

ИНФЕКТОЛОГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ СИМБИОТИЧЕСКИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

О.В.Бухарин¹, И.Н.Чайникова^{1,2}, Е.В.Иванова¹, Н.Б.Перунова¹, Т.А.Бондаренко¹, А.И.Смолягин²

ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫЙ ПРОФИЛЬ МИКРОСИМБИОНТОВ КИШЕЧНОГО БИОТОПА ЧЕЛОВЕКА

¹Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза, Оренбург; ²Оренбургский государственный медицинский университет

Цель. Сравнительное изучение иммунорегуляторных свойств метаболитов доминантных и ассоциативных микросимбионтов при эубиозе и дисбиозе толстого кишечника человека. *Материалы и методы.* В качестве доминантной микробиоты использовали 260 штаммов бифидобактерий, ассоциативных микросимбионтов — 132 культуры условно патогенных бактерий и грибов из 122 кишечных микросимбиоценозов. Продукцию цитокинов изучали у культур мононуклеаров, сокультивируемых с супернатантами микросимбионтов. Результаты обработаны статистически (Statistica 10.0). *Результаты.* При эубиозе доминантные и ассоциативные микросимбионты проявляли гетерогенность иммунорегуляторных свойств. В отношении флогенных цитокинов ассоцианты в равной степени проявляли стимуляцию/супрессию/отсутствие влияния на цитокины, за исключением энтерококков и бактероидов, стимулирующих секрецию ИЛ-8, и лактобацилл, индуцирующих ИФН γ . Доминанты характеризовались однонаправленностью эффекта: стимуляция секреции ИЛ-10 и супрессия ФНО α , ИФН γ и ИЛ-17 при сохранении индукции ИЛ-10 при дисбиозе. Напротив, супернатанты ассоциантов сочетанно увеличивали продукцию оппозитных цитокинов: раннего провоспалительного цитокина ФНО α , иммунорегуляторного цитокина ИФН γ и противовоспалительного цитокина ИЛ-10. *Заключение.* Кишечный гомеостаз при эубиозе поддерживается дифференцированным воздействием метаболитов микросимбионтов на продукцию про-, противовоспалительных, иммунорегуляторных цитокинов с формированием оптимального баланса, ограничивающего воспалительные и аутоиммунные реакции. В условиях дисбиоза у доминантов сохраняется направленность иммунорегуляторных свойств, у ассоциантов — ограничивается разнообразие эффектов влияния на про-/противовоспалительные цитокины.

Журн. микробиол., 2018, № 4, С. 42—51

Ключевые слова: бифидобактерии, ассоциативные микросимбионты, симбиоз, эубиоз, дисбиоз, цитокины, иммунный гомеостаз кишечника

O.V.Bukharin¹, I.N.Chainikova^{1,2}, E.V.Ivanova¹, N.B.Perunova¹, T.A.Bondarenko¹, A.I.Smolyagin²

IMMUNOREGULATORY PROFILE OF MICROSymbionTS OF THE INTESTINAL HUMAN BIOTOPE

¹Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg; ²Orenburg State Medical University, Russia

Aim. To study in comparison immunoregulatory properties of dominant and associative microsymbiotes metabolites in human large intestine's eubiosis and dysbiosis. *Materials and methods.* 260 strains of bifidobacteria used as dominant microbiota, 132 cultures of conditionally pathogenic bacteria and fungi used as associative microsymbiotes from 122 intestinal microsymbioceneses. The cytokines production was studied in cultures of mononuclear cells co-cultivated with

microsymbionts' supernatants. The results were processed statistically (Statistica 10.0). *Results.* In eubiosis, dominant and associative microsymbionts showed immunoregulatory properties heterogeneity. In the case of phlogogenic cytokines, the associates equally exhibited stimulation / suppression / no effect on cytokines, except for enterococci and bacteroids, stimulating IL-8 secretion, and lactobacilli, inducing IFN γ . Dominants were characterized by a unidirectional effect: IL-10 secretion stimulation and TNF α , IFN γ and IL-17suppression, while retaining the induction of IL-10 in dysbiosis. In contrast, supernatants of the associates combined the opposing cytokines production: the early proinflammatory cytokine TNF α , the immunoregulatory cytokine IFN γ and the antiinflammatory cytokine IL-10. *Conclusion.* Intestinal homeostasis in eubiosis is supported by differentiated effects of microsymbionts' metabolites on the production of antiinflammatory, immunoregulatory cytokines with the formation of an optimal balance, limiting inflammatory and autoimmune reactions. The dominance of the immunoregulatory properties remains intact in the conditions of dysbiosis, and the variety of effects on pro-/antiinflammatory cytokines is limited in the associates.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 4, P. 42—51

