

УДК 579.61

Л. П. ТИТОВ<sup>1</sup>, А. Е. ГОНЧАРОВ<sup>1</sup>, А. С. МУРАШКО<sup>1</sup>,  
Н. А. ГОЛОВНЕВА<sup>2</sup>, Э. И. КОЛОМИЕЦ<sup>2</sup>

### ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ БИФИДОБАКТЕРИЙ И ИХ КОМПОНЕНТОВ С ПОЛИНУКЛЕАРНЫМИ И МОНОНУКЛЕАРНЫМИ КЛЕТКАМИ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

<sup>1</sup>Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь,

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт микробиологии НАН Беларуси, Минск

(Поступила в редакцию 11.02.2013)

**Введение.** Бифидобактерии – одна из групп симбиотических бактерий кишечного и вагинального тракта человека и животных, играющих важную роль в поддержании важнейших физиологических процессов в этих биотопах. В связи с этим бифидобактерии являются объектом пристального внимания ученых, врачей и биотехнологов в качестве кандидатов для фармацевтического применения в здравоохранении и ветеринарной медицине при разнообразных заболеваниях. Создание на основе бифидобактерий новых пищевых добавок (про- или пребиотиков) является одной из важнейших задач вследствие их способности элиминировать из соответствующих биотопов болезнетворные микроорганизмы, повышать защитные свойства кишечного барьера и/или модулировать течение локальных иммунологических процессов [1–3]. Бифидобактерии обладают необычно высокой адгезивной активностью в отношении эпителия слизистых, а также выраженным противовоспалительным эффектом, продемонстрированным как *in vivo*, так и *in vitro* [4].

Род *Bifidobacterium* включает более 30 видов, объединенных в 9 подвидов. Это палочковидные полиморфные, неподвижные, не образующие спор грамположительные микроорганизмы размером (0,15–1,3)×(1,5–8,0) мкм, часто с утолщениями на концах. Бактерии хорошо культивируются на сложных мясопептонных средах в анаэробных или капнофильных условиях при температуре 37 °С и pH 6,0–8,0 с образованием круглых, гладких, однородно кремовых или белых непрозрачных пастообразных колоний с ровными краями диаметром 1–3 мм. Биохимическая активность бифидобактерий связана с образованием уксусной и молочной кислот при ферментации таких углеводов, как глюкоза, лактоза, сахароза и маннит. Наибольший интерес исследователей проявляется к таким видам бифидобактерий, как *B. bifidum*, *B. adolescentis*, *B. infantis*, *B. lactensis*, *B. breve*, *B. longum*, *B. suis*, *B. asteroides* [2].

В последние годы активизировались геномные и иммунологические исследования бифидобактерий. К настоящему времени осуществлено полногеномное секвенирование 10 штаммов, относящихся к 5 видам и 2 подвидам этих бактерий. Например, геном *B. bifidum* S17 локализован в одной хромосоме и насчитывает 2 186 882 п. н., 1782 белок-кодирующих генов, 53 гена тРНК и три *gpn* оперона (содержание G:C – 62 %). Новая геномная информация предоставляет исследователям большие возможности установления механизмов колонизации слизистой кишечника бактериями, изучения антагонистических свойств микроба против патогенной микрофлоры, их влияния на созревание и функционирование иммунной системы [2, 5].

Активный поиск бифидобактерий и изучение их штаммов, обладающих уникальными иммунобиологическими свойствами, позволяют обеспечить создание коммерческих продуктов.

Цель исследования – изучение взаимодействия изолятов бифидобактерий и их компонентов с полиморфноядерными и мононуклеарными клетками иммунной системы человека.

**Объекты и методы исследования.** Исследовано 4 штамма культур бактерий рода *Bifidobacterium*, полученных в лаборатории молочнокислых и бифидобактерий Института микробиологии НАН Бела-

руси. Штаммы характеризуются высокой устойчивостью к низким значениям pH, осмолотерантностью, перспективны для использования в составе стартовых заквасок в процессе получения ферментированных пробиотических молочных продуктов. Для проведения иммунологических исследований периферическую (венозную) кровь добровольцев в объеме 10 мл забирали утром натощак в стерильные полипропиленовые пробирки с гепарином. Иммунобиологический эффект бактериальных клеток бифидобактерий, их клеточных стенок и лизатов оценивали в отношении иммунокомпетентных клеток периферической крови: нейтрофилов, моноцитов и лимфоцитов.

*Культивирование бактерий.* Культуры бифидобактерий выращивали в течение 24 ч при 37 °C на жидкой питательной среде MRS с цистеином. Чистые культуры микроорганизмов получали путем посева отдельных колоний на агаризованной среде. Чистоту культур проверяли путем приготовления мазков с последующей окраской по методу Грама. В препарате чистые культуры бифидобактерий выявляли в виде грамположительных полиморфных палочек [6].

*Приготовление лизатов бактерий.* Культуры бактерий аккуратно смывали с плотной питательной среды, несколько раз отмывали в большом объеме фосфатного буферного раствора (DPBS), затем клетки суспендировали в 1 мл DPBS и помещали в стерильную пробирку. Суспензию бактерий лизировали путем 10–15-кратного замораживания-оттаивания в жидком азоте (до просветления взвеси). Далее взвесь центрифугировали при 13 000 g 30 мин, отбирали супернатант и фильтровали его через фильтры с диаметром пор 0,2 мкм [7].

