

ВЛИЯНИЕ ПРОБИОТИКОВ НА ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ В СИСТЕМАХ *IN VITRO* И *IN VIVO*

Аверина О.В.¹, Ермоленко Е.И.^{2,3}, Ратушный А.Ю.¹, Тарасова Е.А.²,
Борщев Ю.Ю.², Леонтьева Г.Ф.², Крамская Т.А.², Котылева М.П.^{2,3},
Даниленко В.Н.¹, Суворов А.Н.^{2,3}

¹ ФГБУН «Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова» Российской академии наук, Москва, Россия

² ФГБУН «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

³ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Исследовано влияние трех штаммов пробиотических бактерий: *Lactobacillus rhamnosus* K32 (L), *Bifidobacterium longum* GT15 (B), *Enterococcus faecium* L-3 (E), на уровне экспрессии и содержания ключевых цитокинов при помощи полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией и иммуноферментного анализа соответственно.

В работе использованы культура клеток промоноцитарного происхождения (НТР-1) и экспериментальная модель дисбиоза кишечника. В геномах штаммов В и Е ранее были выявлены гены, кодирующие бактериоцины, гены компонентов внешней мембраны, пилей и экзополисахаридов, участвующих в модуляции иммунной системы.

При исследовании влияния пробиотических штаммов и их супернатантов на экспрессию цитокинов на культуре клеток выявлено увеличение экспрессии TNF α , обусловленное В, Е и супернатантом L. Культура В дополнительно вызывала экспрессию IL-8 и IL-10.

При коррекции дисбиоза кишечника у крыс (индуцированного метронидазолом и ампициллином) пробиотиками было показано, что нарушение в составе микробиоты (чрезмерный рост *Klebsiella* spp., низкое содержание *Faecalobacterium prausnitzii*) оставались у животных после введения L, как в контроле (без введения пробиотиков). В отличие от этих групп у крыс после введения Е и В были выявлены: 1) низкие уровни экспрессии провоспалительных цитокинов (IL-8, TNF α , MCP-1) в брыжеечных лимфатических узлах и содержание данных факторов в сыворотке крови; 2) увеличение содержания в сыворотке крови противовоспалительного цитокина TGF- β .

В данной работе, при помощи двух взаимодополняющих моделей, выявлены индивидуальные особенности иммуномодулирующих эффектов пробиотических штаммов *L. rhamnosus* K32, *B. longum* GT15 (B), *E. faecium* L-3, оказывающих различное влияние на микробиоту кишечника.

Ключевые слова: лактобациллы, бифидобактерии, энтерококки, дисбиоз, цитокины

Адрес для переписки:

Ермоленко Елена Игоревна
ФГБУН «Институт экспериментальной медицины»
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. акад. Павлова, 12.
Тел.: 8 (812) 234-05-42.
Факс: 8 (812) 234-94-77.
E-mail: lermolenko1@yandex.ru

Address for correspondence:

Ermolenko Elena I.
Research Institute of Experimental Medicine
197376, Russian Federation, St. Petersburg,
Acad. Pavlov str., 12.
Phone: 7 (812) 234-05-42.
Fax: 7 (812) 234-94-77.
E-mail: lermolenko1@yandex.ru

Образец цитирования:

О.В. Аверина, Е.И. Ермоленко, А.Ю. Ратушный,
Е.А. Тарасова, Ю.Ю. Борщев, Г.Ф. Леонтьева,
Т.А. Крамская, М.П. Котылева, В.Н. Даниленко,
А.Н. Суворов, «Влияние пробиотиков на продукцию
цитокинов в системах *in vitro* и *in vivo*»
// Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 5.
С. 443-454. doi: 10.15789/1563-0625-2015-5-443-454

© Аверина О.В. и соавт., 2015

For citation:

