace CFSE. Изучение этого физиологического параметра является одним из перспективных методов исследования свойств пробиотиков [20; 21].

Так как активные формы кислорода образуются в клетках не только из-за течения чисто химических реакций, но и как продукт работы огромного числа клеточных сигнальных систем, изучение паттерна генерации АФК в клетках позволяет охарактеризовать целый спектр особенностей функционирования клеток под действием различных агентов. Кроме этого, на сегодняшний день уже хорошо охарактеризовано влияние микрофлоры и выделяемых ей веществ на паттерны работы систем окислительного статуса клеток кишечника [22]. При проведении проточной цитофлуориметрии наиболее удобны два красителя, используемые совместно - молекулярный зонд на АФК цитозоля CellRox Orange и молекулярный зонд на АФК ядер и митохондрий CellRox Green.

Клеточные тиолы выступают в роли дополнительного клеточного параметра, характеризующего как работу метаболических систем (например, относительную степень активации гликолиза и пентозо-фосфатного шунта), так и клеточную сигнализацию в системах контроля окислительного статуса (при исследовании совместно с указанными зондами на АФК) [23]. Пример подходящего зонда для проточной цитофлуориметрии - ThiolTracker Violet, который позволяет количественно детектировать клеточные тиолы, большая часть из которых приходится на глутатионовый пул. Этот параметр также положительно зарекомендовал себя в исследованиях физиологии кишечника в зависимости от состояния микрофлоры [23; 24].

Так как перечисленные молекулярные зонды для изучения физиологических параметров клеток кишечника перекрывают практически весь видимый спектр, для гейтирования по живым клеткам в подобных исследованиях необходимо использовать два соответствующих красителя - 7-AAD и Sytox Blue. Применение этих красителей позволяет проводить мультипараметрический анализ состояния

клеток и без какой-либо значимой интерференции изучать одновременно в одной и той же клетке до 4 параметров [25; 26].

Некоторые из перечисленных параметров могут анализироваться не только с помощью проточной цитофлуориметрии с последующим получением количественных данных, но также и с помощью флуоресцентной микроскопии. В этом случае возможна детекция изменения качественных параметров - изменение морфологии клеток, органелл, их расположения в клетке [27; 28].

Например, в случае митохондрий с помощью MitoTracker Red - более фотостабильного красителя, чем Rhodamine 123 - возможно изучение и транс-мембранного потенциала (полу-количественно при применении оптической денситометрии), и локализации митохондрий в клетке, и их морфологии, которая может претерпевать значительные изменения. Такие изменения обнаруживаются в том числе при действии на клетки дериватов пробиотических культур [29].

С помощью иммуноцитохимии и генно-инженерного маркера CellLight Peroxisome-GFP возможно изучение локализации пероксисом. Изменение в функционировании пероксисомальной системы является *in vitro*-маркером для биохимических особенностей пробиотических культур, как это показано, например, для бутират-продуцентов [30].

Упомянутый выше LysoTracker Yellow и иммуноцитохимическое окрашивание белка MAP1LC3B (белок оболочки зрелых автофагосом) дают возможность изучать интенсивности автофагии. Модуляция автофагии - один из установленных механизмов противовоспалительных эффектов пробиотиков [31] и нормализации с их помощью слизистого слоя кишечника [32].

Также с помощью иммуноцитохимии проводится изучение и еще одной важнейшей функции кишечника - способности к импорту аминокислот. Например, белок SLC3A2 (CD98), локализующийся на поверхности клеток и позволяющий проводить иммуноцитохимическое окрашивание без пермеабилзации и с сохранением жизнеспособности клеток, является компонентом сразу нескольких комплексов импорта аминокислот в клетки. Экспрессия этого белка зависима от функционального статуса клеток кишечника и межклеточной сигнализации в кишечнике [33].

