

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ, ИНДУЦИРУЕМОГО СУПЕРНАТАНТАМИ ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ И КИШЕЧНЫХ ШТАММОВ БИФИДО- И ЛАКТОБАКТЕРИЙ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

Бухарин О.В.¹, Иванова Е.В.¹, Чайникова И.Н.^{1,2}, Перунова Н.Б.¹,
Бондаренко Т.А.¹, Бекпергенова А.В.¹

¹ Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук – обособленное структурное подразделение ФГБУН «Оренбургский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Оренбург, Россия

² ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Оренбург, Россия

Резюме. Иммуномодулирующие свойства пробиотиков зависят не только от микробных клеток, но и от метаболитов, секретируемых в культуральную среду, которую исследуют как бесклеточный супернатант и относят к постбиотикам. Цель работы – провести скрининг цитокинового профиля кишечных штаммов бифидо- и лактобактерий с использованием мононуклеаров периферической крови человека и, сравнив его с цитокиновым профилем типовых производственных штаммов, отобрать перспективные штаммы с противовоспалительными свойствами в качестве про-/постбиотиков. В работе использовались типовые производственные культуры бифидо- и лактобактерий, входящие в состав отечественных пробиотиков, и кишечные штаммы бифидо- и лактобактерий, отобранные среди выделенных бактериальных культур при исследовании микробиоты толстого кишечника здоровых лиц в возрасте от 18 до 45 лет. Для оценки иммунорегуляторных свойств исследуемых культур определяли влияние их бесклеточных супернатантов на продукцию про- (IFN γ , TNF α , IL-17, IL-8, IL-6) и противовоспалительных (IL-10, IL-1ra) цитокинов, секретируемых мононуклеарными клетками периферической крови здоровых людей. Установлено, что по профилю воздействия супернатантов на секрецию цитокинов, как типовые производственные, так и кишечные штаммы, в равной степени распределились по трем типам влияния на цитокиновый профиль мононуклеарных клеток человека: 1-й тип: преимущественное увеличение продукции IL-10 и снижение TNF α , IL-17, IL-6; 2-й тип: снижение в основном провоспалительных цитокинов (IL-6, IL-17, IL-8, TNF α , IFN γ) и 3-й

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, Т.А. Бондаренко, А.В. Бекпергенова
«Сравнительная характеристика цитокинового
профиля, индуцируемого супернатантами
производственных и кишечных штаммов бифидо-
и лактобактерий в условиях *in vitro*» // Медицинская
иммунология, 2025. Т. 27, № 2. С. 437-444.
doi: 10.15789/1563-0625-CCO-3015

© Бухарин О.В. и соавт., 2025
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

O.V. Bukharin, E.V. Ivanova, I.N. Chainikova,
N.B. Perunova, T.A. Bondarenko, A.V. Bekpergenova
“Comparative characteristics of cytokine profile induced *in vitro* by supernatants of industrial and intestinal strains of bifido- and lactobacteria”, *Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya*, 2025, Vol. 27, no. 2, pp. 437-444.
doi: 10.15789/1563-0625-CCO-3015

© Bukharin O.V. et al., 2025
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-CCO-3015

тип: снижение секреции как про-, так и противовоспалительных цитокинов. Среди кишечных культур 1-го и 2-го типа высоким противовоспалительным потенциалом обладали штаммы *Bifidobacterium bifidum* ICIS-202 и *Bifidobacterium bifidum* ICIS-504, способные не только подавлять секрецию провоспалительных цитокинов, но и усиливать продукцию противовоспалительных цитокинов. Кроме того, перспективной культурой оказался штамм лактобактерий *L. ruminis* ICIS-540, супернатант которого характеризовался многократной способностью снижать уровень раннего провоспалительного цитокина TNF α . В целом было установлено, что выраженность противовоспалительной активности указанных штаммов не уступает, а в отношении отдельных цитокинов (IL-10, TNF α , IL-6) превосходит известные пробиотические штаммы. Использование бесклеточных супернатантов, содержащих продукты метаболизма микроорганизмов, для оценки их влияния на уровень цитокинов *in vitro* позволило отобрать перспективные штаммы *L. ruminis* ICIS-540, *B. bifidum* ICIS-504 и *B. bifidum* ICIS-202, пригодные для создания бактериальных препаратов с противовоспалительной активностью. Результаты исследований могут быть использованы в практике при отборе и тестировании кишечных штаммов по влиянию их на цитокиновый профиль клеток хозяина для создания новых биопрепаратов таргетного действия.