O.V. Averina, E.I. Ermolenko, A.Yu. Ratushniy, E.A. Tarasova,
Yu.Yu. Borshev, G.F. Leontieva, T.A. Kramskaya, M.P. Kotyleva,
V.N. Danilenko, A.N. Suvorov, "Influence of probiotics on cytokine
production in the *in vitro* and *in vivo* systems", *Medical Immunology*
(Russia)/*Meditsinskaya Immunologiya*, 2015, Vol. 17, no. 5,
pp. 443-454. doi: 10.15789/1563-0625-2015-5-443-454

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2015-5-443-454>

INFLUENCE OF PROBIOTICS ON CYTOKINE PRODUCTION IN THE *IN VITRO* AND *IN VIVO* SYSTEMS

Averina O.V.^a, Ermolenko E.I.^{b,c}, Ratushniy A.Yu.^a, Tarasova E.A.^b, Borschev Yu.Yu.^b, Leontieva G.F.^b, Kramskaya T.A.^b, Kotyleva M.P.^{b,c}, Danilenko V.N.^a, Suvorov A.N.^{b,c}

^a N.I. Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

^b Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

^c St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Modulatory effects of three probiotic bacterial strains (*Lactobacillus rhamnosus* K32 (L), *Bifidobacterium longum* GT15 (B), *Enterococcus faecium* L-3 (E)) on expression level and contents of key cytokines were studied using PCR techniques with reverse transcription, and enzyme-linked immunosorbent assay. Both cell cultures and an experimental model of intestinal dysbiosis were used in this study.

The genes encoding bacteriocins, surface membrane component, pili and exopolysaccharides involved in host immune system modulation were previously identified in the B and Ebacterial strains.

Investigation of probiotic strains and effects of their supernatants expression of cytokines in cell cultures of promonocyte origin (HTP-1) showed increased expression of TNF α , due to E and L supernatants. Moreover, the B1 culture induced IL-8 and IL-10 expression.

In a model of Wistar rats with ampicillin- and metronidazole-induced intestinal dysbiosis corrected with probiotics we have shown that the dysbiosis was accompanied by sufficient alterations in microbiota composition (*Klebsiella spp.* overgrowth and low contents of *Faecalobacterium prausnitzii*) that were observed only in the animals untreated with probiotics (control), or after administration of L.

In contrast to these results, the animals treated with E and B, the following changes were revealed: 1) low expression of proinflammatory cytokines IL-8, TNF α , MCP-1 in mesenteric lymph nodes and appropriate changes of their serum contents, 2) increased serum content of the anti-inflammatory TGF- β cytokine. Hence, the present study, having used two complementary models, has detected some individual features of immune modulation produced by the probiotic strains of *L. rhamnosus* K32, *B. longum* GT15 и *E. faecium* L-3 which exert differential effects upon the intestinal microbiota.

Keywords: *Lactobacilli*, *Bifidobacteria*, *Enterococci*, *dysbiosis*, *cytokines*

Работа поддержана РФФИ (№ 13-04-01861) и Государственным контрактом (8418-7/2014).

Введение

К пробиотикам обычно относят лечебно-профилактические препараты, в состав которых чаще всего входят бифидобактерии, лактобациллы и энтерококки, «стабилизирующие многообразные функции микробиоты», в том числе и иммунные реакции организма [3, 30]. Показано, что пробиотики действуют на иммунную систему (врожденный и адаптивный иммунитет) прямо и опосредованно, изменяя микробиоту, восстанавливая морфофункциональные свойства отдельных органов и систем организма.

Оценка влияния пробиотических препаратов на иммунную систему особенно важна при коррекции дисбиозов и лечении воспалительных заболеваний кишечника, что во многом может предопределить успех в терапии других соматических заболеваний [38]. При изучении влияния отдельных пробиотических штаммов бактерий на иммунную систему было показано, что они обладают специфическим иммуномодулирующим действием, проявляющимся в индукции синтеза

одновременно про- и противовоспалительных цитокинов, избирательной активации или ингибирования синтеза отдельных цитокинов и их комбинаций [6, 24, 34]. Некоторыми авторами предложено разделение пробиотических штаммов по иммуномодулирующим эффектам на про- и противовоспалительные, «супрессивные и активирующие» [18, 23, 31].