Иммуноцитохимические методы позволяют также оценить функционирование сигнальных каскадов - и эта технология высоко информативна в сочетании с молекулярно-генетическими исследованиями экспрессии маркеров работы сигнальных систем клетки. Например, в центральном каскаде антиоксидантной и ксенобиотической защиты клеток NFE2L2/AP-1 (также упоминается в литературе как каскад NRF2 и AP-1) есть несколько белков-сенсоров, меняющих локализацию в клетке и управляющих транскрипцией генов эффекторных РНК и белков. Влияние пробиотиков на этот каскад изучалось, в том числе на клетках Caco-2 [34].

С помощью иммуноцитохимии в этом случае детектируется смена компарментализации сенсорного компонента каскада, а с помощью молекулярной генетики - изменение в экспрессии эффекторных молекул [35] и даже в функциональном статусе отдельных компарментов клетки. Например, дифференциальная экспрессия транскриптов 1 и 2 гена XBP1 позволяет характеризовать функционирование эндоплазматического ретикулума [36]. Нормализация работы ЭПР - также один из важных эффектов пробиотиков при их скрининге [37; 38].

Молекулярно-генетические методы также наиболее удобны для скрининга иммунно-модулирующих свойств пробиотиков и позволяют избежать применения технологии ко-культуры для таких исследований. Ключевыми каскадами для изучения в этом случае являются каскад ядерного фактора карра В и гипоксия-индуцибельного фактора HIF1A. Каскад NF-карраВ непосредственно контролирует экспрессию цитокиновых белков и других агентов внутри- и межклеточных взаимодействий [39]. В тоже время смежный и взаимозависимый с предыдущим каскад HIF1A управляет не только ангиогенезом и реакциями на колебания уровня кислорода, но и течением автофагии, характером энергетического метаболизма, пролиферацией клеток и отвечает за сохранение ниши стволовых клеток крипт кишечника [40]; система каскадов, поддерживающих стволовость клеток и обеспечивающих эпителиально-мезенхимальный переход [41].

Таким образом, для анализа свойств пробиотических микроорганизмов и биологически активных веществ (БАВ), синтезируемых такими организмами, на сегодняшний день доступен широкий спектр методов молекулярной и клеточной биологии - от исследований морфологии клеток кишечника *in vitro* и до молекулярно-генетического анализа *in vitro* и *in vivo*. Диапазон исследовательских моделей для таких экспериментов также широк - от искусственных систем и культур клеток с морфологическими признаками энтероцитов и до объектов *ex vivo* и *in vivo*. И как было отмечено выше, использование культуры клеток Caco-2 ввиду возможностей комплексного анализа многих параметров исследования свойств пробиотиков выглядит наиболее адекватным в рамках данного тестирования.

Список использованных источников

1. X Cai, X Chen, N Yin, H Du, G Sun, L Wang, Y Xu, Y Chen and Y Cui Estimation of the bioaccessibility and bioavailability of Fe, Mn, Cu, and Zn in Chinese vegetables using the *in vitro* digestion/Caco-2 cell model: the influence of gut microbiota // Food Funct. 2017;8(12):4592-4600 doi: 10.1039/c7fo01348e
2. MJC Santbergen, M van der Zande, A Gerssen, H Bouwmeester and MWF Nielen Dynamic *in vitro* intestinal barrier model coupled to chip-based liquid chromatography mass spectrometry for oral bioavailability studies // Anal Bioanal Chem. 2020; 412(5):1111-1122 doi: 10.1007/s00216-019-02336-6
3. M Gagnon, A Zihler Berner, N Chervet, C Chassard and C Lacroix Comparison of the Caco-, HT-29 and the mucus-secreting HT29-MTX intestinal cell models to investigate Salmonella adhesion and invasion // J Microbiol Methods. 2013;94(3):274-279 doi: 10.1016/j.mimet.2013.06.027