*Получение фракции клеточных стенок.* Клетки бактерий стационарной фазы роста (20–24 ч) отделяли путем центрифугирования при 10 000 g и температуре 4 °C в течение 10 мин, дважды отмывали от остатков среды культивирования 0,05 М фосфатным буфером с pH 7.5. Для разрушения клеток использовали ультразвуковой дезинтегратор УЗДН-2Т. Режим обработки – 30 с пятикратно при 44 кГц, с охлаждением. Клеточные стенки осаждали из полученного гомогената путем центрифугирования при 10 000 g в течение 10 мин. Осадок промывали и замораживали при –20 °C для дальнейших экспериментов [8].

*Определение концентрации белка в лизатах бактерий и клеточных стенок.* Концентрацию белка определяли спектрофотометрическим методом при длине волны 280 нм на фотометре DU730 (Becton Dickinson, США) с использованием встроенных алгоритмов расчета концентрации [9].

*Оценка фагоцитоза бифидобактерий, меченных флуоресцеинизотиоцианатом.* 1. Из суточной культуры бактерий готовили суспензию в DPBS, содержащую  $3 \cdot 10^8$ /мл клеток. Бактерии прогревали в течение 30 мин при 95 °C и отмывали многократно в большом объеме DPBS. Бактерии ресуспендировали в карбонатно-бикарбонатном буфере, добавляли раствор флуоресцеинизотиоцианата (ФИТЦ) в диметилсульфоксиде – 0,5 мг/мл бактериальной суспензии, инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре и затем несколько раз отмывали в большом количестве DPBS. Бактерии, меченные ФИТЦ, хранили при 4 °C в DPBS до использования [10]. Перед постановкой фагоцитарной реакции меченные ФИТЦ бактерии промывали несколько раз в большом объеме DPBS. 2. Для постановки реакции фагоцитоза гепаринизированную цельную кровь в количестве 100 мкл помещали в полипропиленовую пробирку и добавляли 30 мкл суспензии бактерий, смесь тщательно перемешивали. Опытные и контрольные пробы инкубировали в течение 30 мин при 37 °C. По завершении инкубирования лизировали эритроциты раствором хлорида аммония в течение 15 мин. Затем клетки осаждали, после чего промывали DPBS. Учет результатов фагоцитарной реакции проводили с помощью цитофлуориметра (рис. 1, а–в) [10].

*Определение продукции реактивных форм кислорода фагоцитами.* Детекцию реактивных форм кислорода (reactive oxygen species – ROS) осуществляли с использованием дихлорфлуоресцеиндиацетата (DCFDA). Данное нефлуоресцирующее вещество проникает в цитоплазму фагоцитирующих клеток и под действием свободных радикалов кислорода и эстераз трансформируется в флуоресцеин, дающий яркое свечение в зеленом диапазоне. Для детекции ROS в пробирку с 250 мкл цельной венозной крови добавляли DCFDA в концентрации 10 мкМ и довели объем смеси питательной средой RPMI-1640 до 500 мкл. Смесь инкубировали в термостате при 37 °C на протяжении 10 мин. Затем к образцам добавляли: а) DPBS в качестве отрицательного контроля; б) форбол-12-миристат-13-ацетат (ФМА) (30 нг/мл) – стимулятор респираторного взрыва в ка-

честве положительного контроля; в) лизаты бактерий (1 мкг/мл по белку); г) клеточные стенки (1 мкг/мл). Реакционную смесь инкубировали в термостате при температуре 37 °С на протяжении 30 мин. Эритроциты лизировали, клетки осаждали путем центрифугирования, после чего в пробирки вносили по 300 мкл DPBS и проводили учет результатов с помощью проточного цитофлуориметра (рис. 1, з, д) [11, 12].