В большинстве случаев при оценке суммарного воздействия пробиотиков (как и других факторов) на иммунную систему учитывается изменение в количественном соотношении популяций лимфоцитов, сопровождающееся увеличением продукции цитокинов, в том числе ключевых для каждого направления поляризации. Примерами таких цитокинов являются: IFN γ , TNF α , NF- κ B (Th1), IL-4, IL-13 (Th2), IL-17, IL-22 (Th17), IL-10, TGF- β , (Threg) [21, 33, 38].

Исследование иммуномодулирующей активности пробиотиков проводится чаще всего на клеточных культурах из клеток кишечника (Caco-2, HT-29) или иммунцитов (ЕС-6, THP-1)

[6, 11] и лабораторных животных (здоровых, с дефектами иммунной системы, гнотобионтов, а также с экспериментальной инфекционной и неинфекционной патологией желудочно-кишечного тракта) [6, 11, 36].

При исследовании влияния живых и разрушенных (прогреванием или ультрафиолетовым воздействием) пробиотических штаммов бактерий и их метаболитов на иммунитет анализируются особенности кластерной дифференцировки иммунокомпетентных клеток и уровень продукции цитокинов при помощи иммунологических и генетических методов [41]. Однако до сих пор не существует четких критериев сравнения иммуномодулирующих эффектов пробиотических бактерий. Особенности влияния отдельных пробиотических бактерий исследованы недостаточно, а результаты, полученные при оценке иммуномодулирующих свойств штаммов, трудно сопоставимы.

Целью данной работы было изучение влияния различных штаммов пробиотических бактерий на уровень экспрессии и продукции ключевых цитокинов с использованием двух моделей: культура клеток и экспериментальный дисбиоз кишечника у крыс.

Материалы и методы

Бактериальные штаммы

В работе использовали три пробиотических штамма: *Bifidobacterium longum* GT15, *Lactobacillus rhamnosus* K32 и *Enterococcus faecium* L-3.

Штамм *B. longum* GT15 выделен из содержимого кишечника здорового взрослого человека (г. Тверь), депонирован в GenBank (№SUB167727, 2 309 998 пар оснований и содержит 1954 генов) и в ВКПМ (Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов).

Штамм *L. rhamnosus* K32 выделен из содержимого кишечника здоровой девочки в возрасте 12 лет (г. Тверь), депонирован в GenBank (№SUB168082, 2 906 246 пар оснований содержит 2742 генов) и ВКПМ.

Штамм *E. faecium* L-3 выделен из сквашенного молока, депонирован в GenBank (№ SUB167269, размер 2 629 318 пар оснований содержит 2717 генов) и во Всероссийском НИИ сельскохозяйственной микробиологии, ND-79, патент РФ № 2220199.

Все штаммы культивировали на среде MRS бульон (HiMedia, Индия). Для культивирования штамма *B. longum* GT15 в среду добавляли L-цистеин до 0,05%. Культуру бактерий выращивали в анаэробном состоянии в HiAnaerobic System (HiMedia, Индия) при 37 °С в течение 18-24 часов до достижения плотности культуры 10⁹ КОЕ/мл. Уровень плотности бактериальных культур отслеживали при помощи измерения оптической плотности

при длине волны 600 нм на спектрофотометре (PD-303, Japan).

Для анализа экспрессии генов цитокинов в условиях *in vitro* использовали взвесь живых бактерий и супернатант. Супернатант получали посредством центрифугирования живой бактериальной культуры при 3500 об/мин в течение 15 минут. Затем супернатанты стерилизовали методом фильтрации (Filtropor 0,45 µm [Sarstedt, Германия]).

