

ВЛИЯНИЕ МОНОАЦИЛТРЕГАЛОЗНОЙ ФРАКЦИИ RHODOCOCCLUS-БИОСУРФАКТАНТА НА ОТДЕЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ

INFLUENCE OF MONOACYLTREHALOSE FRACTION OF RHODOCOCCLUS-BIOSURFACTANT ON SELECTED INDICATORS

10.46235/1028-7221-17066-IOM

ВЛИЯНИЕ МОНОАЦИЛТРЕГАЛОЗНОЙ ФРАКЦИИ RHODOCOCCLUS-БИОСУРФАКТАНТА НА ОТДЕЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ПРИ ПЕРОРАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ

Гейн С. В. ^{1, 2},

Южанинова Ю. Д. ¹,

Куюкина М. С. ^{1, 2},

Ившина И. Б. ^{1, 2}

¹ Институт экологии и генетики микроорганизмов – филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия.

² Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия.

ВЛИЯНИЕ МОНОАЦИЛТРЕГАЛОЗНОЙ ФРАКЦИИ RHODOCOCCLUS-БИОСУРФАКТАНТА НА ОТДЕЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ

INFLUENCE OF MONOACYLTREHALOSE FRACTION OF RHODOCOCCLUS-BIOSURFACTANT ON SELECTED INDICATORS

10.46235/1028-7221-17066-IOM

INFLUENCE OF MONOACYLTREHALOSE FRACTION OF RHODOCOCCLUS-BIOSURFACTANT ON SELECTED INDICATORS OF THE IMMUNE SYSTEM DURING ORAL ADMINISTRATION

Gein S. V. ^{a, b},

Yuzhaninova J. D. ^a,

Kuyukina M. S. ^{a, b},

Ivshina I. B. ^{a, b}

^a Institute of ecology and genetics of microorganisms - Perm Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation.

^b Perm State National Research University, Perm, Russian Federation.

Резюме

В последнее десятилетие микробные биосурфактанты, наряду с традиционным применением в качестве эмульгаторов и солюбилизаторов гидрофобных веществ, привлекают внимание как возможные агенты биомедицины. Это обусловлено уникальными проявлениями биологической активности биосурфактантов, не обнаруживаемыми у синтетических аналогов: способность проявлять антибактериальную, противогрибковую, противовирусную, противоопухолевую или иммуномодулирующую активность в зависимости от структуры молекул. Цель работы – изучение влияния *Rhodococcus*-биосурфактанта и его моноацилтрегалозной фракции на продукцию IL-2, IL-4, IFN- γ , IL-17, апоптоз CD4⁺ и CD8⁺ - спленоцитов при однократном пероральном введении, а также на гуморальный и клеточноопосредованный иммунитет и реакцию хозяина против трансплантата (РХТП) при курсовом пероральном введении *in vivo*.

Установлено, что при пероральном однократном введении моноацилтрегалозная фракция *Rhodococcus*-биосурфактанта угнетала Кон А-индуцированную продукцию IL-2 и IFN- γ , стимулировала выработку IL-4 и не влияла на уровень IL-17 спленоцитами, нефракционированный *Rhodococcus*-биосурфактант оказывал угнетающее действие только на продукцию IFN- γ . Пероральное однократное введение мышам моноацилтрегалозы приводило к снижению процента раннего и позднего апоптоза CD8⁺ лимфоцитов, а также позднего апоптоза CD4⁺ Т-клеток. При этом нефракционированный биосурфактант снижал только процент раннего апоптоза CD8⁺ Т-лимфоцитов. В процессе 24 ч культивирования CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов выявлено лишь единичное статистически значимое снижение процента CD4⁺ клеток в состоянии позднего апоптоза в стимулированных Кон А культурах у мышей, получавших моноацилтрегалозу. В условиях курсового перорального введения моноацилтрегалозная фракция приводила к снижению количества ядродержащих клеток в селезенке, угнетению антителогенеза, а также к подавлению выраженности реакций ГЗТ и РХТП. Таким образом, пероральное введение мышам моноацилтрегалозной фракции *Rhodococcus*-биосурфактанта приводило к снижению продукции Th1 цитокинов, что способствует смещению дифференцировки Th0 в сторону Th2 клеток. Моноацилтрегалоза не оказывала апоптогенного действия, и даже напротив, снижала процент позднего апоптоза CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов. Следовательно, апоптоз не является одним из возможных механизмов реализации иммуносупрессии, индуцированной компонентами *Rhodococcus*-биосурфактанта.

Ключевые слова: моноацилтрегалоза, *Rhodococcus*, цитокины, апоптоз, лимфоциты, трансплантат.

Abstract

In the last decade, microbial biosurfactants, along with their traditional use as emulsifiers and solubilizers of hydrophobic substances, have attracted attention as possible biomedicine agents. This is due to the unique manifestations of the biological activity of biosurfactants, not found in synthetic analogs: the ability to exhibit antibacterial, antifungal, antiviral, antitumor or immunomodulatory activity depending on the structure of the molecules. The purpose of the work is to study the effect of *Rhodococcus* biosurfactant and its monoacyltrehalose fraction on the production of IL-2, IL-4, IFN- γ , IL-17, apoptosis of CD4⁺ and CD8⁺ splenocytes with a single oral administration, as well as on humoral and cell-mediated immunity and response host versus graft (HVG) with a course of oral administration in vivo.

