

## ВЛИЯНИЕ КИШЕЧНЫХ МИКРОСИМБИОНТОВ НА ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ В СИСТЕМЕ *IN VITRO*

Бухарин О.В., Иванова Е.В., Чайникова И.Н.,  
Перунова Н.Б., Никифоров И.А., Челпаченко О.Е.,  
Бондаренко Т.А., Бекпергенова А.В.

Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук  
ФГБУН «Оренбургский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук, г. Оренбург, Россия

**Резюме.** В сохранении иммунного гомеостаза кишечника важнейшая роль принадлежит иммунорегуляторным свойствам микробиоты, которая, взаимодействуя с образующими рецепторами, активирует внутриклеточные сигнальные системы, экспрессию цитокинов, продукцию про- и противовоспалительных факторов и ограничивает воспалительные реакции в кишечнике. Итог взаимодействий микробиоты и клеток хозяина (развитие воспалительного процесса или поддержание кишечного гомеостаза) зависит от многих факторов, включая потенциальную способность кишечных комменсалов влиять на цитокиновую сеть организма человека. При нарушении количественных и качественных характеристик микробиоты (дисбиоз) цитокиновый баланс, формируемый за счет влияния кишечных микросимбионтов и их метаболитов на иммунные и эпителиальные клетки кишечника, может изменяться, способствуя развитию различной патологии человека. Целью данного исследования явилась оценка иммунорегуляторных свойств эубиотических и дисбиотических кишечных микросимбионтов человека по влиянию их бесклеточных супернатантов на продукцию цитокинов в системе *in vitro*. Исследование было проведено на 49 эубиотических и 77 дисбиотических штаммах микроорганизмов, выделенных от условно здоровых пациентов, обследуемых на дисбиоз толстого кишечника. Для оценки иммунорегуляторных свойств кишечных микросимбионтов изучено влияние бесклеточных супернатантов исследуемых культур бактерий и грибов на продукцию про- (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-17, IL-8, IL-6) и противовоспалительных (IL-10, IL-1ra) цитокинов, секретируемых мононуклеарными клетками периферической крови здоровых людей. Микробиоту кишечника исследовали бактериологическим методом. Идентификацию выделенных микробных культур проводили с помощью MALDI TOF MS серии Microflex LT (Bruker Daltonics, Германия). Уровень цитокинов определяли иммуноферментным методом с использованием коммерческих тест-систем («Цитокин», Россия). Статистический анализ включал: дискриминантный анализ, классификационное дерево решений и метод картирования

### Адрес для переписки:

Иванова Елена Валерьевна  
Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза  
Уральского отделения Российской академии наук  
460000, Россия, г. Оренбург, ул. Пионерская, 11.  
Тел.: 8 (3532) 77-26-19.  
E-mail: walerewna13@gmail.com

### Address for correspondence:

Elena V. Ivanova  
Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis  
11 Pionerskaya St  
Orenburg  
460000 Russian Federation  
Phone: +7 (3532) 77-26-19.  
E-mail: walerewna13@gmail.com

### Образец цитирования:

О.В. Бухарин, Е.В. Иванова, И.Н. Чайникова,  
Н.Б. Перунова, И.А. Никифоров, О.Е. Челпаченко,  
Т.А. Бондаренко, А.В. Бекпергенова «Влияние кишечных  
микросимбионтов на продукцию цитокинов в системе  
*in vitro*» // Медицинская иммунология, 2023. Т. 25, № 6.  
С. 1371-1388. doi: 10.15789/1563-0625-IVE-2622

© Бухарин О.В. и соавт., 2023  
Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

### For citation:

O.V. Bukharin, E.V. Ivanova, I.N. Chainikova,  
N.B. Perunova, I.A. Nikiforov, O.E. Chelpachenko,  
T.A. Bondarenko, A.V. Bekpergenova "In vitro effects  
of intestinal microsymbionts on the cytokine production",  
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,  
2023, Vol. 25, no. 6, pp. 1371-1388.

doi: 10.15789/1563-0625-IVE-2622

© Bukharin O.V. et al., 2023  
The article can be used under the Creative  
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-IVE-2622

равнодействующих. Применение многомерного статистического анализа позволило определить круг наиболее информативных показателей (среди цитокинов и микробных культур, изменяющих их продукцию) для оценки состояния гомеостаза при эу- и дисбиозе кишечника. Установлено, что супернатанты эубиотических культур кишечных симбионтов характеризовались выраженной способностью ингибировать уровень провоспалительных цитокинов: IFN $\gamma$ , IL-8 и стимулировать секрецию противовоспалительного цитокина (IL-10), а дисбиотические культуры — преимущественно индуцировали провоспалительные цитокины IL-17, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ . В сохранение равномерного баланса между про- и противовоспалительными цитокинами при эубиозе вносили значимый вклад как ассоциации микросимбионтов (по мере убывания уровня факторных нагрузок: *Bacteroides* spp. > *E. coli* > *Lactobacillus* spp.), так и монокультуры (*Bifidobacterium* spp. и *Lactobacillus* spp.), через индукцию IL-10. При дисбиозе кишечника увеличивалось количество ассоциаций микросимбионтов, индуцирующих секрецию провоспалительных цитокинов. Провоспалительный профиль дисбиотических культур формировался через влияние на продукцию IFN $\gamma$  (по мере убывания уровня факторных нагрузок) ассоциаций *Bifidobacterium* spp. > *Enterococcus* spp. > *E. coli* > *Lactobacillus* spp., а также ассоциации *S. aureus* > *Candida* spp. На секрецию IL-17 влияли монокультура *Clostridium* spp. и ассоциация *C. acnes* > *S. aureus* > *Klebsiella* spp., на TNF $\alpha$  — монокультуры бифидобактерий и эшерихий. Таким образом, при эубиозе нормобиота поддерживает равномерный баланс про- и противовоспалительных цитокинов, а при дисбиозе кишечника может происходить смещение баланса цитокинов в сторону провоспалительных за счет усиления уровня их секреции, расширения спектра данной группы цитокинов и увеличения количества моно- и ассоциаций микробных культур, влияющих на их продукцию.

**Ключевые слова:** кишечные микросимбионты, провоспалительные цитокины, противовоспалительные цитокины, эубиоз, дисбиоз, методы многомерной статистики

## IN VITRO EFFECTS OF INTESTINAL MICROSymbionTS ON THE CYTOKINE PRODUCTION

Bukharin O.V., Ivanova E.V., Chainikova I.N., Perunova N.B.,  
**Nikiforov I.A.**, Chelpachenko O.E., Bondarenko T.A.,  
Bekpergenova A.V.

*Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russian Federation*

**Abstract.** The most important role in homeostasis of intestinal immune belongs to the immunoregulatory properties of the microbiota which activates intracellular signaling systems, cytokine expression, production of protective factors and limits inflammatory reactions in the intestine by interacting with the pattern recognition receptors. The outcome of interactions between the microbiota and host cells (development of an inflammatory process or maintenance of intestinal homeostasis) depends on many factors, including a potential ability of intestinal commensals to influence the cytokine network in human body. Due to disturbances of quantitative and qualitative microbiota profile (dysbiosis), the cytokine balance may be changed by the influence of intestinal microsymbiotics and their metabolites on immune and epithelial cells of intestines, thus contributing to the development of various human disorders. The aim of this study was to evaluate the immunoregulatory properties of eubiotic and dysbiotic human intestinal microsymbiotics by assessing the effects of their cell-free supernatants on cytokine production in the *in vitro* system. The study was conducted on 49 eubiotic and 77 dysbiotic strains of microorganisms isolated from conditionally healthy patients examined for colon dysbiosis. To assess immunoregulatory properties of intestinal microsymbiotics, we studied the effects of cell-free supernatants from bacterial and fungal cultures up on production of proinflammatory (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-17, IL-8, IL-6) and anti-inflammatory (IL-10, IL-1ra) cytokines secreted by mononuclear cells isolated from peripheral blood of healthy persons. The intestinal microbiota was determined by bacteriological methods. Identification of isolated microbial cultures was performed using MALDI TOF MS Microflex LT series (Bruker Daltonics, Germany). The level of cytokines was determined by enzyme immunoassay using commercial test systems ("Cytokine", Russia). Statistical evaluation included discriminant analysis, classification decision tree

and resultant mapping method. The multivariate statistical analysis enabled us to determine the range of the most informative indexes among cytokines and microbial cultures that changing their production in order to assess the state of homeostasis in eubiosis and intestinal dysbiosis. It was found that the supernatants of eubiotic cultures of intestinal symbionts exhibited a pronounced ability to inhibit the level of pro-inflammatory cytokines (IFN $\gamma$ , IL-8) and to stimulate the secretion of anti-inflammatory cytokine (IL-10), whereas the dysbiotic cultures predominantly induced pro-inflammatory cytokines (IL-17, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ ). In maintaining a uniform balance between pro- and anti-inflammatory cytokines during eubiosis, both associations of microsymbionts (in descending order of factor loads): *Bacteroides* spp. > *E. coli* > *Lactobacillus* spp.), and monocultures (*Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus* spp.) made a significant contribution via IL-10 induction. In cases of intestinal dysbiosis, we found an increased number of associations between microsymbionts inducing secretion of pro-inflammatory cytokines was. The pro-inflammatory profile of dysbiotic cultures was determined by the influence on IFN $\gamma$  production (ranged in descending order of factor loads) of *Bifidobacterium* spp. > *Enterococcus* spp. > *E. coli* > *Lactobacillus* spp. associations, as well as *S. aureus* > *Candida* spp associations. The secretion of IL-17 was influenced by the monoculture of *Clostridium* spp., and by association *C. acnes* > *S. aureus* > *Klebsiella* spp. Monocultures of *Bifidobacteria* and *Escherichia* exerted effects upon TNF $\alpha$  production. Thus, during eubiotic state, the normobiota maintains a uniform balance of pro- and anti-inflammatory cytokines, and, in presence of intestinal dysbiosis, a shift in the balance of cytokines towards pro-inflammatory ones may occur due to increased levels of their secretion, an expanded spectrum of cytokines from this group, and increased number of single bacteria and associations of microbial cultures affecting their production.

**Keywords:** intestinal microsymbionts, pro-inflammatory cytokines, anti-inflammatory cytokines, eubiosis, dysbiosis, multivariate statistical analysis

## Введение

Введение термина «микробиом» позволило Дж. Ледербергу «раздвинуть» привычные рамки микробиоты, а организм хозяина определить как «суперорганизм» со всем микробным сообществом, где симбиотические связи оказывают влияние, как на физиологию «хозяина», так и определяют перестройки микробиоты [2, 31]. Рассмотрение инфекции в качестве модели ассоциативного симбиоза позволило использовать биологический потенциал микробиоты для решения вопросов о механизмах взаимодействия прокариот и эукариот [3]. Современные технологии секвенирования способствовали расширению исследований, связанных с микробиомом кишечника, и показали, что микробиота участвует в регулировании многих физиологических систем хозяина [39, 48]. Микробиота устанавливает симбиотические перекрестные связи со своим хозяином, продуцирует белки и метаболиты, модулирующие ключевые функции хозяина, включая переработку питательных веществ, поддержание энергетического гомеостаза и развитие иммунной системы [29, 36]. Вместе с тем кишечник является не только местом обитания многочисленных микроорганизмов, но и самым большим иммунологическим органом с разнообразным представительством иммунных клеток, организованных в структурные и изолированные лимфоидные фолликулы. Основой симбиотических взаимоотношений является ацептивный иммунитет, который в физиологических условиях на слизистых оболочках обеспечивает состо-

яние толерантности к представителям индигенной микробиоты, что является необходимым для формирования кишечного гомеостаза [8, 23].

