

# КОМПЛЕКСНЫЕ ЭФФЕКТЫ «САЛЬМОЗАНА» И ПРОБИОТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ РОДА *LACTOBACILLUS* НА ЕСТЕСТВЕННУЮ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ И АДАПТИВНЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

Николаева Т.Н., Григорьева Е.А., Козлов В.В.,  
Пронин А.В.

*Лаборатория естественного иммунитета Научно-исследовательского института эпидемиологии  
и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАМН, Москва*

**Резюме.** Представлены результаты исследования иммунопротективных свойств препарата «Сальмозан» и его сочетанного воздействия с пробиотическими бактериями рода *Lactobacillus* на естественную резистентность и показатели адаптивного иммунитета экспериментальных живот-

Создание новых препаратов целенаправленной регуляции иммунологической реактивности и коррекции ее нарушений является актуальной медицинской проблемой. Большую группу иммуномодуляторов представляют препараты созданные на основе живых бактерий, их лизатов, компонентов бактериальной клетки-ЛПС, пептидигликаны, рибосомы, нуклеиновые кислоты, минимальные биологически активные фрагменты (Бронхонал, Имудон, Продигозан, Рибомунил, Иммуномакс и др.). В последние годы выявлен широкий спектр иммунотерапевтических эффектов пробиотических препаратов, созданных на основе бактерий рода *Lactobacillus* (Лактобактерин, Ацилакт, Линекс, Трилакт и др.). Представители рода *Lactobacillus* являются одним из основных компонентов нормального микробиоценоза кишечника макроорганизма, важнейшей функцией которых является участие в формировании местной и системной иммунорезистентности [2, 7, 8].

В ГУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН создан препарат «Сальмозан» представляющий собой полисахаридный компонент О-соматического антигена бактерий *S. typhi* (не менее 70% углеводов), не содержащий липидов и белков.

Вопросы взаимных эффектов воздействия иммуномодуляторов бактериального происхождения и представителей комменсальной микрофлоры кишечника в системе иммунологического контроля гомеостаза представляют определенный научный и практический интерес.

Целью настоящего исследования являлось изучение влияния препарата «Сальмозан» на показатели естественной резистентности и адаптивного иммунитета экспериментальных животных.

## Материалы и методы

Эксперименты выполнены на линейных Balb/c, CBA и беспородных мышах (самцах весом 16-18 г), полученных из питомника «Столбовая» РАМН.

Препарат «Сальмозан» вводили мышам внутрибрюшинно в дозе 20 мкг/мл. Бактерии рода *Lactobacillus* штамм *L. plantarum*, *L. acidophilus per os* в дозе  $5 \times 10^9$  КОЕ/0,5 мл. Протективные свойства исследовали при заражении животных живыми бактериями *Kl. pneumoniae* в дозе  $1 \times 10^4$  КОЕ/0,5 мл (внутривенно) и *Ps. aeruginosa*  $1 \times 10^5$  КОЕ/0,2 мл (внутрибрюшинно).

Влияние препарата «Сальмозан» на продукцию цитокинов IL-1 $\alpha$ , IL-12, IL-10 и TNF $\alpha$  перитонеальными макрофагами мышей Balb/c оценивали иммуноферментным анализом; МИФ определялся в супернатантах клеток селезенки и пейеровых бляшек (ПБ) мышей на 7-е сутки после сенсibilизации в реакции торможения

миграции макрофагов; функциональную активность Т-, В-лимфоцитов и естественных киллеров оценивали по включению в спленоциты сенсibilизированных мышей CBA  $^3\text{H}$ -тимидина и  $^3\text{H}$ -уридина соответственно.

Статистическую обработку полученных данных проводили путем определения средних арифметических и средних геометрических значений с вычислением средних ошибок и доверительных интервалов. Достоверность полученных результатов оценивали с помощью критерия Стьюдента при  $p < 0,05$ .