Key words: bifidobacteria, associative microsymbionts, symbiosis, eubiosis, dysbiosis, cytokines, immune intestinal homeostasis

ВВЕДЕНИЕ

Микросимбиоз толстого кишечника человека представляет собой сбалансированную экосистему, в условиях которой происходит взаимодействие микробных компонентов с эффекторами врожденного и адаптивного иммунитета. Способность микросимбионтов и их метаболитов участвовать в ограничении воспалительных реакций и поддержании толерантности иммунного ответа связана с моделированием про- и противовоспалительного цитокинового профиля в среде обитания, изменением соотношения иммунорегуляторных цитокинов, влияющих на направленность иммунного ответа Т-хелперов в сторону Th1-варианта с последующим уравниванием Th1, Th2, Th3/ Th1 механизмов [7, 10, 14]. Все это определяет участие микросимбионтов в процессах регуляции и поддержании кишечного гомеостаза посредством формирования адекватного цитокинового баланса. Молекулярные механизмы взаимодействия «микроорганизм — микробные метаболиты — иммунные клетки хозяина» в настоящее время продолжают расшифровываться. Показано, что иммуномодулирующее действие микросимбионтов реализуется путем активации генов ряда цитокинов в иммунных и эпителиальных клетках, определяя тем самым гетерогенность их иммуномодулирующих свойств [2]. Цитокины могут обладать прогностической значимостью при развитии воспаления в кишечнике и являться мишенями для терапевтических воздействий [8, 13], в том числе препаратов, используемых для коррекции нарушений микробиоценоза кишечника у человека, а также для создания рекомбинантных пробиотических штаммов с заданным цитокиновым профилем [3, 4].

Несмотря на этот очевидный факт, комплексных исследований, затрагивающих одновременно оценку влияния метаболитов различных групп микросимбионтов, выделенных из кишечника при эубиозе и дисбиозе 1 — 3 степени, на продукцию различных функциональных классов цитокинов мононуклеарами периферической крови человека до сих пор не проводилось. Учитывая феномен транслокации бактериальной флоры при тяжелых нарушениях микросимбиоза кишечника биотопа, культуры мононуклеарных клеток периферической крови человека представляются удобной моделью

для изучения иммунорегуляторной функции нормофлоры и участия различного вида комменсалов в формировании определенного цитокинового баланса при дисбиотических состояниях.

Целью исследования явилось сравнительное изучение иммунорегуляторных свойств метаболитов доминантных и ассоциативных микросимбионтов при эубиозе и дисбиозе толстого кишечника человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования послужили 260 штаммов бифидобактерий, выделенных при обследовании 122 лиц в возрасте от 1 года до 45 лет на дисбиоз толстого кишечника. В работе также были использованы клинические штаммы облигатно-анаэробных бактерий (36 штаммов) (*Clostridium difficile*, *Bacteroides fragilis*), факультативно-анаэробных микроорганизмов (84 штамма) (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Candida albicans*) и 12 культур лактобацилл (*Lactobacillus ghamnosus*), изолированных из кишечного микросимбиоза человека. При обследовании пациентов на дисбиоз толстого кишечника человека были соблюдены акты национального стандарта Российской Федерации ГОСТ Р 52379-2005 о надлежащей клинической практике. Деление обследуемых лиц на возрастные группы для оценки состояния микрофлоры проводили в соответствии с приказом Минздрава РФ № 231 (9.06.2003). Выделение и идентификацию штаммов микроорганизмов осуществляли общепринятыми методами.

Для получения метаболитов (супернатантов) 24 — 48-часовую бульонную культуру микросимбионтов двукратно центрифугировали при 3000 об/мин и готовили фильтрат (мембранные фильтры с диаметром пор 0,22 мкм, «Millipore», USA). Мононуклеары периферической крови выделяли из гепаринизированной крови здоровых доноров методом градиентного центрифугирования (400 g) в градиенте плотности фиколл-верографин («Pharmacia», Швеция) плотностью 1,077 г/см³. Продукцию цитокинов изучали у нестимулированных культур мононуклеаров, сокультивируемых с метаболитами микросимбионтов (опыт) и без добавления метаболитов (контроль) после 24-часовой инкубации клеток (2×10^6) при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в полной культуральной среде RPMI-1640. В супернатантах опытных и контрольных проб измеряли уровень провоспалительных цитокинов (ФНО α , ИЛ-6), хемокинов (ИЛ-8), иммунорегуляторных цитокинов (ИФН γ , ИЛ-17) и противовоспалительного цитокина ИЛ-10 методом ИФА («Цитокин», Россия). Регистрацию результатов проводили на фотометре Multiskan (Labsystems, Финляндия). Результат оценивали по изменению концентрации цитокинов в опыте и контрольных пробах. Статистическую обработку полученных данных проводили средствами пакета Statistica 10 с оценкой различий между средними величинами по t-критерию Стьюдента. Статистические результаты выражали в виде медианы (Me), нижних (Q25) и верхних (Q75) квартилей. Уровень статистической значимости различий определяли с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни. Различия считались статистически достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Среди эубиотических штаммов бифидобактерий примерно в равной степени выделялись штаммы, супернатанты которых в условиях *in vitro* в отношении провоспалительных цитокинов проявляли ингибирующий эффект