Известно, что во взаимодействии хозяин-микробиота задействованы метаболиты, клеточные рецепторы и молекулы с антибактериальной и противовоспалительной активностью, включая цитокины, которые способны модулировать эпигенетический и иммунный ответ. При эубиозе вместе с эпителиальными и иммунными клетками эти сигнальные молекулы образуют сеть, необходимую для гомеостаза кишечника и противоинфекционной защиты. С другой стороны, при дисбиозе эти защитные механизмы нарушаются. Любые количественные или функциональные изменения кишечной микробиоты (дисбиоз) изменяют иммунный ответ, дестабилизируют гомеостаз кишечника, опосредуя транслокацию микробов и развитие инфекции (роль дисбиоза кишечника как «тroyанского коня») [28].

Цитокины, как медиаторы межклеточной «коммуникации», обеспечивают регуляцию иммунных реакций и скоординированное взаимодействие клеток иммунной системы [11]. Взаимодействие лигандов микроорганизмов с образраспознающими рецепторами ведет к активации внутриклеточных сигнальных систем, экспрессии цитокинов и продукции протективных факторов [18]. Итог таких взаимодействий зависит от многих факторов, включая потенциальную способность кишечных комменсалов влиять на цитокиновую сеть организма человека. Исследование взаимодействия кишечных микросимбионтов и цитокиновой сети человека представля-

ется важным, поскольку известна роль цитокинов и дисбиоза в формировании различной патологии: воспалительные заболевания кишечника, метаболические нарушения, аутоиммунные заболевания, онкология и др. [7, 9, 13, 25]. Вместе с тем отсутствуют комплексные исследования иммунорегуляторных свойств микросимбионтов при различных состояниях микросимбиоза (эубиоз/дисбиоз) кишечника человека, участие основных представителей дистального отдела кишечника в продукции различных функциональных групп цитокинов.

Указанные моменты и предопределили направленность наших исследований, которые могли бы способствовать лучшему пониманию роли микробиоты в поддержании иммунного гомеостаза кишечника, а также изысканию новых подходов для дальнейшей работы по отбору эффективных пробиотиков мишень-направленного действия.

**Цель исследования** — дать сравнительную оценку иммунорегуляторных свойств эубиотических и дисбиотических кишечных микросимбионтов человека по влиянию их супернатантов на продукцию цитокинов в системе *in vitro*.

## Материалы и методы

### Штаммы микроорганизмов

Материалом для исследования послужили 126 фекальных штаммов (49 эубиотических и 77 дисбиотических культур) облигатно-анаэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов, включая культуры *Bifidobacterium* spp. (*longum*, *bifidum*, *breve adolescentis*, *catenulatum*); *Lactobacillus* spp. (*fermentum*, *plantarum*, *acidophilus*, *rhamnosus*, *ruminis*, *paracasei*, *casei*); *Bacteroides* spp. (*fragilis*, *ovatus*, *vulgatus*); *Cutibacterium acnes*, *Clostridium* spp. (*difficile*, *novyi*); представителей семейства *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli*, *Klebsiellae* spp. (*pneumoniae*, *oxytoca*), *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp. (*aerogenes* и *cloaceae*), *Citrobacter freundii*, *Proteus mirabilis*); *Staphylococcus* spp. (*aureus*, *warneri*, *xylosus*, *epidermalis* и *saprophyticus*); *Enterococcus faecium* и *Candida albicans*.

Микробиоту кишечника исследовали в соответствии с приказом Минздрава РФ № 231 (от 9.06.2003) «Об утверждении отраслевого стандарта «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника». Штаммы были выделены от условно здоровых пациентов в возрасте от 18 до 45 лет при обследовании на дисбиоз толстого кишечника человека. В результате у 20 пациентов был выявлен эубиоз и у 45 пациентов — дисбиоз кишечника I–III степени.

Идентификацию облигатно-анаэробных и факультативно-анаэробных бактерий и грибов проводили с помощью времяпролетной масс-

спектрометрии MALDI TOF MS серии Microflex LT (Bruker Daltonics, Германия), программное обеспечение Maldi BioTyper 3.0. Положительная идентификация на уровне рода соответствовала значению Score  $\geq 1,7$  и на уровне вида — Score = 2,0 или выше.

Для исследования влияния метаболитов микроорганизмов на секрецию цитокинов в условиях *in vitro* использовали супернатанты бактериальных культур и грибов. Супернатанты получали из 24–48-часовой бульонной культуры в результате двукратного центрифугирования (3200 об/мин) с последующей фильтрацией (мембранные фильтры с диаметром пор 0,22 мкм, Millipore, США). Контроль стерильности супернатантов осуществляли высевом на питательные среды после предварительной их заморозки при  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### Выделение мононуклеаров из периферической крови человека

Мононуклеарные клетки (МНК) выделяли в стерильных условиях из гепаринизированной крови, взятой стандартным методом из локтевой вены в вакуумные пробирки (BD Vacutainer™, Greiner-bio-one, Австрия) у 13 условно здоровых доноров обоего пола (средний возраст —  $24,0 \pm 0,6$  года). Выделение МНК проводили посредством центрифугирования (400 g) на градиенте плотности фиколл-верографин (Pharmacia, Швеция) плотностью  $1,077\text{ г/см}^3$ . Число жизнеспособных клеток учитывали с помощью камеры Горяева после окраски 0,1% раствором трипанового синего. Готовую взвесь клеток МНК доводили до концентрации  $1 \times 10^6$ /мл в культуральной среде и использовали для соинкубирования с бесклеточными супернатантами микроорганизмов.

### Соинкубирование мононуклеаров с супернатантами исследуемых культур микросимбионтов

Сокультивирование взвеси МНК с супернатантами исследуемых микроорганизмов проводили в 96-луночных полистероловых планшетах в соотношении 1:4 (опыт) в культуральной среде, содержащей RPMI («ПанЭко», Россия), 10% инактивированную эмбриональную телячью сыворотку (Sigma-Aldrich, США), 0,01% L-глутамин и 80 мкг/мл гентамицина. Пробы инкубировали 24 часа во влажной атмосфере с 5%  $\text{CO}_2$  (в  $\text{CO}_2$  инкубаторе) при  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Исследование каждой клеточной культуры проводили в трех дублях. Контролем служили пробы: 1. контроль МНК в культуральной среде; 2. контроль МНК с добавлением питательной среды (бульон Шадлера, HiMedia, Индия), используемой для получения бульонной культуры исследуемых культур бактерий и грибов. По окончании срока инкубации культуральную жидкость собирали и замораживали ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) для последующего определения концентрации цитокинов.



### Исследование содержания цитокинов в культуральной жидкости

Уровни про- ( $\text{IFN}\gamma$ ,  $\text{TNF}\alpha$ , IL-17, IL-8, IL-6) и противовоспалительных (IL-10, IL-1ra) цитокинов в клеточных супернатантах определяли иммуноферментным методом на фотометре Multiskan (Labsystems, Финляндия) с использованием соответствующих коммерческих тест-систем («Цитокин», Россия). Результат влияния бесклеточных супернатантов кишечных микросимбионтов на секрецию цитокинов МНК оценивали по изменению концентрации цитокинов в культуральной среде по сравнению с контрольными пробами.

### Статистический анализ

Результаты проведенных исследований обработаны методами вариационной статистики с использованием пакета прикладных программ Microsoft Excel и STATISTICA 10.0. Вычислялась средняя арифметическая величина ( $M$ ) и стандартная ошибка средней арифметической ( $m$ ). Для проверки нормальности распределения использован  $W$ -критерий Шапиро–Уилка. В случае распределения, приближенного к нормальному, использовали критерий Стьюдента, в остальных – применяли  $U$ -критерий Манна–Уитни для оценки значимости различий. Различия между выборками считались значимыми при уровне  $p < 0,05$ . Также были использованы дискриминантный анализ, метод дерева решений и метод картирования равнодействующих [40].

## Результаты

Анализ влияния супернатантов кишечных микросимбионтов на секрецию цитокинов периферическими мононуклеарами показал, что большинство (82,1±3,6%) штаммов *Bifidobacterium* spp. ингибировали провоспалительный цитокин  $\text{TNF}\alpha$ . Супернатанты исследуемых условно-патогенных кишечных микросимбионтов проявляли примерно в равной степени как ингибирующий, так и стимулирующий эффект. Исключение составили штаммы *Enterococcus* spp. и *Pseudomonas* spp., супернатанты которых во всех исследуемых случаях стимулировали продукцию данного цитокина (рис. 1А).

Уровень  $\text{TNF}\alpha$  в среде культивирования мононуклеаров периферической крови человека в контроле составлял 37,12±2,15 пг/мл. В опытных пробах уровень его составил для *Bifidobacterium* spp. и *Lactobacillus* spp. 19,2±8,5 пг/мл и 51,4±23,5 пг/мл ( $p < 0,05$  по сравнению контролем); для *Bacteroides* spp. и *Clostridium* spp. – 56,2±36,6 и 137,6±84,1 пг/мл ( $p < 0,05$ ); для грамотрицательных условно-патогенных бактерий (УПБ) – 174,2±71,7 пг/мл ( $p < 0,05$ ); для грамположительных УПБ – 157,2±73,2 пг/мл ( $p < 0,05$ ),

для грибов рода *Candida* – 81,2±47,3 пг/мл ( $p < 0,05$ ).

Оценка влияния супернатантов исследуемых культур на продукцию провоспалительного цитокина  $\text{IFN}\gamma$  лимфоцитами показала, что большинство штаммов (до 85,0±3,1%) стимулировали продукцию данного цитокина, а энтерококки и псевдомонады стимулировали во всех исследуемых случаях. Подавляли секрецию цитокина  $\text{IFN}\gamma$  супернатанты культур бифидобактерий (20,0±2,8%), кутибактерий (35,0±3,1%), лактобактерий (42,0±2,3%), клебсиелл (40,0±2,7%), золотистого стафилококка (50,0±2,9%) и клостридий (72,7±3,1%) (рис. 1Б).

Содержание цитокина  $\text{IFN}\gamma$  в среде культивирования лимфоцитов в контроле составляло 18,1±1,2 пг/мл. В опытных пробах уровень его составил для *Bifidobacterium* spp. и *Lactobacillus* spp. 51,3±10,2 пг/мл и 63,4±18,9 пг/мл, ( $p < 0,05$ ); для *Bacteroides* spp. и *Clostridium* spp. – 86,3±30,1 пг/мл и 41,3±8,2 пг/мл ( $p < 0,05$ ); для грамотрицательных УПБ – 131,4±36,5 пг/мл, ( $p < 0,05$ ); для грамположительных УПБ – 66,3±15,7 пг/мл ( $p < 0,05$ ); для грибов рода *Candida* – (77,3±15,2 пг/мл,  $p < 0,05$ ).