Ключевые слова: цитокины, бесклеточные супернатанты, бифидобактерии, лактобактерии, скрининг, пробиотики, постбиотики

COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF CYTOKINE PROFILE INDUCED *IN VITRO* BY SUPERNATANTS OF INDUSTRIAL AND INTESTINAL STRAINS OF BIFIDO- AND LACTOBACTERIA

Bukharin O.V.^a, Ivanova E.V.^a, Chainikova I.N.^{a, b}, Perunova N.B.^a,
Bondarenko T.A.^a, Bekpergenova A.V.^a

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

^b Orenburg State Medical University, Orenburg, Russian Federation

Abstract. The immunomodulatory properties of probiotics largely depend on the metabolites secreted into the culture medium, which is studied as a cell-free supernatant and referred to as postbiotics. The aim of the present work was to conduct screening of cytokine profiles for intestinal strains of *Bifidobacteria* and *Lactobacillus* by testing it with mononuclear cells from human peripheral blood, and comparing it with cytokine profile of typical industrial bacterial strains, in order to select promising strains with anti-inflammatory properties as potential pro-/postbiotics. The cytokine profile of probiotic and intestinal strains of *Bifidobacteria* and *Lactobacillus* isolated from the large intestine of healthy people was determined by the biological effects of cell-free supernatants on the production of pro- (IFN γ , TNF α , IL-17, IL-8, IL-6) and anti-inflammatory (IL-10, IL-1ra) cytokines in the *in vitro* model of peripheral mononuclear cells isolated from human blood. We have established three types of effects on the cytokine profile: type 1 was characterized by a predominant increase in IL-10 production, and a decrease in TNF α , IL-17, IL-6; type 2, produced a decrease, mainly at the level of pro-inflammatory cytokines; type 3 caused a decreased secretion of both pro- and anti-inflammatory cytokines. Among type 1 and type 2 cultures, the *Bifidobacterium bifidum* ICIS-202 and *Bifidobacterium bifidum* ICIS-504 strains had high anti-inflammatory potential, capable of both suppressing the secretion of pro-inflammatory cytokines, and enhancing the production of anti-inflammatory cytokines. The supernatant of *L. ruminis* ICIS-540 strain showed a promising effect, i.e., it repeatedly reduced the level of early pro-inflammatory TNF α cytokine. The anti-inflammatory activity of these strains was not inferior, but, in relation to individual cytokines (IL-10, TNF α , IL-6), was superior to the known probiotic bacterial cultures. The *in vitro* testing of metabolic products in bacterial supernatants enabled us to select promising strains of *L. ruminis* ICIS-540, *B. bifidum* ICIS-504 and *B. bifidum* ICIS-202 which may be suitable for implementation of bacterial preparations with anti-inflammatory activity.

Keywords: cytokines, cell-free supernatants, bifidobacteria, lactobacilli, screening, probiotics, postbiotics

Введение

Появляется все больше материалов о том, что полезными для организма человека могут быть не только пробиотики, обеспечивающие поддержание здоровой микробиоты кишечника, антагонистическую активность, стабилизацию и укрепление барьерной функции кишечника, но и метаболиты пробиотических штаммов. Биологически активные вещества, полученные в результате метаболических процессов микробиоты, рассматриваются как постбиотики, которые обладают широким спектром полезных для человека свойств, в том числе антибактериальными, иммуномодулирующими и противовоспалительными свойствами [13]. В настоящее время появляется все больше доказательств того, что пероральный прием постбиотиков может регулировать микробиоту кишечника, повышать иммунитет, подавлять воспалительные процессы в кишечнике [2]. Поэтому постбиотики рассматриваются в качестве дополнительной терапевтической стратегии.

Постбиотики, полученные из молочнокислых бактерий в качестве биологически активных метаболитов, содержат широкий спектр органических кислот, короткоцепочечных жирных кислот, углеводов, антимикробных пептидов, ферментов, витаминов, кофакторов, иммуносигнальных соединений и других молекул [12, 13]. Поэтому можно предположить возможность их направленного действия в отношении влияния на секрецию цитокинов, оппозитных по отношению к воспалению. Вместе с тем вопросы, касающиеся отбора пробиотических штаммов с учетом их иммунорегуляторного профиля с оценкой индукции/ингибирования про- и противовоспалительных цитокинов, изучены недостаточно. Указанные моменты и определили направленность наших исследований, которые могли бы способствовать изысканию новых подходов по отбору эффективных пробиотиков (постбиотиков) мишень-направленного действия.