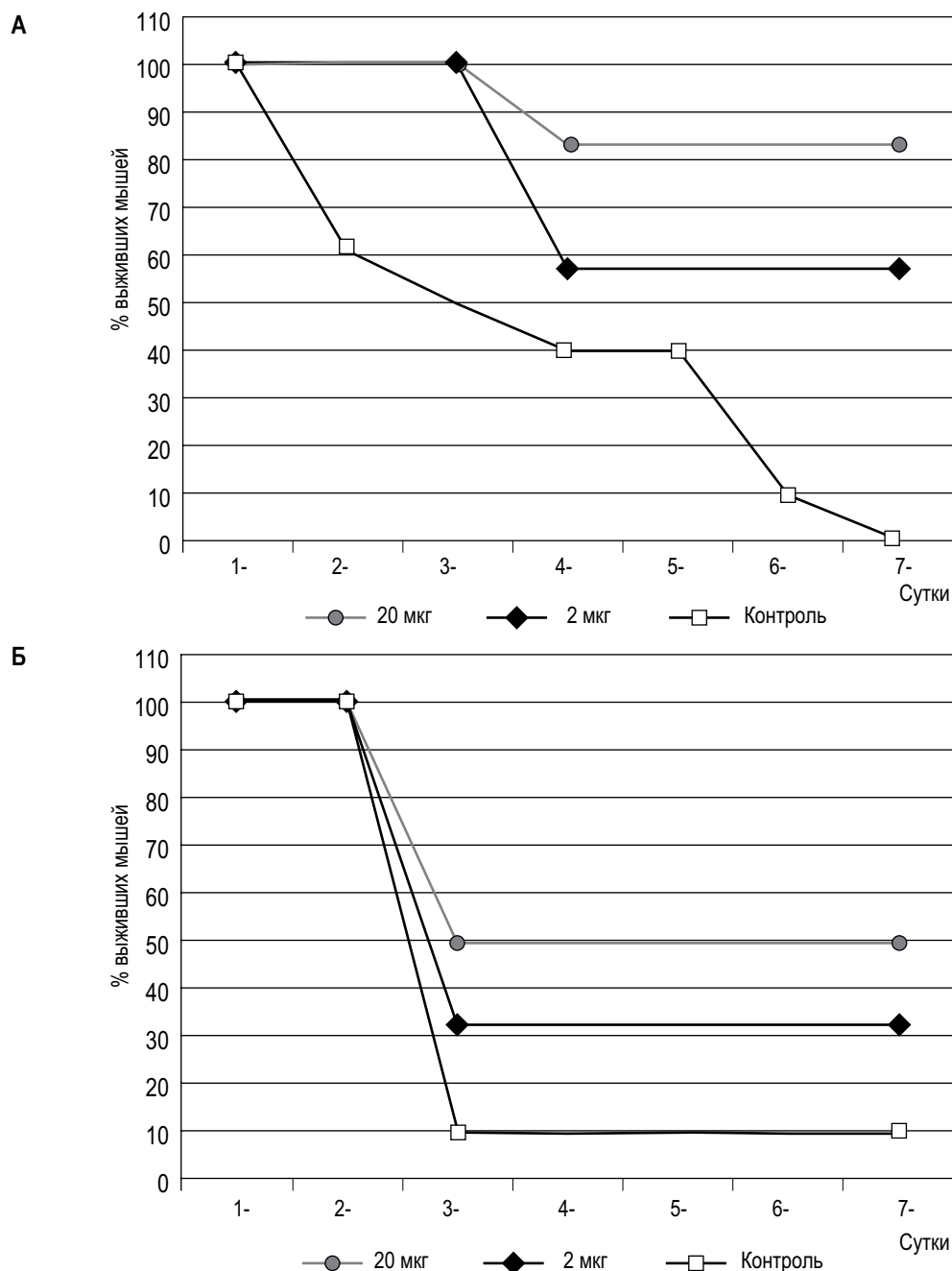
## Результаты

Показана протективная активность препарата «Сальмозан» в диапазоне доз от 20 мкг/мл до 0,02 мкг/мл при заражении Balb/c и беспородных мышей грам-бактериями (*Kl. pneumoniae* и *Ps. aeruginosa*). Эффект защиты составил 57-83% (рис. 1).

Сенсibilизация мышей препаратом «Сальмозан» стимулирует продукцию цитокинов IL-1 $\alpha$ , TNF $\alpha$ , IL-12 в перитонеальных макрофагах. Максимальные показатели отмечены спустя 3 часа после введения препарата *in vivo* и инкубации макрофагов *in vitro* в течение 24 часов ( $p < 0,05$ ) (рис. 2). Клетки пейеровых бляшек (ПБ), стимулированные «Сальмозаном», вырабатывали TNF $\alpha$ . Продукция IL-10 в этот период не выявлена. Полученные данные свидетельствуют о способности «Сальмозана» активировать синтез медиаторов регулирующих и координирующих развитие клеточных иммунных реакций врожденного и адаптивного иммунных ответов, направленно опосредующих дифференцировку Т-хелперов в направлении Th1 субпопуляции. В реализации эффекта ведущая роль принадлежит IL-12, продуцируемого антигенпрезентирующими клетками, который направляет дифференцировку Т-лимфоцитов в CD4 $^+$ Т-клетки.

