

ВЛИЯНИЕ МЕТАБОЛИТОВ МИКРОСИМБИОНТОВ КИШЕЧНИКА ЧЕЛОВЕКА НА ПРОДУКЦИЮ ОКСИДА АЗОТА ПЕРИТОНЕАЛЬНЫМИ МАКРОФАГАМИ

Иванова Е. В., Бондаренко Т. А., Чайникова И. Н.,
Бухарин О. В.

ФГБУН «Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН»,
Оренбург, Россия

Метаболиты клинических культур *Clostridium spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Bacteroides spp.*, значительно подавляли *in vitro* базальную секрецию перитонеальными макрофагами (МФ) мышей оксида азота (NO). Напротив, метаболиты *Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.* и *Propionibacterium spp.* умеренно стимулировали секрецию NO. Суммарный эффект влияния метаболитов кишечных микросимбионтов на функциональную активность МФ, будет определяться их качественным и количественным составом при эубиозе и дисбиозе толстого кишечника человека.

Ключевые слова: метаболиты бактерий, оксид азота, макрофаги

Оксид азота (NO) является одной из ключевых сигнальных молекул воспаления и секретируется многими клетками, в том числе активированными макрофагами (МФ). Известно, что NO регулирует различные физиологические процессы, включая поддержание нормальной проницаемости кишечного барьера, киллинг патогенов, апоптоз, локальное и системное воспаление [1]. Одним из индукторов, активирующих МФ, служат различные группы химических соединений, входящих в состав метаболитов микроорганизмов [2].

Целью настоящей работы явилось изучение влияния метаболитов кишечных микросимбионтов на базальную (нестимулированную) продукцию NO перитонеальными макрофагами.

Материалы и методы. В работе использовали 96 штаммов бактерий, выделенных от пациентов при обследовании на дисбиоз кишечника: *Bifidobacterium bifidum* (n=27), *Bifidobacterium longum* (n=15), по 9 штаммов *Bifidobacterium pseudocatenulatum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Propionibacterium acnes*, *Bacteroides fragilis*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*. Выделение и идентификацию исследуемых микроорганизмов проводили по белковому профилю с использованием масс-спектрометра MALDI TOF MS серии Microflex LT («Bruker Daltonics», Германия). Для получения метаболитов (фильтратов) бульонные

культуры исследуемых бактерий двукратного центрифугирования (3200 об/мин) и фильтровали (мембранные фильтры с диаметром пор 0,22 мкм, «Millipore», USA). Донорами перитонеальных МФ служили 16 интактных мышей (СВАхС₅₇Bl₆)F₁. Концентрацию клеток, полученную после внутрибрюшинного введения среды 199 с 10% фетальной сывороткой и гепарином (10 ед/мл), доводили полной культуральной средой до 1×10⁶/мл, полученную суспензию инкубировали в планшетах 2 часа при 37°C. После удаления неприлипшей фракции к адгезированным МФ добавляли метаболиты микроорганизмов в соотношении 1,5:1 и культивировали в течение 24-48 часов в CO₂ инкубаторе (опыт) (Binder, Германия). Контролем служили перитонеальные МФ, к которым добавляли питательный бульон без микробных метаболитов. Определение содержания NO проводилось с использованием тест-системы Total NO/Nitrite/ Nitrite Assay по уровню его стабильного метаболита – нитрита.