В отношении IL-6 у супернатантов всех исследуемых культур проявлялся примерно в равной степени как ингибирующий, так и индифферентный эффект, вместе с тем около 20% исследуемых штаммов *Bifidobacterium* spp. стимулировали секрецию лимфоцитами этого цитокина. Уровень IL-6 в контроле составлял 514,1±20,2 пг/мл. В опытных пробах уровень его составил для *Bifidobacterium* spp. и *Lactobacillus* spp. 386,3±38,2 пг/мл и 336,3±28,9 пг/мл ( $p < 0,05$ ); для *Bacteroides* spp. и *Clostridium* spp. – 456,1±29,2 пг/мл и 406,1±27,2 пг/мл ( $p < 0,05$ ); для грамотрицательных УПБ – 461,7±25,7 пг/мл ( $p \geq 0,05$ ); для грамположительных УПБ – 449,2±31,2 пг/мл ( $p < 0,05$ ); для грибов рода *Candida* – 412,5±28,7 пг/мл ( $p < 0,05$ ).

Оценка продукции хемокина IL-8 лимфоцитами в присутствии супернатантов кишечных микросимбионтов показала, что большинство культур (40-100%) оказывали стимулирующий эффект в отношении данного цитокина. Среди изученных штаммов только 23-25% культур бифидобактерий и лактобактерий подавляли секрецию IL-8, а остальные культуры либо не влияли на секрецию цитокина, либо ингибирующий эффект наблюдался в единичных случаях. В контроле содержание IL-8 составляло 615,3±25,0 пг/мл. В опытных пробах уровень его составил для *Bifidobacterium* spp. 626,8±113,1 пг/мл ( $p \geq 0,05$ ); для *Bacteroides* spp. – 766,8±68,7 пг/мл ( $p < 0,05$ ); для грамотрицательных УПБ – 935,1±147,4 пг/мл ( $p < 0,05$ ); для грамположительных УПБ –

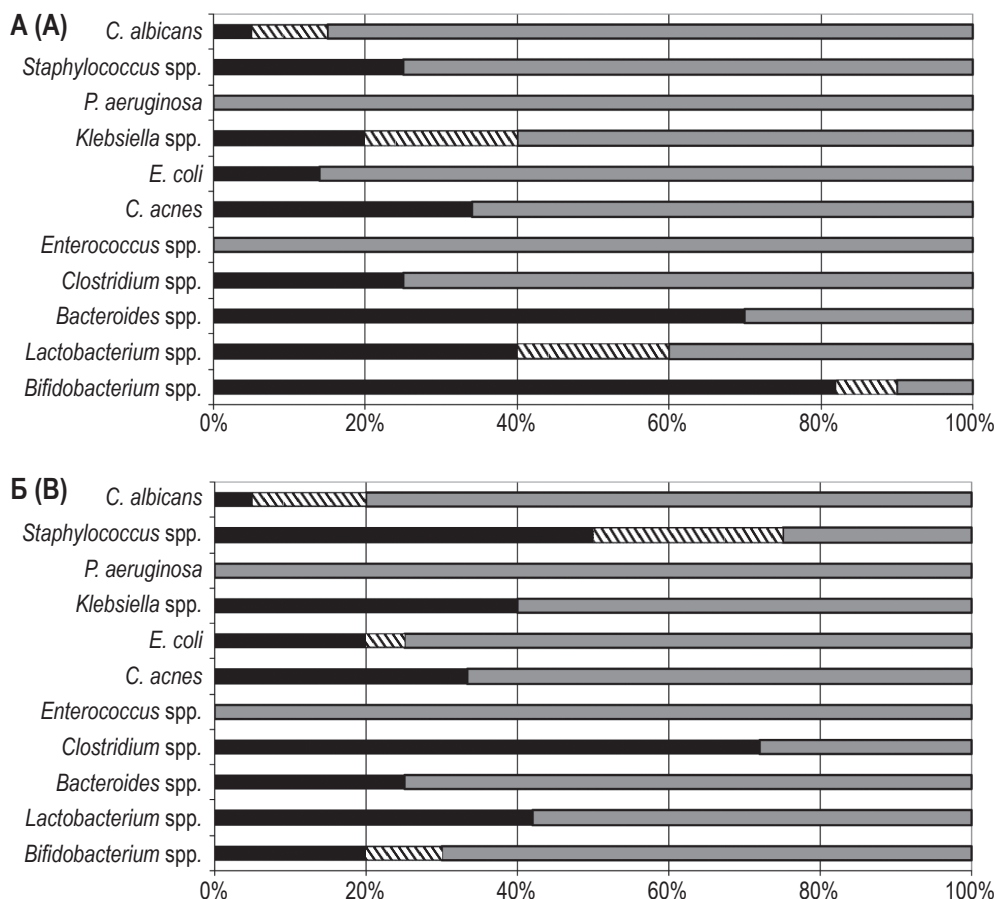


Рисунок 1. Частота встречаемости штаммов кишечных микросимбионтов с различным влиянием на продукцию провоспалительных цитокинов TNFα (А), IFNγ (Б) лимфоцитами (% от исследуемых штаммов)

Примечание. ■ – подавление продукции; ▨ – отсутствие влияния; ■ – увеличение продукции.

Figure 1. Frequency of occurrence of intestinal microsymbiont strains with different effects on the production of proinflammatory cytokines TNFα (A), IFNγ (B) by lymphocytes (% of the studied strains)

Note. ■, decreased of production; ▨, no effect; ■, increased of production.

833,8±78,5 пг/мл ( $p < 0,05$ ); для грибов рода *Candida* – 723,8±84,9 пг/мл ( $p < 0,05$ ).

Анализ влияния супернатантов кишечных микросимбионтов на продукцию IL-17 лимфоцитами показал, что для большинства культур был характерен разнонаправленный эффект, кроме супернатантов бифидобактерий, лактобактерий и бактероидов, оказывающих в 97-100% случаев подавляющий эффект в отношении данного цитокина. Среди изученных штаммов 19-79% культур клостридий, кутибактерий, энтеробактерий, стафилококков и дрожжевых грибов проявляли стимулирующее влияние в отношении IL-17. В контроле значение IL-17 составляло 140,3±3,3 пг/мл. В опытных пробах уровень его составил для *Bifidobacterium* spp. и *Lactobacillus* spp. 59,4±29,1 пг/мл и 76,1±14,5 пг/мл ( $p < 0,05$ ); для *Bacteroides* spp. и *Clostridium* spp. – 81,2±12,4 пг/мл и 166,1±35,6 пг/мл ( $p < 0,05$ ); для грамотрицательных УПБ – 170,1±21,4 пг/мл ( $p < 0,05$ ); для грамположительных УПБ – 153,6±24,1 пг/мл ( $p < 0,05$ );

для грибов рода *Candida* – 152,5±17,1 пг/мл ( $p < 0,05$ ).

В отношении противовоспалительного цитокина IL-10 было установлено, что большинство штаммов (18,0-100,0%) ингибировали секрецию данного цитокина. Стимулирующий эффект на продукцию IL-10 лимфоцитами выявлялся у 75,0±4,3% культур бифидобактерий, у 63,6±2,7% бактероидов, у 50,0±1,8% лактобактерий, у 20,0±1,2% клебсиелл и у 33,0±1,5% эшерихий (рис. 2А). В контроле значения IL-10 составляли 50,3±5,56 пг/мл. В опытных пробах уровень его составил для *Bifidobacterium* spp. и *Lactobacillus* spp. 63,5±20,9 пг/мл ( $p < 0,05$ ) и 61,1±17,9 пг/мл ( $p \geq 0,05$ ); для *Bacteroides* spp. и *Clostridium* spp. – 52,4±17,9 пг/мл ( $p \geq 0,05$ ) и 22,3±9,7 пг/мл ( $p < 0,05$ ); для грамотрицательных УПБ – 21,1±3,2 пг/мл ( $p < 0,05$ ); для грамположительных УПБ – 32,1±14,6 пг/мл ( $p < 0,05$ ); для грибов рода *Candida* – 37,8±8,4 пг/мл ( $p < 0,05$ ).

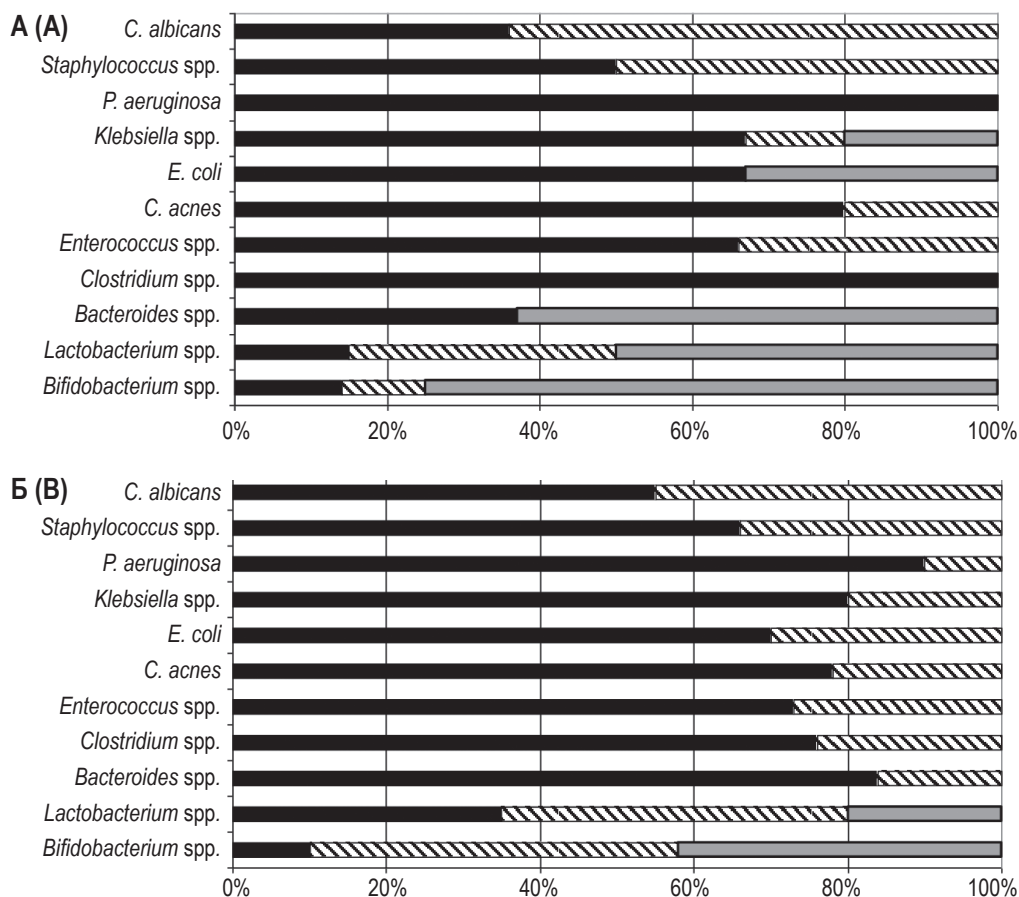


Рисунок 2. Частота встречаемости штаммов кишечных микросимбионтов с различным влиянием на продукцию противовоспалительных цитокинов IL-10 (А) и IL-1ra (Б) лимфоцитами (% от исследуемых штаммов)

Примечание. ■ – подавление продукции; ▨ – отсутствие влияния; ■ – увеличение продукции.