Дальнейшие эксперименты подтвердили модулирующий эффект «Сальмозана» на функциональную активность клеточных факторов иммунного ответа. Анализ показателей цитотоксической активности ЕК-клеток селезенки показал увеличение ее в 7 раз по сравнению с аналогичным показателем в интактном контроле при добавлении в среду культивирования препарата в дозе 20,0 мкг/мл при соотношении клеток-мишеней и эффекторов 1/10 ( $p < 0,05$ ). Снижение дозы препарата (0,2 мкг/мл) не вызывало существенного снижения показателей (рис. 3).

О вовлечении в процесс CD4 $^+$  лимфоцитов свидетельствуют данные об увеличении продукции фактора, ингибирующего миграцию макрофагов (migration inhibitory factor-MIF) на 7 сутки в присутствии супернатантов клеток ПБ



**Рисунок 1.** Протективная активность препарата «Сальмозан» при и внутривенном введении бактерий *Klebsiella pneumoniae* в дозе  $1 \times 10^4$  КОЕ/0,5 мл (А) и внутрибрюшинном заражении мышей живыми бактериями *Pseudomonas aeruginosa* в дозе  $1 \times 10^5$  КОЕ/0,2 мл (Б)

и в меньшей степени селезенки мышей, сенситизированных «Сальмозаном» (рис. 4).

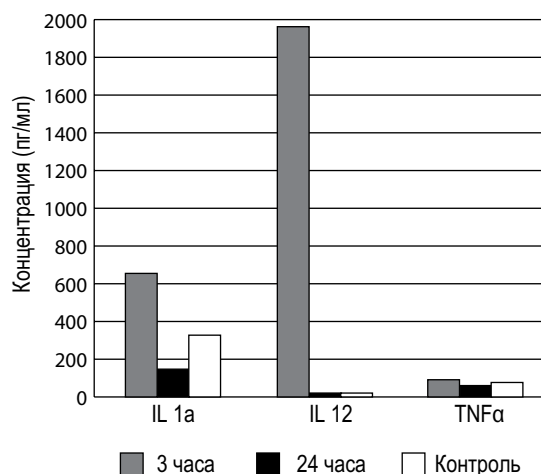
Показано увеличение пролиферативного потенциала интактных спленоцитов (*in vitro*) в присутствии препарата в дозе 2 и 0,2 мкг ( $p < 0,05$ ).

Исследования функциональной активности иммунокомпетентных клеток мышей на 4-е сутки после введения препарата «Сальмозан» свидетельствуют о стимуляции Т-лимфоцитов в присутствии митогена КонА ( $p < 0,05$ ) (рис. 5).

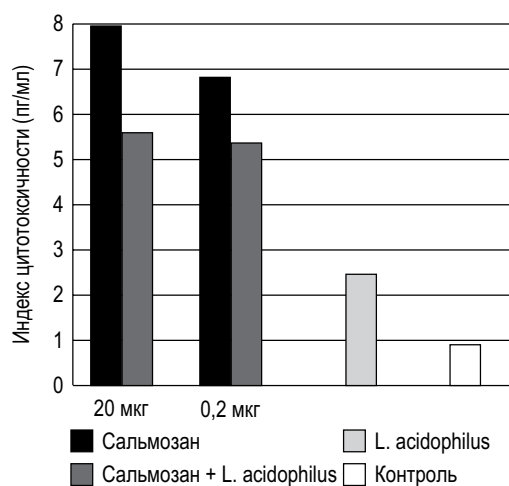
Важнейшим компонентом естественной резистентности макроорганизма является облигатная

флора, участвующая в поддержании иммунного гомеостаза, ведущими представителями которой являются бактерии рода *Lactobacillus*. В связи с этим определенный интерес представляло изучение сочетанного воздействия препарата «Сальмозан» с пробиотическими лактобактериями на развитие клеточных иммунных реакций.