It was found that the single oral administration of monoacyltrehalose fraction of *Rhodococcus* biosurfactant inhibited Con A-induced production of IL-2 and IFN- γ , stimulated IL-4 production and had no effect on levels of IL-17 by splenocytes. Unfractionated *Rhodococcus* biosurfactant had an inhibitory effect only on IFN- γ production. Oral administration of monoacyltrehalose to mice resulted in a decrease in the percentage of early and late apoptosis of CD8⁺ lymphocytes, and a decrease in the percentage of late apoptosis of CD4⁺ T cells. Only the percentage of early apoptosis of CD8⁺ T lymphocytes was reduced by unfractionated biosurfactant. During 24 hours of culture, we found a single statistically significant effect of reducing the percentage of CD4⁺ cells in a state of late apoptosis in Con A-stimulated cultures from mice treated with monoacyltrehalose. Under conditions of a course of oral administration, the monoacyltrehalose fraction led to a decrease in the number of nucleated cells in the spleen, inhibition of antibody genesis, as well as suppression of the severity of DTH and RHVG reactions. Thus, oral administration of the monoacyltrehalose fraction of *Rhodococcus* biosurfactant to mice resulted in decreased Th1 cytokine production, which contributes to a shift in Th0 differentiation towards Th2 cells. The monoacyltrehalose fraction had no apoptogenic effect and, on the contrary, reduced the percentage of late apoptosis of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes. Therefore, apoptosis is not one of the possible mechanisms of immunosuppression induced by *Rhodococcus ruber*-biosurfactant components.

Keywords: monoacyltrehalose, *Rhodococcus*, cytokines, apoptosis, lymphocytes, transplant.

1 Введение

В последнее десятилетие микробные биосурфактанты, наряду с традиционным применением в качестве эмульгаторов и солюбилизаторов гидрофобных веществ, привлекают внимание как возможные агенты биомедицины. Это обусловлено уникальными проявлениями биологической активности биосурфактантов, не обнаруживаемыми у синтетических аналогов: способность проявлять антибактериальную, противогрибковую, противовирусную, противоопухолевую или иммуномодулирующую активность в зависимости от структуры молекул [17]. Микроорганизмы активно синтезируют биосурфактанты, главным образом, при использовании источников углерода с низким сродством к воде, например, углеводов. Наиболее изученной и широко применяемой подгруппой микробных биоПАВ являются гликолипиды, к которым относятся: рамнолипиды, софоролипиды, трегалолипиды и др. [15].

В последние годы обсуждается применение гликолипидных биосурфактантов в биомедицине с акцентом на терапевтическую практику [8, 13]. Наиболее перспективными для применения в качестве иммуномодуляторов являются биосурфактанты, продуцируемые бактериями родов *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, *Nocardia* и *Rhodococcus*. Они представлены трегалолипидами, содержащими в молекуле гидрофильный остаток трегалозы, ковалентно связанный с одним или двумя остатками высокомолекулярных жирных (миколовых) кислот [7, 14]. Однако токсичность биоПАВ патогенных продуцентов существенно ограничивает их терапевтическое применение. В сравнении с биоПАВ патогенных бактерий трегалолипиды родококков обладают меньшей токсичностью, что обусловлено меньшей длиной углеродной цепи миколовых кислот [16].

Механизм иммуномодулирующего действия бактериальных гликолипидов основан на их взаимодействии с лектиновыми рецепторами С-типа, экспрессированных на мембране клеток врожденного иммунитета (CLRs). Связываясь с CLRs-рецепторами на клеточной мембране клеток врожденного иммунитета, гликолипид активирует экспрессию транскрипционного фактора *Nf-kb* [12]. Ранее проведенные нами исследования иммуномодулирующего потенциала биосурфактантов, синтезируемых *Rhodococcus ruber*, выявили [2, 4] их способность влиять как на врожденный, так и адаптивный иммунитет. Так внесение трегалолипидного биосурфактанта *R. ruber* ИЭГМ 231 в культуру моноцитов периферической крови человека в системе *in vitro* стимулировало выработку провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-6, TNF- α [5, 10], также была отмечена индукция секреции IL-8 нейтрофилами [1]. В системе *in vivo*, напротив, исследуемый трегалолипид оказывал угнетающее влияние на продукцию IL-1 β , TNF- α и стимулировал секрецию IL-10 [2].

Цель данной работы – изучение влияния *Rhodococcus*-биосурфактанта и его моноацилтрегалозной фракции на продукцию IL-2, IL-4, IFN- γ , IL-17,

апоптоз CD4⁺ и CD8⁺ - спленоцитов при однократном пероральном введении, а также на гуморальный и клеточноопосредованный иммунитет и реакцию хозяин против трансплантата (РХТП) при курсовом пероральном введении *in vivo*.

2 Материалы и методы

Все эксперименты были проведены на мышах линии Swiss средней массой 20–22 г. Животные содержались в условиях лабораторного вивария, двухразовом питании натуральным кормом в количестве, соответствующем суточным нормам, при неограниченном доступе к воде. Эксперименты проведены в соответствии с этическими нормами и рекомендациями по гуманизации работы с лабораторными животными и одобрены локальным этическим комитетом ИЭГМ УрО РАН.

