

ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ СУПЕРНАТАНТОВ *BIFIDOBACTERIUM* *BIFIDUM* И КЛЕТОК КУРИНОГО ЭМБРИОНА НА МОДЕЛИ ОПИСТОРХОЗНОЙ ИНВАЗИИ

Костоломова Е.Г., Лозовая П.Б., Полянских Е.Д., Тимохина Т.Х.,
Паромова Я.И.

ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ,
г. Тюмень, Россия

Резюме. Морфологические изменения печени, как основного органа, в котором локализуется *Opisthorchis felineus*, по данным литературы характеризуются значительными структурными изменениями. Так же недавние исследования показывают, что инфекция *O. felineus* модифицирует иммунную реактивность за счет увеличения синтеза супрессоров иммунного ответа IL10 и TGF- β и снижения уровня провоспалительных маркеров IL-4, IL-5. Эксперимент проведен на 15 сирийских золотых хомячках (*Mesocricetus auratus*) в возрасте от 4 до 6 недель. Животные были разделены на 3 равные группы. Длительность наблюдения составила 24 дня. Живые метацеркарии *Opisthorchis felineus* были выделены из зараженной рыбы семейства карповых. Заражение проводилось путем их перорального введения (доза заражения – 50 метацеркариев). Животным в экспериментальных группах при заражении метацеркариями внутрибрюшинно параллельно вводили 1 мл исследуемых супернатантов. Гистологический материал обработан стандартными методами. Гистологические препараты исследованы методами светооптической микроскопии с иммерсией, видеомикроскопии с морфометрией. В результате исследования установлено, что в острую фазу описторхоза преобладает общая инфильтрация области порталного тракта. Клеточный состав инфильтратов характеризовался наличием лимфоцитов, макрофагов, фибробластов, эпителиоидных клеток и клеток инородных тел. Описанные изменения клеток связаны с локальным снижением доступа кислорода к гепатоцитам периферической зоны дольки из-за их сдавления фиброзной тканью. В печени экспериментальных групп отмечались лишь тканеспецифические изменения, а поражения гепатоцитов были наименее выраженные в группе с введением супернатанта *B. bifidum*. Цитокиновый профиль в контрольной группе соответствовал Th1-варианту. В экспериментальной группе 1 при применении супернатанта *B. bifidum* в сравнении с контролем в 4 раза уменьшалась способность лимфоцитов продуцировать основной провоспалитель-

Адрес для переписки:

Костоломова Елена Геннадьевна
ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский
университет» Министерства здравоохранения РФ
625023, Россия, г. Тюмень, ул. Одесская, 54.
Тел.: 8 (345) 220-00-61, 8 (904) 493-06-74.
E-mail: lenakost@mail.ru

Address for correspondence:

Elena G. Kostolomova
Tyumen State Medical University
54 Odesskaya St
Tyumen
625023 Russian Federation
Phone: +7 (345) 220-00-61, +7 (904) 493-06-74.
E-mail: lenakost@mail.ru

Образец цитирования:

Е.Г. Костоломова, П.Б. Лозовая, Е.Д. Полянских,
Т.Х. Тимохина, Я.И. Паромова «Изучение
противовоспалительной активности супернатантов
Bifidobacterium bifidum и клеток куриного эмбриона
на модели описторхозной инвазии» // Российский
иммунологический журнал, 2024. Т. 27, № 2. С. 181-186.
doi: 10.46235/1028-7221-16675-STA

© Костоломова Е.Г. и соавт., 2024
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

E.G. Kostolomova, P.B. Lozovaya, E.D. Polyanskikh,
T.Kh. Timokhina, Ya.I. Paromova "Studying the anti-
inflammatory activity of *Bifidobacterium bifidum* supernatants
and chicken embryo cells on a model of opisthorchic invasion",
Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii
Zhurnal, 2024, Vol. 27, no. 2, pp. 181-186.
doi: 10.46235/1028-7221-16675-STA

© Kostolomova E.G. et al., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-16675-STA

ный цитокин – TNF α , также супрессирующий эффект наблюдался в отношении IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IFN γ . Вместе с тем наблюдалось угнетение продукции основного противовоспалительного цитокина IL-10, при этом в сравнении с контролем увеличивается уровень IL-4, IL-5. При применении супернатанта клеток куриного эмбриона, мы наблюдали схожие результаты с 1-й группой: супрессирующий эффект в отношении провоспалительных и активацию продукции противовоспалительных цитокинов. Уровень IL-17 снижался в обеих экспериментальных группах. Активация продукции противовоспалительных цитокинов в обеих экспериментальных группах модулирует иммунный ответ в сторону Th2, что способствует блокированию воспалительных эффектов.