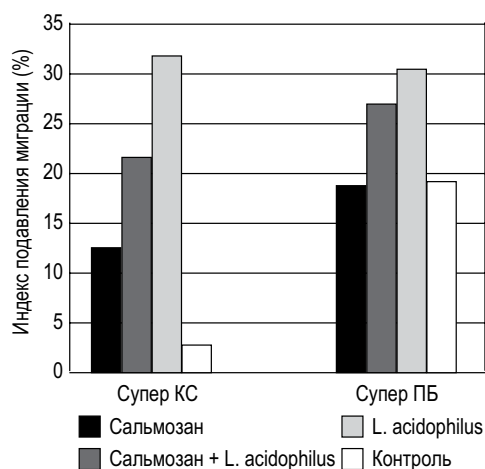
Показано, что культивирование спленоцитов *in vitro* одновременно с препаратом «Сальмозан» и живыми бактериями *L. acidophilus* усиливает цитотоксическую активность клеток по сравнению с наличием в среде одних бактерий



**Рисунок 2. Продукция цитокинов в перитонеальных макрофагах мышей, сенсibilизированных препаратом «Сальмозан»**



**Рисунок 3. Цитотоксическая активность спленоцитов в присутствии препарата «Сальмозан» и живых бактерий *Lactobacillus acidophilus***



**Рисунок 4. Подавление миграции макрофагов в присутствии супернатантов клеток селезенки (КС) и пейеровых бляшек (ПБ) мышей СВА, сенсibilизированных препаратом «Сальмозан» и живыми бактериями *Lactobacillus acidophilus***

( $p < 0,05$ ). При сенсibilизации мышей СВА препаратом «Сальмозан» и *L. acidophilus* (*per os*) отмечено усиление продукции MIF спленоцитами и в меньшей степени клетками ПБ ( $p < 0,05$ ). Аналогичная тенденция отмечена при исследовании пролиферативного потенциала интактных спленоцитов инкубируемых в присутствии препарата «Сальмозан» и бактерий *L. plantarum*. Совместная сенсibilизация животных препаратом «Сальмозан» и *L. plantarum* (*per os*) вызывает более выраженную стимуляцию Т-клеток селезенки, усиливает включение  $^3\text{H}$ -тимидина в присутствии В-митогена (ЛПС) и «Сальмозана», добавленного в среду инкубации спленоцитов ( $p < 0,05$ ).

## Обсуждение

Таким образом, результаты проведенных экспериментов свидетельствуют об иммунопротективных свойствах препарата «Сальмозан». Полисахаридные структурные компоненты клеточной стенки грам-бактерий широко представлены у представителей комменсальной и транзитной микрофлоры макроорганизма. Доминирующий вид микробиоты желудочно-кишечного тракта представлен бактериями рода *Lactobacillus*, важнейшей функцией которых является поддержание естественной резистентности макроорганизма, участие в системе иммунологического контроля гомеостаза [7, 8]. Исследования комплексных модулирующих эффектов воздействия данных бактериальных компонентов экосистемы кишечника выявили их сочетанное иммуностимулирующее и регулирующее воздействие на показатели врожденного и адаптивного иммунитета.

Мишенью действия препарата «Сальмозан» в первую очередь являются антигенпрезентирующие клетки, что сопровождается продукцией провоспалительных цитокинов (IL-1α, IL-12, и TNFα), направленными на инициацию, регулирование и координацию развития клеточных иммунных реакций.

IL-1α запускает начальные этапы иммунного ответа. IL-12, в свою очередь, являясь полипотентным активатором клеточного иммунного ответа, усиливает активность NK, LAK Т-киллерных клеток и цитотоксических макрофагов. Действуя в кооперативном взаимодействии с TNFγ, IL-12, являясь синергистом IL-18, также способствует продукции TNFγ Th1-лимфоцитами. Кроме того, IL-12 усиливает экспрессию FasL, участвуя тем самым в индукции апоптоза. TNFα способствует реализации функций NK, LAK-клеток, совместно с Fas-лигандом запускает каскад биохимических реакций, финальным результатом которых является запрограммированная гибель клеток (апоптоз).