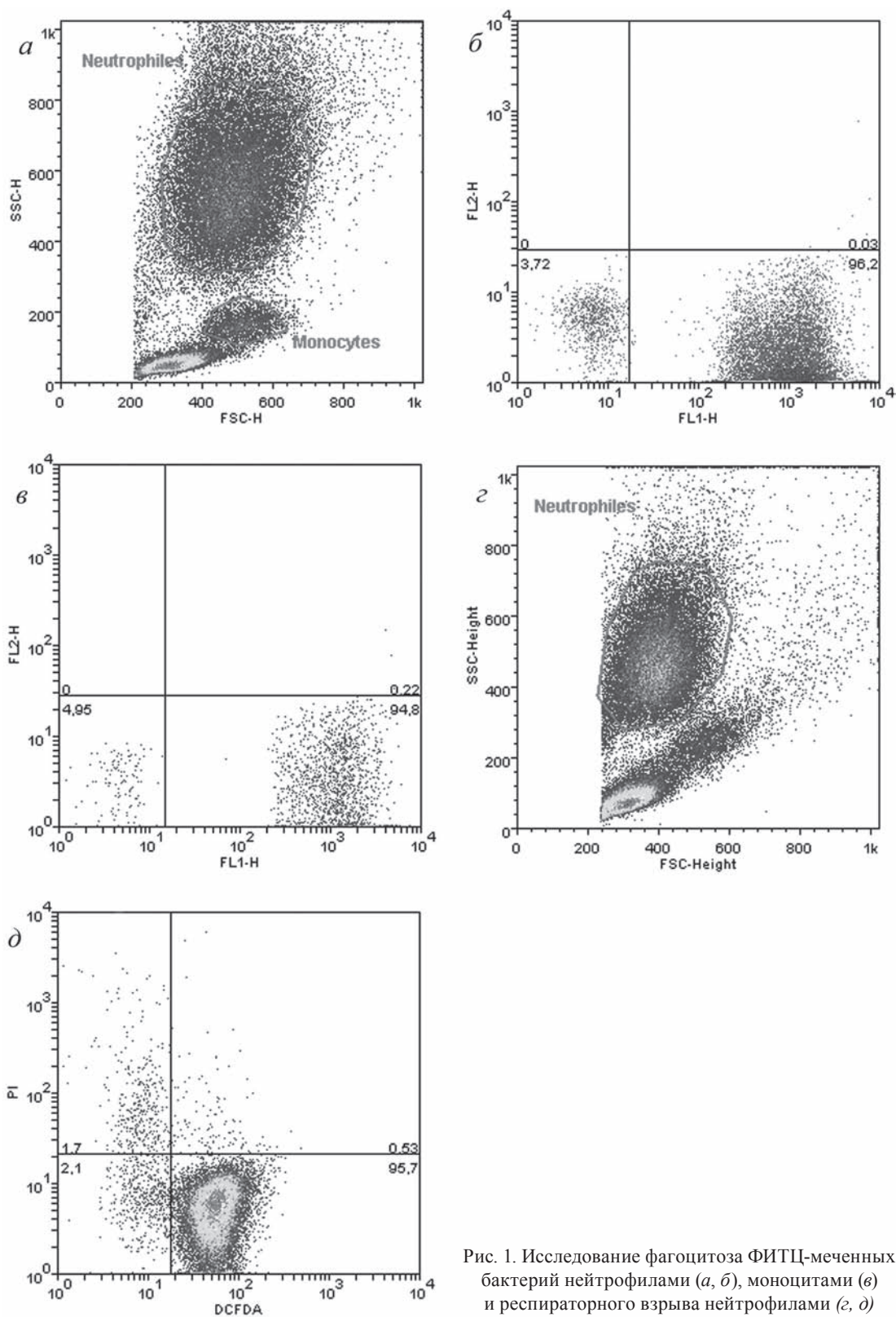


Рис. 1. Исследование фагоцитоза ФИТЦ-меченных бактерий нейтрофилами (а, б), моноцитами (в) и респираторного взрыва нейтрофилами (з, д)

*Определение внутриклеточных цитокинов.* К крови в количестве 500 мкл добавляли: 1) DPBS; 2) LPS *E. coli* (1 мкг/мл); 3) клеточные стенки бифидобактерий в количестве 0,1 и 1 мкг/мл каждого, доводили объем средой RPMI-1640 до 1 мл и культивировали 20 ч при температуре 37 °С. Затем добавляли монензин (10 мкг/мл) и дополнительно инкубировали в течение 4 ч. Образцы крови в количестве 100 мкл инкубировали с моноклональными антителами к CD14 15 мин при температуре 4 °С. Эритроциты лизировали 15 мин раствором хлорида аммония, а затем осаждали путем центрифугирования и удаляли супернатант. Клетки фиксировали в 4 %-ном растворе параформальдегида 10 мин, объем клеточной взвеси доводили DPBS до 3 мл и центрифугировали для осаждения клеток. Удалив супернатант, клетки ресуспендировали в 0,1 %-ном растворе сапонина для пермеабиллизации и инкубировали 15 мин, после чего отмывали в 3 мл DPBS. Надосадочную жидкость удаляли, клетки инкубировали с моноклональными антителами к внутриклеточным цитокинам (интерферону (ИНФ)- $\gamma$ , фактору некроза опухолей (ФНО)- $\alpha$ ) и соответствующими изотипическими контролями 30 мин при 4 °С. По истечении времени инкубации клетки отмывали от несвязавшихся антител, суспендировали в DPBS и исследовали на проточном цитофлуориметре.

*Определение маркеров активации и костимуляции клеток под действием бифидобактерий.* К крови в количестве 500 мкл добавляли: 1) DPBS; 2) LPS (1 мкг/мл); 3) ФМА (30 нг/мл); 4) клеточные стенки бифидобактерий в количестве 1 мкг/мл каждой, доводили объем средой RPMI-1640 до 1 мл и культивировали 24 ч при температуре 37 °С. Активированную кровь в количестве 100 мкл инкубировали с моноклональными антителами к CD14 (PerCP), CD3 (APC), CD69 (FITC) и CD80 (PE) 15 мин при температуре 4 °С. Эритроциты лизировали 15 мин раствором хлорида аммония, а затем осаждали путем центрифугирования и удаляли супернатант [13].

*Статистический анализ.* Статистическую обработку данных проводили с использованием программ Statistica версии 8 (StatSoft, США) и StatPlus версии 4.9 (AnalystSoft, США). Показатели представлены в виде медианы (Me) с 25-й и 75-й процентилями. Для статистической обработки использовали непараметрические методы. Различия показателей считали достоверными при  $P < 0,05$  [14, 15].