Цель работы — провести скрининг цитокинового профиля кишечных штаммов бифидо- и лактобактерий с использованием мононоуклеаров периферической крови человека и, сравнив его с цитокиновым профилем типовых производственных штаммов, отобрать перспективные штаммы с противовоспалительными свойствами в качестве про-/постбиотиков.

Материалы и методы

В работе были использованы типовые производственные штаммы: *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 (№ 900811), *Lactobacillus fermentum* 90T-C4

(№ 900812), депонированные в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов (ГКПМ) ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России; *Lactobacillus acidophilus* КЗШ24 (№ 42) и *Bifidobacterium longum* МС-42 (№ 210) — в Государственной коллекции микроорганизмов нормальной микрофлоры ФБУН МИИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора; *Bifidobacterium bifidum* 791 (№ В-3300) — во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ) ФГУП ГосНИИгенетика.

В работе были также использованы бифидо- и лактобактерии, выделенные в лаборатории инфекционной симбиологии ИКВС УрО РАН (*Bifidobacterium bifidum* ICIS-643, ICIS-202, ICIS-629, ICIS-310, ICIS-504; *Bifidobacterium longum* ICIS-1113, ICIS-505; *Lactobacillus rhamnosus* ICIS-627, *Ligilactobacillus ruminis* ICIS-540), депонированные в Государственной коллекции микроорганизмов нормальной микрофлоры ФБУН МИИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора и в сетевой коллекции симбионтных микроорганизмов и их консорциумов ИКВС УрО РАН. Исследуемые кишечные культуры были отобраны среди выделенных бактериальных культур при исследовании микробиоты толстого кишечника здоровых лиц в возрасте от 18 до 45 лет. Идентификацию микроорганизмов проводили с помощью времяпролетной масс-спектрометрии MALDI TOF MS серии Microflex LT (Bruker Daltonics, Германия) и ПЦП-анализом с использованием оригинальных праймеров 16sРНК (ООО «ДНК-технология», Россия).

Микробные бесклеточные супернатанты получали из бульонных культур микроорганизмов двукратным центрифугированием при 3200 об/мин с последующей фильтрацией через мембранные фильтры с диаметром пор 0,22 мкм (Milipore, США).

Мононуклеарные лейкоциты выделяли в стерильных условиях из гепаринизированной крови здоровых доноров методом градиентного центрифугирования (400 g) в градиенте плотности фиколл-верографин (Pharmacia, Швеция) плотностью 1,077 г/см³. После отмывки клетки лейкоцитов доводили до концентрации 2х10⁶/мл в культуральной среде: RPMI-1640 с 10% фетальной сывороткой и с добавлением Нерес (25 мМ), 0,01% L-глутамин и гентамицин (100 мкг/мл). Полученную суспензию клеток разносили в лунки планшета с последующим добавлением супернатантов культур бифидо- и лактобактерий (опыт) и без их добавления (контроль). Исследование проводилось в 3 параллелях. После 24-часовой инкубации клеток при 37 °С в атмосфере

5% CO₂ собирали культуральную жидкость и замораживали (-20 °C).

В опытных и контрольных пробах определяли уровень про- (IFN γ , TNF α , IL-17, IL-8, IL-6) и противовоспалительных (IL-10, IL-1ra) цитокинов методом ИФА (ООО «Цитокин», Россия). Регистрацию результатов проводили на фотометре Multiskan (Labsystems, Финляндия). Результат влияния микроорганизмов на мононуклеары оценивали по изменению концентрации цитокинов в культуральной среде.

Полногеномное секвенирование штаммов микроорганизмов было осуществлено с использованием технологии высокопроизводительного секвенирования на платформе MiSeq (Illumina, США).

Статистическая обработка проводилась с использованием пакета прикладных программ Microsoft Excel и STATISTICA 10.0, включая методы параметрического (t-критерий Стьюдента), непараметрического (U-критерий Манна–Уитни) анализ. Результаты исследований представлены в виде $M \pm m$, где M — средняя арифметическая, m — стандартная ошибка средней, в виде медианы (Me) и границ межквартильных 25-го и 75-го интервалов Me ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$). Статистически значимыми считали изменения при $p < 0,05$. Все эксперименты были проведены в 5 независимых повторах.

Результаты и обсуждение

Проведенный анализ цитокин-модулирующего эффекта супернатантов исследуемых производственных и кишечных штаммов позволил выделить три типа модуляции цитокинового профиля мононуклеарных клеток человека: первый — преимущественное увеличение продукции IL-10 и снижение TNF α , IL-17, IL-6; второй — снижение уровня в основном только провоспалительных цитокинов (IL-6, IL-17, IL-8, TNF α , IFN γ) и третий — снижение секреции про- и противовоспалительных цитокинов (табл. 1).