Клеточные линии

Клеточная линия ТНР-1 (выделенная при острой промиелоцитарной лейкемии) была получена из Российской коллекции клеточных культур позвоночных, Санкт-Петербург. Клетки культивировали в среде RPMI («ПанЭко», Россия) с 10% содержанием эмбриональной телячьей сыворотки («ПанЭко», Россия), 292 мг/л L-глутамин («ПанЭко», Россия), 25 мг пенициллина и 25 мг стрептомицина при температуре 37 °С в атмосфере с 5% CO₂.

В качестве индуктора иммунного ответа и активатора воспалительной реакции использовали липополисахарид (ЛПС) *Escherichia coli* 0127: B8 (Sigma-Aldrich, США).

Характеристика животных и условия их содержания

Эксперименты выполнены на 50 самцах крыс линии Вистар (вес 230-250 г в возрасте 6-7 недель), полученных из питомника в Рапполово. Содержание, питание, уход за животными и выведение их из эксперимента осуществляли в соответствии с требованиями «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу МЗ СССР от 12.08.1977 г. № 755). Все животные содержались при сходных условиях в отношении температуры (18-22 °С), влажности (50-60%) и освещения (12 часов), шума (до 85 дБ) а также рациона питания (комбикорм ПК-120-1, Россия). Эксперименты проведены в полном соответствии с Директивой Европейского Совета (The European Council Directive 86/609/ЕЕС) по соблюдению этических принципов в работе с лабораторными животными и одобрены Комиссией по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных. Работа выполнялась в соответствии с Национальным стандартом РФ ГОСТ Р 53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики» (утв. и введен в действие Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 2 декабря 2009 г. No 544-ст).

Коинкубация клеточной линии ТНР-1 с исследуемыми образцами

Коинкубацию клеток линии ТНР-1 с бактериальными культурами и их супернатантами проводили в 6-луночных планшетах на среде RPMI с L-глутамином (292 мг/л) и 10% эмбриональной телячьей сыворотки без антибиотика.

В лунку вносили 10^6 клеток линии ТНР-1 в 4 мл среды культивирования. Иммуномодулирующий эффект оценивали после индукции клеток липополисахаридом (ЛПС) в концентрации 50 нг/мл. ЛПС вносили в культуральную среду за 1 час до добавления бактериальной взвеси (из расчета конечной концентрации в лунке – 10^7 КОЕ/мл) или супернатанта (в количестве 1% от общего объема среды в лунке, 40 мкл).

Образцы инкубировали при 37 °С и 5% CO₂ в течение 2, 4 и 6 часов.

Экспрессия цитокинов для исследований в системе *in vitro*

Выделение РНК проводили согласно протоколу, прилагаемому к набору TRIzol (Изоген, Россия). После коинкубации эукариотических клеток с исследуемыми образцами бактерий среду культивирования удаляли при помощи центрифугирования и добавляли к клеткам тризол (Изоген, Россия) в объеме 400 мкл.

Концентрацию выделенной РНК измеряли с помощью флуориметра Qubit 2.0 (Invitrogen, США) с использованием набора реагентов Qubit RNA Assay Kit (Invitrogen, США). Количество РНК выравнивали и подвергали воздействию ДНКаз (Biolabs, США) в соответствии с указаниями производителя.

Обратную транскрипцию проводили с помощью набора реагентов GenPak RT Core (Изоген, Россия) согласно указаниям производителя.

Для оценки экспрессии генов цитокинов был использован метод полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ). ПЦР-РВ в присутствии SYBR Green I (Синтол, Россия) проводили на приборе CFX96 Real-Time System (BIO-RAD, USA). Образцы кДНК нормировали по контрольному гену *GAPDH*. В качестве контроля использовали экспрессию цитокинов в клетках, индуцированных ЛПС, без добавления бактериальных образцов.