**Результаты и их обсуждение.** *Изучение штаммовых различий в чувствительности/резистентности культур бифидобактерий к фагоцитозу нейтрофилами и моноцитами крови человека.* Фагоцитарная реакция как важнейшая защитная реакция организма на инфекцию осуществляется преимущественно нейтрофильными фагоцитами, а также моноцитами в периферической крови и тканях. Реакция протекает в несколько стадий и завершается полным или неполным (незавершенным) фагоцитозом. Интенсивность протекания процесса и конечный эффект фагоцитарной реакции зависят как от функционального состояния клеток, так и от особенностей микроорганизма, его видовой или штаммовой чувствительности/резистентности.

Как свидетельствуют полученные данные, 4 исследованные культуры бифидобактерий отличались по их способности фагоцитироваться нейтрофилами периферической крови (рис. 2). Так, культура № 1 характеризовалась более низкой способностью поглощаться нейтрофилами ( $P < 0,001$ ) по сравнению с другими штаммами. В то же время культуры № 2 и № 4 более эффективно захватывались и поглощались нейтрофильными фагоцитами (соответственно 89,0 (85,0–95,0) % и 95,0 (90,0–97,0) % нейтрофилов). В целом же следует отметить высокую фагоцитарную активность нейтрофилов в отношении бифидобактерий.

Моноциты периферической крови добровольцев в отношении тех же культур бифидобактерий также характеризовались высокой фагоцитарной активностью, сравнимой с таковой нейтрофильных фагоцитов ( $P > 0,05$ ). Вместе с тем четко прослеживались одинаковые тенденции в отношении штаммовой способности бифидобактерий поглощаться как моноцитами, так и нейтрофилами крови. Например, культура № 1 проявляла себя более устойчивой к поглощению моноцитами, а культуры № 2–4 оказались более чувствительными, что сходно с фагоцитарной активностью нейтрофилов.

Представленные результаты фагоцитарной активности штаммов бифидобактерий нейтрофилами и моноцитами периферической крови также четко демонстрируют наличие штаммовых различий в способности бифидобактерий поглощаться нейтрофилами и моноцитами крови, равно



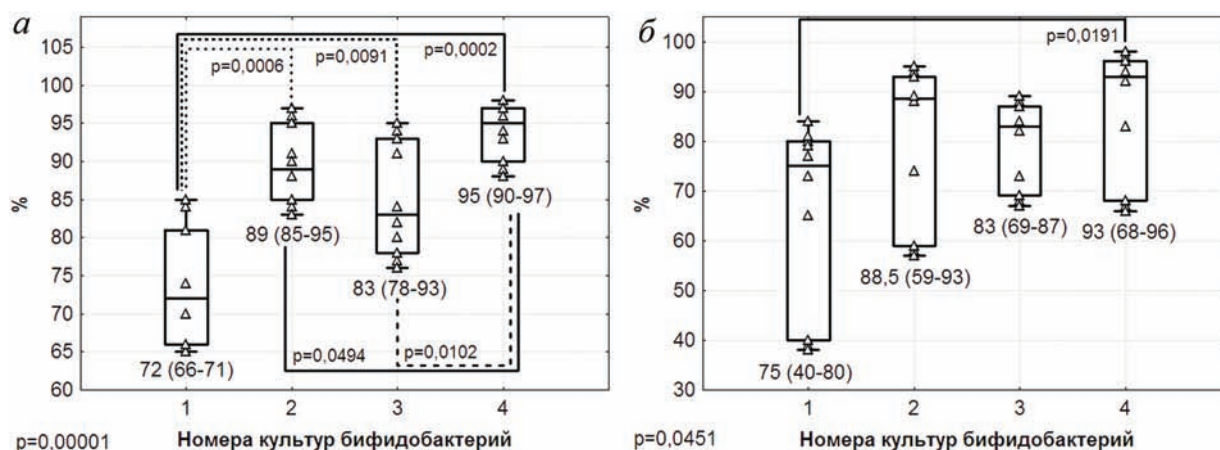


Рис. 2. Фагоцитарная активность клеток периферической крови (а – нейтрофилов; б – моноцитов) в отношении бифидобактерий (№ 1–4)

как и наличие определенных различий в фагоцитарной активности между нейтрофилами и моноцитами в отношении отдельных штаммов. Так, имеют место достоверные различия в резистентности/чувствительности между штаммами бифидобактерий № 1 и № 4 ( $P < 0,05$ ), а также близкие к статистически значимым различия между штаммами № 1 и № 2. При анализе штаммовых различий бифидобактерий при фагоцитозе моноцитами крови общая тенденция в чувствительности/резистентности между ними сохраняется, хотя достоверных различий не прослеживается.

*Изучение способности клеточных стенок и лизатов бифидобактерий стимулировать респираторный взрыв в нейтрофилах.* Респираторный взрыв – совокупность биохимических процессов в фагоцитирующих клетках (нейтрофилах, макрофагах), развиваемых в ответ на взаимодействие поверхностных мембранных рецепторов с бактериями, их компонентами или синтетическими активаторами. В результате связывания структурных компонентов бактерий (белков, полисахаридов, нуклеиновых кислот) с рецепторами фагоцитов формируются активационные сигналы, инициирующие образование в цитоплазме фагоцитов реактивных кислородсодержащих интермедиатов, таких как супероксидный анион, гидроксильный радикал и перекись водорода. Респираторный взрыв в фагоцитирующих клетках развивается при участии окислительно-восстановительных ферментов фагоцитов – оксидаз и, как правило, ассоциируется с активацией триггерных механизмов с вовлечением медиаторов воспаления – лейкотриенов, фактора активации тромбоцитов, фактора некроза опухолей и др.