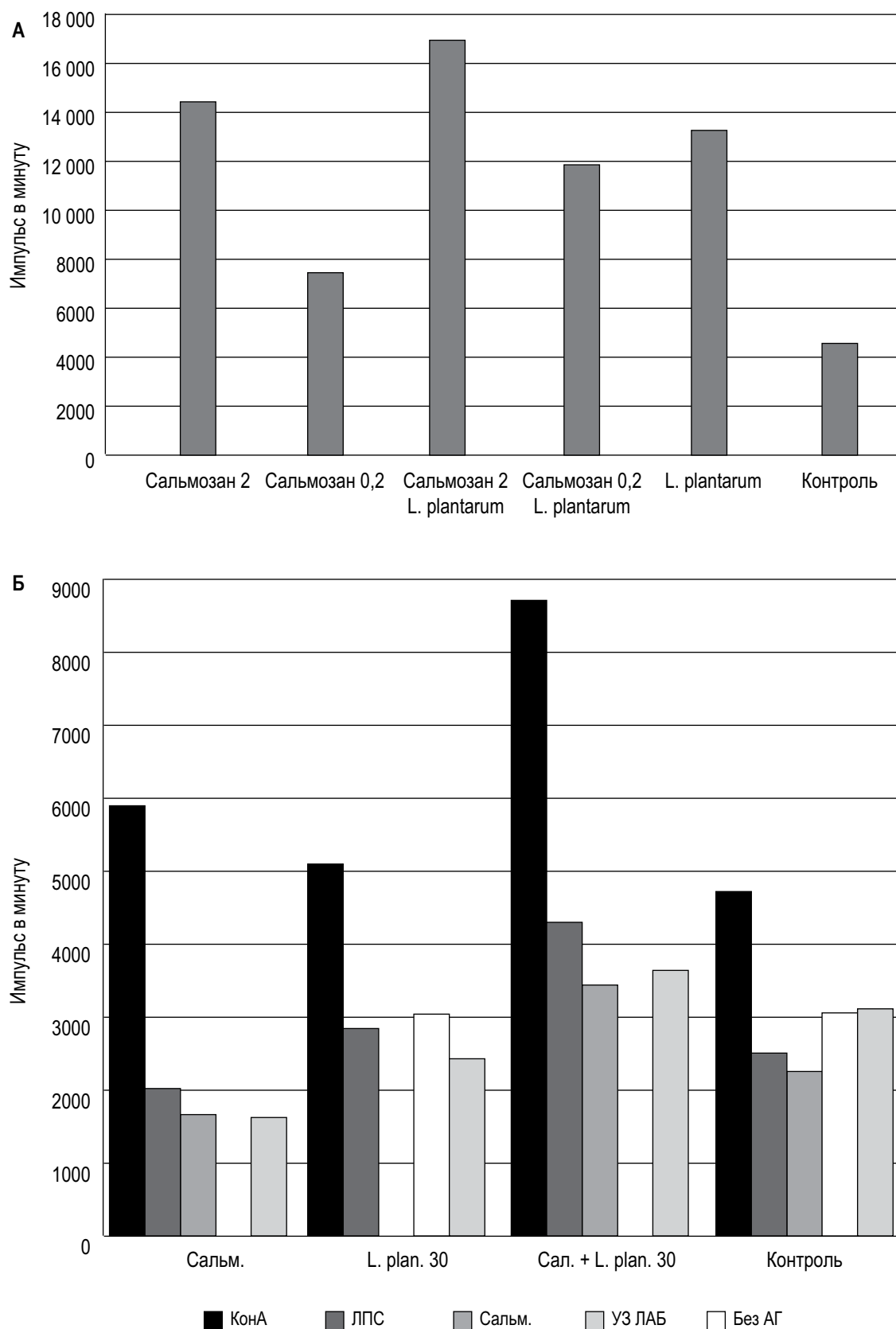


Рисунок 5. Проллиферативная активность клеток селезенки мышей СВА (*in vitro*) в присутствии препарата «Сальмозан» и живых бактерий *L. plantarum* (А) и мышей, сенсibilизированных препаратом «Сальмозан» и бактериями *Lactobacillus plantarum* (*in vivo*) в присутствии митогенов (Б)

Результаты проведенных экспериментов свидетельствуют об усилении цитотоксических свойств естественных киллеров (NK), цитотоксических лимфоцитов, CD4<sup>+</sup> клеток, продуцирующих MIF, и пролиферативного потенциала иммунокомпетентных лимфоцитов.

Таким образом, «Сальмозан» оказывает комплексное воздействие на иммунную систему, стимулирует механизмы противовирусной, антибактериальной и противоопухолевой естественной защиты макроорганизма.