Figure 2. Frequency of occurrence of intestinal microsymbiote strains with different effects on the production of anti-inflammatory cytokines IL-10 (A) and IL-1ra (B) by lymphocytes (% of the studied strains)

Note. ■, decreased of production; ▨, no effect; ■, increased of production.

Изучение влияния супернатантов на продукцию другого противовоспалительного цитокина IL-1ra показало, что большинство исследуемых штаммов также снижали его продукцию (рис. 2Б). Вместе с тем  $42,8 \pm 1,2\%$  культур бифидобактерий и  $20,0 \pm 0,05\%$  лактобактерий стимулировали продукцию данного цитокина лимфоцитами.

В среде культивирования контрольных проб значения IL-1ra составляли  $321,3 \pm 2,4$  пг/мл. В опытных пробах уровень его составил для *Bifidobacterium spp.* и *Lactobacillus spp.*  $454,7 \pm 190,1$  пг/мл ( $p < 0,05$ ) и  $389,5 \pm 107,9$  пг/мл ( $p \geq 0,05$ ); для *Bacteroides spp.* и *Clostridium spp.* –  $184,2 \pm 74,9$  пг/мл и  $212,3 \pm 70,1$  пг/мл ( $p < 0,05$ ); для грамотрицательных УПБ –  $177,4 \pm 75,2$  пг/мл ( $p < 0,05$ ); для грамположительных УПБ –  $190,2 \pm 78,6$  пг/мл ( $p < 0,05$ ); для грибов рода *Candida* –  $204,7 \pm 80,0$  пг/мл ( $p < 0,05$ ).

Опираясь на полученный фактический материал, был проведен комплексный анализ влияния супернатантов различных видов микросимбионтов на цитокиновый профиль мо-

нонуклеаров периферической крови человека. Для выявления наиболее значимых различий между видами кишечных микросимбионтов и состояния микросимбиотоза (эу- и дисбиоз дистального отдела кишечника), оцениваемых по способности супернатантов бактерий и грибов изменять секрецию цитокинов иммунными клетками, использовали методы многомерной математической статистики: дискриминантный анализ, метод картирования равнодействующих и дерево решений.

Построенная диаграмма значений ROOT1 по данным дискриминантного анализа выявила существенное различие эу- и дисбиотических штаммов по цитокиновому профилю (рис. 3). Поскольку для каждого штамма существовало свое решение данного уравнения, график значений ROOT1 по всей выборке отражает главную тенденцию различия иммунорегуляторной активности супернатантов микроорганизмов: для эубиотических штаммов значения ROOT1 ха-

рактизовались положительными значениями дискриминантного корня; для дисбиотических штаммов значения ROOT1 в большинстве случаев были ниже нулевых. Это сопровождалось значительным снижением значений  $TNF\alpha$  и одновременно с этим происходит некоторый рост значений IL-1ra.

С использованием метода картирования равнодействующих [40] по 7 цитокинам была построена трехмерная диаграмма. Метод картирования наглядно представил разграничение эу- и дисбиотических культур по комплексу из 7 цитокинов, но оно не было стопроцентным для всех штаммов. Наблюдалось около 3 исключений из этого правила (т. е. четкое разграничение эу- и дисбиотических изолятов) для отдельных штаммов бифидобактерий, бактероидов и кутибактерий (рис. 4).

Дерево решений было построено по данным содержания исследуемых цитокинов (ед.) в культуральной среде (по отношению к контролю, т. е. уровню цитокинов в культуральной среде мнуклеаров без супернатантов микробных культур) при добавлении супернатантов различных видов микроорганизмов для разработки индуктивных правил распознавания особенностей иммунорегуляторного влияния культур в зависимости от источника выделения (эубиоз/дисбиоз). Правила генерируются при обобщении множества отдельных наблюдений, описывающих предметную область, представленную клинической выборкой. Форма решения представляется древовидной

иерархией, построенной путем статистического распознавания групп микроорганизмов через набор информативных показателей. Они вычисляются независимо от определенных ранее при дискриминантном анализе, что позволяет сравнить результаты обоих методов.

Интерпретация диаграммы дерева решений исследуемых микроорганизмов, выделенных при эубиозе, состояла в описании природы и компонентных связей каждого уровня возникшей древовидной структуры. Дерево было представлено 3 уровнями, которые распадались на ветви, продолжающие делиться, и 4 листьев, которые уже делению не подвержены.

Вклад каждого признака (содержание цитокинов в среде культивирования) в распознавание источника выделения культур микроорганизмов, необходимых дереву решений, уровень факторных нагрузок цитокинов позволили сформировать рейтинг информативных признаков, характерных для эубиотических штаммов кишечных микросимбионтов, представленный на рисунке 5.

Данные, представленные на рисунке 5А, демонстрируют сходство результатов нашей интерпретации дискриминантного анализа и дерева решений. Главная роль в обоих случаях принадлежала одним и тем же признакам, которые имели отрицательные факторные нагрузки. Значимыми для культур, выделенных при эубиозе, оказались признаки, характеризующие способность супер-

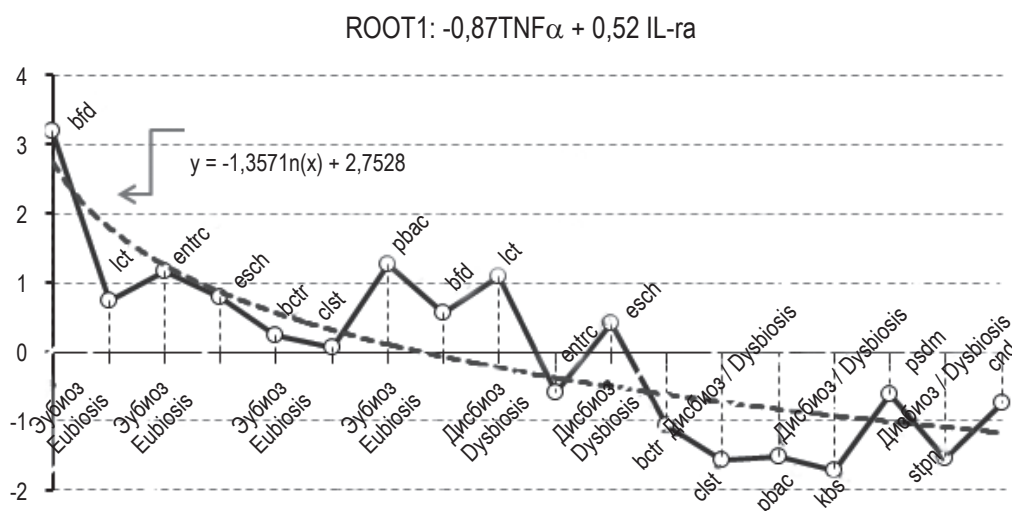


Рисунок 3. Диаграмма распределения штаммов по цитокиновому профилю с учетом состояния микросимбиоза толстого кишечника человека

Примечание. bfd – *Bifidobacterium* spp.; lct – *Lactobacillus* spp.; bctr – *Bacteroides* spp.; pbact – *C. acnes*; clst – *Clostridium* spp.; entrc – *Enterococcus* spp.; esch – *E. coli*; kbs – *Klebsiella* spp.; psdm – *P. aeruginosa*; stp – *S. aureus*; cnd – *C. albicans*.

Figure 3. Diagram of the distribution of strains by cytokine profile, taking into account the state of microsimbiocenosis of the human colon

Note. bfd, *Bifidobacterium* spp.; lct, *Lactobacillus* spp.; bctr, *Bacteroides* spp.; pbact, *C. acnes*; clst, *Clostridium* spp.; entrc, *Enterococcus* spp.; esch, *E. coli*; kbs, *Klebsiella* spp.; psdm, *P. aeruginosa*; stp, *S. aureus*; cnd, *C. albicans*.



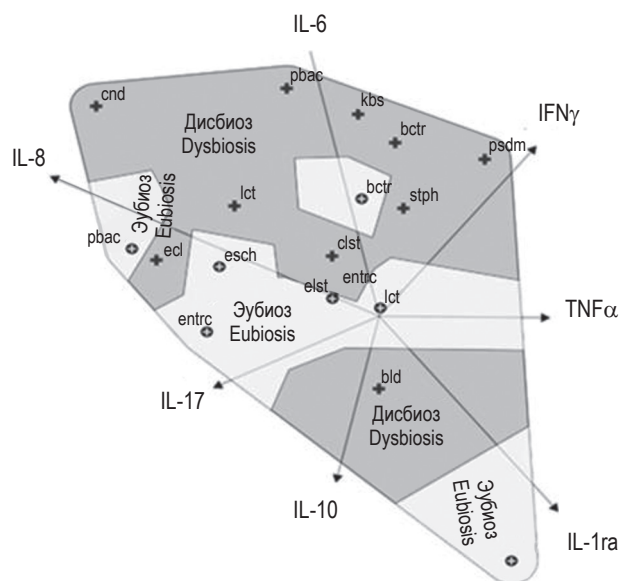
натантов влиять на уровень  $IFN\gamma$  и IL-8, а также IL-10.

Интерпретация диаграммы дерева решений исследуемых микроорганизмов, выделенных при дисбиозе толстого кишечника человека, состоящая в описании природы и компонентных связей каждого уровня возникшей древовидной структуры, установила, что дерево состояло из 7 уровней, которые распадались на ветви, продолжающие делиться, и 8 листьев, которые уже не делились. На рисунке 5Б представлено участие микросимбионтов, выделенных при дисбиозе кишечника, в формировании цитокинового профиля мононуклеаров по данным метода дерева решений.

Уровень факторных нагрузок цитокинов позволил сформировать рейтинг информативных признаков, характерных для дисбиотических штаммов кишечных микросимбионтов. Значимыми информативными признаками для культур, выделенных при дисбиозе, оказались IL-17,  $IFN\gamma$  и  $TNF\alpha$ , характеризующие выраженное влияние супернатантов исследуемых культур на секрецию указанных провоспалительных цитокинов.

Результаты анализа количественных и качественных взаимозависимостей родового состава и исследуемого набора признаков (продукция цитокинов) на основании примененного в работе метода «дерево решений», позволили решить вопрос о специфичном вкладе не только отдельных кишечных микросимбионтов, но и их ассоциаций в формирование цитокинового профиля кишечного биотопа и представлены схематично на рисунке 6. Интерпретация диаграммы дерева решений посредством описания природы и компонентных связей каждого уровня возникшей древовидной структуры позволила установить, что при эубиозе создается равномерный баланс между про- и противовоспалительными цитокинами (рис. 6). Значимый вклад в продукцию противовоспалительного цитокина IL-10 вносили как ассоциация микроорганизмов (*Bacteroides* spp. > *E. coli* > *Lactobacillus* spp.), так и отдельные изоляты *Bifidobacterium* spp. и *Lactobacillus* spp. Информативным признаком оказался IL-8, на секрецию которого влияла как ассоциация *C. acnes* > *Clostridium* spp. > *Enterococcus* spp., так и отдельные культуры (*Bifidobacterium* spp. и *E. coli*). Влияние на продукцию  $IFN\gamma$  оказывали все исследуемые микроорганизмы (преимущественно *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Clostridium* spp. и *Enterococcus* spp.), за исключением *Bacteroides* spp. и *C. acnes*.