Первый тип модуляции был характерен для трех кишечных штаммов, выделенных в лаборатории инфекционной симбиологии ИКВС УрО РАН (*B. bifidum* ICIS-310, *B. bifidum* ICIS-202, *B. bifidum* ICIS-504), а также двух типовых производственных штаммов лактобактерий (*L. plantarum* 8P-A3, *L. acidophilus* К₃Ш₂₄), входящих в состав пробиотиков (табл. 1). По выраженности модулирующего влияния на базовую продукцию цитокинов мононуклеарами исследуемые штаммы можно расположить в порядке убывания эффекта влияния на цитокины. По уровню стимуляции противовоспалительного цитокина IL-10 штаммы

располагались в следующем порядке: *B. bifidum* ICIS-504 $\approx$ *B. bifidum* ICIS-202 > *L. acidophilus* К₃Ш₂₄ > *B. bifidum* ICIS-310 > *L. plantarum* 8P-A3. По выраженности подавления секреции провоспалительного цитокина TNF α культуры располагались в ряду: *L. plantarum* 8P-A3 > *B. bifidum* ICIS-310 > *B. bifidum* ICIS-202 > *B. bifidum* ICIS-504 $\approx$ *L. acidophilus* К₃Ш₂₄; по уровню подавления секреции IL-6 — *B. bifidum* ICIS-202 > *B. bifidum* ICIS-310 > *B. bifidum* ICIS-504 > *L. plantarum* 8P-A3 > *L. acidophilus* К₃Ш₂₄; по влиянию на продукцию IL-17 — *B. bifidum* ICIS-310 > *B. bifidum* ICIS-504 > *L. acidophilus* К₃Ш₂₄ > *B. bifidum* ICIS-202 > *L. plantarum* 8P-A3.

Второй тип модуляции был свойственен двум кишечным штаммам бифидобактерий (*B. longum* ICIS-505, *B. bifidum* ICIS-629), штамму лактобактерий *L. ruminis* ICIS-540, выделенным в лаборатории инфекционной симбиологии ИКВС УрО РАН, а также пробиотическому штамму бифидобактерий *B. bifidum* 791. Анализируя свойства штаммов второго типа модуляции по уровню ингибирования провоспалительных цитокинов (табл. 1), их можно расположить в следующем порядке: для TNF α — *L. ruminis* ICIS-540 > *B. bifidum* ICIS-629 $\approx$ *B. bifidum* 791 > *B. longum* ICIS-505; для IL-6 — *B. bifidum* 791 > *L. ruminis* ICIS-540 $\approx$ *B. bifidum* ICIS-629 $\approx$ *B. longum* ICIS-505; для IFN γ — *B. bifidum* ICIS-629 $\approx$ *B. bifidum* 791 $\approx$ *B. longum* ICIS-505 > *L. ruminis* ICIS-540; для IL-17 — *B. longum* ICIS-505 $\approx$ *L. ruminis* ICIS-540 > *B. bifidum* ICIS-629 $\approx$ *B. bifidum* 791; для IL-8 — *B. longum* ICIS-505 > *B. bifidum* ICIS-629 > *B. bifidum* 791 > *L. ruminis* ICIS-540 (табл. 1).

Третий тип модуляции цитокинов был представлен штаммами, супернатанты которых ингибировали продукцию как провоспалительных, так и противовоспалительных цитокинов. Эта группа была представлена тремя кишечными штаммами (*B. bifidum* ICIS-643, *B. longum* ICIS-1113, *L. rhamnosus* ICIS-627) и двумя типовыми производственными культурами (*L. fermentum* 90-TC-4, *B. longum* Mc-42). Тем самым указанные культуры не обладали какой-либо избирательностью в отношении модуляции продукции цитокинов.