На рис. 3 приведены результаты исследования активации нейтрофильных фагоцитов и продукции ими активных форм кислорода под воздействием препаратов клеточных стенок и клеточных лизатов испытуемых штаммов бифидобактерий.

Как видно, наибольшей активностью в стимуляции респираторного взрыва в нейтрофилах вызывало внесение в культуру нейтрофилов ФМА в качестве положительного контроля. Препараты клеточных стенок в соответствующих концентрациях также проявляли относительно высокую стимулирующую активность, сравнимую с таковой ФМА. Вместе с тем лизаты испытуемых культур бифидобактерий в концентрации 1 мкг/мл проявляли относительно невысокую активность, которая была достоверно ниже, чем у клеточных стенок ( $P < 0,05$ ). Существенных штаммовых различий разрушенных бактериальных клеток бифидобактерий в отношении стимуляции респираторного взрыва нейтрофилов не выявлено.

*Изучение влияния клеточных стенок штаммов бифидобактерий на экспрессию поверхностных молекул иммунокомпетентных клеток – CD69 и CD80.* Иммунный ответ организма человека на инфекционные агенты характеризуется сложностью механизмов, многокомпонентностью и многостадийностью. Однако в иммунном ответе можно выделить ряд ключевых событий, которые являются базовыми для функционирования иммунной системы, но часто оказываются неэффективными и нуждаются в определенной медикаментозной коррекции. К таким ключевым этапам и процессам относится фаза активации иммунной системы антигенными субстанциями,

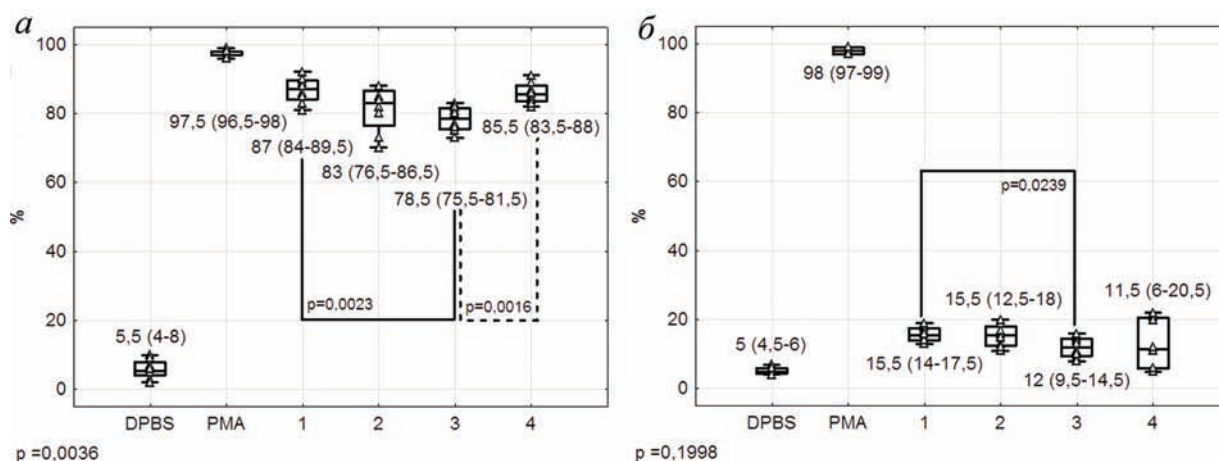


Рис. 3. Оценка респираторного взрыва нейтрофилов ( $n = 8$ ) в ответ на стимуляцию компонентами бактерий: а – клеточными стенками; б – лизаатами бифидобактерий

а также кооперации антигенпрезентирующих клеток и антигенспецифических клеток эффекторов (В-лимфоцитов, Т-лимфоцитов хелперов, цитотоксических и регуляторных Т-лимфоцитов). Эффективная кооперация указанных популяций и субпопуляций клеток и развитие иммунного ответа ограничиваются экспрессией специальных контактных молекул – молекул ко-стимуляции, которые обеспечивают формирование дополнительных сигналов, индуцирующих активацию и пролиферацию отвечающих клеток. В соответствии с центральной стратегией функционирования иммунной системы нами выбрано изучение экспрессии двух ключевых молекул иммунного ответа – CD69 (молекула, экспрессируемая при активации клеток, лектин С типа) и CD80 (молекула ко-стимуляции, лиганд для молекул CD28 и CD152 на мембране Т-лимфоцитов) [16].