Ключевые слова: *Bifidobacterium bifidum*, клетки куриного эмбриона, *Opisthorchis felineus*, печень, цитокины

STUDYING THE ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF *BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM* SUPERNATANTS AND CHICKEN EMBRYO CELLS ON A MODEL OF OPISTHOCHIC INVASION

Kostolomova E.G., Lozovaya P.B., Polyanskikh E.D., Timokhina T.Kh.,
Paromova Ya.I.

Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation

Abstract. Morphological changes in the liver during infection with *Opisthorchis felineus* are characterized by significant structural changes. It has been proven that *O. felineus* modifies immune reactivity by increasing the synthesis of IL-10 and TGF- β and decreasing the levels of IL-4 and IL-5. The experiment was carried out on 15 *Mesocricetus auratus* aged from 4 to 6 weeks. The animals were divided into 3 equal groups. The duration of observation was 24 days. Live metacercariae of *O. felineus* were isolated from infected cyprinid fish. Infection was carried out by oral administration of 50 metacercariae. Animals in the experimental groups were injected intraperitoneally with 1 ml of the test supernatants. Histological preparations were examined by video microscopy with morphometry. It has been established that in the acute phase of opisthorchiasis, general infiltration of the portal tract area predominates. The cellular composition of infiltrates is characterized by the presence of lymphocytes, macrophages, fibroblasts, epithelioid cells and foreign body cells. The described cell changes are associated with a local decrease in oxygen access to hepatocytes in the peripheral zone of the lobule due to their compression by fibrous tissue. In the liver of the experimental groups, only tissue-specific changes were noted, and the damage to hepatocytes was the least pronounced in the group with the introduction of *B. bifidum* supernatant. The cytokine profile in the control group corresponded to the Th1 variant. In experimental group 1, when using the supernatant of *B. bifidum*, in comparison with the control, the ability of lymphocytes to produce the main pro-inflammatory cytokine, TNF α , decreased 4 times; a suppressive effect was also observed in relation to IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, and IFN γ . Inhibition of IL-10 production was observed, while the level of IL-4 and IL-5 increased in comparison with the control. When using the supernatant of chicken embryo cells, we observed similar results to group 1: a suppressive effect on pro-inflammatory and activation of the production of anti-inflammatory cytokines. IL-17 levels decreased in both experimental groups. Activation of the production of anti-inflammatory cytokines in experimental groups modulates the immune response towards Th2, which helps block inflammatory effects.

Keywords: *Bifidobacterium bifidum*, chicken embryo cells, *Opisthorchis felineus*, liver, cytokines

Введение

Описторхоз из группы биогельминтозов считается эндемичным и гиперэндемичным заболеванием [1]. Большая часть мирового ареала описторхоза находится на территории России. Самые крупные очаги находятся на территории Ханты-

Мансийского и Ямало-Ненецкого автономных округов, а также Тюменской, Томской, Омской и Новосибирской областей [5]. Естественное течение инфекции *Opisthorchis felineus* характеризуется острой фазой, сопровождающейся миграцией ювенильного паразита через стенку кишечника в

паренхиму печени, и хронической фазой, в которой зрелые паразиты обструктируют и вызывают воспаление желчевыводящих путей. На обеих стадиях заболевание оказывает большое влияние на здоровье человека вследствие своей высокой патогенности и иммуномодуляции [3]. Недавние исследования показывают, что описторхозная инвазия модифицирует иммунную реактивность за счет увеличения синтеза супрессоров иммунного ответа IL10 и TGF- β и снижения уровня провоспалительных маркеров IL-4, IL-5 [4]. В настоящее время важно понимать взаимодействие между паразитами, кишечной микробиотой и их влияние на здоровье хозяина. Кроме того, было описано, что *Opisthorchis felinus* может модулировать иммунную систему и ее реакцию на различные антигены, в том числе антигены резидентных бактерий, составляющих микробиоту кишечника [6].