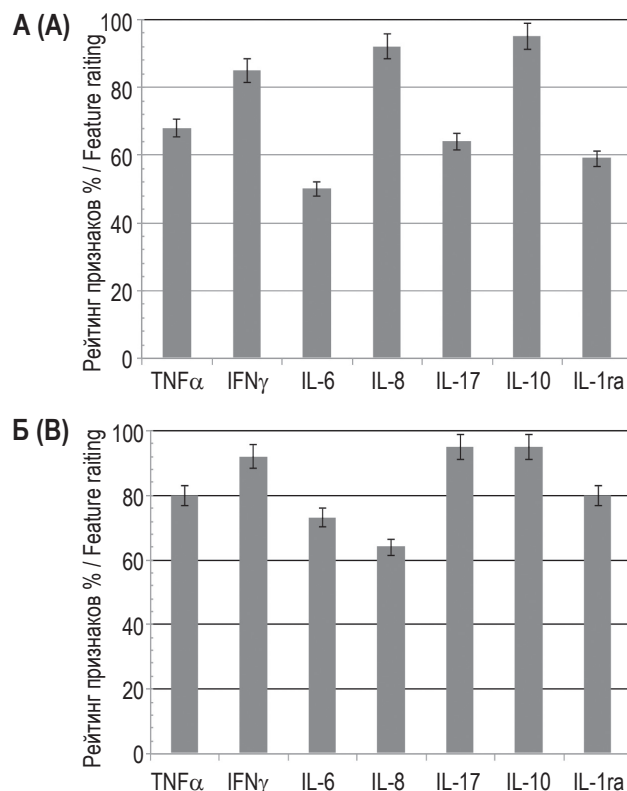
При дисбиозе толстого кишечника по данным диаграммы дерева решений увеличивалось количество ассоциаций микросимбионтов, влияющих на секрецию провоспалительных цитоки-



**Рисунок 4. Распределение штаммов по комплексу из 7 цитокинов. Метод картирования равнодействующих**  
Примечание. См примечание к рисунку 3. ⊕ □ – эубиоз; ⊞ – дисбиоз.

Figure 4. Distribution of strains by a complex of 7 cytokines. Method of mapping resultants

Note. As for Figure 3. ⊕ □, eubiosis; ⊞, dysbiosis.



**Рисунок 5. Рейтинг информативных признаков формирования дерева решений: А – при эубиозе; Б – при дисбиозе**

Figure 5. Rating of informative signs of decision tree formation: A, in case of eubiosis B, in case of dysbiosis

нов. Наиболее информативными оказались провоспалительные цитокины  $IFN\gamma$ , IL-17 и  $TNF\alpha$ . На продукцию  $IFN\gamma$  влияли ассоциация (по мере убывания) *Bifidobacterium* spp. > *Enterococcus* spp. > *E. coli* > *Lactobacillus* spp., а также ассоциация *S. aureus* > *Candida* spp. На секрецию IL-17 влияли монокультура *Clostridium* spp. и ассоциация *C. acnes* > *S. aureus* > *Klebsiella* spp.,  $TNF\alpha$  — монокультуры бифидобактерий и эшерихий. Оба исследуемых противовоспалительных цитокина — IL-10 и IL-1ra при дисбиозе оказались значимыми. На секрецию IL-1ra влияла ассоциация *Bacteroides* spp. > *P. aeruginosa* > *Lactobacillus* spp. В продукцию IL-10 значимый вклад вносили *Clostridium* spp. в монокультуре и ассоциация *C. acnes* > *Klebsiella* spp.

Анализ полученных данных свидетельствует, что результаты интерпретации дискриминантного анализа и дерева решений дополняют друг друга. Применение методов многомерного статистического анализа позволило определить круг наиболее информативных факторов, участвующих в формировании кишечного гомеостаза человека в условиях эу- и дисбиоза. Значимую роль (рейтинг) в формировании эу- и дисбиоза вносила способность микросимбионтов влиять на секрецию противовоспалительных цитокинов IL-10 и IL-1ra. При дисбиозе увеличивалось общее количество ассоциаций

микросимбионтов, влияющих на секрецию провоспалительных цитокинов, и расширялось количество цитокинов этой функциональной группы (IL-17,  $IFN\gamma$ ,  $TNF\alpha$ ) со значимым вкладом в развитие дисбиоза.

Таким образом, применение методов многомерного статистического анализа (дискриминантный анализ, метод картирования и дерева решений) показало, что при эубиозе создается равномерный баланс между про- и противовоспалительными цитокинами. При дисбиозе толстого кишечника превалирует провоспалительный профиль цитокинов за счет увеличения количества ассоциаций микросимбионтов, стимулирующих их секрецию. Полученные результаты дают основание полагать, что важным фактором поддержания кишечного гомеостаза в условиях эубиоза является способность супернатантов кишечных микросимбионтов оказывать дифференцированное воздействие по направленности, спектру и выраженности (индукция/ингибция/отсутствие влияния) на продукцию цитокинов разных функциональных групп (про- и противовоспалительных цитокинов, хемокина).

В условиях дисбиоза супернатанты микроорганизмов чаще оказывали провоспалительный эффект, усиливая секрецию IL-17,  $TNF\alpha$  и  $IFN\gamma$  иммунными клетками. Полученные результаты могут быть использованы для отбора и тестиро-

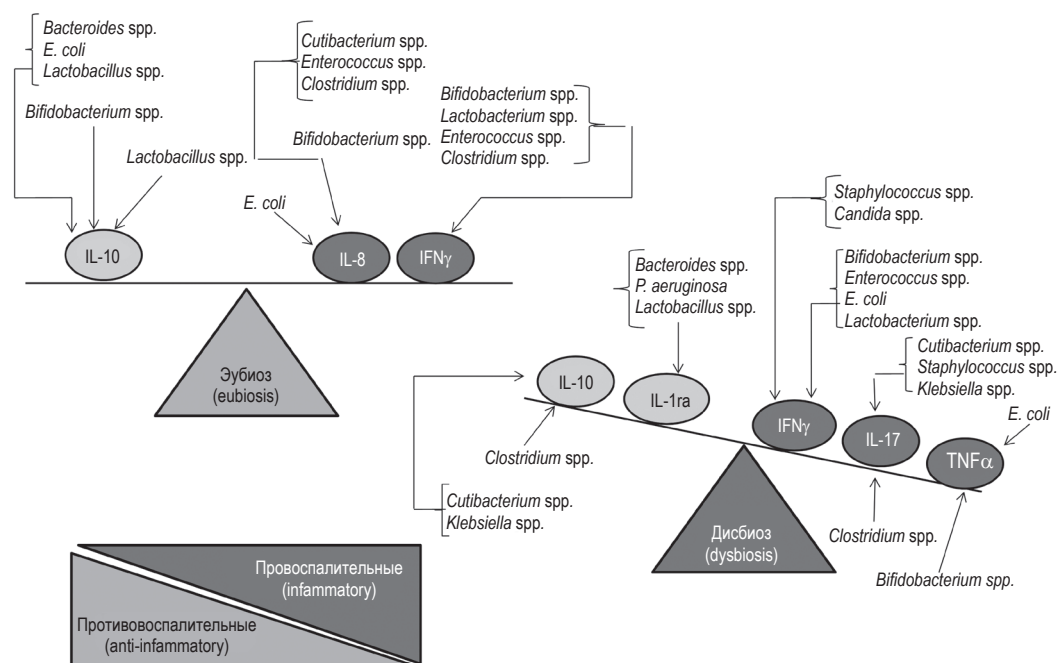


Рисунок 6. Схема формирования баланса цитокинов в присутствии супернатантов микросимбионтов при эубиозе и дисбиозе толстого кишечника человека

Примечание. Условные обозначения: { – ассоциации микроорганизмов

Figure 6. Scheme of cytokine balance formation in the presence of micronatants of microsymbiotics in eubiosis and dysbiosis of the human colon

Note. Symbols: {, associations of microorganisms.

вания клинических штаммов по влиянию их на цитокиновый профиль клеток хозяина для создания новых бактериальных препаратов таргетного действия.

## Обсуждение

Структуры слизистых оболочек кишечника, выполняющие пограничные функции, и симбиотическая микрофлора, заселяющая эти слизистые, филогенетически и онтогенетически являются функциональным единством и частью врожденной иммунной системы [14]. Взаимодействие кишечной микробиоты с хозяином осуществляется во многом посредством постоянной перекрестной связи между иммунными, эпителиальными клетками кишечника и микробиотой через сложную сеть цитокинов [15]. Исход таких взаимодействий во многом определяется качественно-количественным составом микробиоты, продуцирующей различные биологически активные молекулы и состоянием рецепторов хозяина, с которыми реализуются взаимодействия «микробиота-хозяин» [46]. Изменение микробиологического состояния биотопа дистального отдела толстого кишечника (дисбиоз) рассматривается в качестве одного из патогенетических звеньев при различной патологии человека, а разработка эффективных профилактических средств на основе микроорганизмов является актуальным направлением биотехнологии и медицины.

Недавние достижения в изучении взаимодействия между хозяином и микробиотой подтверждают ключевую роль микробных метаболитов в различных физиологических процессах, поскольку они служат посредниками в сложном «диалоге» между комменсальными бактериями, иммунными и эндокринными клетками хозяина [29, 33]. Спектр продуцируемых кишечными симбионтами метаболитов в целом можно разделить на три основные группы: метаболиты, образующиеся в результате микробной ферментации/разложения пищевых компонентов, метаболиты, полученные от хозяина, которые подвергаются микробной модификации, и биосинтез микробных метаболитов *de novo* [45]. Одними из ключевых метаболитов в кишечнике являются короткоцепочечные жирные кислоты (КЦЖК), образующиеся в результате анаэробного микробного метаболизма [47]. Наиболее распространенные КЦЖК в кишечнике — пропионат, бутират и ацетат, осуществляющие «сигналинг» через рецепторы, связанные с G-белком (GPCR), включая GPR43, GPR41 и GPR109A, которые экспрессируются как иммунными, так и эпителиальными клетками [17, 50]. Известно, что микросимбионты, обитающие в кишечнике, и их метаболиты способны индуцировать не только

локальные, но и иммунные реакции в отдаленных местах (органах) посредством двух основных механизмов: через транслокацию кишечных микробов и/или их компонентов или метаболитов в системный кровоток (прямой механизм) и благодаря локальной стимуляции эпителиальных, стромальных и иммунных клеток, сигналы от которых при участии цитокинов передаются в отдаленные органы (косвенный механизм) [34].