Таким образом, полученные результаты позволили выявить среди выделенных кишечных штаммов культуры бифидо- и лактобактерий с различной способностью *in vitro* модулировать секрецию цитокинов мононуклеарами периферической крови человека. Супернатанты штаммов 1-го типа (*B. bifidum* ICIS-310, *B. bifidum* ICIS-202, *B. bifidum* ICIS-504) и 2-го типа модуляции (*B. bifidum* ICIS-629, *B. longum* ICIS-505 и *L. ruminis* ICIS-540) характеризовались выраженной способностью снижать уровень провоспа-

**ТАБЛИЦА 1. ВЛИЯНИЕ СУПЕРНАТАНТОВ БИФИДО- И ЛАКТОБАКТЕРИЙ НА ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ
МОНОНУКЛЕАРАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА**

**TABLE 1. EFFECT OF BIFIDO- AND LACTOBACTERIA SUPERNATANTS ON CYTOKINE PRODUCTION BY HUMAN
PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEARS**

Штаммы бифидо- и лактобактерий Strains of bifidobacteria and lactobacteria	Продукция цитокинов периферическими мононуклеарными клетками (пг/мл) Cytokine production by peripheral mononuclear cells (pg/ml)						
	IFN γ	TNF α	IL-6	IL-10	IL-1ra	IL-8	IL-17
	Контроль-уровень цитокинов в среде без добавления супернатантов Control-the level of cytokines in the medium without the addition of supernatants						
	26,0	110,5	184,5	50,5	321,1	936,5	138,9
I тип влияния Type I of influence							
<i>B. bifidum</i> ICIS-310	29,0 $\pm$ 1,9	22,0 $\pm$ 2,3*	67,0 $\pm$ 3,9*	112,0 $\pm$ 12,4*	324,0 $\pm$ 39,2	937,8 $\pm$ 44,1	45,6 $\pm$ 4,1*
<i>B. bifidum</i> ICIS-202	33,0 $\pm$ 3,2	31,0 $\pm$ 0,6*	35,0 $\pm$ 4,1*	262,0 $\pm$ 26,9*	312,0 $\pm$ 25,9	931,2 $\pm$ 39,1	69,9 $\pm$ 2,8*
<i>B. bifidum</i> ICIS-504	32,0 $\pm$ 2,8	51,6 $\pm$ 2,5*	100,0 $\pm$ 15,3*	279,3 $\pm$ 19,6*	310,0 $\pm$ 11,4	934,3 $\pm$ 40,1	56,8 $\pm$ 4,2*
<i>L. fermentum</i> 8- PA-3	18,5 $\pm$ 0,2	10,5 $\pm$ 1,8*	115,8 $\pm$ 12,3*	106,6 $\pm$ 12,3*	315,3 $\pm$ 21,9	925,7 $\pm$ 36,4	73,6 $\pm$ 4,8*
<i>L. acidophilus</i> K ₃ Ш ₂₄	19,7 $\pm$ 4,2	59,2 $\pm$ 5,3*	121,4 $\pm$ 9,3*	183,3 $\pm$ 9,3*	322,9 $\pm$ 22,9	935,6 $\pm$ 25,8	64,4 $\pm$ 3,6*
Me (Q _{0,25} -Q _{0,75})	29,0 (19,7-29,0)	31,0 (22,0-31,0)	100,0 (67,0-100,0)	183,3 (112,0-183,3)	315,3 (312,0-315,3)	935,7 (931,0-935,7)	64,4 (56,9-64,4)
II тип влияния Type II of influence							
<i>B. longum</i> ICIS-505	11,0 $\pm$ 3,2*	26,4 $\pm$ 1,4*	88,0 $\pm$ 5,3*	40,00 $\pm$ 0,01	269,0 $\pm$ 14,3	167,0 $\pm$ 28,6*	36,1 $\pm$ 3,1*
<i>B. bifidum</i> ICIS-629	8,0 $\pm$ 2,5*	10,00 $\pm$ 0,01*	82,0 $\pm$ 4,8*	40,00 $\pm$ 0,02	275,0 $\pm$ 29,4	324,0 $\pm$ 45,3*	39,1 $\pm$ 2,8*
<i>B. bifidum</i> 791	10,0 $\pm$ 1,5*	12,00 $\pm$ 0,15*	51,0 $\pm$ 25,3*	63,0 $\pm$ 3,8	300,0 $\pm$ 35,9	534,2 $\pm$ 36,1*	37,1 $\pm$ 3,4*
<i>L. ruminis</i> ICIS-540	15,0 $\pm$ 2,1*	3,00 $\pm$ 0,01*	82,0 $\pm$ 3,9*	45,0 $\pm$ 0,01	288,0 $\pm$ 16,9	639,4 $\pm$ 33,2*	36,3 $\pm$ 3,0*
Me (Q _{0,25} -Q _{0,75})	10,5 (9,5-10,5)	11,0 (8,25-11,00)	82,0 (74,25-82,00)	42,5 (40,0-42,5)	281,5 (273,5-281,5)	429,0 (284,7-429,0)	36,7 (35,9-36,7)
III тип влияния Type III of influence							
<i>B. bifidum</i> ICIS-643	17,0 $\pm$ 2,2*	18,0 $\pm$ 0,1*	120,0 $\pm$ 12,4*	14,0 $\pm$ 0,1*	223,0 $\pm$ 34,3	419,0 $\pm$ 45,2*	37,9 $\pm$ 3,5*
<i>B. longum</i> ICIS-1113	16,0 $\pm$ 2,1*	12,17 $\pm$ 1,10*	140,0 $\pm$ 8,3*	15,2 $\pm$ 0,2*	121,0 $\pm$ 15,3*	149,0 $\pm$ 27,3*	36,8 $\pm$ 2,5*
<i>L. rhamnosus</i> ICIS-627	11,0 $\pm$ 3,1*	32,20 $\pm$ 0,02*	96,0 $\pm$ 2,6*	10,00 $\pm$ 0,01*	90,0 $\pm$ 10,3*	299,0 $\pm$ 33,6*	34,8 $\pm$ 2,9*
<i>L. fermentum</i> 90-TC-4	2,9 $\pm$ 0,3*	45,8 $\pm$ 1,9*	124,6 $\pm$ 11,3*	39,2 $\pm$ 1,5*	219,8 $\pm$ 15,6*	345,1 $\pm$ 41,6*	34,2 $\pm$ 5,3*
<i>B. longum</i> Mc-42	3,40 $\pm$ 0,03*	41,6 $\pm$ 2,2*	132,0 $\pm$ 14,3*	23,7 $\pm$ 2,1*	228,9 $\pm$ 25,9*	531,2 $\pm$ 42,3*	34,8 $\pm$ 2,9*
Me (Q _{0,25} -Q _{0,75})	11,0 (3,5-11,0)	32,2 (18,0-32,2)	124,0 (120,0-124,0)	15,2 (14,0-15,2)	219,8 (121,0-219,8)	345,1 (299,0-345,1)	34,2 (32,1-34,2)