Все животные были разбиты на 3 группы: 1-я группа – контрольная, мышам этой группы однократно перорально вводили 2 мкл 0,9% NaCl; 2-я – мыши, которым однократно перорально вводили моноацилтрегалозу в дозе 100 мг/кг; 3-я – мыши, которым однократно перорально вводили нефракционированный биосурфактант в дозе 100 мг/кг. Выделение доминирующей фракции из гликолипидного комплекса *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 231 проводили согласно опубликованной ранее методике [11]. Через 3 часа после введения препаратов животных выводили из эксперимента путем декапитации под эфирным наркозом и выделяли спленоциты путем гомогенизации селезенки в среде RPMI 1640. Взвесь спленоцитов центрифугировали при 1500 об/мин в течение 10 мин. Получившийся осадок ресуспендировали в среде, проводили подсчет клеток в камере Горяева, необходимый для приготовления концентрации 1×10^7 клеток/мл. Для анализа цитокиновой секреции спленоциты культивировали в течение 24 ч в 96-луночных планшетах при температуре 37°C. Культивирование проводили в полной культуральной среде, которую готовили на основе среды RPMI 1640 (Gibco, Великобритания) с добавлением 10 mM HEPES (Биолот, Россия), 100 мкг/мл гентамицина (Белмедпрепараты, Беларусь), 2 mM Glutamax (Invitrogen, США), 1% MEM-заменимых аминокислот (Invitrogen, США), 1mM натрий пирувата (Invitrogen, США) и 20 мкл фетальной коровьей сыворотки (FCS, ICN) (Invitrogen). Для индукции синтеза цитокинов использовали конканавалин А (Кон А) в концентрации 20 мкг/мл (MP Biomedicals, Франция).

Оценку концентрации цитокинов IL-17, IL-2, IL-4 и IFN- γ проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа с помощью иммуноферментных тест-систем R&D Systems (США) и спектрофотометра Infinite M200 (Tecan, Швейцария).

Оценку апоптоза CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов проводили в первый день сразу после выведения животных из эксперимента и во второй день после 24 ч культивирования в полной питательной среде. Изолированные селезенки гомогенизировали для получения суспензии спленоцитов. Клетки из

суспензии разносили по пробам для анализа на первые и вторые сутки. При пробоподготовке для анализа на первые сутки эритроциты в суспензии лизировали раствором NH_4Cl с ЭДТА, клетки окрашивали моноклональными антителами PE anti-mouse CD4 и PE anti-mouse CD8 (BioLegend, США) в течение 20 мин в соответствии с инструкцией производителя, после чего клетки отмывали DPBS (Sigma, США) и окрашивали с помощью реагентов Annexin V-FITC/7-AAD kit (Beckman Coulter, США) в соответствии с инструкцией производителя, и регистрировали апоптоз лимфоцитов методом проточной цитометрии на проточном цитофлюориметре CytoFLEX (Beckman Coulter, США). Для анализа на вторые сутки пробы с культивированными спленоцитами готовили аналогичным способом. Путем гейтирования в популяции CD4/CD8 лимфоцитов выделяли 3 субпопуляции клеток, в разной степени окрашенных красителями Annexin V и 7-AAD: жизнеспособные неапоптотические клетки (AnV^- , 7-ADD^-); ранние апоптотические клетки (AnV^+ , 7-ADD^-); поздние апоптотические-некротические клетки (AnV^+ , 7-ADD^+).

Антителогенез и реакцию «хозяин против трансплантата» (РХТП) оценивали на фоне курсового введения биосурфактанта и моноацилтрегалозной фракции. Для оценки антителогенеза, соединения вводили перорально, последовательно, через день, в дозировке 100 мг/кг, в течение 5 сут. Через 3 ч после введения последней дозы животных иммунизировали эритроцитами барана в брюшную полость, в концентрации 10^8 в 200 мкл физиологического раствора. На 4-й день мышам вводили разрешающую дозу эритроцитов барана 10^8 в 200 мкл под кожу левой стопы и аналогичный объем физиологического раствора NaCl , 0,9% под кожу правой стопы, для индукции реакции гиперчувствительности замедленного типа. На 5-й день животных выводили из эксперимента методом декапитации под эфирным наркозом. Количество антителообразующих клеток оценивали в селезенке методом локального гемолиза в геле агарозы по Ерне. Клеточноопосредованный иммунитет оценивали по выраженности реакции ГЗТ, результаты представляли в виде разницы толщины опытной и контрольной стопы в виде индекса реакции, который рассчитывали по формуле: $(P_o - P_k) / P_k * 100\%$, где P_o - показатели массы или толщины в опытной конечности; P_k - то же в контрольной конечности.

Выраженность иммунного ответа на аллогенные спленоциты в РХПТ регистрировали по увеличению клеточности регионального подколенного лимфатического узла [6]. Для моделирования реакции РХПТ использовали модель трансплантации аллогенных обработанных камптотецином спленоцитов с оценкой разницы в клеточности регионального и отдаленного лимфатического узла. МАТ вводили один раз в сутки перорально в дозе 100 мг/кг в течение 7 сут с момента введения аллогенных спленоцитов. Для этого животным подкожно под апоневроз стопы вводили 100 мкл суспензии аллогенных спленоцитов в дозе 1×10^7 , обработанных камптотецином 50

мкг/мл. На 7-е сут животных выводили из эксперимента, выделяли региональный (правый) и отдаленный (левый) л/у, подсчитывали количество клеток.

Статистический анализ полученных результатов проводили с использованием непарного *t* критерия Стьюдента. Данные представлены в виде средней и стандартной ошибки ($M \pm m$).