Цель исследования – оценить и сравнить противовоспалительную активность супернатанта *Bifidobacterium bifidum* и клеток куриного эмбриона на модели сирийских золотистых хомячков, зараженных *Opisthorchis felinus* в эксперименте *in vivo*.

Материалы и методы

Живые метацеркарии были выделены *Opisthorchis felinus* (Of) из зараженной рыбы семейства карповых. Супернатант *Bifidobacterium bifidum* (Bb) получали по ранее описанной методике [2]. Для получения супернатанта клеток куриного эмбриона (ККЭ) использовали авторскую методику [7]. Эксперимент проведен на 15 сирийских золотых хомячках (*Mesocricetus auratus*) в возрасте от 4 до 6 недель. Животные были разделены на 3 равные группы по 5 особей в каждой:

1. Контрольная группа (КГ), зараженные метацеркариями Of.
2. Экспериментальная группа 1 (ЭГ 1), зараженные метацеркариями Of с внутрибрюшинным введением Bb (1 мл).
3. Экспериментальная группа (ЭГ 2), зараженные метацеркариями Of с внутрибрюшинным введением ККЭ (1 мл).

Заражение проводилось путем перорального введения метацеркариев Of всем трем группам (доза заражения: 50 метацеркариев). Длительность наблюдения составила 24 дня, во время которых экспериментальные группы ежедневно получали по 3 капли Bb и ККЭ перорально. Условия содержания, экспериментальной работы и вывода животных из эксперимента соответствовали Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (1986), и российскому за-

конодательству (ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными» от 01.07.2016). По истечению времени эксперимента была изъята печень и кровь хомячков всех групп для гистологического исследования и определения количества цитокинов. Для описательной морфологии органа использовали метод световой микроскопии. Гистологические препараты изучали с использованием бинокулярного светового микроскопа. Срезы изготавливались с помощью автоматического ротационного микротомы Leica RM 2255 («Лейка Биосистемс Нуслох ГмбХ», Германия. Толщина 5 мкм. Межгрупповое сравнение данных проводили в соответствии протоколом «Морфологические ведомости» – Morphological Newsletter: 2022 Том (Volume) 30 Выпуск (Issue) с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни (U) для парных выборок с ненормальным распределением, при уровне доверительной вероятности $p \leq 0,05$.

Количество Th1 (IL-1, IL-2, IFN γ , TNF α , IL-6, IL-8) и Th2 (IL-4, IL-10) и Th17 (IL-17) цитокинов в сыворотке крови определяли с помощью панели Bio-Plex Pro™ Mouse Cytokine 23-plex для анализа цитокинов мыши (M60009RDPD) методом xMAP мультиплексного ИФА. При помощи анализатора Bio-Plex (Luminex) 200, MAGPIX.

Все статистические анализы проводились с использованием SPSS версии 15 для Windows (SPSS Inc., Чикаго, Иллинойс, США). Значение p менее 0,05 считалось значимой разницей.

Результаты и обсуждение

Патоморфологическое изучение печени контрольной группы (рис. 1А, см. 3-ю стр. обложки) показало выраженные органо- и тканеспецифические изменения в виде нарушения структур классических долек за счет гиперплазии соединительной ткани из области портальных трактов. Вследствие чего часть долек имеет нетипичную форму и уменьшенные размеры. Синусоидные капилляры расширены, стенки крупных желчных протоков утолщены, в них сформировались паразитарные гранулемы, в центре которых обнаруживались яйца описторхов, лимфоциты, плазматические и эпителиоидные клетки, эозинофилы. Тканеспецифические изменения обусловили появление гепатоцитов крупных размеров, имеющих полигональную и округлую формы, со светлой, почти неокрашенной, набухшей цитоплазмой и одним круглым базофильным ядром. Описанные изменения клеток связаны с локальным снижением доступа кислорода к гепатоцитам периферической зоны дольки из-за их сдавления фиброзной тканью. Развитие фиброзных изменений печени коррелировало с количеством