В настоящее время накоплены фактические данные о механизмах модулирующего воздействия бактерий рода *Lactobacillus* на показатели естественной резистентности. Показано, что на первом этапе активации иммунокомпетентных клеток, ассоциированных с кишечником, в индукцию иммунной системы вовлекаются компоненты клеточной стенки лактобактерий поверхностные пептидогликаны, тейхоевые кислоты (особенно липотейхоевая кислота), взаимодействующие с Toll-like (TLR4, TLR2) рецепторами на поверхности клеток [6, 9]. Это, в свою очередь, приводит к активации транскрипционного фактора NF-κB (nuclear factor «карра-В»), который является главным регулятором воспаления, контролирующим экспрессию генов врожденного и адаптивного иммунитета. Выявлены модулирующие свойства бактерий рода *Lactobacillus* видов *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. acidophilus* на показатели иммунного гомеостаза. Результаты ПЦР-анализа спектра экспрессированных генов цитокинов свидетельствуют об индукции синтеза мРНК провоспалительных цитокинов IL-12, IL-18, TNFα. Получены данные о стимуляции продукции MIF, TNFα, TNFγ в клетках пейеровых бляшек (ПБ), тимуса и селезенки и увеличение их в сыворотке сенсibilизированных мышей. Активация продукции цитокинов является одним из важнейших механизмов взаимодействия лактобактерий с клеточными факторами естественного иммунитета, приводит к усилению цитотоксической активности NK-клеток и пролиферации иммунокомпетентных Т- и В-лимфоцитов [1, 2, 3, 4, 5].

В результате проведенных экспериментов выявлена комплексная стимуляция функциональной активности иммунокомпетентных клеток, увеличение показателей цитотоксической активности и продукции MIF клетками селезенки при совместной сенсibilизации мышей препаратом «Сальмозан» и введении лактобактерий.

Таким образом, результаты проведенных исследований выявили модулирующее влияние препарата «Сальмозан» на показатели естественной резистентности экспериментальных животных, определяющие иммунный гомеостаза

и участвующие в противоинфекционной, противоопухолевой защите макроорганизма. Введение лактобактерий усиливает модулирующие эффекты препарата «Сальмозан» на клеточные иммунные реакции, что дает основание для его использования с целью иммунопрофилактики и коррекции клеточных иммунных реакций на фоне пробиотикотерапии.

## Список литературы

1. Зорина В.В., Николаева Т.Н., Наровлянский А.Н. Влияние бактерий рода *Lactobacillus* на продукцию цитокинов клетками пейеровых бляшек экспериментальных животных // Иммунология. — 2004. — № 5. — С. 288-290.
2. Николаева Т.Н., Зорина В.В., Бондаренко В.М. Иммуностимулирующая и антиканцерогенная активность нормальной микрофлоры кишечника // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. — 2004. — № 4. — С. 39-43.
3. Николаева Т.Н., Зорина В.В., Григорьева Е.А. Влияние бактерий рода *Lactobacillus* на цитотоксическую активность спленоцитов экспериментальных животных // Микробиология. — 2007. — №3. — С. 53-54.
4. Christensen H.R., Frokioer H., Pestka J.J. Lactobacilli Differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells // J. Immunol. — 2002. — Vol. 168. — P. 171-178.
5. Cross. M. Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens // FEMS. — 2002. — Vol. 34, N 4. — P. 245-253.
6. Grangette C., Nutton S., Palumbo E., Morath S., Hermann C., Dewulf J., Pot B., Hartung T., Hols P., Mercenier A. Enhancer anti-inflammatory capacity of a *Lactobacillus plantarum* mutant synthesizing modified teichoic acids // PNAS. — 2005. — Vol. 102, N 29. — P. 10321-10326.
7. Isolauri E., Sutas Y., Arvilommi H., Salminen S. Probiotics: effect on immunity // Amer. J. Clinical Nutrition. — 2001. — Vol. 73. — N. 2. — P. 444S-450S.
8. Perdigon G., Fuller R., Raya R. Lactic acid bacteria and their effect on immune system // Curr. Issues Intest. Microbiol. — 2001. — Vol. 2, N 1. — P. 27-42.
9. Vinderola G., Matar C., Perdigon G. Role of intestinal epithelial cells in immune effects mediated by gram-positive probiotic bacteria: involvement of toll-like receptors // Clinical and diagnostic laboratory immunology. — 2005. — Vol. 12, N 9. — P. 1075-1084.

поступила в редакцию 16.06.2009

отправлена на доработку 19.06.2009

принята к печати 21.06.2009