На рис. 4 представлены результаты исследования влияния клеточных стенок штаммов бифидобактерий на экспрессию лимфоцитами молекулы CD69, индуцированной активацией клеток. Известно, что данная молекула экспрессируется на мембране широкого спектра клеток иммунной системы – Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, естественных киллеров, нейтрофилов, моноцитов и дендритных клеток под влиянием разнообразных активаторов. Как видно из таблицы, в контрольной культуре клеток крови выявлялось 4,6 (3,0–7,0) % CD69<sup>+</sup> клеток, в то время как воздействие ФМА индуцировало ее экспрессию у 98,5 (97,0–99,0) % клеток, т. е. фактически вся совокупность клеток отвечала на активационный сигнал. Добавление к культуре лейкоцитов клеточных стенок штаммов бифидобактерий в концентрации 1 мкг/мл вызывало увеличение содержания активированных клеток крови примерно в 3 раза в сравнении с контрольной пробой (нестимулированные лейкоциты). Заметных различий между штаммами в способности клеточ-

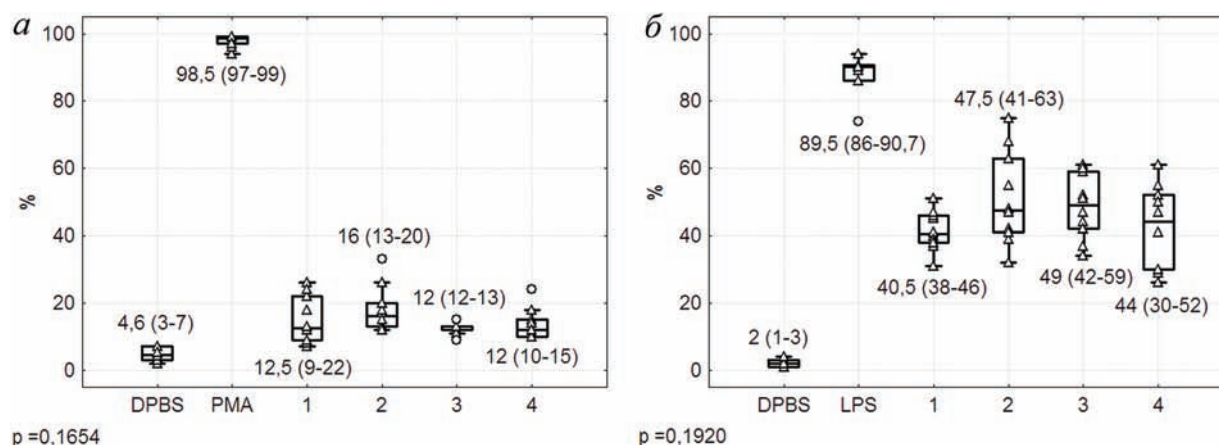


Рис. 4. Влияние компонентов клеточной стенки бифидобактерий (1 мкг/мл) на экспрессию молекул активации клетками периферической крови: а – экспрессия молекулы CD69 лимфоцитами; б – экспрессия молекулы CD80 моноцитами

ных стенок бифидобактерий активировать субпопуляции лимфоцитов не выявлено ( $P > 0,05$ ). Результаты исследования иммуностимулирующих свойств препаратов клеточных стенок бифидобактерий указывают на достаточную ее выраженность и наличие достоверных различий по отношению к контрольной пробе с DPBS ( $P < 0,001$ ).

Молекула CD80 является ко-стимуляторной молекулой и играет важную роль в кооперации антигенпрезентирующих клеток с Т-лимфоцитами и индукции антигенспецифического протективного иммунитета. Как видно из представленных данных, в контрольной пробе (лейкоциты, культивированные с LPS), выявляется 89,5 (86,0–90,7) % CD80<sup>+</sup> моноцитов. Под влиянием клеточных стенок бифидобактерий более чем 40 % моноцитов периферической крови экспрессируют CD80 молекулу. Существенных штаммовых различий в степени индукции экспрессии моноцитами крови молекулы CD80 не отмечается. На рис. 4 отчетливо демонстрируется способность препаратов клеточных стенок бифидобактерий стимулировать экспрессию молекулы CD80, а соответственно, и развитие иммунного ответа на вакцины или компоненты патогенных бактерий с целью развития протективных механизмов противомикробного иммунитета и элиминации их из организма. Экспрессия молекулы CD80 моноцитами крови в результате воздействия препаратами клеточных стенок бифидобактерий (1 мкг/мл) возросла более чем в 20 раз, что указывает на возможность ожидания позитивного иммунобиологического эффекта на функцию иммунной системы при их применении.

*Исследование влияния клеточных стенок бифидобактерий на продукцию цитокинов моноцитами и лимфоцитами.* Продукция ИНФ- $\gamma$  лимфоцитами под действием клеточных стенок исследованных штаммов бактерий достоверно не отличалась от отрицательного контроля (DPBS) ( $H = 5,182$ ;  $P = 0,819$ ) (см. таблицу).