В нашей работе проведено сравнительное исследование различных видов микросимбионтов, изолированных при эу- и дисбиозе кишечника, по спектру влияния их бесклеточных супернатантов на секрецию цитокинов мононуклеарами периферической крови человека. Согласно полученным данным, выявленное разнонаправленное влияние (индукция/ингибирование/отсутствие влияния) супернатантов бактерий и грибов на продукцию различных функциональных групп цитокинов мононуклеарами периферической крови человека является штаммо- и видоспецифичным, как по частоте встречаемости, так и по уровню секреции цитокинов. Было установлено, что среди штаммов бифидо-, лактобактерий и бактероидов преобладали культуры, подавляющие продукцию цитокинов TNF $\alpha$ , IL-6, IL-17 и, напротив, стимулирующие секрецию IL-10 и IL-1ra. Способность штаммов бифидобактерий снижать экспрессию провоспалительных цитокинов TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 и совместно с лактобактериями препятствовать развитию TNF $\alpha$ -индуцированной проницаемости кишечника, ограничивая повреждение монослоя, была показана на модели Caco-2 [27, 58]. Влияние на целостность и индуцированную проницаемость кишечного барьера авторы связывают с наличием у кислотолюбивых бактерий такого метаболита, как ацетат, активирующего процесс укрепления целостности кишечного барьера. Ацетат и лактат, продуцируемый бифидобактериями после ферментации углеводов, далее могут быть преобразованы другими кишечными бактериями в бутират, обладающий противовоспалительными свойствами. Продукция данных метаболитов является одной из важных функций *Bifidobacterium* spp. [44]. Тем самым суммарные эффекты воздействия метаболитов нормобиоты на секрецию цитокинов иммунными клетками обеспечивают цитокиновый баланс, характеризующийся умеренным уровнем провоспалительных цитокинов, контролируемым супрессивным воздействием IL-10, продуцируемого преимущественно популяцией Treg-клеток [24, 51].

В работах ранее нами было показано, что уровень и спектр КЦЖК бифидобактерий варьировал в зависимости от состояния микросимбиоза [5]. Сравнительный анализ спектра

карбоновых кислот в супернатанте бифидобактерий при эу- и дисбиозе толстого кишечника человека показал снижение частоты встречаемости всех исследованных карбоновых кислот ( $C_1$ – $C_6$ ) в супернатантах бифидобактерий при 2-3-й степени дисбиоза, за исключением уксусной и масляной кислот. При тяжелой степени дисбиоза (3-я степень) в супернатантах бифидобактерий была снижена суммарная концентрация КЦЖК, включая уровень уксусной и пропионовой кислот.

В последние годы вопрос о механизмах, лежащих в основе иммуномодулирующих свойств бифидобактерий, рассматривался на различных моделях [41, 57]. Установлено, что живые клетки *B. longum subsp. longum* GT15 при соинкубации с клетками THP-1 увеличивали экспрессию мРНК  $TNF\alpha$ , IL-8 и IL-10 [1]. Такая избирательная способность индуцировать выработку цитокинов в сочетании со способностью распознавать соответствующие цитокины позволяет предположить, что бифидобактерии могут быть вовлечены в регуляцию воспаления в кишечнике в качестве активного участника. В дополнение к этому было показано [21, 37, 38], что у автохтонных видов бифидобактерий выявлен белок FN3, кодируемый одним из генов, составляющих кластер PFNA, содержащий домены и мотивы цитокиновых рецепторов, способных избирательно связывать  $TNF\alpha$ . Как предполагают авторы, кластер PFNA может играть важную роль в распознавании бифидобактериями сигналов иммунной системы.

На основе экспериментальных и литературных данных в работе Бухарина О.В. и соавт. (2015) была представлена роль бифидобактерий в формировании иммунного гомеостаза кишечника человека. Было показано, что первичная дискриминация «чужеродного материала» бифидобактериями — инициальный этап последующего «сигналинга» в регуляции иммунного гомеостаза хозяина [4]. Дальнейшие этапы регуляции осуществляются активацией дендритных клеток непосредственно бифидобактериями, их метаболитами с последующим влиянием на дифференцировку наивных  $CD4^+$ T-лимфоцитов в сторону регуляторных лимфоцитов и поддержанием оптимального цитокинового баланса кишечного биотопа человека.

О высокой иммунорегулирующей способности бифидобактерий свидетельствуют исследования Rabe Н. (2020), в которых было установлено, что дети с высоким содержанием *Bifidobacteriaceae* или колонизированные *Bifidobacterium spp.* в раннем младенчестве, имеют мононуклеарные клетки с более высокой способностью продуцировать цитокины (IL-5, IL-6, IL-13, TNF и IL-1 $\beta$ ) по-

сле ФГА-стимуляции в позднем детском возрасте [43]. Напротив, колонизация кишечника большим количеством *Enterococcus spp.*, *Clostridium spp.* и *S. aureus* была связана с более низкой способностью к продукции цитокинов в возрасте 3 лет. Характерно, что индукция секреции мононуклеарами  $IFN\gamma$  не была связана с ранней колонизацией кишечника новорожденных бифидофлорой. Следует отметить, что экзополисахариды, секретируемые молочнокислыми бактериями (бифидо- и лактобактерии), индуцируя синтез цитокинов, стимулируют фагоцитарную активность макрофагов и нейтрофилов [18, 20], усиливая тем самым колонизационную резистентность кишечного биотопа.

Анализ влияния супернатантов условно-патогенных микроорганизмов (УПМ) показал, что для большинства из них характерна стимуляция секреции провоспалительных цитокинов  $TNF\alpha$ , IL-8, IL-17 и супрессия — IL-10 и IL-1ra, что свидетельствует о преобладающем провоспалительном балансе у данных микроорганизмов. Вместе с тем у бактерий, изолированных при дисбиозе, высокая частота встречаемости и выраженный уровень индуцируемых противовоспалительных цитокинов были характерны для штаммов клебсиелл, кишечной палочки, бактероидов. Другими авторами было установлено, что способностью повышать экспрессию противовоспалительного цитокина TGF- $\beta$ 1 обладали преимущественно бутират продуцирующие комменсальные штаммы клостридий через экспансию Treg-клеток в кишечнике [35]. Так как в нашей работе для оценки иммунорегуляторных свойств кишечных комменсалов использовались бесклеточные супернатанты, можно предположить, что продукция цитокинов мононуклеарами после прямого контакта с супернатантами УПМ может быть опосредована не только карбоновыми кислотами, но и рядом других биологически активных молекул. Так, на секрецию цитокинов и активацию иммунных клеток могут оказывать воздействие лиамины микробного происхождения; индол и его производные, продуцируемые бактериями с триптофаназой, такими, как кишечная палочка и лактобациллы; сидерофоры клебсиелл, индуцирующие IL-6 и хемокины; ацил-гомосериновые лактоны (3-оксо-C12:2-HSL *Pseudomonas aeruginosa*), влияющие на секрецию как про-, так и провоспалительных цитокинов различными иммунными и эпителиальными клетками [6, 19, 22, 26, 53]. Супернатанты микроорганизмов могут также содержать и внеклеточный АТФ, высвобождаемый бактериями и грибами, такими как *E. coli*, *Enterococcus spp.* и многими другими, включая и грибы рода *Candida*. Внеклеточный



микробный АТФ, действуя как сигнальная молекула, опосредует взаимодействие с клетками хозяина, может влиять на активность иммунных клеток и секрецию цитокинов [49].

Умеренно повышенное содержание провоспалительных цитокинов является необходимым для контроля инфекции, в этом проявляется позитивный эффект выявленного разнообразия стимулирующего влияния комменсалов на секрецию ранних цитокинов —  $\text{TNF}\alpha$  и  $\text{IL-8}$ . Однако следует учитывать, что при избыточной продукции такое воздействие комменсалов может привести к повреждению тканей, структурными элементами которых являются клетки-продуценты цитокинов [10, 54]. Необходимо учитывать, что гетерогенность иммуномодулирующих свойств микросимбионтов во многом опосредована различными сигнальными путями активации генов цитокинов в иммунных и эпителиальных клетках кишечника [1, 16, 32, 52, 55, 56].

Обсуждение полученных данных по сравнительной оценке иммунорегуляторных свойств кишечных микросимбионтов при эу- и дисбиозе толстого кишечника представляет известные трудности, связанные с большим спектром членов микробных консорциумов в кишечном микросимбиозе, а также штаммовой специфичностью биологических свойств, метаболического профиля, секретируемых биологически активных молекул (КЦЖК, участков ДНК, коротких пептидов экзополисахаридов) и других потенциально иммуномодулирующих молекул. Учитывая вышесказанное, для выявления наиболее значимых различий между видами кишечных микросимбионтов и источника их выделения (эу- и дисбиоз), оцениваемых по способности супернатантов штаммов бактерий и грибов изменять секрецию цитокинов иммунными клетками, мы использовали методы многомерной математической статистики: дискриминантный анализ, метод картирования и дерево решений. Оценивая в целом полученные материалы, следует отметить, что при анализе методами многомерной статистики исследуемых признаков удалось конкретизировать круг наиболее информативных показателей для оценки иммунорегуляторной активности кишечных симбионтов в различных микрорасположенных состояниях (эу- и дисбиоз).

Рейтинг информативных признаков формирования дерева решений по уровню факторных нагрузок при эубиозе/дисбиозе показал, что значимой для культур эубиотических кишечных симбионтов оказалась способность супернатантов влиять на уровень провоспалительных цитокинов  $\text{IFN}\gamma$ ,  $\text{IL-8}$  и противовоспалительного цитокина  $\text{IL-10}$ , а для дисбиотических культур —

преимущественно на цитокины провоспалительного профиля —  $\text{IL-17}$ ,  $\text{IFN}\gamma$ ,  $\text{TNF}\alpha$ . В сохранение равномерного баланса между про- и противовоспалительными цитокинами при эубиозе вносили значимый вклад ассоциации бациллоидов, кишечной палочки, лактобацилл, а также монокультуры бифидо- и лактобактерий, стимулирующих секрецию  $\text{IL-10}$ . Провоспалительный профиль дисбиотических культур формировался через влияние на продукцию  $\text{IFN}\gamma$  ассоциациями, представленными бифидобактериями, энтерококками, кишечной палочкой, лактобактериями, а также золотистым стафилококком совместно с грибами рода *Candida*. На секрецию  $\text{IL-17}$  влияли монокультура клостридий и ассоциация кутибактерий, золотистого стафилококка, клебсиелл, на  $\text{TNF}\alpha$  — монокультуры бифидобактерий и эшерихий. Тем самым при дисбиозе увеличивалось общее количество ассоциаций микросимбионтов, влияющих на секрецию провоспалительных цитокинов, и расширялось количество цитокинов этой функциональной группы ( $\text{IL-17}$ ,  $\text{IFN}\gamma$ ,  $\text{TNF}\alpha$ ) со значимым вкладом (значения факторных нагрузок) в развитие дисбиоза. Обращаем внимание, что при дисбиозе по результатам метода «дерево решений» установлен высокий рейтинг и для  $\text{IL-10}$  (факторные нагрузки, определяющие рейтинг данного параметра, практически совпадали с рейтингом  $\text{IL-17}$ ). Эти результаты показывают, что смещение баланса цитокинов при дисбиозе в сторону провоспалительного профиля может реализовываться не только через расширение количества ассоциаций микросимбионтов, индуцирующих секрецию провоспалительных цитокинов, но и через ограничение индукции  $\text{IL-10}$  дисбиотическими штаммами УПМ. Об усилении провоспалительного ответа с индукцией  $\text{IFN}\gamma$  и других провоспалительных цитокинов кишечными УПМ в условиях дисбиоза свидетельствуют также работы ряда авторов [30, 42]. На основании этого было предложено использовать уровень и спектр провоспалительных цитокинов как биомаркер дисбиоза кишечника [12].