3 Результаты исследований

Установлено, что в Кон А-стимулированных культурах спленоцитов мышцей при пероральном способе введения МАТ оказывала угнетающее действие на продукцию IL-2 и IFN- γ , стимулировала выработку IL-4 и не влияла на уровень IL-17 (рис. 1). По сравнению с очищенной доминирующей фракцией нефракционированный *Rhodococcus*-биосурфактант показал значительно менее выраженный иммуномодулирующий эффект. Биосурфактант статистически значимо снижал продукцию IFN- γ , не влияя на секрецию остальных цитокинов. Продукция цитокинов в нестимулированных культурах была ниже предела детекции тест-систем. Таким образом, судя по полученным данным, моноацилтрегалозная фракция *Rhodococcus*-биосурфактанта может обладать выраженным Th2-поляризующим эффектом.

При оценке влияния *Rhodococcus ruber*-биосурфактанта и его моноацилтрегалозной фракции на апоптоз CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов было отмечено (табл. 1), что на момент выведения животных из эксперимента процент апоптотирующих Т-лимфоцитов, находящихся на стадии раннего апоптоза, был выше процента лимфоцитов в позднем апоптозе/некрозе. Данный факт свидетельствует о том, что большая часть апоптотирующих клеток либо была активирована, либо только вступила на путь апоптоза и еще сохраняла целостность поверхностной мембраны. Пероральное введение мышам моноацилтрегалозы приводило к снижению уровня раннего и позднего апоптоза CD8⁺ лимфоцитов, а также к снижению уровня позднего апоптоза CD4⁺ Т-клеток. Нефракционированный биосурфактант снижал только уровень раннего апоптоза CD8⁺ Т-лимфоцитов. На динамику позднего апоптоза биосурфактант статистически значимо не влиял, однако обращает на себя внимание в соответствующих группах животных явная тенденция к снижению процента CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток.

Помимо этого, мы оценили динамику апоптотических процессов CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов в процессе 24 ч культивирования в спонтанных и в Кон А стимулированных культурах. В стимулированных Кон А культурах процент клеток в состоянии апоптоза был значительно выше, нежели в нестимулированных. Нами был выявлен единичный статистически значимый эффект, заключающийся в снижении процента CD4⁺ клеток в состоянии позднего апоптоза в стимулированных Кон А культурах у мышцей, получавших моноацилтрегалозу. Статистически недостоверная тенденция к угнетению данного параметра прослеживалась в группе животных, получавших биосурфактант. Изменений динамики раннего и позднего апоптоза CD8⁺ Т-

лимфоцитов в спонтанных и Кон А индуцированных культурах у мышей, как получавших моноацилтрегалозу, так и нефракционированный биосурфактант, зарегистрировано не было (табл. 2).

Установлено, что в условиях курсового введения моноацилтрегалозная фракция приводила к снижению количества ядродержащих клеток (ЯСК) в селезенке, как следствие угнетению абсолютного числа АОК, а также подавляла выраженность реакции ГЗТ, в то время как нефракционированный биосурфактант статистически значимого влияния на данные показатели не оказывал (табл. 3). Аналогичные по направленности эффекты были зафиксированы при анализе влияния моноацилтрегалозной фракции на динамику РХПТ. Как видно из рис. 2, в группе мышей, получавших моноацилтрегалозу, было выявлено статистически достоверное снижение разницы в клеточности между регионарным и отдаленным лимфатическим узлом по сравнению с животными контрольной группы.

4 Обсуждение

Таким образом, пероральное введение моноацилтрегалозной фракции *Rhodococcus* - биосурфактанта приводит к подавлению функциональной активности спленоцитов, аналогичное тому, что ранее было показано для внутримышечного и внутрибрюшинного путей введения [11]. Этот факт свидетельствует о независимости биологического действия моноацилтрегалозы от пути введения в организм. Как установлено в настоящей работе, моноацилтрегалозная фракция *Rhodococcus*-биосурфактанта не оказывала апоптогенного действия, и даже напротив, снижала уровень апоптоза CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов, как непосредственно после выведения животных из эксперимента, так и после 24 ч культивирования. Следовательно, апоптоз не является одним из возможных механизмов реализации иммуносупрессии, индуцированной компонентами *Rhodococcus*-биосурфактанта. Предположительно, снижение апоптотической гибели Т-лимфоцитов связано с увеличением экспрессии белков-ингибиторов апоптоза за счет активации Nf-kb, экспрессия которого возрастает при взаимодействии гликолипидов с лектиновыми рецепторами С-типа [12]. В тоже время, опираясь на данные исследования [9] о влиянии софоролипидов на дифференцировку макрофагов с провоспалительных на супрессорные, можно предположить, что моноацилтрегалоза также может способствовать поляризации макрофагов в сторону M2-фенотипа. Ранее нами было показано, что при внутримышечном и внутрибрюшинном способах введения моноацилтрегалозная фракция *Rhodococcus*-биосурфактанта модулировала ряд показателей врожденного и адаптивного иммунитета, в частности снижала количество антителообразующих клеток, угнетала продукцию IL-1 β , TNF- α , IFN- γ [2, 11] и стимулировала секрецию IL-10 [11]. Макрофаги, поляризованные в M2-фенотип, продуцируют IL-10, который, в свою очередь, ингибирует секрецию Th1-цитокинов, что смещает дифференцировку Т-лимфоцитов в сторону Th2-клеток.