Результаты и обсуждение. Инкубация перитонеальных МФ с метаболитами бифидо-, лакто- и пропионибактерий сопровождалась достоверным умеренным возрастанием базовой продукции NO по сравнению с контролем: уровень нитритов (Me; Q₂₅ – Q₇₅) в культуральной среде *B. longum* составил 74,8 (60,2-77,4) мкмоль/л, *B. bifidum* 66,8 – (61,6-74,8) мкмоль/л, *B. pseu-*

docatenulatum – 60,4 (58,8-62,6) мкмоль/л, *L. rhamnosus* 70,8 (70,3-72,3) мкмоль/л, *P. acnes* – 64,4 (63,8-65,6) мкмоль/л против 55,8 (54,2- 56,7) мкмоль/л в пробах без добавления метаболитов (контроль). Метаболиты клостридий и стафилококков супрессировали продукцию NO по отношению к контролю: в присутствии метаболитов *C. perfringens* и *S. aureus* содержание нитритов снижалось трехкратно и составляло соответственно 17,6 (15,6-19,6) и 18,6 (17,5-19,5) мкмоль/л ($p < 0,05$ по сравнению с контролем). Менее выраженное подавление продукции NO перитонеальными МФ выявлено для метаболитов *B. fragilis* – 33,6 (32,8-34,8) мкмоль/л ($p < 0,05$).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что присутствие в среде сокультивирования метаболитов кишечных микросимбионтов по – разному влияло на базальную продукцию NO перитонеальными МФ – от выраженной супрессии (представители родов *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Bacteroides*) до умеренной индукции (кисло-молочные и пропионибактерии). Исходя из гетерогенности (изоформы МФ) и пластичности макрофагов (способность к репрограммированию), NO рассматривается как один из маркеров, определяющих фенотип МФ (M1/M2 и промежуточные формы), отличающихся по функциональной активности [1]. M1 (классические) макрофаги, продуцируя провоспалительные цитокины, активные формы кислорода и азота (NO), обладают выраженными фагоцитарными, бактерицидными свойствами и интегрированы в Th1-зависимый иммунный ответ. M2 (альтернативные) макрофаги секретируют противовоспалительные цитокины, в меньшей степени NO, опосредуя Th2-зависимые реакции с инициацией репаративных процессов. Кишечные микросимбионты могут через поверхностные структуры, метаболиты влиять на поляризационный статус МФ [3]. Наши данные об ограничении секреции NO метаболитами клостридий, стафилококков и бактероидов свидетельствуют о поляризующем эффекте МФ в сторону M2 предположительно за счет бутирата, поскольку эти бактерии активно продуцируют бутират, который редуцируя iNO-синтазу, снижает продукцию NO [2]. Вместе с тем установленная в данной работе умеренная стимуляция мета-

болитами *Bifidobacterium* продукции NO МФ отражает влияние ацетата, преобладающего в их составе [4]. Очевидно, что исследованные в работе штаммы кисло-молочных бактерий не проявляли поляризующий эффект в отношении МФ [3]. Показано, что противовоспалительный эффект их реализуется преимущественно посредством влияния на профиль секретируемых иммунными эффекторами цитокинов с активацией Treg. Необходимо отметить, что установленное в работе умеренное стимулирующее влияние метаболитов *Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.* и *Propionibacterium spp.* можно рассматривать как способность представителей данных кишечных микросимбионтов усиливать бактерицидный потенциал макрофагов, реализуемый при участии оксида азота [1, 3]. В целом, суммарный эффект влияния метаболитов кишечных микросимбионтов на функциональную активность макрофагов, модулирующий потенциал метаболитов в отношении других эффекторов врожденного, адаптивного иммунитета и воспаления будет определяться качественным и количественным составом микросимбионтов, различающемся при эу- и дисбиозе толстого кишечника человека.

Исследование выполнено при финансовой поддержке фундаментальных научных исследований УрО РАН в рамках научных проектов № 15-5-4-7 и № 15-3-4-36.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm / C. D. Mills, K. Kincaid, J. M. Alt et al. // J. Immunol. – 2000. – Vol. 164, N. 12. – P. 6166-6173.
2. Short-Chain Fatty Acids Suppress Lipopolysaccharide-Induced Production of Nitric Oxide and Proinflammatory Cytokines Through Inhibition of NF- κ B Pathway in RAW264.7 Cells / T. Liu, J. Li, Y. Liu et al. // Inflammation. – 2012. – Vol. 35, N. 5. – P. 1676-1684.
3. Phenotypic Diversity and Emerging New Tools to Study Macrophage Activation in Bacterial Infectious diseases. Frontiers in Immunology / M. B. Ka, A. Daumas, J. Textoris et al. // 2014;5:500. doi:10.3389/fimmu.2014.00500.
4. Метаболический профиль бифидофлоры при различных микрoэкологических состояниях биотопы толстого кишечника человека / О. В. Бухарин, Е. В. Иванова, Н. Б. Перунова и соавт. // Журн. микробиол. 2017. – № 1. – С. 3-11