(71,4% — в отношении ИЛ-8; 35,7% — в отношении ФНО α ; 39,2% — в отношении ИЛ-6; 60,7% — в отношении ИФН γ) или не изменяли продукцию указанных цитокинов мононуклеарами (10,7% — в отношении ИЛ-8; 38,6% — в отношении ФНО α ; 57,1% — в отношении ИЛ-6; 32,0% — в отношении ИФН γ). Вместе с тем, во влиянии на секрецию ИЛ-17 и ИЛ-10 штаммы бифидобактерий были достаточно однородны: супернатанты всех исследуемых изолятов подавляли продукцию ИЛ-17 и, напротив, 67,9% стимулировали секрецию ИЛ-10. Доля штаммов бифидобактерий, ингибирующих секрецию ИЛ-10, составила 10,7% и не влияющих на его секрецию — 21,4%. Диапазон колебаний уровня цитокинов в культуральной среде в присутствии метаболитов доминантов составил для ФНО α — 8,72 — 85,96 пг/мл (в контроле — 42,66 \pm 7,56 пг/мл), для ИЛ-6 — 398,8 — 552,2 пг/мл (в контроле — 514,66 \pm 87,5 пг/мл), для ИЛ-8 — 676 — 870 пг/мл (в контроле — 931,1 \pm 98,2 пг/мл), для ИФН γ — 4,44 — 33,77 пг/мл (в контроле 18,11 \pm 2,31 пг/мл), для ИЛ-17 — 20,44 — 43,11 пг/мл (в контроле — 140,5 \pm 45,3 пг/мл), для ИЛ-10 — 14,31 — 121,93 пг/мл (в контроле — 50,03 \pm 7,56 пг/мл).

Штаммы ассоциантов (кишечная палочка, лактобациллы, энтерококки, бактероиды) в условиях эубиоза характеризовались неоднородностью по эффекту влияния их супернатантов на секрецию исследуемых цитокинов. Так, на секрецию ФНО α они оказывали в равной степени как стимулирующий, так и ингибирующий эффект, при этом уровень ФНО α в культуральной среде в присутствии бактериальных метаболитов изменялся в диапазоне 12,7-156,2 пг/мл. Влияние на продукцию ИЛ-6, ИФН γ , ИЛ-17, ИЛ-10 у штаммов ассоциантов характеризовалось как оппозитными эффектами, так и отсутствием влияния метаболитов на секрецию данных цитокинов за исключением штаммов кишечной палочки, бактероидов и лактобацилл, супернатанты большинства которых усиливали секрецию ИФН γ , одного из ведущих цитокинов, индуцирующих клеточные иммунные реакции. Для эубиотических ассоциантов уровень цитокинов изменялся в следующих диапазонах: для ИЛ-6 — 388,2—487,2 пг/мл, для ИФН γ — 10,44-88,4 пг/мл, для ИЛ-17 — 13,9 — 142,9 пг/мл и для ИЛ-10 — 18,7 — 213,6 пг/мл. Следует отметить, что супернатанты энтерококков в 77,8% случаев и бактероидов (44%) проявляли умеренную (на 30% от уровня в контроле) стимулирующую активность в отношении хемокина ИЛ-8, одного из самых ранних провоспалительных цитокинов, секреция которого возрастает при различных стимулах (продукты метаболизма бактерий, вирусов), в том числе и на провоспалительные цитокины ИЛ-1, ФНО α . Концентрация ИЛ-8 в среде в присутствии метаболитов энтерококков составляла 692,1 — 1079 пг/мл, бактероидов — 839,7 — 921 пг/мл.

Таким образом, цитокиновый профиль как результат воздействия на мононуклеары *in vitro* супернатантов доминантных симбионтов бифидобактерий при эубиозе характеризовался преобладанием негативного или индифферентного влияния на секрецию провоспалительных цитокинов (ФНО α , ИЛ-6), хемокинов (ИЛ-8), иммунорегуляторных цитокинов (ИФН γ , ИЛ-17) и стимулирующим влиянием на секрецию противовоспалительного цитокина ИЛ-10. Цитокиновый баланс под влиянием супернатантов ассоциантов, выделенных при эубиозе, формировался за счет равномерного распределения штаммов с различным эффектом влияния на секрецию провоспалительных, иммунорегуляторных и противовоспалительных цитокинов (стимулирующий/ингибирующий или индифферентный).