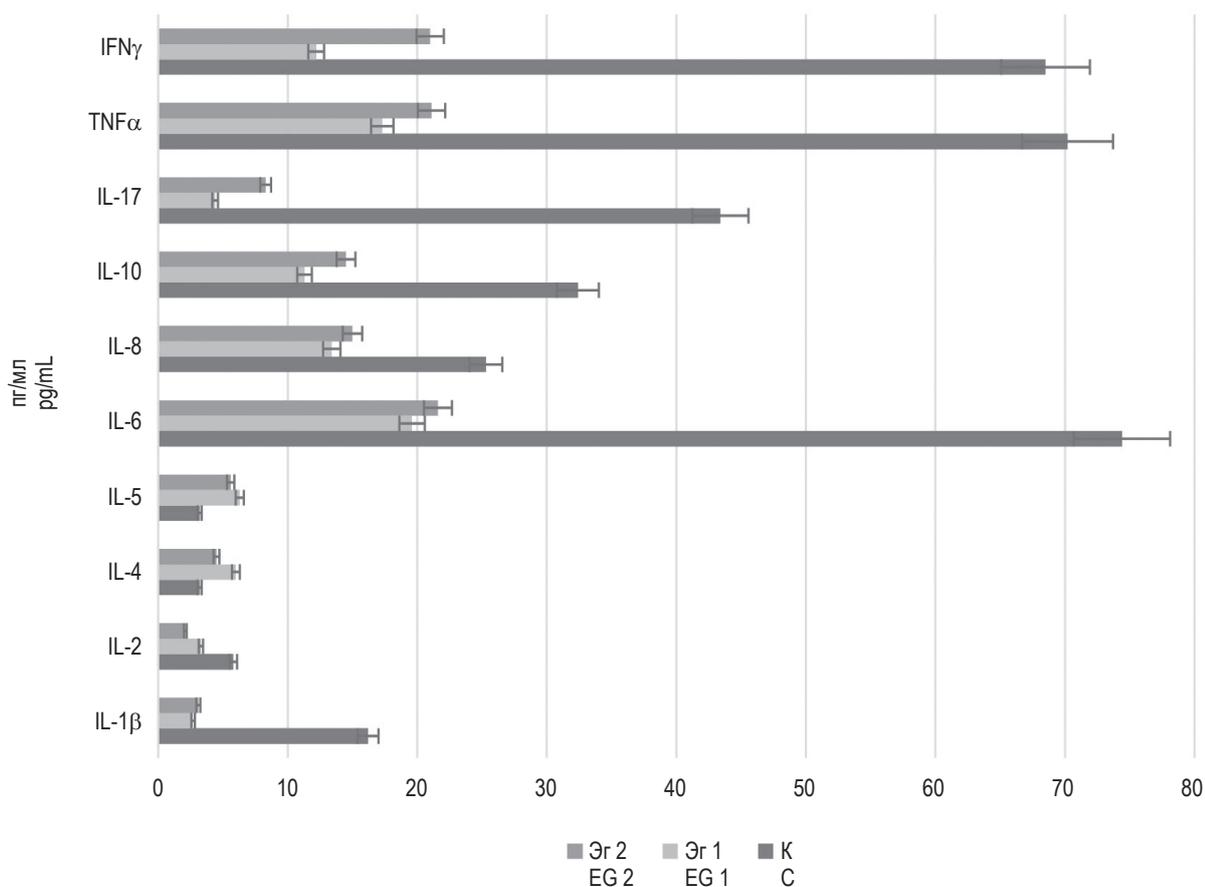


Рисунок 2. Профиль и уровень цитокинов в сыворотке крови животных

Примечание. Уровень и профиль цитокинов, изменялся в зависимости от вводимого супернатанта. Представлены результаты среднего значения из пяти независимых экспериментов, планки погрешности соответствуют стандартной ошибке среднего. Статистическая достоверность различий опытных групп с контрольными проверялась с использованием t критерия Стьюдента, * соответствуют $p < 0,05$, $n = 5$.

Figure 2. Profile and level of cytokines in animal blood serum

Note. The level and profile of cytokines changed depending on the administered supernatant. Results are shown as the average of five independent experiments, with error bars representing the standard error of the mean. The statistical significance of the differences between the experimental groups and the control groups was tested using Student's t test, * corresponds to $p < 0.05$, $n = 5$.

провоспалительных цитокинов TNF α ($r = 0,78$), IL-6 ($r = 0,75$), IL-1 β ($r = 0,71$), IL-8 ($r = 0,51$).