Продукция цитокинов клетками, %

Группа	Субпопуляция, %		
	ИНФ- $\gamma$ <sup>+</sup> лимфоциты	ФНО- $\alpha$ <sup>+</sup> лимфоциты	ФНО- $\alpha$ <sup>+</sup> моноциты
Контроль (DPBS)	1,95 (1,06–2,29)	12,8 (12,5–17,1)*	33,6 (23,5–36,4)*
LPS <i>E. coli</i>	2,34 (1,11–2,38)	21,4 (18,1–26,5)**	94,9 (93,4–96,6)**
№ 1 (100 нг/мл)	4,25 (1,34–4,66)	18,7 (17,4–19,8)**	89,4 (78,2–91,9)*, **
№ 1 (1 мкг/мл)	2,23 (1,69–6,54)	23,4 (21,8–27,8)**	79,3 (79,3–92,3)*, **
№ 2 (100 нг/мл)	3,16 (1,21–5,11)	26,0 (25,7–29,2)**	87,3 (86,8–91,0)**
№ 2 (1 мкг/мл)	3,24 (1,10–3,96)	24,6 (20,9–25,1)**	80,7 (79,2–82,5)*, **

Примечание. Достоверность различий ( $P < 0,05$ ): \* – по сравнению с LPS *E. coli*; \*\* – по сравнению с DPBS.

Число ФНО- $\alpha$ <sup>+</sup> лимфоцитов после культивирования клеток с LPS и клеточными стенками увеличивалось в 2 раза (вероятно, за счет В-клеток) ( $P < 0,05$ ). Достоверных различий в способности LPS и клеточных стенок исследуемых культур бифидобактерий стимулировать продукцию ФНО- $\alpha$  лимфоцитами не выявлено.

Клеточные стенки бифидобактерий слабо стимулировали продукцию ИНФ- $\gamma$  лимфоцитами ( $P > 0,05$ ). Активность клеточных стенок в отношении продукции ФНО- $\alpha$  моноцитами была значительно выше в сравнении с отрицательным контролем во всех исследованных образцах, хотя в большинстве случаев не достигала таковой LPS.

Не выявлено различий в продукции цитокинов клетками при стимуляции бактериальными клеточными стенками в двух концентрациях: 100 нг/мл и 1 мкг/мл, что, вероятно, связано с тем, что минимальная концентрация (100 нг/мл) оказалась достаточна для активации всех клеток, потенциально отвечающих на данные стимулы.

Бактерии рода *Bifidobacterium* являются представителями нормальной микрофлоры человека и в высоких концентрациях обнаруживаются в ротовой полости, кишечном и вагинальном тракте. У новорожденных они колонизируют слизистые уже в течение нескольких дней после рождения, составляя 99 % микрофлоры кишечника здорового грудного ребенка. В онтогенезе происходит постепенное уменьшение численности бифидобактерий и они уступают первенство зубак-

териям и бактероидам. Значение бифидобактерий как доминантной микрофлоры кишечника человека в поддержании здоровья привлекает все больший интерес ученых [17, 18]. Клеточная стенка бифидобактерии является типичной для грамположительных бактерий и представляет собой тонкий слой пептидогликана, который покрыт полисахаридами, белками и тейхоевой кислотой. Композиция аминокислот в тетрапептиде муреинового слоя варьируется в зависимости от вида и/или штамма. В структуру тетрапептида обычно входят L-аланин, D-глутаминовая кислота, L-орнитин и D-аланин, но у некоторых штаммов орнитин может замещаться лизином. Возможны также различия в аминокислотах, используемых для перекрестного связывания тетрапептидов. Полисахаридный компонент бифидобактерий, включающий глюкозу, галактозу, рамнозу, по качественному и количественному составу варьируется в зависимости от вида и/или штамма бактерий. Некоторые из них экскретируют полимеры полисахаридов. Липотейхоевые кислоты клеточной стенки образуют связи с цепочками полисахаридов, а также выполняют роль адгезивных молекул, связываясь с рецепторами мембраны энтероцитов. Липогликаны бифидобактерий обладают антигенными и иммуномодулирующими свойствами.

Муропептиды разного происхождения, естественные и синтетические, относятся к иммуномодуляторам мягкого целенаправленного действия, оказывающим иммуностимулирующий эффект посредством взаимодействия с хорошо охарактеризованными рецепторами клеток иммунной системы и сигнальными путями [16, 19]. Отдельные моносахара могут составлять основу пребиотических препаратов, так как они повышают колонизационную способность микрофлоры и оказывают иммуномодулирующий эффект на эпителиальные клетки [20].

Полученные в ходе исследования результаты о способности штаммов бифидобактерий взаимодействовать с клетками иммунной системы (нейтрофилами, моноцитами и лимфоцитами) свидетельствуют о высоком иммуномодулирующем потенциале как клеток бактерий, так и препаратов из них. Они могут быть успешно использованы в биотехнологических процессах по разработке иммуномодуляторов или пребиотиков с заданными свойствами для клинического или профилактического применения при разнообразной патологии и для сохранения здоровья людей и животных.

## Выводы

1. Исследование взаимодействия клеток разных штаммов бифидобактерий и их компонентов с поли- и мононуклеарными фагоцитами периферической крови человека выявило наличие штаммовых различий бактерий в чувствительности/резистентности к захвату и поглощению фагоцитами: штамм бифидобактерий № 1 обладал относительно более высокой резистентностью к захвату фагоцитами, а штаммы № 2 и № 4 более легко захватывались и поглощались фагоцитирующими клетками.

2. Фагоцитарная активность моноцитов периферической крови была несколько ниже таковой нейтрофилов при сохранении общей тенденции в отношении исследованных штаммов бифидобактерий.