Супернатанты штаммов бифидобактерий, выделенных от обследуемых с 1 степенью дисбиоза, по влиянию на секрецию ФНО α , ИЛ-6, ИЛ-8, ИФН γ , как и при эубиозе, проявляли преимущественно ингибирующий эффект или не изменяли продукцию указанных цитокинов лимфоцитами человека, а в отношении ИЛ-17, как и эубиотические изоляты, оказывали супрессирующий эффект. Обращает на себя внимание, что в отношении ИЛ-10, по сравнению с эубиозом, штаммы бифидобактерий, выделенные от обследуемых с 1 степенью дисбиоза, характеризовались различными эффектами влияния: супернатанты (66% изолятов) стимулировали секрецию ИЛ-10, остальные в равной мере подавляли продукцию противовоспалительного цитокина или не влияли на его уровень в культуральной среде.

При 1 степени дисбиоза из фекалий обследуемых высевались такие ассоцианты, как клебсиеллы, клостридии, грибы рода *Candida*. В отношении влияния супернатантов указанных культур на секрецию цитокинов выявлялись различные эффекты. Так, все выделенные штаммы *S. albicans*, большинство изолятов клостридий (90%) не влияли на секрецию ИЛ-6. Супернатанты культур бактероидов и энтерококков практически в 100% стимулировали секрецию ФНО α . Стимулирующий эффект был выявлен и в отношении ИЛ-8 и ИФН γ у супернатантов всех выделенных штаммов клостридий, энтерококков, лактобацилл, напротив, в отношении ИЛ-17 они проявляли ингибирующее влияние. Что касается противовоспалительного цитокина ИЛ-10, то среди ассоциантов выраженный стимулирующий эффект был выявлен для супернатантов всех штаммов клостридий, тогда как бактероиды, напротив, ингибировали секрецию данного цитокина.

При 2 степени дисбиоза среди культур бифидобактерий уменьшалась доля штаммов, ингибирующих продукцию провоспалительных цитокинов, вместе с тем, способность стимулировать противовоспалительный цитокин ИЛ-10 сохранялась у всех изолятов. Ухудшение состояния микробиоценоза толстого кишечника до уровня 2 степени характеризовалось выделением культур кишечной палочки, клебсиелл, клостридий, бактероидов, *S. aureus*, грибов рода *Candida*, проявляющих в большинстве случаев в отношении наиболее раннего цитокина ФНО α выраженный стимулирующий эффект (от 3-кратного до 5-кратного роста по сравнению с дисбиозом 1 — 2 степени).

В условиях тяжелых нарушений микробиоценоза толстого кишечника (3 степень дисбиоза) снижалась гетерогенность доминантных и ассоциативных культур микробиоты в отношении иммунорегуляторных свойств. Среди выделяемых штаммов бифидобактерий стали преобладать изоляты (98%), стимулирующие секрецию ИФН γ . Более выраженный уровень индукции ФНО α и ИФН γ (до 5-6 кратного роста), по сравнению с уровнем при 1 степени дисбиоза, выявлялся у супернатантов штаммов клебсиелл, клостридий, *S. aureus*, *S. albicans*. Характерно, что при 3 степени дисбиоза снижалась гетерогенность дрожжевых грибов и в отношении влияния на секрецию ИЛ-17. Стимулирующий эффект стал превалировать практически у всех исследуемых штаммов *S. albicans*. Остальные виды ассоциантов проявляли или ингибирующий эффект, или не влияли на продукцию ИЛ-17. В отношении ИЛ-6 сохранялась гетерогенность проявлений иммуномодулирующих свойств как у доминантов, так и у культур ассоциантов. При анализе эффектов влияния супернатантов микросимбионтов на секрецию ИЛ-8 было установлено исчезновение штаммов бифидобактерий, подавляющих его секрецию (80%

штаммов стимулировали продукцию, 20% — не влияли). Практически все штаммы исследуемых ассоциантов стимулировали секрецию хемокина, лишь 44% изолятов клебсиелл не влияли на его уровень.

Несмотря на тяжелые микрoэкологические нарушения, присущие 3 степени дисбиоза, бифидобактерии сохраняли способность стимулировать секрецию ИЛ-10. Выраженный стимулирующий эффект на продукцию ИЛ-10, как и при дисбиозе 2 степени, сохраняли супернатанты клостридий и *S. aureus*, а выраженный ингибирующий эффект на секрецию ИЛ-10 оказывали супернатанты бактериоидов и клебсиелл.