4. I Hänel, J Müller, W Müller and F Schulze Correlation between invasion of Caco-2 eukaryotic cells and colonization ability in the chick gut in *Campylobacter jejuni* // *Vet Microbiol.*2004101275-82 doi: 10.1016/j.vetmic.2004.04.004
5. I Hänel, E Borrmann, J Müller, W Müller, B Pauly, E M Liebler-Tenorio and F Schulze Genomic and phenotypic changes of *Campylobacter jejuni* strains after passage of the chicken gut // *Vet Microbiol.* - 20091361-2121-129 doi: 10.1016/j.vetmic.2008.10.018
6. J Müller, F Schulze, W Müller and I Hänel PCR detection of virulence-associated genes in *Campylobacter jejuni* strains with differential ability to invade Caco-2 cells and to colonize the chick gut // *Vet Microbiol.*20061131-2123-129 doi: 10.1016/j.vetmic.2005.10.029
7. AR McWhorter, R Tearle, T S Moyle and K K Chousalkar In vivo passage of *Salmonella Typhimurium* results in minor mutations in the bacterial genome and increases in vitro invasiveness // *Vet Res.* 2019 501 71doi: 10.1186/s13567-019-0688-1
8. Y Xu, Y Tian, Y Cao, J Li, H Guo, Y Su, Y Tian, C Wang, T Wang and L Zhang Probiotic Properties of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* L1 and Its Growth Performance-Promotion in Chicken by Improving the Intestinal Microflora // *Front Physiol.* 201910 ID 937doi: 10.3389/fphys.2019.00937
9. R L DiMarco, D R Hunt, R E Dewi and S C Heilshorn Improvement of paracellular transport in the Caco-2 drug screening model using protein-engineered substrates // *Biomaterials.* 2017129152-162 doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.03.023
10. B Yao, J He, X Yin, Y Shi, J Wan and Z Tian The protective effect of lithocholic acid on the intestinal epithelial barrier is mediated by the vitamin D receptor via a SIRT1/Nrf2 and NF- κ B dependent mechanism in Caco-2 cells // *Toxicol Lett.*2019316109-118doi: 10.1016/j.toxlet.2019.08.024
11. M I Bhat, K Sowmya, S Kapila and R Kapila Potential Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* (MTCC-5897) Inhibits *Escherichia coli* Impaired Intestinal Barrier Function by Modulating the Host Tight Junction Gene Response // *Probiotics Antimicrob Proteins.* 2019Epub ahead of printdoi: 10.1007/s12602-019-09608-8
12. A Saber, B Alipour, Z Faghfoori, A Mousavi Jam and A Yari Khosroushahi Secretion metabolites of probiotic yeast, *Pichia kudriavzevii* AS-1., induces apoptosis pathways in human colorectal cancer cell lines // *Nutr Res.*2017 4136-46doi: 10.1016/j.nutres.2017.04.001
13. S Chikte, N Panchal and G Warnes Use of LysoTracker dyes: a flow cytometric study of autophagy // *Cytometry A.*2014 852169-178doi: 10.1002/cyto.a.22312
14. B Chazotte Labeling mitochondria with rhodamine 123 // *Cold Spring Harb Protoc.*20117892-894doi: 10.1101/pdb.prot5648
15. J G Schnitzler, S J Bernelot Moens, F Tiessens, G J Bakker, G M Dallinga-Thie, A K Groen, M Nieuwdorp, E S G Stroes and J Kroon Nile Red Quantifier: a novel and quantitative tool to study lipid accumulation in patient-derived circulating monocytes using confocal microscopy // *J Lipid Res.*201758112210-2219doi: 10.1194/jlr.D073197
16. R T Zaman, S Tuerkcan, M Mahmoudi, T Saito, P C Yang, F T Chin, M V McConnell and L Xing Imaging cellular pharmacokinetics of ¹⁸F-FDG and ⁶-NBDG uptake by inflammatory and stem cells // *PLoS One.* 2018132e0192662 doi: 10.1371/journal.pone.0192662
17. L Bonfili, V Cecarini, O Gogoi, S Berardi, S Scarpona, M Angeletti, G Rossi and A M Eleuteri Gut microbiota manipulation through probiotics oral administration restores glucose homeostasis in a mouse model of Alzheimer's disease // *Neurobiol Aging.* 2019 ID S0197-4580doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2019.11.004
18. M E Coates, C B Cole, R Fuller, S B Houghton and H Yokota The gut microflora and the uptake of glucose from the small intestine of the chick // *Br Poult Sci.* 1981223289-294 doi: 10.1080/00071688108447888
19. C Slaymi, E Vignal, G Crès, P Roux, A Blangy, P Raynaud and P Fort The atypical RhoU/Wrch1 Rho GTPase controls cell proliferation and apoptosis in the gut epithelium // *Biol Cell.* 2019. 1115121-141 doi: 10.1111/boc.201800062
20. M F Laursen, R P Laursen, A Larnkjær, K F Michaelsen, M I Bahl and T R Licht Administration of two probiotic strains during early childhood does not affect the endogenous gut microbiota composition despite probiotic proliferation // *BMC Microbiol.*2017171175 doi: 10.1186/s12866-017-1090-7
21. M Maguire and G Maguire Gut dysbiosis, leaky gut, and intestinal epithelial proliferation in neurological disorders: towards the development of a new therapeutic using amino acids, prebiotics, probiotics, and postbiotics // *Rev Neurosci.*201930 2179-201doi: 10.1515/revneuro-2018-0024
22. R M Jones and A S Neish Redox signaling mediated by the gut microbiota // *Free Radic Biol Med.*201710541-47doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.10.495
23. A Mardinoglu, S Shoaie, M Bergentall, P Ghaffari, C Zhang, E Larsson, F Bäckhed and J Nielsen The gut microbiota modulates host amino acid and glutathione metabolism in mice // *Mol Syst Biol.*20151110 834doi: 10.15252/msb.20156487