3. Клеточные стенки и лизаты клеток бифидобактерий при взаимодействии с фагоцитами обладают способностью их активировать и стимулировать окислительно-восстановительные процессы с генерацией активных форм кислорода, обладающих бактерицидными свойствами; более высокая стимуляторная активность препаратов клеточных стенок в отношении фагоцитов, вероятно, обусловлена более высокой концентрацией биологически активных веществ в сравнении с лизатами.

4. Препараты клеточных стенок штаммов бифидобактерий обладают выраженными иммуностимуляторными свойствами: 1) вызывают трехкратное увеличение содержания CD69<sup>+</sup> активированных клеток иммунной системы, что позволяет обеспечить развитие последующих этапов иммунологической реакции; 2) значительно увеличивают содержание мононуклеарных моноцитов, экспрессирующих ко-стимуляторную молекулу – CD80, обеспечивающую способность антигенпрезентирующих клеток активировать эффекторные и регуляторные Т-лимфоциты; 3) существенно усиливают продукцию ФНО- $\alpha$  моноцитами и лимфоцитами при отсутствии такового эффекта на продукцию ИНФ- $\gamma$ .



## Литература

1. *Титов Л. П., Кирильчик Е. Ю., Канашикова Т. А.* // Особенности строения, развития и функционирования иммунной системы детского организма: учеб.-метод. пособие. Минск, 2007. – 28 с.
2. *Lee J., O'Sullivan D. J.* // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2010. Vol. 74. P. 378–416.
3. *Philippe D., Farve L., Foata F.* et al. // World J. Gastroenterol. 2011. Vol. 17, N 4. P. 459–469.
4. *Dong P., Yang Y., Wang W.* et al. // Early human development. 2010. Vol. 86, N 1. P. 51–58.
5. *Zhu J., Zhao L., Guo H.* et al. // Afr. J. of Microbiol. Res. 2011. Vol. 5, N 1. P. 8–15.
6. *Терновская Л. Н., Калинина Т. Э., Суханова С. М.* и др. // ЖМЭИ. 2012. № 4. С. 124–125.
7. *Moradian F., Garen C., Cherney L.* et al. // Acta Cryst. 2006. Vol. 62, N 10. P. 986–988.
8. *Tejada-Simon M. V., Pestka J. J.* // J. of Food Protection. 1999. Vol. 62, N 12. P. 1435–1444.
9. *Walker J. M.* // The Protein Protocols Handbook. N. Y., 2002. P. 3–6.
10. *Augustyniak D., Jankowski A., Mackiewicz P.* et al. // BMC Immunol. [Electronic resource]. 2012. Vol. 13, N 24. – Mode of access: <http://www.biomedcentral.com/1471-2172/13/24>. – Date of access: 10.01.2013.
11. *Vowells S. J., Sekhsaria S., Malech H. L.* et al. // J. of Immunol. Meth. 1995. Vol. 178. P. 89–97.
12. *Gomes A., Fernandes E., Lima J. L. F. C.* // J. Biochem. Biophys. Meth. 2005. Vol. 65. P. 45–80.
13. *Гончаров А. Е., Титов Л. П., Кошелев С. В.* и др. // Весці НАН Беларусі. Сер. мед. навук. 2012. № 2. С. 63–69.
14. *Реброва О. Ю.* // Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. М., 2008.
15. *Genser B., Cooper P. J., Yazdanbakhsh M.* et al. // BMC Immunol. [Electronic resource]. 2007. Vol. 8, N 27. – Mode of access: <http://www.biomedcentral.com/1471-2172/8/27>. – Date of access: 10.01.2013.
16. *Титов Л. П.* // Иммунология: терминологический словарь. МИА. М., 2008. – 512 с.
17. *Бухарин О. В., Перунова Н. Б., Иванова Е. Б.* // ЖМЭИ. 2012. № 4. С. 51–56.
18. *Сидоренко А. В., Новик Г. И., Акимов В. Н.* // Микробиология. 2008. Т. 77, № 3. С. 293–302.
19. *Пащенко М. В., Будихина А. С., Голубева Н. М.* и др. // Иммунология. 2012. Т. 33, № 4. С. 199–203.
20. *Корнеева О. С., Черемушкина И. В., Глуценко А. С.* и др. // ЖМЭИ. 2012. № 5. С. 67–70.

*L. P. TITOV, A. Y. HANCHAROU, A. S. MURASHKO, N. A. GOLOVNYOVA, E. I. KOLOMIETS*

### **INTERACTION OF BIFIDOBACTERIA AND THEIR COMPONENTS WITH POLYNUCLEAR AND MONONUCLEAR HUMAN BLOOD CELLS**

#### **Summary**

The aim of the current investigation was to study the interaction of bifidobacteria strains and their components with polynuclear and mononuclear human immune cells. Experiments have shown the presence of inter-strain variations in the ability of bacteria for internalization by phagocytes, the ability of bifidobacteria cell wall components and cell lysates to stimulate the generation of reactive oxygen species by neutrophils, to enhance the expression of the early marker of activation – CD69 by lymphocytes and the expression of the co-stimulatory CD80 molecule by monocytes, to stimulate the production of TNF- $\alpha$  by human monocytes and lymphocytes. Taken together, the results obtained demonstrate the possibility to use the studied bifidobacteria strains in biotechnology to develop immunomodulators or prebiotics with the designated properties for treatment and prophylaxis of human diseases.