Таким образом, под влиянием метаболитов штаммов как доминантных, так и ассоциативных микросимбионтов, изолированных из кишечника с выраженными нарушениями микросимбиоза, изменялся цитокиновый профиль иммунных клеток. Для мононуклеаров человека преобладающим становился провоспалительный спектр цитокинов, секретируемых под влиянием метаболитов кишечной микрофлоры. Так, среди бифидобактерий возрастало количество изолятов, супернатанты которых характеризовались способностью усиливать секрецию цитокинов из функциональных групп, пролонгирующих воспаление: хемокина (ИЛ-8) и иммунорегуляторного цитокина (ИФН γ). Вместе с тем, у бифидобактерий сохранялась доля штаммов, индуцирующих секрецию противовоспалительного цитокина ИЛ-10. Значительный вклад в усиление провоспалительного фона в кишечном биотопе при тяжелых нарушениях микросимбиоза могут вносить такие микросимбионты, как бактериоиды, клебсиеллы, грибы рода *Candida*, золотистый стафилококк, клостридии. Супернатанты культур этих микроорганизмов 4 — 5-кратно увеличивали, по сравнению дисбиозом 1 степени, продукцию лимфоцитами раннего системного провоспалительного цитокина ФНО α и иммунорегуляторного цитокина ИФН γ .

ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование способности метаболитов кишечной микрофлоры к влиянию на продукцию цитокинов иммунными клетками человека позволило установить ряд особенностей. В условиях нормального микрoэкологического состояния дистального отдела толстого кишечника человека как для доминантов (бифидобактерии), так и для ассоциантов (кишечная палочка, энтерококки, лактобациллы, бактериоиды) характерна гетерогенность в проявлении иммунорегуляторных свойств (рис. 1). При этом в отношении флогогенных цитокинов (ФНО α , ИЛ-6, ИЛ-8, ИФН γ) ассоциантам была присуща способность примерно в равной степени проявлять все три эффекта (стимуляция/супрессия/отсутствие влияния), исключая преобладание среди энтерококков и бактериоидов штаммов, стимулирующих секрецию ИЛ-8, среди лактобацилл — ИФН γ . Для доминантов (бифидобактерий) преобладание одностороннего эффекта проявлялось во влиянии на продукцию ряда цитокинов: стимулирующий эффект для ИЛ-10, супрессирующий — в отношении ФНО α , ИФН γ и ИЛ-17. Тем самым суммарные эффекты воздействия метаболитов комменсальной микрофлоры на секрецию цитокинов иммунными клетками человека в условиях нормы обеспечивают цитокиновый баланс, характеризующийся умеренным уровнем провоспалительных цитокинов, контролируемым супрессивным воздействием ИЛ-10, продуцируемого преимущественно популяцией Трег клеток [6, 14]. При этом следует отметить вклад

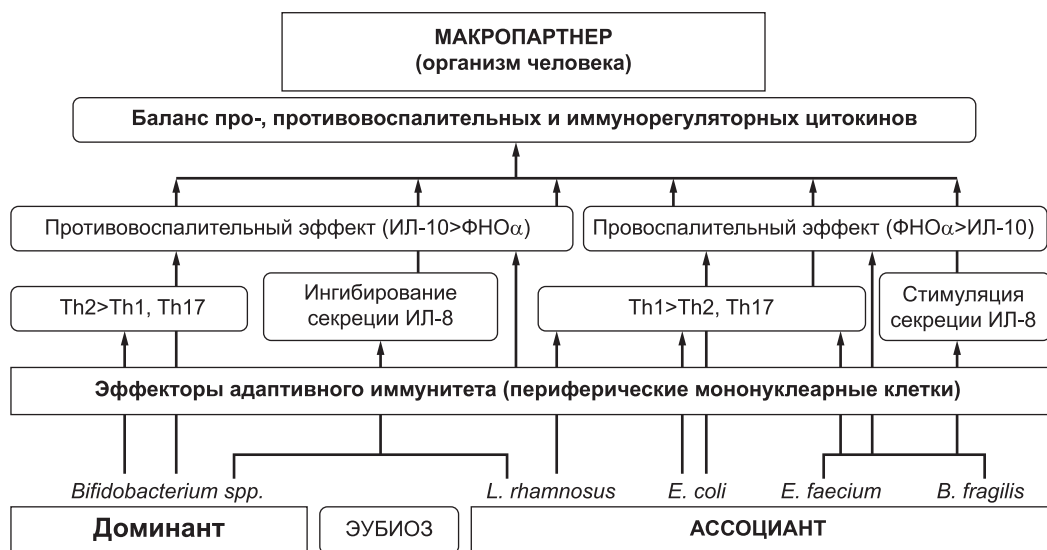


Рис. 1. Формирование цитокиновой среды под влиянием метаболитов микросимбионтов, изолированных при эубиозе толстого кишечника человека.