24. F Blachier, M Beaumont and E Kim Cysteine-derived hydrogen sulfide and gut health: a matter of endogenous or bacterial origin // *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*.201922168-75 doi: 10.1097/MCO.0000000000000526
25. C W Nuelle, C R Cook, A M Stoker, J L Cook and S L Sherman In vitro toxicity of local anaesthetics and corticosteroids on supraspinatus tenocyte viability and metabolism // *J Orthop Translat*.2016820-24doi: 10.1016/j.jot.2016.08.002
26. M Wang, G Yang, X Jiang, D Lu, H Mei and B Chen Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Coactivator-1 α (PGC-1 α) Regulates the Expression of B-Cell Lymphoma/Leukemia-2 (Bcl-2) and Promotes the Survival of Mesenchymal Stem Cells (MSCs) via PGC-1 α /ERR α Interaction in the Absence of Serum, Hypoxia, and High Glucose Conditions // *Med Sci Monit*.2017233451-3460doi: 10.12659/msm.902183
27. A G Ali, M F Mohamed, A O Abdelhamid and M S Mohamed A novel adamantane thiadiazole derivative induces mitochondria-mediated apoptosis in lung carcinoma cell line // *Bioorg Med Chem*.2017251241-253
28. M H Schuler, A Lewandowska, G D Caprio, W Skillern, S Upadhyayula, T Kirchhausen, J M Shaw and B Cunniff Miro1-mediated mitochondrial positioning shapes intracellular energy gradients required for cell migration // *Mol Biol Cell*.2017 28 162159-2169doi: 10.1091/mbc.E16-10-0741
29. C Xu, L Qiao, L Ma, Y Guo, X Dou, S Yan, B Zhang and A Roman Biogenic selenium nanoparticles synthesized by *Lactobacillus casei* ATCC 393 alleviate intestinal epithelial barrier dysfunction caused by oxidative stress via Nrf2 signaling-mediated mitochondrial pathway // *Int J Nanomedicine*. 2019144491-4502doi: 10.2147/IJN.S199193
30. H Weng, K Endo, J Li, N Kito and N Iwai Induction of peroxisomes by butyrate-producing probiotics // *PLoS One*.2015102e0117851doi: 10.1371/journal.pone.0117851
31. M Zaylaa, J Alard, I A Kassaa, V Peucelle, D Boutillier, J Desramaut, P Rosenstiel, H T T Nguyen, F Dabboussi, B Pot abd C Grangette Autophagy: A Novel Mechanism Involved in the Anti-Inflammatory Abilities of Probiotics // *Cell Physiol Biochem*. 2019535774-793doi: 10.33594/000000172
32. M A Engevik, B Luk, A L Chang-Graham, A Hall, B Herrmann, W Ruan, B T Endres, Z Shi, K W Garey, J M Hyser and J Versalovic *Bifidobacterium dentium* Fortifies the Intestinal Mucus Layer via Autophagy and Calcium Signaling Pathways // *MBio*.2019103e01087-19doi: 10.1128/mBio.01087-19