В печени экспериментальных групп (рис. 1Б, В, см. 3-ю стр. обложки) отмечались лишь тканеспецифические изменения. Поражения гепатоцитов наименее выраженные у ЭГ 1 (рис. 1Б, см. 3-ю стр. обложки).

При оценке результатов было установлено, что профиль и уровень цитокинов изменялся в зависимости от вводимого супернатанта (рис. 2). В контрольной группе наблюдалось повышение количества провоспалительных цитокинов. В экспериментальной группе ЭГ 1 в сравнении с контролем в 4 раза уменьшалась способность

лимфоцитов продуцировать основной провоспалительный цитокин TNF α . Супрессирующий эффект наблюдался и в отношении IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IFN γ (на $83,9 \pm 0,2$; $43,1 \pm 0,3$; $73,7 \pm 1,0$; $48,0 \pm 1,1$; $82,2 \pm 0,7\%$ соответственно). Вместе с тем отмечалось угнетение продукции основного противовоспалительного цитокина IL-10 на $64 \pm 1,04\%$, но при этом в сравнении с контролем увеличивался уровень IL-4, IL-5 на $87,5 \pm 0,2$ и $95,9 \pm 0,2\%$ соответственно. После введения ККЭ в ЭГ 2 мы наблюдали схожие результаты с ЭГ 1: супрессирующий эффект в отношении провоспалительных цитокинов (IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IFN γ на $80,8 \pm 0,1$; $63,3 \pm 0,5$; $71,0 \pm 1,1$; $40,7 \pm 1,5$;

69,3±1,4% соответственно), активацию продукции лимфоцитами IL-4 и IL-5 на 40,6±0,9% и 80,6±0,3% в сравнении с контролем. Уровень IL-17 снижался в обеих ЭГ, причем в ЭГ 1 в 10 раз (на 89,9±0,8%), а в ЭГ 2 в 5 раз (на 80,8±1,2%), что объясняется тем, что IL-17 располагается в слизистой оболочке кишечника, которую в большей степени населяют Vb. Активация продукции противовоспалительных цитокинов в обеих группах модулирует иммунный ответ в сторону Th2, что способствует блокированию воспалительных эффектов.

Заключение

Морфологическую картину печени при развивающемся описторхозе можно охарактеризовать как тенденцию к увеличению проявлений тканевой атипии. В острой фазе гепатоциты печеночных долек, лежащие периферически, имеют более выраженные изменения, по сравнению с центральными. Это свидетельствует о нарушении функционального состояния печени.

Введение супернатантов *Bifidobacterium bifidum* и клеток куриного эмбриона предупреждает проникновение *Opisthorchis felineus* в печень экспериментальных животных. Супернатанты *Bifidobacterium bifidum* более активно снижают количество провоспалительных цитокинов, чем супернатанты клеток куриного эмбриона.

Активация продукции противовоспалительных цитокинов в обеих экспериментальных группах модулирует иммунный ответ в сторону Th2, что способствует блокированию воспалительных эффектов и, возможно, предотвращению образования фиброзных изменений в печени при описторхозной инвазии.

Таким образом, результаты проведенного пилотного исследования применения супернатантов *Bifidobacterium bifidum* и клеток куриного эмбриона дают основание считать состояние нормальной микробиоты макроорганизма определяющим в предупреждении поражения гепатоцитов при описторхозной инвазии и возможность рассматривать *Bifidobacterium bifidum* для профилактики описторхозной инвазии.