Ранее нами было показано, что на фоне однократного внутрибрюшинного и внутримышечного введения моноацилтрегалозы наблюдалось угнетение антителогенеза [3]. Данные феномен нашел свое подтверждение и при курсовом пероральном введении, при этом снижение количества АОК зависело от снижения клеточности селезенки, а не от непосредственного угнетения функциональной активности лимфоцитов. Аналогичным образом наблюдалось снижение клеточности регионарного лимфатического узла на фоне введения в стопу аллогенных спленоцитов при РХПТ, что подтверждает наличие иммуносупрессорного эффекта у доминирующего компонента *Rhodococcus*-биосурфактанта.

Исследования проведены в рамках государственного задания, номер государственной регистрации темы № АААА-А19-119112290007-7 и 123041400034-2.

ТАБЛИЦЫ

Таблица 1. Влияние биосурфактанта *R. ruber* IEGM 231 и его моноацилтрегалозной фракции на показатели раннего и позднего апоптоза в CD4+ и CD8+ субпопуляций Т-лимфоцитов.

Table 2. Effect of biosurfactant *R. ruber* IEGM 231 and its monoacyltrehalose fraction on early and late apoptosis in CD4+ and CD8+ T-lymphocyte subpopulations.

	Апоптотические лимфоциты, % Apoptotic lymphocytes, %			
	CD4+		CD8+	
	Ранний апоптоз Early apoptosis	Поздний апоптоз Late apoptosis	Ранний апоптоз Early apoptosis	Поздний апоптоз Late apoptosis
Контроль Control	7,50±0,41	3,85±0,34	6,4±0,2	4,29±0,56
МАТ	7,89±0,66	2,93±0,24*	5,11±0,52*	2,26±0,34*
Б/с B/s	7,27±0,60	3,30±0,16	5,37±0,47	3,41±0,46

Примечание. Здесь и далее: МАТ – моноацилтрегалоза; Б/с – биосурфактант.
 * – $p < 0,05$ к контролю, $n=11$.

Note. МАТ – monoacyltrehalose; B/s – biosurfactant. * – $p < 0,05$ to control, $n=11$.

Таблица 2. Влияние биосурфактанта *R. ruber* IEGM 231 и его моноацилтрегалозной фракции на показатели раннего и позднего апоптоза CD4⁺ и CD8⁺ субпопуляций Т-лимфоцитов в 24 ч культурах спленоцитов.

Table 2. Effect of biosurfactant *R. ruber* IEGM 231 and its monoacyltrehalose fraction on early and late apoptosis in CD4⁺ and CD8⁺ T-lymphocyte subpopulations in 24 hour cultures.

Ранний апоптоз, %				
Early apoptosis, %				
	CD4 ⁺		CD8 ⁺	
	sp	st	sp	st
Контроль Control	7,19±1,11	29,14±3,46 #	7,55±1,22	35,43±4,49 #
МАТ	7,78±0,97	33,04±4,16	7,94±0,99	27,12±5,73
Б/с B/s	9,21±1,42	35,55±5,27	7,63±1,44	40,67±5,35
Поздний апоптоз, %				
Late apoptosis, %				
	CD4 ⁺		CD8 ⁺	
	sp	st	sp	st
Контроль Control	14,85±2,61	37,85±5,96 #	25,07±6,33	36,48±7,17
МАТ	21,72±3,86	24,74±1,26*	34,39±4,73	37,54±3,00
Б/с B/s	19,99±4,30	25,78±3,29	27,74±6,12	33,10±6,25

Примечание. sp – спонтанные пробы, st – стимулированные Con A пробы. * – p < 0,05 к контролю, # – p < 0,05 к спонтанным культурам, n=8.

Note. sp – spontaneous cultures, st – Con A stimulated cultures.* – p < 0,05 to control, # – p < 0,05 to spontaneous cultures, n=8.

Таблица 3. Влияние биосурфактанта *R. ruber* IEGM 231 и его моноацилтрегалозной фракции на количество АОК и выраженность реакции ГЗТ при курсовом пероральном введении.

Table 3. Effect of biosurfactant *R. ruber* IEGM 231 and its monoacyltrehalose fraction on number of PFC and DTH reaction with a course of oral administration.

	ЯСК Nucleated cells	Log АОК/млн Log PFC/mln	Log АОК/опг Log PFC/spleen	ГЗТ % DTH %
Контроль Control	376±36,44	2,80±0,08	5,36±0,07	12,98±3,77
МАТ	203,33±15,26*	2,58±0,12	4,88±0,11*	4,10±1,10*
Б/с B/s	343,5±41,85	3,00±0,07	5,52±0,08	14,88±0,83

Примечание. Здесь и далее: МАТ – моноацилтрегалоза; Б/с – биосурфактант.

* – $p < 0,05$ к контролю, $n=7$.

Note. PFC - plaque forming cell; МАТ – monoacyltrehalose; B/s – biosurfactant. * – $p < 0,05$ to control, $n=7$.

РИСУНКИ

Рисунок 1. Влияние моноацилтрегалозы и *Rhodococcus*-биосурфактанта на продукцию IL-2, IL-4, IFN- γ и IL-17 в стимулированных культурах спленоцитов. По оси абсцисс: К – контроль, МАТ – моноацилтрегалоза, Б/с – *Rhodococcus*-биосурфактант; sp – спонтанные пробы, st – стимулированные Con A пробы. * – $p < 0,05$ к контролю, $n=7$.