Последовательности используемых праймеров (Литех, Россия) для ПЦР представлены в таблице 1.

Экспериментальная модель дисбиоза и дизайн исследования

В работе использована разработанная нами ранее модель экспериментального дисбиоза (Ермоленко и др., 2009), вызванного внутрижелудочным введением крысам (самцы, Вистар) 75 мг/кг ампициллина (ОАО «Органика», Россия) и 50 мг/кг метронидазола (ОАО «Ирбитский химико-фармацевтический завод», Россия). Животные были разделены на 5 групп, по 10 крыс в каждой (табл. 2).

Антимикробные препараты вводили ежедневно в течение трех дней животным из 4 групп (L, B, E и K1). Крысы из второй контрольной группы (K2) получали первые три дня дистиллированную воду. После этого в течение 5 дней крысам из групп L, B и E вводили, соответственно, *L. rhamnosus* K32, *B. longum* GT15 и *E. faecium* L-3, по $5,5 \times 10^8$ КФЕ/мл бактерий каждого вида. Животные из контрольных групп получали фосфатный буфер. Все вводимые препараты и дистиллированную воду вводили внутрижелудочно в объеме 0,5 мл. В последний день эксперимента собирали пробы фекалий для бактериологического и генетического исследований микробиоты кишечника, при этом использовали описанный ранее культуральный метод [16] и ПЦР-РВ с использованием реагентов для выделения ДНК (QIAamp DNA Stool Mini Kit, США, Интерлаб-сервис) и комплекта реагентов «Колонофлор» ООО «Альфалаб».

На заключительном этапе исследования животных декапетировали, отбирали кровь для получения сыворотки, выделяли лимфатические узлы брыжейки для дальнейшей оценки иммуномодулирующих свойств пробиотических штаммов.

ТАБЛИЦА 1. ПРАЙМЕРЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ ЦИТОКИНЫ, *IN VITRO*

Название праймеров	Олигонуклеотидные последовательности		Размер ПЦР продукта (нп)
	Прямой праймер	Обратный праймер	
IL-8	5'GGCACAAACTTTTCAGAGACAG5'	5'ACACAGAGCTGCAGAAATCAGG3'	153
IL-10	5'TCAGGGTGGCGACTCTAT 3'	5'TGGGCTTCTTCTAAATCGTTC3'	198
TNF α	5'TCTCGAACCCCGAGTGACAA 3'	5'TATCTCTCAGCTCCACGCCA 3'	124
GAPDH*	5'GGAGTCAACGGATTTGGTCCG3'	5'TGAGGTCAATGAAGGGGTCA3'	103

Примечание. * GAPDH – glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

ТАБЛИЦА 2. ДИЗАЙН ИССЛЕДОВАНИЯ

Группы	1-3-й дни	3-8-й дни	9-й день
L	Метронидазол + ампициллин	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> K32	Взятие материала: мезентериальные узлы, кровь и фекалии
B	Метронидазол + ампициллин	<i>Bifidobacterium longum</i> GT15	
E	Метронидазол + ампициллин	<i>Enterococcus faecium</i> L-3	
K1	Метронидазол + ампициллин	+ вода + фосфатный буфер	
K2	+ вода	+ вода + фосфатный буфер	

ТАБЛИЦА 3. ПРАЙМЕРЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ ЦИТОКИНЫ, *IN VIVO*

Название праймеров	Олигонуклеотидные последовательности		Размер ПЦР продукта (нп)
	Прямой праймер	Обратный праймер	
IL-8	5'CCACGCCACAAGTACACTGAT3'	5'TGGTTCTCATGAGGGTGTCTG 3'	393
IL-10	5'TGGGTTGCCAAGCCTTGT 3'	5'ATCGATGACAGCGTCGCA 3'	152
TNF α	5'TTCCCAAATGGGCTCCCTC3'	5'GGCTTGTCACTCGAGTTTT3'	83
β -актин	5'GAAGATCCTGACCGAGCGTG3'	5'AGCACTGTGTTGGCATAGAG 3'	326