Примечание. * – $p < 0,05$ по отношению к контролю.

Note. *, $p < 0.05$ in relation to the control.

лительных цитокинов. Дополнительно, бифидобактерии *B. bifidum* ICIS-202, *B. bifidum* ICIS-504 (1-й тип модуляции) значительно стимулировали секрецию противовоспалительного цитокина IL-10 (5-10-кратно), что усиливало противовоспалительный потенциал данных штаммов. Тем самым выявленные цитокин-стимулирующие (в отношении противовоспалительных цитокинов) и цитокин-ингибирующие (в отношении провоспалительных цитокинов) свойства представленных в работе бифидо- и лактобактерий позволяют характеризовать их как перспективные для создания современных бактериальных биопрепаратов с противовоспалительным эффектом.

Кроме того, среди исследованных кишечных штаммов перспективной культурой оказался штамм лактобактерий *L. ruminis* ICIS-540, супернатант которого характеризовался многократной способностью *in vitro* снижать уровень провоспалительных цитокинов: TNF α (в десять раз), IL-17 (четырежды) и IL-6 (дважды).

В отношении кишечных штаммов бифидо- и лактобактерий было проведено определение биобезопасности, молекулярно-генетической паспортизации с генотипированием с помощью полногеномного секвенирования. Геномная последовательность культур депонирована в базе данных NCBI BioProject GenBank: *L. ruminis* ICIS-540-SRNR000000000.1; *B. longum* ICIS-505-RJZF000000000.1; *B. bifidum* ICIS-629-JAJFBS000000000.1; *B. bifidum* ICIS-202-SSMS000000000.1; *B. bifidum* ICIS-504-JAJPE000000000.1; *B. bifidum* ICIS-310-NBYL01000001.1.

Терапевтический потенциал современных пробиотиков в настоящее время рассматривается как с позиции возможности направленного иммуномодулирующего влияния на механизмы врожденного и адаптивного иммунитета, так и с использованием их как эффективных противовоспалительных препаратов [12]. Приоритетным является применение не только непосредственно живых/инактивированных микробных культур, но и секретируемых ими метаболитов, являющихся основой постбиотиков, обладающих высоким лечебным потенциалом благодаря разнообразию состава метаболитических компонентов, хорошо усвоению, безопасности их использования [9, 13]. Разнообразная биологическая активность бесклеточной среды отдельных пробиотических штаммов, включая противовоспалительный, противоопухолевый и противовирусный эффекты, установленная рядом исследователей [1, 12], может быть объяснена биологически активными веществами, выделяемыми бактериями. К ним относятся растворимые белки, [8], полисахари-

ды клеточных мембран, гликопротеины [4, 15], которые обеспечивают важнейшие сигналы, необходимые для развития и функционирования иммунной системы. Кроме того, установлено, что бесклеточная надосадочная жидкость пробиотических штаммов — *L. rhamnosus*, *L. fermentum*, *Pediococcus acidilactici* и *Lactobacillus delbrueckii* богата активными фенольными соединениями и флавоноидами, которые известны своими противовоспалительными, антиоксидантными и иммуномодулирующими свойствами [6].