Figure 1. Effect of monoacyltrehalose and *Rhodococcus* biosurfactant on the production of IL-2, IL-4, IFN- γ and IL-17 in stimulated splenocyte cultures. On the abscissa axis: K – control, MAT – monoacyltrehalose, B/s – *Rhodococcus*-biosurfactant; sp – spontaneous tests, st – Con A stimulated tests. * - $p < 0.05$ in relation to control, ($n=7$).

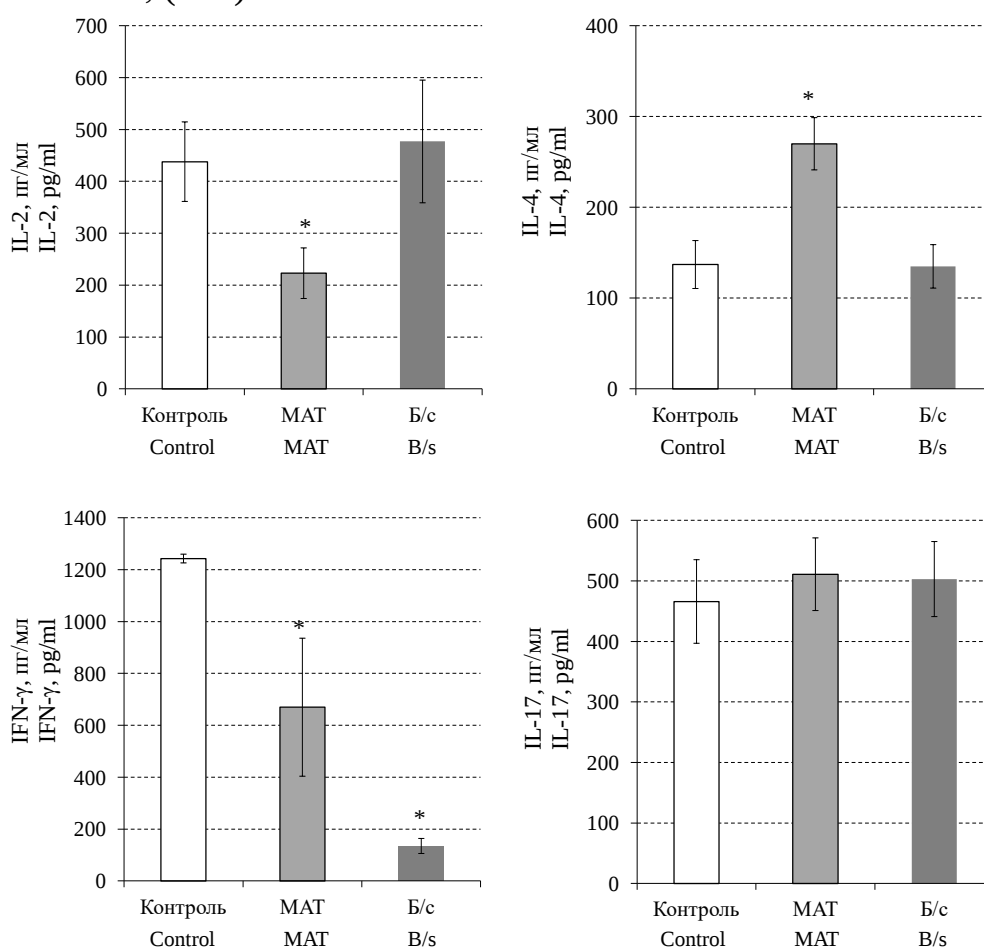
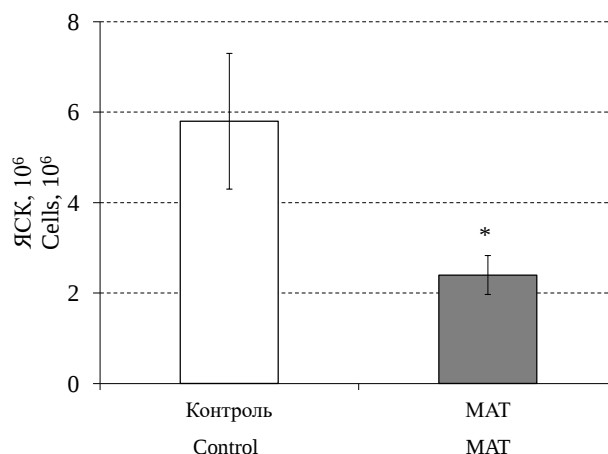


Рисунок 2. Влияние моноацилтрегалозы (МАТ) на разницу в количестве ЯСК между регионарным и отдаленным лимфатическим узлом в РХПТ. * – $p < 0,05$ к контролю, (n=8).

Figure 2. The effect of monoacyltrehalose (MAT) on the difference in the number of cells between regional and distant lymph nodes in the RHVG. * - $p < 0.05$ in relation to control, (n=8).



ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ_МЕТАДАННЫЕ

Блок 1. Информация об авторе ответственном за переписку

Гейн Сергей Владимирович – доктор медицинских наук, директор ФГБУ Институт экологии и генетики микроорганизмов – филиал Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН, профессор кафедры микробиологии и иммунологии ФГАОУ ВО Пермский государственный национальный исследовательский университет;

адрес: 614081, г. Пермь, ул. Голева, 13;

телефон: 8(902)831-77-05;

e-mail: gein@iegm.ru

Gein Sergey V. MD, director of Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms - Perm Federal Research Center, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences; professor of department of microbiology and immunology Perm State National Research University;

address: 614081 Perm, Goleva 13;

telephone: 8(912)781-81-25;

e-mail: gein@iegm.ru

Блок 2. Информация об авторах

Южанинова Юлия Дмитриевна – Младший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН;

адрес: 614081, г. Пермь, ул. Голева, 13;

e-mail: yulyayd@mail.ru

Yuzhaninova Julia Dmitrievna, junior researcher, laboratory of molecular immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Ural Branch RAS.

Куюкина Мария Станиславовна - Доктор биологических наук, профессор кафедры микробиологии и иммунологии Пермского государственного университета;

адрес: 614081, г. Пермь, ул. Голева, 13;

e-mail: kuyukina@iegm.ru

Kuyukina Maria Stanislavovna, doctor of biology, professor of department of microbiology and immunology Perm State National Research University.

Ившина Ирина Борисовна - Академик РАН, доктор биологических наук, зав. лабораторией алканотрофных микроорганизмов ИЭГМ УрО РАН, профессор кафедры микробиологии и иммунологии Пермского государственного университета;

адрес: 614081, г. Пермь, ул. Голева, 13;

e-mail: ivshina@iegm.ru

Ivshina Irina Borisivna, doctor of biology, academic of RAS, Chief of Laboratory of Alkanotrophic Microorganisms “Institute of Ecology and Genetics of Microorganism Ural Branch Russian Academy of Sciences” – Branch of the FSBIS of the Perm Federal Research Centre of the Branch of the RAS; professor of department of microbiology and immunology Perm State National Research University.

Блок 3. Метаданные статьи

ВЛИЯНИЕ МОНОАЦИЛТРЕГАЛОЗНОЙ ФРАКЦИИ *RHODOCOCCLUS*-БИОСУРФАКТАНТА НА ОТДЕЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ПРИ ПЕРОРАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ
INFLUENCE OF MONOACYLTREHALOSE FRACTION OF RHODOCOCCLUS-BIOSURFACTANT ON SELECTED INDICATORS OF THE IMMUNE SYSTEM DURING ORAL ADMINISTRATION

Сокращенное название статьи для верхнего колонтитула:

ВЛИЯНИЕ МОНОАЦИЛТРЕГАЛОЗНОЙ ФРАКЦИИ *RHODOCOCCLUS*-БИОСУРФАКТАНТА НА ОТДЕЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ
INFLUENCE OF MONOACYLTREHALOSE FRACTION OF RHODOCOCCLUS-BIOSURFACTANT ON SELECTED INDICATORS

Ключевые слова: моноацилтрегалоза, *Rhodococcus*, цитокины, апоптоз, лимфоциты, трансплантат.

Keywords: monoacyltrehalose, *Rhodococcus*, cytokines, apoptosis, lymphocytes, transplant.

Оригинальные статьи.

Количество страниц текста – 8,

Количество таблиц – 3,

Количество рисунков – 2.

09.09.2023

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Порядко вый номер ссылки	Авторы, название публикации, выходные данные	ФИО, название публикации на английском	Полный интернет адрес
1.	Баева Т.А., Гейн С.В., Куюкина М.С. и др. Влияние гликолипидного Rhodococcus-биосурфактанта на секреторную активность нейтрофилов in vitro // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2014. Т. 157, №2. С. 202-206.	Baeva T.A., Gein S.V., Kuyukina M.S. et. al. Effect of glycolipid Rhodococcus biosurfactant on secretory activity of neutrophils in vitro. <i>Bulletin of Experimental Biology and Medicine</i> , 2014, Vol. 157, no. 3, pp. 202-206 (In Russ.)	https://www.elibrary.ru/item.asp?id=23961315
2	Гейн С.В., Кочина О.А., Куюкина М.С. и др. Влияние моноацилтрегалозной фракции Rhodococcus-биосурфактанта на показатели врождённого и адаптивного иммунитета in vivo // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2020. Т. 169. №. 4. С. 457–461.	Gein S.V., Kochina O.A., Kuyukina M.S. et. al. Effects of monoacyltrehalose fraction of Rhodococcus biosurfactant on the innate and adaptive immunity parameters in vivo. <i>Bulletin of Experimental Biology and Medicine</i> , 2020, Vol. 169, no. 4, pp. 457–461 (In Russ.)	https://www.elibrary.ru/item.asp?id=42631193
3	Кочина О.А., Куюкина М.С., Ившина И.Б. Влияние Rhodococcus-биосурфактанта и его доминирующей фракции на выраженность	Kochina O.A., Kuyukina M.S., Ivshina I.B. Influence of Rhodococcus-biosurfactant and its dominant fraction on the severity of humoral response in the in vivo system. <i>Meditinskaya</i>	https://www.elibrary.ru/item.asp?id=29758094