INFLUENCE OF INTESTINE MICROSymbionTS METABOLITES ON THE PRODUCTION OF NITRIC OXIDE BY PERITONEAL MACROPHAGES

Ivanova E. V., Bondarenko T. A., Chainikova I. N., Bukharin O. V.

"Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis", Orenburg, Russia

Metabolites of clinical cultures *Clostridium spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Bacteroides spp.* significantly inhibited *in vitro* basal secretion by peritoneal macrophages (MF) of nitric oxide (NO) mice. In contrast, metabolites of *Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.* and *Propionibacterium spp.* moderately stimulated the NO secretion. The overall effect of the metabolites influence of intestinal microsymbionts on the functional activity of MF will be determined by their qualitative and quantitative composition in the human intestine eubiosis and dysbiosis.

Key words: metabolites of bacteria, nitric oxide, macrophages

ИДИОТИПИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ИНДУКЦИИ И РЕГУЛЯЦИИ АУТОИММУННЫХ РЕАКЦИЙ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ АУТОИММУННОМ ЭНЦЕФАЛОМИЕЛИТЕ КРЫС

Иванов П. В., Меньшиков И. В., Бедулева Л. В.

ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», Ижевск, Россия

Целью работы являлась проверка гипотезы о том, что индукция и регуляция аутореактивных лимфоцитов в модели экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (ЭАЭ) крыс осуществляется опосредованно через идиотип-антиидиотипические (ИАИ) взаимодействия с участием лимфоцитов, продуцирующих антиидиотипические антитела со свойствами ревматоидного фактора (РФ). **Методы.** Крыс иммунизировали основным белком миелина морской свинки (ОБМмс). Исследовали кинетику образования антител и аутоантител в ходе иммунного ответа. Антитела к ОБМмс и аутоантитела к ОБМ крысы (ОБМк) определяли методом ИФА. РФ определяли в тесте агглютинации танализованных нагруженных IgG эритроцитов. Наличие ИАИ взаимодействий исследовали методом конкурентного ИФА. **Результаты.** Показано существование ИАИ взаимодействий между антителами к ОБМмс и РФ с одной стороны, и между антителами к ОБМк и РФ с другой. Обнаружена ассоциация между высоким уровнем РФ в крови и отсутствием клинических признаков ЭАЭ у иммунизированных животных. **Заключение.** Механизм индукции аутоантител к ОБМк при иммунизации ОБМмс опосредован ИАИ взаимодействиями с клонами лимфоцитов продуцирующими антиидиотипические антитела со свойствами РФ. Антиидиотипические антитела со свойствами РФ осуществляют специфическую негативную регуляцию гуморального иммунного ответа против гетерологичного антигена-индуктора ЭАЭ, ОБМмс через ИАИ взаимодействия.

Ключевые слова: рассеянный склероз, экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит, ревматоидный фактор, идиотип-антиидиотипические взаимодействия

Введение. Экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит (ЭАЭ) является демиелинизирующим заболеванием ЦНС, которое обнаруживает множество сходных признаков с рассеянным склерозом. Несмотря на боль-

шое количество проведенных исследований, причины развития аутоиммунной реакции и механизмы ее регуляции, во многом, не выяснены. Чаще всего как причину активации аутореактивных лимфоцитов рассматривают