Противовоспалительные свойства пробиотиков и их метаболитов, как указывалось выше, обосновывают возможность применения их в качестве успешного средства для лечения воспалительных заболеваний [5], противовоспалительный эффект которых может реализовываться различными механизмами. Так, на модели дифференцировки моноцитарных клеток человека THP-1, индуцированной форбол миристатацетатом, показано, что противовоспалительная активность бесклеточных супернатантов двух видов лактобацилл (*L. acidophilus* и *L. rhamnosus* GG) проявлялась в способности снижать экспрессию и активность ферментов из группы матриксных металлопротеиназ, секретируемых активированными макрофагами [10]. С другой стороны, противовоспалительные свойства пробиотиков и их супернатантов могут реализовываться через усиление секреции противовоспалительных цитокинов IL-10 [11], TGF- β [3] и подавление продукции ранних провоспалительных цитокинов, например IL-6 [14]. В других работах показан противоположный эффект влияния пробиотических штаммов лакто-, бифидобактерий на ранние провоспалительные цитокины [7], что связывают со штаммоспецифичностью. Иммуностимулирующие свойства бесклеточных супернатантов смеси коммерческих пробиотиков DophilusTM были выявлены на модели мышинных макрофагов RAW264 в отношении продукции TNF α , выраженности миграции и активности фагоцитоза [1].

Хотя наше исследование не включало детальный химический анализ бесклеточных супернатантов исследуемых штаммов бифидо- и лактобактерий, вместе с тем выявленные различные профили воздействия на секрецию цитокинов мононуклеарами крови человека обосновывают дальнейшую необходимость проведения дополнительных исследований для выяснения специфических путей и сигнальных механизмов, участвующих во взаимодействии между метаболитами исследованных новых кишечных штаммов и иммунными клетками.

Заключение

Проведенное в работе исследование *in vitro* цитокин-модулирующей активности бесклеточных супернатантов новых кишечных штаммов бифидо- и лактобактерий позволило выделить штаммы с противовоспалительным потенциалом, реализуемым через подавление секреции провоспалительных цитокинов и/или усиление продукции противовоспалительных цитокинов. Выраженность противовоспалительной активности исследованных штаммов не уступала, а в отношении отдельных цитокинов (IL-10, TNF α ,

IL-6) превосходила известные пробиотические штаммы. В результате проведенного скрининга модулирующих свойств кишечных штаммов бифидо- и лактобактерий отобраны перспективные штаммы *L. ruminis* ICIS-540, *B. bifidum* ICIS-504 и *B. bifidum* ICIS-202, пригодные для создания бактериальных препаратов с противовоспалительной активностью. Результаты исследований могут быть использованы в практике при отборе и тестировании кишечных штаммов по влиянию их на цитокиновый профиль клеток хозяина для создания новых биопрепаратов таргетного действия.