Список литературы / References

1. Бибик О.И. Описторхоз – актуальная проблема здравоохранения (обзор и анализ проблемы) // Российский паразитологический журнал, 2020. Т. 14, № 4. С. 38-49. [Bibik O.I. Opisthorchosis is a topical health problem (problem overview and analysis). *Rossiyskiy parazitologicheskii zhurnal = Russian Journal of Parasitology*, 2020, Vol. 14, no. 4, pp. 38-49. (In Russ.)]
2. Костоломова Е.Г., Тимохина Т.Х., Перунова Н.Б., Полянских Е.Д., Сахаров Р.А., Комарова А.В. Оценка иммуномодулирующей активности *Bifidobacterium bifidum* 791 на модели клеток врожденного и адаптивного иммунитета в эксперименте *in vitro* // Российский иммунологический журнал, 2022. Т. 25, № 2. С. 213-218. [Kostolomova E.G., Timokhina T.K., Perunova N.B., Polyanskikh E.D., Sakharov R.A., Komarova A.V. *In vitro* evaluation of immunomodulatory activity of *Bifidobacterium bifidum* 791 in the cell model of innate and adaptive immunity. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2022, Vol. 25, no. 2, pp. 213-218. (In Russ.)] doi: 10.46235/1028-7221-1133-IVE.
3. Хадиева Е.Д., Костоломова Е.Г., Полянских Е.Д., Коробейникова Д.А., Бычкова Е.М., Морозов Е.Н., Бычков В.Г. Цитокиновый профиль мононуклеарных клеток периферической крови, стимулированных антигеном *Opisthorchis felineus* в эксперименте *in vitro* // Медицинская паразитология и паразитарные болезни, 2022. № 2. С. 47-51. [Khadiyeva E.D., Kostolomova E.G., Polyanskikh E.D., Korobeynikova D.A., Bychkova E.M., Morozov E.N., Bychkov V.G. Cytokine profile of peripheral blood mononuclear cells stimulated with *Opisthorchis felineus* antigen in an *in vitro* experiment. *Meditinskaya parazitologiya i parazitarnyye bolezni = Medical Parasitology and Parasitic Diseases*, 2022, no. 2, pp. 47-51. (In Russ.)]
4. Fedorova O.S., Janse J.J., Ogorodova L.M., Fedotova M.M., Achterberg R.A., Verweij J.J., Fernández-Rivas M., Versteeg S.A., Potts J., Minelli C., van Ree R., Burney P., Yazdanbakhsh M. *Opisthorchis felineus* negatively associates with skin test reactivity in Russia-EuroPrevall-International Cooperation study. *Allergy*, 2017, Vol. 72, no. 7, pp. 1096-1104.
5. Fedorova O.S., Fedotova M.M., Sokolova T.S., Golovach E.A., Kovshirina Y.V., Ageeva T.S., Kovshirina A.E., Kobyakova O.S., Ogorodova L.M., Odermatt P. *Opisthorchis felineus* infection prevalence in Western Siberia: A review of Russian literature. *Acta Trop.*, 2018, Vol. 178, pp. 196-204.

6. Pakharukova M.Y., Lishai E.A., Zapparina O., Baginskaya N.V., Hong S.J., Sripa B., Mordvinov V.A. *Opisthorchis viverrini*, *Clonorchis sinensis* and *Opisthorchis felineus* liver flukes affect mammalian host microbiome in a species-specific manner. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2023, Vol. 17, no. 2, e0011111. doi: 10.1371/journal.pntd.0011111.
7. Goltsov S.V., Suhovei Yu.G., Kostolomova E.G., Unger I.G. Means for wound healing "Cellgel", a method for its preparation and a method for treating wounds of various etiologies with the product obtained. Patent RU2481115 (Russia) on 13.10.2011. EDN: ZGRGOD.

Авторы:

Костоломова Е.Г. — к.б.н., доцент кафедры микробиологии; научный сотрудник лаборатории геномики, протеомики и метаболомики Университетского НИИ медицинских биотехнологий и биомедицины ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Тюмень, Россия

Лозовая П.Б. — студентка, Институт клинической медицины ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Тюмень, Россия

Полянских Е.Д. — студентка, Институт материнства и детства ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Тюмень, Россия

Тимохина Т.Х. — д.б.н., доцент, заведующая кафедрой микробиологии ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Тюмень, Россия

Паромова Я.И. — к.б.н., доцент кафедры микробиологии ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Тюмень, Россия

Authors:

Kostolomova E.G., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Microbiology; Research Associate of the University Research Institute of Medical Biotechnology and Biomedicine, Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation

Lozovaya P.B., Student, Institute of Clinical Medicine, Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation

Polyanskikh E.D., Student, Institute of Motherhood and Childhood, Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation

Timokhina T.Kh., PhD, MD (Biology), Associate Professor, Head, Department of Microbiology, Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation

Paromova Ya.I., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Microbiology, Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation

Поступила 27.03.2024

Отправлена на доработку 31.03.2024

Принята к печати 02.04.2024

Received 27.03.2024

Revision received 31.03.2024

Accepted 02.04.2024