Медиаторы Th1 — ИФН γ , Th2 — ИЛ-6, Th17 — ИЛ-17, хемокин — ИЛ-8 (здесь и на рис. 2).

таких компонентов метаболитов анаэробной флоры, как короткоцепочные жирные кислоты, которые способны связываться с рецепторами ассоциированных с кишечником иммунных клеток [7]. С другой стороны, известно, что экзополисахариды, секретируемые молочнокислыми бактериями нормофлоры (бифидобактериями и лактобациллами), индуцируя синтез цитокинов, стимулируют фагоцитарную активность макрофагов и нейтрофилов [11].

В условиях эубиоза кишечного биотопа иммунорегуляторные свойства доминантных и ассоциативных микросимбионтов гетерогенны по направленности, спектру и выраженности (индукция/ ингибция/ отсутствие влияния) секреции иммунными клетками цитокинов в ответ на метаболиты комменсалов, что важно при формировании кишечного иммунного гомеостаза. Данные свойства нормальной микробиоты, с одной стороны, реализуют ее способность предотвращать развитие локальных воспалительных реакций, с другой — обеспечивать развитие необходимой ответной реакции иммунных клеток при проникновении в кишечник условно патогенных микроорганизмов (УПМ) и патогенов [10]. Умеренно повышенное содержание провоспалительных цитокинов является необходимым для контроля инфекции, в этом проявляется позитивный эффект выявленного разнообразия стимулирующего влияния комменсалов на секрецию ранних цитокинов — ФНО α и ИЛ-8. Однако следует учитывать, что при избыточной продукции такое воздействие комменсалов может привести к повреждению тканей, структурными элементами которых являются клетки — продуценты цитокинов [8, 9].

В условиях нарастания антигенной нагрузки при дисбиозе через активацию Toll-like рецепторов усиливается продукция целого спектра провоспалительных цитокинов, которые способствуют как развитию локального воспаления, так и запуску эффекторных иммунных реакций в лимфоидных образованиях кишечника, защищающих организм от патогенов [12]. Выявленное при 3 степени дисбиоза кишечника усиление секреции метаболитами доми-

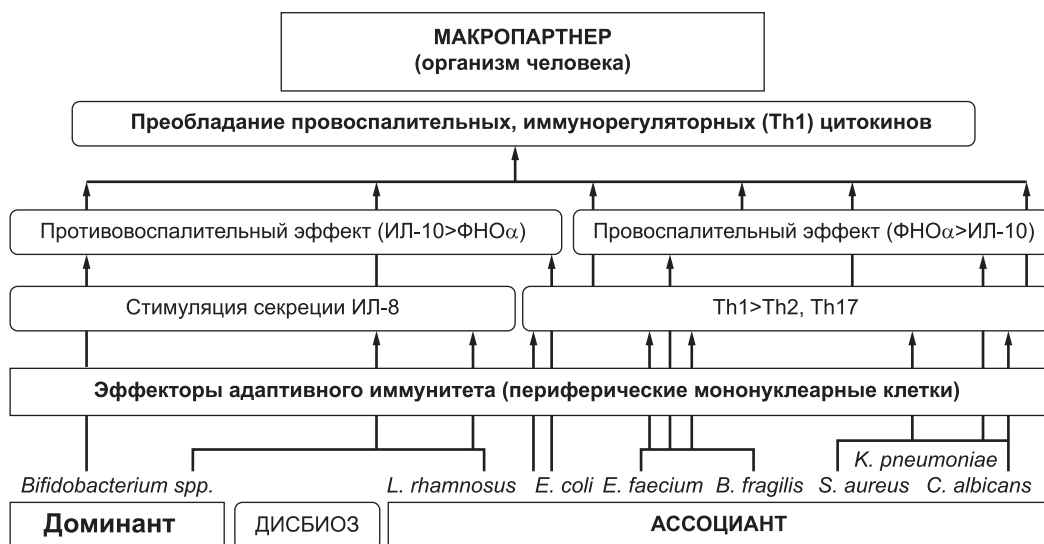


Рис. 2. Формирование цитокиновой среды под влиянием метаболитов микросимбионтов, изолированных при дисбиозе толстого кишечника человека.

нантной и ассоциативной микрофлоры ИФН γ (медиатора ответа Th1 типа) в условиях *in vivo* в кишечном биотопе может ассоциировать с индукцией у Т-клеток цитотоксической активности (рис. 2), избыток которой оказывает повреждающее действие. Повышенное содержание ИФН γ в копрофильтратах в условиях дисбактериоза кишечника с увеличением содержания УПМ рассматривается как информативный маркер дисбиоза кишечника [1]. Если степень активации ИФН γ метаболитами кишечных ассоциантов (3 степень дисбиоза) перестает быть адекватной, тогда первоначально защитный механизм регуляции кишечного гомеостаза перерастает в патологический. Несмотря на то, что ИФН γ оказывает иммуностимулирующее действие, при его избыточной продукции он может быть иммуносупрессивным фактором, способствующим персистенции УПМ.