В целом применение многомерных методов статистики для анализа влияния супернатантов кишечных микросимбионтов на секрецию иммунными клетками цитокинов показало сопоставимые результаты, характеризующие превалирование провоспалительного профиля у штаммов симбионтов, выделенных от людей с выраженными микрорасположенными нарушениями толстого кишечника. Кроме того, при дисбиозе толстого кишечника увеличивалось количество и разнообразие по составу ассоциаций микросим-

бионтов, индуцирующих секрецию провоспалительных цитокинов.

## Заключение

Полученные в работе данные свидетельствуют о том, что дисбиотическая микробиота толстого кишечника человека может препятствовать поддержанию гомеостатических реакций в кишечнике человека через влияние на цитокиновую сеть с формированием патологического цитокинового профиля со смещением баланса в сторону провоспалительных цитокинов.

Выделение информативных для эубиоза и дисбиоза цитокинов, секретируемых иммунными клетками при контакте с бесклеточными супернатантами кишечных микросимбионтов, может

служить обоснованным критерием при разработке пробиотиков, постбиотиков таргетного действия для коррекции микрoэкологических нарушений в кишечнике при различных заболеваниях. При проведении мероприятий по восстановлению микробиоты при дисбиозе важным критерием эффективности, наряду с изменением качественно-количественного состава микроорганизмов, может быть изменение цитокинового профиля кишечных микросимбионтов. Оба эти критерия являются взаимосвязанными. Следует учитывать и персонифицированный подход, поскольку микроорганизмы имеют штаммоспецифические характеристики, а человек — особенности генетики и физиологии, определяющие ответные реакции хозяина на присутствие в кишечном биотопе нормобиоты.

## Список литературы / References

1. Аверина О.В., Ермоленко Е.И., Ратушный А.Ю., Тарасова Е.А., Борщев Ю.Ю., Леонтьева Г.Ф., Крамская Т.А., Котылева М.П., Даниленко В.Н., Суворов А.Н. Влияние пробиотиков на продукцию цитокинов в системах *in vitro* и *in vivo* // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 5. С. 443-454. [Averina O.V., Ermolenko E.I., Ratushnyi A.Yu., Tarasova E.A., Borshev Yu.Yu., Leontieva G.F., Kramskaya T.A., Kotyleva M.P., Danilenko V.N., Suvorov A.N. Influence of probiotics on cytokine production in the *in vitro* and *in vivo* systems. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 5, pp. 443-454. (In Russ.)] doi:10.15789/1563-0625-2015-5-443-454.
2. Бухарин О.В., Перунова Н.Б. Микросимбиоз. Екатеринбург: УрО РАН, 2014. 257 с. [Bukharin O.V., Perunova N.B. *Microsymbiogenesis*. Yekaterinburg: Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 2014. 257 p.
3. Бухарин О.В., Лобакова Е.С., Немцева Н.В., Черкасов С.В. Ассоциативный симбиоз. Екатеринбург: УрО РАН, 2007. 264 с. [Bukharin O.V., Lobakova E.S., Nemtseva N.V., Cherkasov S.V. *Associative symbiosis*. Yekaterinburg: Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 2007. 264 p.
4. Бухарин О.В., Иванова Е.В., Перунова Н.Б., Чайникова И.Н. Роль бифидобактерий в формировании иммунного гомеостаза человека // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии, 2015. № 6. С. 98-104. [Bukharin O.V., Ivanova E.V., Perunova N.B., Chaynikova I.N. The role of bifidobacteria in the formation of human immune homeostasis. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2015, no. 6, pp. 98-104. (In Russ.)]
5. Бухарин О.В., Иванова Е.В., Перунова Н.Б., Чайникова И.Н., Андрющенко С.В. Метаболический профиль бифидофлоры при различных микрoэкологических состояниях биотопы толстого кишечника человека // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии, 2017. Т. 94, № 1. С. 3-11. [Bukharin O.V., Ivanova E.V., Perunova N.B., Chaynikova I.N., Andryushchenko S.V. Metabolic profile of bifidoflora in various microecological conditions of human colon biotope. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2017, Vol. 94, no. 1, pp. 3-11. (In Russ.)]
6. Годовалов А.П., Карпунина Т.И. Влияние полиаминов бактериального происхождения на продукцию ключевых цитокинов в культуре мононуклеарных лейкоцитов человека // Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 2. С. 257-262. Godovalov A.P., Karpunina T.I. Influence of polyamines of bacterial origin on the production of key cytokines in the culture of human mononuclear leukocytes. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2022, Vol. 24, no. 2, pp. 257-262. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-IOP-2399.
7. Демидова Т.Ю., Лобанова К.Г., Ойроткина О.Ш. Кишечная микробиота как фактор риска развития ожирения и сахарного диабета 2-го типа // Терапевтический архив, 2020. Т. 92, № 10. С. 97-104. [Demidova T.Yu., Lobanova K.G., Oynotkina O.Sh. Intestinal microbiota as a risk factor for the development of obesity and type 2 diabetes mellitus. *Terapevticheskiy arkhiv = Therapeutic Archive*, 2020, Vol. 92, no. 10, pp. 97-104. (In Russ.)]
8. Киселева Е.П. Акцептивный иммунитет – основа симбиотических взаимоотношений // Инфекция и иммунитет, 2015. Т. 5, № 2. С. 113-130. [Kiseleva E.P. Acceptive immunity – a basis for symbiotic relationships. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2015, Vol. 5, no. 2, pp. 113-130. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2015-2-113-130.

9. Лукичев Б.Г., Румянцев А.Ш., Акименко В. Микробиота кишечника и хроническая болезнь почек. Сообщение первое // Нефрология, 2018. Т. 22, № 4. С. 57-73. [Lukichev B.G., Rumyantsev A.S., Akimenko V. Colonic microbiota and chronic kidney disease. message one. *Nefrologiya = Nephrology*, 2018, Vol. 22, no. 4, pp. 57-73. (In Russ.)]
10. Семинский И.Ж., Серебренникова С.Н., Гузовская Е.В. Роль цитокинов в патогенезе заболеваний // Сибирский медицинский журнал (Иркутск), 2015. Т. 132, № 1. С. 14-17. [Seminsky I.Zh., Serebrennikova S.N., Guzovskaya E.V. The role of cytokines in the pathogenesis of diseases. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal (Irkutsk) = Siberian Medical Journal (Irkutsk)*, 2014, Vol. 131, no. 8, pp. 30-33. (In Russ.)]
11. Симбирцев А.С. Цитокины в патогенезе и лечении заболеваний человека. СПб.: Фолиант, 2018. 512 с. [Simbircev A.S. Cytokines in the pathogenesis and treatment of human diseases]. St. Petersburg: Foliant, 2018. 512 p.
12. Abe K., Takahashi A., Fujita M., Imaizumi H., Hayashi M., Okai K., Ohira H. Dysbiosis of oral microbiota and its association with salivary immunological biomarkers in autoimmune liver disease. *PLoS One*, 2018, Vol. 13, no. 7, e0198757. doi: 10.1371/journal.pone.0198757.
13. Al Bander Z., Nitert M.D., Mousa A., Naderpoor N. The gut microbiota and inflammation: An overview. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 2020, Vol. 17, no. 20, 7618. doi: 10.3390/ijerph17207618.
14. Allaire J.M., Crowley S.M., Law H.T., Chang S.Y., Ko H.J., Vallance B.A. The intestinal epithelium: central coordinator of mucosal immunity. *Trends Immunol.*, 2018, Vol. 39, no. 9, pp. 677-696.
15. Andrews C., McLean M.H., Durum S.K. Cytokine tuning of intestinal epithelial function. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 1270. doi: 10.3389/fimmu.2018.01270.
16. Badi S.A., Khatami S.H., Irani S.H., Siadat S.D. Induction Effects of bacteroides fragilis derived outer membrane vesicles on Toll like receptor 2, Toll like receptor 4 genes expression and cytokines concentration in human intestinal epithelial cells. *Cell J.*, 2019, Vol. 21, no. 1, pp. 57-61.
17. Caffaratti C., Plazy C., Mery G., Tidjani A.R., Fiorini F., Thiroux S., Toussaint B., Hannani D., le Gouvellec A. What we know so far about the metabolite-mediated microbiota-intestinal immunity dialogue and how to hear the sound of this crosstalk. *Metabolites*, 2021, Vol. 11, no. 6, 406. doi: 10.3390/metabo11060406.
18. Ciesielska A. TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cell Mol. Life Sci.*, 2021, Vol. 78, no. 4, pp. 1233-1261.
19. Coquant G., Aguanno D., Brot L., Belloir C., Delugeard J., Roger N., Pham H.P., Briand L., Moreau M., de Sordi L., Carrière V., Grill J.P., Thenet S., Seksik P. 3-oxo-C12:2-HSL, quorum sensing molecule from human intestinal microbiota, inhibits pro-inflammatory pathways in immune cells via bitter taste receptors. *Sci. Rep.*, 2022, Vol. 12, no. 1, 9440. doi: 10.1038/s41598-022-13451-3.
20. Duany R.K., Batish V.K., Grover S. Immunomodulatory activity of two potential probiotic strains in LPS-stimulated HT-29 cells. *Genes Nutr.*, 2014, Vol. 9, no. 3, 398. doi: 10.1007/s12263-014-0398-2.
21. Dyakov I.N., Mavletova D.A., Chernyshova I.N., Snegireva N.A., Gavrilova M.V., Bushkova K.K., Dyachkova M.S., Alekseeva M.G., Danilenko V.N. FN3 protein fragment containing two type III fibronectin domains from *B. longum* GT15 binds to human tumor necrosis factor alpha *in vitro*. *Anaerobe*, 2020, Vol. 65, 102247. doi: 10.1016/j.anaerobe.2020.102247.
22. Gao J., Xu K., Liu H., Liu G., Bai M., Peng C., Li T., Yin Y. Impact of the gut microbiota on intestinal immunity mediated by tryptophan metabolism. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2018, Vol. 8, 13. doi: 10.3389/fcimb.2018.00013.
23. Guzmán-Mejía F., Godínez-Victoria M., Vega-Bautista A., Pacheco-Yépez J., Drago-Serrano M.E. Intestinal homeostasis under stress siege. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, Vol. 22, no. 10, 5095. doi: 10.3390/ijms22105095.
24. Harrison O.J., Powrie F.M. Regulatory T cells and immune tolerance in the intestine. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2013, Vol. 5, no. 7, a018341. doi: 10.1101/cshperspect.a018341.
25. Hills R.D. Jr, Pontefract B.A., Mishcon H.R., Black C.A., Sutton S.C., Theberge C.R. Gut microbiome: profound implications for diet and disease. *Nutrients*, 2019, Vol. 11, no. 7, 1613. doi: 10.3390/nu11071613.
26. Holden V.I., Breen P., Houle S., Dozois C.M., Bachman M.A. *Klebsiella pneumoniae* siderophores induce inflammation, bacterial dissemination, and HIF-1 $\alpha$  stabilization during pneumonia. *mBio*, 2016, Vol. 7, no. 5, e01397-16. doi: 10.1128/mBio.01397-16.
27. Hsieh C.Y., Osaka T., Moriyama E., Date Y., Kikuchi J., Tsuneda S. Strengthening of the intestinal epithelial tight junction by bifidobacterium bifidum. *Physiol. Rep.*, 2015, Vol. 3, e12327. doi: 10.14814/phy2.12327.
28. Iacob S., Iacob D.G. Infectious threats, the intestinal barrier, and its trojan horse: dysbiosis. *Front Microbiol.*, 2019, Vol. 10, 1676. doi: 10.3389/fmicb.2019.01676.
29. Kayama H., Takeda K. Manipulation of epithelial integrity and mucosal immunity by host and microbiota-derived metabolites. *Eur. J. Immunol.*, 2020, Vol. 50, no. 7, pp. 921-931.
30. Laffont S., Siddiqui K.R., Powrie F. Intestinal inflammation abrogates the tolerogenic properties of MLN CD103<sup>+</sup> dendritic cells. *Eur. J. Immunol.*, 2010, Vol. 40, no. 7, pp. 1877-1883.
31. Lederberg J. Infectious history. *Science*, 2000, Vol. 288, no. 5464, pp. 287-293.