33. H T Nguyen, G Dalmasso, L Torkvist, J Halfvarson, Y Yan, H Laroui, D Shmerling, T Tallone, M D'Amato, S V Sitaraman and D Merlin CD98 expression modulates intestinal homeostasis, inflammation, and colitis-associated cancer in mice // *J Clin Invest*. 201112151733-1747doi: 10.1172/JCI44631
34. G Mu, H Li, Y Tuo, Y Gao and Y Zhang Antioxidative effect of *Lactobacillus plantarum* Y44 on 2,2'-azobis(2-methylpropanimidine)dihydrochloride (ABAP)-damaged Caco-2 cells // *J Dairy Sci*. 20191028863-6875doi: 10.3168/jds.2019-16447
35. G C Pistol, D E Marin, C Dragomir and I Taranu Synbiotic combination of prebiotic grape pomace extract and probiotic *Lactobacillus* sp. reduced important intestinal inflammatory markers and in-depth signalling mediators in lipopolysaccharide-treated Caco-2 cells // *Br J Nutr*. 201820181-15doi: 10.1017/S0007114518003410
36. A Kishino, K Hayashi, C Hidai, T Masuda, Y Nomura and T Oshima XBP1-FoxO1 interaction regulates ER stress-induced autophagy in auditory cells // *Sci Rep*.2017714442doi: 10.1038/s41598-017-02960-1
37. S Zhao, W Liu, J Wang, J Shi, Y Sun, W Wang, G Ning, R Liu and J Hong *Akkermansia muciniphila* improves metabolic profiles by reducing inflammation in chow diet-fed mice // *J Mol Endocrinol*. 20175811-14 doi: 10.1530/JME-16-0054
38. M Balakumar, D Prabhu, C Sathishkumar, P Prabu, N Rokana, R Kumar, S Raghavan, A Soundarajan, S Grover, V K Batish, V Mohan and M Balasubramanyam Improvement in glucose tolerance and insulin sensitivity by probiotic strains of Indian gut origin in high-fat diet-fed C57BL/6J mice // *Eur J Nutr*. 201857 1279-295doi: 10.1007/s00394-016-1317-7
39. D E Kim, J K Kim, S K Han, S E Jang, M J Han and D H Kim *Lactobacillus plantarum* NK3 and *Bifidobacterium longum* NK49 Alleviate Bacterial Vaginosis and Osteoporosis in Mice by Suppressing NF- κ B-Linked TNF- α Expression // *J Med Food*. 201922101022-1031doi: 10.1089/jmf.2019.4419
40. Y Chen, S H Lee, Y H Tsai and S H Tseng Ischemic preconditioning increased the intestinal stem cell activities in the intestinal crypts in mice // *J Surg Res*.2014187185-93doi: 10.1016/j.jss.2013.10.001.
41. D Vergara, P Simeone, M Damato, M Maffia, P Lanuti and Trerotola M The Cancer Microbiota: EMT and Inflammation as Shared Molecular Mechanisms Associated with Plasticity and Progression // *J Oncol*. 201920191253727doi: 10.1155/2019/1253727

Authors acknowledge the support of the Government of the Russian Federation (contract No. 075-15-2019-1880).