Список литературы / References

1. Al-Najjar M.A.A., Abdulrazzaq S.B., Alzaghari L.F., Mahmod A.I., Omar A., Hasen E., Athamneh T., Talib W.H., Chellappan D.K., Barakat M. Evaluation of immunomodulatory potential of probiotic conditioned medium on murine macrophages. *Sci Rep.*, 2024, Vol. 14, 7126. doi: 10.1038/s41598-024-56622-0.
2. Asif A., Afzaal M., Shahid H., Saeed F., Ahmed A., Shah Y.A., Ejaz A., Ghani S., Ateeq H., Khan M.R. Probing the functional and therapeutic properties of postbiotics in relation to their industrial application. *Food Sci. Nutr.*, 2023, Vol. 11, no. 8, pp. 4472-4484.
3. Bermudez-Brito M., Muñoz-Quezada S., Gomez-Llorente C., Romero F., Gil A. Lactobacillus rhamnosus and its cell-free culture supernatant differentially modulate inflammatory biomarkers in Escherichia coli-challenged human dendritic cells. *Br. J. Nutr.*, 2014, Vol. 111, no. 10, pp. 1727-1737.
4. Chen Y.C., Wu Y.J., Hu C.Y. Monosaccharide composition influence and immunomodulatory effects of probiotic exopolysaccharides. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2019, Vol. 133, pp. 575-582.
5. oey A., Habil N., Strachan A., Beal J. Lactocaseibacillus casei strain shirota modulates macrophage-intestinal epithelial cell co-culture barrier integrity, bacterial sensing and inflammatory cytokines. *Microorganisms*, 2022, Vol. 10, no. 10, 2087. doi: 10.3390/microorganisms10102087.
6. Hamad G.M., Abdelmotilib N.M., Darwish A.M., Zeitoun A.M. Commercial probiotic cell-free supernatants for inhibition of Clostridium perfringens poultry meat infection in Egypt. *Anaerobe*, 2020, Vol. 62, 102181. doi: 10.1016/j.anaerobe.2020.102181.
7. Lee J., Kim S., Kang C.H. Immunostimulatory activity of lactic acid bacteria cell-free supernatants through the activation of NF- κ B and MAPK signaling pathways in RAW 264.7 cells. *Microorganisms*, 2022, Vol. 10, no. 11, 2247. doi: 10.3390/microorganisms10112247.
8. Leser T., Baker A. Molecular mechanisms of Lactocaseibacillus rhamnosus, LGG⁺ probiotic function. *Microorganisms*, 2024, Vol. 12, no. 4, 794. doi: 10.3390/microorganisms12040794.
9. Liang B., Xing D. The current and future perspectives of postbiotics. *Probiotics Antimicrob. Proteins*, 2023, Vol. 15, no. 6, pp. 1626-1643.
10. Maghsood F., Mirshafiey A., Farahani M.M., Modarressi M.H., Jafari P., Motevaseli E. Dual effects of cell free supernatants from lactobacillus acidophilus and lactobacillus rhamnosus GG in regulation of MMP-9 by up-regulating TIMP-1 and down-regulating CD147 in PMADifferentiated THP-1 cells. *Cell J.*, 2018, Vol. 19, no. 4, pp. 559-568.
11. Magryś A., Pawlik M. Postbiotic fractions of probiotics Lactobacillus plantarum 299v and Lactobacillus rhamnosus GG show immune-modulating effects. *Cells*, 2023, Vol. 12, no. 21, 2538. doi: 10.3390/cells12212538.
12. Mazziotta C., Tognon M., Martini F., Torreggiani E., Rotondo J.C. Probiotics mechanism of action on immune cells and beneficial effects on human health. *Cells*, 2023, Vol. 12, no. 1, 184. doi: 10.3390/cells12010184.
13. Prajapati N., Patel J., Singh S., Yadav V.K., Joshi C., Patani A., Prajapati D., Sahoo D.K., Patel A. Postbiotic production: harnessing the power of microbial metabolites for health applications. *Front. Microbiol.*, 2023, Vol. 14, 1306192. doi: 10.3389/fmicb.2023.1306192.
14. Zanetta P., Ballacchino C., Squarzanti D.F., Amoroso A., Pane M., Azzimonti B. Lactobacillus johnsonii LJO02 (DSM 33828) cell-free supernatant and vitamin D improve wound healing and reduce interleukin-6 production in staphylococcus aureus-infected human keratinocytes. *Pharmaceutics*, 2023, Vol. 16, no. 1, 18. doi: 10.3390/pharmaceutics16010018.

15. Zhang J., Xiao Y., Wang H., Zhang H., Chen W., Lu W. Lactic acid bacteria-derived exopolysaccharide: Formation, immunomodulatory ability, health effects, and structure-function relationship. *Microbiol. Res.*, 2023, Vol. 274, 127432. doi: 10.1016/j.micres.2023.127432.

Авторы:

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

Иванова Е.В. — д.м.н., доцент, заведующий лабораторией инфекционной симбиологии, Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук — обособленное структурное подразделение 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 — обособленное структурное подразделение ФГБУН «Оренбургский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук»; профессор кафедры нормальной физиологии ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Оренбург, Россия

Перунова Н.Б. — д.м.н., профессор Российской академии наук, ведущий научный сотрудник лаборатории инфекционной симбиологии, Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук — обособленное структурное подразделение 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 — обособленное структурное подразделение 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 — обособленное структурное подразделение 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, Scientific 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, Head, 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; Professor, Department of Normal Physiology, Orenburg State Medical University, 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

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