Усиление продукции ИЛ-17 под влиянием метаболитов культур грибов рода *Candida*, колонизирующих кишечник при 3 степени дисбиоза, на фоне индифферентного воздействия таких ассоциантов, как клостридии, клебсиеллы, золотистый стафилококк, выступает существенным механизмом усиления провоспалительного профиля цитокинов. Вместе с тем, снижение продукции ИЛ-17 под влиянием анаэробных культур бифидобактерий, бактероидов, кишечных палочек, колонизирующих кишечник при 3 степени дисбиоза, выступает механизмом защитного действия нормальной анаэробной микрофлоры через ограничение участия данного цитокина (одновременно индуцируемого дисбиотическими штаммами *S. albicans*) в стимуляции синтеза провоспалительных цитокинов, а также в мобилизации гранулоцитов, поддерживающей остроту воспалительной реакции и отражающей специфику Th-17-опосредованного воспаления [5, 6, 9].

Рассматривая полученные в работе данные об увеличении при 3 степени дисбиоза доли штаммов микросимбионтов, способных к гиперпродукции ФНО α , следует отметить, что это может являться одним из механизмов активации пролонгированного воспаления на фоне высокой концентрации

ИЛ-10. Результаты работы свидетельствуют о том, что наряду с усилением продукции провоспалительных цитокинов при наиболее тяжелых микробиологических нарушениях в толстом кишечнике у выделенных культур микросимбионтов одновременно возрастала и доля штаммов, стимулирующих секрецию ИЛ-10, который, с одной стороны, оказывает супрессирующее воздействие на эффекторы клеточного и гуморального иммунитета, с другой — его секреция преобладает при поляризации Т-хелперов в сторону Th2 клеток. Возрастание продукции ИЛ-10 под влиянием супернатантов ассоциантов (кlostридии, дрожжевые грибы, кишечные палочки, золотистый стафилококк), колонизирующих дистальные отделы толстого кишечника при 3 степени дисбиоза, можно расценивать как проявление ауторегуляторной функции иммунной системы, ассоциированной с лимфоидной тканью кишечника, в виде включения супрессорного фактора (ИЛ-10), лимитирующего избыточную цитотоксичность и, соответственно, выраженность иммунного воспаления благодаря способности включать апоптотический механизм гибели активированных Т-клеток избыточным количеством самих микросимбионтов, компонентов их клеточной стенки и продуктами метаболизма [9].

Таким образом, полученные результаты дают основание полагать, что базовым фактором поддержания кишечного гомеостаза в условиях эубиоза является способность метаболитов доминантных и ассоциативных микросимбионтов оказывать дифференцированное воздействие по направленности, спектру и выраженности (индукция/ ингибция/ отсутствие влияния) на продукцию цитокинов разных функциональных групп (про-, противовоспалительных, иммунорегуляторных цитокинов, хемокинов). В результате этого суммарные эффекты воздействия метаболитов комменсальной микрофлоры на секрецию цитокинов иммунными клетками человека в условиях нормы обеспечивают оптимальный цитокиновый баланс с умеренным уровнем провоспалительных цитокинов, контролируемым супрессивным воздействием антифлогенных цитокинов. По мере усиления выраженности дисбиоза у ассоциативных микросимбионтов снижается диапазон разнообразия штаммоспецифичности в отношении иммуномодулирующих свойств с преобладанием культур, сочетанно индуцирующих высокий уровень оппозитных цитокинов (про/антивоспалительные). Тем не менее, благодаря способности большинства штаммов доминантных представителей микробиоты сохранять направленность иммуномодулирующего влияния на баланс цитокинов в условиях выраженного дисбиоза кишечника поддерживается гомеостаз кишечника с ограничением воспалительных и аутоиммунных реакций.

Работа выполнена при грантовой поддержке фундаментальных исследований по Программе УрО РАН «Фундаментальные науки — медицине», проект № 18-7-8-34.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гапон М.Н., Терновская Л.Н., Денисенко О.В., Зарубинский В.Я. Показатели иммунитета и локальной защиты у людей с дисбактериозом кишечника. Журн. микробиол. 2014, 4: 65-68.
2. Зорина В.В., Николаева Т.Н., Наровлянский А.Н. Влияние бактерий рода *Lactobacillus* на продукцию цитокинов клетками пейеровых бляшек экспериментальных животных. Иммунология, 2004, 5: 288-290.
3. Carvalho R.D.D.O., do Carmo F.L.R., de Oliveira Junior A. et al. Use of Wild Type or Recombinant Lactic Acid Bacteria as an Alternative Treatment for Gastrointestinal Inflammatory Diseases: A Focus on Inflammatory Bowel Diseases and Mucositis. *Frontiers in Microbiology*. 2017, 8:800. doi:10.3389/fmicb.2017.00800.