32. Liu T., Wang S., Wornow M., Altman R.B. Construction of disease-specific cytokine profiles by associating disease genes with immune responses. *PLoS Comput. Biol.*, 2022, Vol. 18, no. 4, e1009497. doi: 10.1371/journal.pcbi.1009497.
33. Liu M., Nieuwdorp M., de Vos W.M., Rampanelli E. Microbial tryptophan metabolism tunes host immunity, metabolism, and extraintestinal disorders. *Metabolites*, 2022, Vol. 12, no. 9, 834. doi: 10.3390/metabo12090834.
34. Lo B.C., Chen G.Y., Núñez G., Caruso R. Gut microbiota and systemic immunity in health and disease. *Int. Immunol.*, 2021, Vol. 33, no. 4, pp. 197-209.
35. Martin-Gallausiaux C., Béguet-Crespel F., Marinelli L., Jamet A., Ledue F., Blottière H.M., Lapaque N. Butyrate produced by gut commensal bacteria activates TGF-beta1 expression through the transcription factor SP1 in human intestinal epithelial cells. *Sci Rep.*, 2018, Vol. 8, no. 1, 9742. doi: 10.1038/s41598-018-28048-y.
36. Martin-Gallausiaux C., Marinelli L., Blottière H.M., Larraufie P., Lapaque N. SCFA: mechanisms and functional importance in the gut. *Proc. Nutr. Soc.*, 2021, Vol. 80, no. 1, pp. 37-49.
37. Nezametdinova V.Z., Mavletova D.A., Alekseeva M.G., Chekalina M.S., Zakharevich N.V., Danilenko V.N. Species-specific serine-threonine protein kinase Pkb2 of bifidobacterium longum subsp. Longum: genetic environment and substrate specificity. *Anaerobe*, 2018, Vol. 51, pp. 26-35.
38. Nezametdinova V.Z., Yunes R.A., Dukhinova M.S., Alekseeva M.G., Danilenko V.N. The role of the PFNA operon of bifidobacteria in the recognition of host's immune signals: prospects for the use of the FN3 protein in the treatment of COVID-19. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, Vol. 22, no. 17, 9219. doi: 10.3390/ijms22179219.
39. Nicolas G.R., Chang P.V. Deciphering the chemical lexicon of host-gut microbiota interactions. *Trends Pharmacol. Sci.*, 2019, Vol. 40, no. 6, pp. 430-445.
40. Nikiforov I.A. Geochemical classification by means of mapping resultants. *Geochem. Int.*, 2014, Vol. 52, no. 4, pp. 325-332.
41. Nogacka A.M., Oddi S., Salazar N., Reinheimer J.A., Gueimonde M., Vinderola G., de Los Reyes-Gavilán C.G. Intestinal immunomodulation and shifts on the gut microbiota of BALB/c mice promoted by two bifidobacterium and lactobacillus strains isolated from human samples. *Biomed Res. Int.*, 2019, Vol. 2019, 323540. doi: 10.1155/2019/2323540.
42. Perrotta G. The intestinal microbiota: Towards a multifactorial integrative model. Eubiosis and dysbiosis in morbid physical and psychological conditions. *Arch. Clin. Gastroenterol.*, 2021, Vol. 7, no. 2, pp. 024-035.
43. Rabe H., Lundell A.-C., Sjöberg F., Ljung A., Strömbeck A., Gio-Batta M., Maglio C., Nordström L., Andersson K., Nookaew I., Wold A.E., Adlerberth I., Rudin A. Neonatal gut colonization by Bifidobacterium is associated with higher childhood cytokine responses. *Gut Microbes*, 2020, Vol. 12, no.1, pp. 1-14.
44. Rivière A., Selak M., Lantin D., Leroy F., de Vuyst L. Bifidobacteria and butyrate-producing colon bacteria: importance and strategies for their stimulation in the human gut. *Front. Microbiol.*, 2016, Vol. 7, 979. doi: 10.3389/fmicb.2016.00979.
45. Sharon G., Garg N., Debelius J., Knight R., Dorrestein P.C., Mazmanian S.K. Specialized metabolites from the microbiome in health and disease. *Cell Metab.*, 2014, Vol. 20, no. 5, pp. 719-730.
46. Shehata E., Parker A., Suzuki T., Swann J.R., Suez J., Kroon P.A., Day-Walsh P. Microbiomes in physiology: insights into 21st-century global medical challenges. *Exp. Physiol.*, 2022, Vol. 107, no. 4, pp. 257-264.
47. Silva Y.P., Bernardi A., Frozza R.L. The Role of short-chain fatty acids from gut microbiota in gut-brain communication. *Front. Endocrinol.*, 2020, Vol. 1, 25. doi: 10.3389/fendo.2020.00025.
48. Sonnenburg J.L., Bäckhed F. Diet-microbiota interactions as moderators of human metabolism. *Nature*, 2016, Vol. 535, pp. 56-64.
49. Spari D., Beldi G. Extracellular ATP as an inter-kingdom signaling molecule: release mechanisms by bacteria and its implication on the host. *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, Vol. 21, no. 15, 5590. doi: 10.3390/ijms21155590.
50. Sun M., Wu W., Liu Z., Cong Y. Microbiota metabolite short chain fatty acids, GPCR, and inflammatory bowel diseases. *J. Gastroenterol.*, 2017, Vol. 52, no. 1, pp. 1-8.
51. Telesford K.M., Yan W., Ochoa-Reparaz J., Pant A., Kircher C., Christy M. A., Begum-Haque S., Kasper D.L., Kasper L.H. A commensal symbiotic factor derived from Bacteroides fragilis promotes human CD39(+)Foxp3(+) T cells and Treg function. *Gut Microbes*, 2015, Vol. 6, no. 4, pp. 234-242.
52. Thaïs C.A., Levy M., Suez J., Elinav E. The interplay between the innate immune system and the microbiota. *Curr. Opin. Immunol.*, 2014, Vol. 26, pp. 41-48.
53. Turkina M.V., Vikström E. Bacteria-host crosstalk: sensing of the quorum in the context of pseudomonas aeruginosa infections. *J. Innate Immun.*, 2019, Vol. 11, no. 3, pp. 263-279.
54. Winter S.E., Lopez C.A., Bäuml A.J. The dynamics of gut-associated microbial communities during inflammation. *EMBO Rep.*, 2013, Vol. 14, no. 4, pp. 319-327.
55. Yadav A.K., Tyagi A., Kumar A., Panwar S., Grover S., Saklani A.C., Hemalatha R., Batish V.K. Adhesion of lactobacilli and their anti-infectivity potential. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2017, Vol. 57, no. 10, pp. 2042-2056.



56. Yang Y.H., Qian W., Hou X.H., Dai C.B. Bifidobacterium bifidum and Bacteroides fragilis induced differential immune regulation of enteric glial cells subjected to exogenous inflammatory stimulation. *Inflammation*, 2022. doi.org/10.1007/s10753-022-01700-6.
57. Yu R., Zuo F., Ma H., Chen S. Exopolysaccharide-producing *Bifidobacterium adolescentis* Strains with similar adhesion property induce differential regulation of inflammatory immune response in Treg/Th17 Axis of DSS-Colitis Mice. *Nutrients*, 2019, Vol. 11, no. 4, 782. doi: 10.3390/nu11040782.
58. Zhao L., Xie Q., Etareri Evvie S., Liu D., Dong J., Ping L., Liu F., Li B., Huo G. Bifidobacterium dentium N8 with potential probiotic characteristics prevents LPS-Induced intestinal barrier injury by alleviating the inflammatory response and regulating the tight junction in Caco-2 cell monolayers. *Food Funct.*, 2021, Vol. 12, pp. 7171-7184.

---

**Авторы:**

**Бухарин О.В.** — д.м.н., академик РАН, научный руководитель Института клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук ФГБУН «Оренбургский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук, г. Оренбург, Россия

**Иванова Е.В.** — д.м.н., доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории инфекционной симбиологии, Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук ФГБУН «Оренбургский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук, г. Оренбург, Россия

**Чайникова И.Н.** — д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории инфекционной симбиологии, Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук ФГБУН «Оренбургский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук, г. Оренбург, Россия

**Перунова Н.Б.** — д.м.н., профессор РАН, ведущий научный сотрудник лаборатории инфекционной симбиологии, Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук ФГБУН «Оренбургский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук, г. Оренбург, Россия

---

**Authors:**

**Bukharin O.V.**, PhD, MD (Medicine), Full Member, Russian Academy of Sciences, Research Director, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russian Federation

**Ivanova E.V.**, PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Leading Research Associate, Laboratory of Infectious Symbiology, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russian Federation

**Chaynikova I.N.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Leading Research Associate, Laboratory of Infectious Symbiology, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russian Federation

**Perunova N.B.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Russian Academy of Sciences, Leading Research Associate, Laboratory of Infectious Symbiology, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russian Federation

**Никифоров И.А.** — к.г.-м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории инфекционной симбиологии, Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук ФГБУН «Оренбургский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук, г. Оренбург, Россия

**Челпаченко О.Е.** — д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории инфекционной симбиологии, Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук ФГБУН «Оренбургский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук, г. Оренбург, Россия

**Бондаренко Т.А.** — научный сотрудник лаборатории инфекционной симбиологии, Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук ФГБУН «Оренбургский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук, г. Оренбург, Россия

**Бекпергенова А.В.** — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории инфекционной симбиологии, Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук ФГБУН «Оренбургский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук, г. Оренбург, Россия

**Nikiforov I.A.**, PhD (Geology), Leading Research Associate, Laboratory of Infectious Symbiology, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russian Federation

**Chelpachenko O.E.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Leading Research Associate, Laboratory of Infectious Symbiology, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russian Federation

**Bondarenko T.A.**, Research Associate, Laboratory of Infectious Symbiology, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russian Federation

**Bekpergenova A.V.**, PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Infectious Symbiology, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russian Federation

Поступила 07.12.2022  
Принята к печати 20.02.2023

Received 07.12.2022  
Accepted 20.02.2023