	гуморального ответа в системе in vivo // Медицинская иммунология. 2017. Т. 19. № 5. С. 40-41.	<i>Immunologiya</i> , 2017, Vol. 19, no. 5, pp. 40-41. (In Russ.)	
4	Куюкина М.С., Ившина И.Б., Гейн С.В. и др. In vitro иммуномодулирующая активность биосурфактантного гликолипидного комплекса из <i>Rhodococcus ruber</i> // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2007. Т. 144, N 9. С. 301- 305.	Kuyukina M.S., Ivshina I.B., Gein S.V. et. al. In vitro immunomodulating activity of biosurfactant glycolipid complex from <i>Rhodococcus ruber</i> . <i>Bulletin of Experimental Biology and Medicine</i> , 2007, Vol. 144, no. 9, pp. 301 - 305 (In Russ.)	https://www.elibrary.ru/item.asp?id=9541496
5	Черешнев В.А., Гейн С.В., Баева Т.А. и др. Модуляция цитокиновой секреции и окислительного метаболизма эффекторов врожденного иммунитета под влиянием <i>Rhodococcus</i> -биосурфактанта // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2010. Т. 149, N 6. С. 673-677.	Chereshnev V.A., Gein S.V., Baeva T.A. et. al. Modulation of cytokine secretion and oxidative metabolism of innate immune effectors by <i>Rhodococcus</i> biosurfactant. <i>Bulletin of Experimental Biology and Medicine</i> , 2010, Vol. 149, no. 6, pp. 673-677 (In Russ.)	https://www.elibrary.ru/item.asp?id=15168707
6	Ширшев С.В., Шилов Ю.И., Владыкина В.П. Динамика функциональной активности фагоцитирующих клеток при реакциях трансплантационного иммунитета и ее модуляция женскими	Shirshev S.V., Shilov J.I., Vladikina V.P. Dynamics of functional activity of phagocytic cells during transplantation immunity reactions and its modulation by female steroid hormones. <i>Meditinskaya Immunologiya</i> , 2000, Vol. 2, no. 2, pp. 205. (In Russ.)	https://www.elibrary.ru/contents.asp?id=33282308

	стероидными гормонами // Медицинская иммунология. 2000. Т. 2. № 2. С. 205.		
7	Banat I.M., De Rienzo M.A.D., Quinn G.A. Microbial biofilms: biosurfactants as antibiofilm agents // Applied microbiology and biotechnology. 2014. Vol. 98. P. 9915–9929.		doi: 10.1007/ s00253-014-6169-6
8	Cameotra S.S., Makkar R.S. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules // Current opinion in microbiology. 2004. Vol. 7. №. 3. P. 262–266.		doi: 10.1016/j.mib.2004.04.006
9	Diaz-Rodriguez P., Chen H., Erndt-Marino J.D. et al. Impact of select sophorolipid derivatives on macrophage polarization and viability // ACS Applied Bio Materials. 2018. Vol.2. №. 1. P. 601-612.		doi: 10.1021/acsabm.8b00799
10	Gein S.V., Kuyukina M.S., Ivshina I.B. et al. <i>In vitro</i> cytokine stimulation assay for glycolipid biosurfactant from <i>Rhodococcus ruber</i> : role of monocyte adhesion // Cytotechnology. 2011. Vol. 63. P. 559–566.		doi: 10.1007/s10616-011-9384-3

11	Gein S.V., Yuzhaninova J.D., Kuyukina M.S. et al. Effects of Monoacyltrehalose Biosurfactant from <i>Rhodococcus ruber</i> on the <i>in vivo</i> Production of IL-2, IL-4, IFN- γ , IL-17 // Lecture Notes in Networks and Systems. 2023. P. 444-449.		doi: 10.1007/978-3-031-28086-3_38
12	Fujiwara Y., Shiba H., Iwase R. et al. Inhibition of nuclear factor kappa-B enhances the antitumor effect of combination treatment with tumor necrosis factor-alpha gene therapy and gemcitabine for pancreatic cancer in mice // Journal of the American College of Surgeons. 2013. Vol. 216. №. 2. P. 320–332. e3.		doi: 10.1016/j.jamcollsurg.2012.09.016
13	Gupta S., Pruthi V. Exploiting the Significance of Biosurfactant for the Treatment of Multidrug-Resistant Pathogenic Infections // Biosurfactants for a Sustainable Future: Production and Applications in the Environment and Biomedicine. 2021. P. 339–352.		doi: 10.1002/9781119671022.ch15
14	Kügler J.H., Muhle-Goll C., Köhl B. et al. Trehalose lipid biosurfactants produced by the actinomycetes <i>Tsukamurella spumae</i> and <i>T.</i>		doi: 10.1007/s00253-014-5972-4

	<i>pseudospumae</i> // Applied microbiology and biotechnology. 2014. Vol. 98. P. 8905–8915.		
15	Naughton P.J., Marchant R., Naughton V. et al. Microbial biosurfactants: current trends and applications in agricultural and biomedical industries // Journal of applied microbiology. 2019. Vol. 127. №. 1. P. 12–28.		doi: 10.1111/jam.14243
16	Sakaguchi I., Ikeda N., Nakayama M. et al. Trehalose 6, 6'-dimycolate (cord factor) enhances neovascularization through vascular endothelial growth factor production by neutrophils and macrophages // Infection and immunity. 2000. Vol. 68. №. 4. P. 2043–2052.		doi: 10.1128/IAI.68.10.5991-5997.2000
17	Satpute S.K., Ibrahim M. B., Prashant K. D. et al. Biosurfactants, bioemulsifiers and exopolysaccharides from marine microorganisms // Biotechnology advances. 2010. Vol. 28. №. 4. P. 436–450.		doi: 10.1016/j.biotechadv.2010.02.006