4. de Moreno de LeBlanc A., Del Carmen S., Chatel J.M. et al. Current Review of Genetically Modified Lactic Acid Bacteria for the Prevention and Treatment of Colitis Using Murine Models. *Gastroenterol. Res. Pract.* 2015;146972. doi: 10.1155/2015/146972.
5. Kim D., Yoo S.A., Kim W.U. Gutmicrobiota in autoimmunity: potential for clinical applications. *Arch Pharm Res.* 2016, 39 (11): 1565-1576.
6. Kim D., Zeng M.Y., Núñez G. The interplay between host immune cells and gut microbiota in chronic inflammatory diseases. *Experimental Molecular Medicine.* 2017, 49(5): e339-. doi:10.1038/emm.2017.24.
7. Koh A., De Vadder F., Kovatcheva-Datchary P., Bäckhed F. From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites. *Cell.* 2016, 165: 1332-1345.
8. Lee S.H., Kwon J., Cho M.-L. Immunological pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Intestinal Research.* 2018, 16 (1): 26-42.
9. Levy M., Kolodziejczyk A.A., Thaïss C.A., Elinav E. Dysbiosis and the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 2017, 17 (4): 219-232.
10. Lin L., Zhang J. Role of intestinal microbiota and metabolites on gut homeostasis and human diseases. *BMC Immunology.* 2017, 18:2. doi:10.1186/s12865-016-0187-3.
11. Llewellyn A., Foey A. Probiotic Modulation of Innate Cell Pathogen Sensing and Signaling Events. *Nutrients.* 2017, 9 (10): 1156. doi:10.3390/nu9101156.
12. Mowat A.M., Bain C.C. Mucosal Macrophages in Intestinal Homeostasis and Inflammation. *Journal of Innate Immunity.* 2011, 3 (6): 550-564.
13. Nakase H., Okazaki K., Tabata Y. et al. New cytokine delivery system using gelatin microspheres containing interleukin-10 for experimental inflammatory bowel disease. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2002, 301 (1): 59-65.
14. Pagliari D., Gambassi G., Piccirillo C.A. et al. The Intricate Link among Gut Immunological Niche, Microbiota, and Xenobiotics in Intestinal Pathology. *Mediators of Inflammation.* 2017:8390595. doi:10.1155/2017/8390595.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

Ю.С.Шишкова¹, В.Ф.Долгушина¹, Е.Д.Графова¹, С.А.Завьялова², И.В.Курносенко¹, Н.П.Евстигнеева³, К.Г.Громакова¹, О.Л.Колесников¹, А.В.Чукичев¹, И.И.Долгушин¹

ВЗАИМОСВЯЗЬ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СТАТУСА НЕЙТРОФИЛОВ ЦЕРВИКАЛЬНОГО СЕКРЕТА У БЕРЕМЕННЫХ ЖЕНЩИН С ВИДОВЫМ СОСТАВОМ ЛАКТОФЛОРЫ

¹Южно-Уральский государственный медицинский университет, ²ГКП № 5, Челябинск;

³Уральский НИИ дерматовенерологии и иммунопатологии, Екатеринбург

Цель. Определить функциональный статус нейтрофилов цервикального секрета у женщин в I триместре беременности в зависимости от видового состава лактофлоры.

Материалы и методы. У обследованных 40 беременных женщин проводили масс-спектрометрическую видовую идентификацию влагалищных лактобацилл, оценивали их способность к образованию биопленок, изучали жизнеспособность, лизосомальную активность, спонтанный и индуцированный НСТ-тест, способность к поглощению частиц латекса нейтрофилами цервикальной слизи. Выделенные штаммы были разделены на 3 группы в зависимости от наличия или отсутствия инфекционного процесса влагалища и/или цервикального канала. *Результаты.* Среди выделенных 40 штаммов лактобацилл было идентифицировано 5 видов: *L.jensenii*, *L. crispatus*, *L. acidophilus*, *L.gasseri*, *L. delbrueckii*. В условиях нормоценоза показана различная интенсивность фагоцитоза частиц латекса нейтрофилами цервикального секрета в зависимости от доминирующего вида: при доминировании *L. crispatus* отмечена наименьшая интенсивность фагоцитоза, по сравнению с *L. acidophilus* и *L.jensenii*. При наличии генитальной инфекции лактобациллы способны интенсивно секретировать биоматрикс, блокируя свой антигенный потенциал, что сопровождается отсутствием НСТ-редуцирующей способности нейтрофильных гранулоцитов и снижением антимикробной защиты слизистой оболочки