Экспрессия генов, кодирующих цитокины, в мезентеральных узлах крыс

Для выделения тотальной РНК из мезентеральных узлов использовали RNeasy Mini Kit («Qiagen», Германия). Уровень экспрессии мРНК цитокинов определяли методом обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией (ОТ-ПЦР) с праймерами, которые были специально сконструированы (табл. 3). В качестве внутреннего стандарта для оценки прохождения реакции обратной транскрипции использовали мРНК β -актина. Продукты ПЦР анализа визуализировали методом электрофореза в 2% агарозном геле. Полуколичественную оценку уровня экспрессии генов, обеспечивающих продукцию цитокинов, проводили с помощью компьютерной программы «Scion Image» и выражали в условных единицах.

Исследование содержания цитокинов в сыворотке крови крыс

Концентрации цитокинов: MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein 1), TNF α (Tumor necrosis factor), TGF- β (Transforming growth factor beta), IL-8 и IL-10 в сыворотке крови крыс определяли при помощи иммуоферментного анализа (ИФА), тест-системы с моноклональными антителами, eBioscience, Bender MedSystems, USA.

Статистический анализ

Данные представлены в виде средних значений \pm стандартные отклонения. Для подтверждения различий между образцами использовали критерий Манна-Уитни. Каждая выборка включает не менее трех независимых повторностей. При статистическом анализе результатов исследования применяли программы «Microsoft® Office Excel 97» с использованием t-критерия Стьюдента (уровень значимости $p < 0,05$).

Результаты

Сравнительное исследование влияния пробиотических штаммов *Bifidobacterium longum* GT15, *Lactobacillus rhamnosus* K32 и *Enterococcus faecium* L-3 на иммунную систему проводили, используя моноцитоподобную клеточную культуру и модель кишечного дисбактериоза, анализируя уровни экспрессии ключевых про- и противовоспалительных цитокинов. При исследовании в системе *in vivo* также оценивалось содержание цитокинов в сыворотке крови крыс при помощи ИФА.

Оценка экспрессии цитокинов на культуре клеток

Иммуномодулирующий эффект исследуемых штаммов оценивался на линии клеток ТНР-1 после индукции ЛПС. Изучалось влияние живых бактериальных клеток и супернатантов их культур на экспрессию генов цитокинов IL-8, IL-10, TNF α через 2, 4 и 6 часов коинкубации. Полученные профили экспрессии цитокинов на уровне мРНК представлены на рисунке 1.

У штамма *B. longum* GT15 выявлена иммуномодулирующая активность, проявляемая в индукции экспрессии как противовоспалительного цитокина IL-10, так и провоспалительных цитокинов IL-8 и TNF α с постепенным увеличением в течение всего времени коинкубации клеток (рис. 1А). Наибольшая экспрессия цитокинов наблюдалась при коинкубации ТНР-1 клеток с живыми клетками бифидобактерий, причем максимально она проявилась в случае TNF α через 6 часов коинкубации.

Штамм *L. rhamnosus* K32 вызывал экспрессию противовоспалительных цитокинов TNF α и IL-8 только к 6 часам коинкубации ТНР-1 клеток со взвесью живых бактерий (рис. 1Б). Воздействие супернатанта лактобацилл приводило к увеличению экспрессии TNF α в течение всего периода коинкубации (2, 4 и 6 ч), однако было в 2 раза меньше, чем при воздействии супернатанта бифидобактерий и в 5-10 раз уступало показателям экспрессии генов, кодирующих TNF α после контакта с живыми *B. longum* GT15.

Выраженный эффект на индукцию TNF α продемонстрировали живые клетки штамма *E. faecium* L-3 (рис. 1В). Существенное возрастание индукции продукции данного цитокина было обнаружено уже после двух часов коинкубации ТНР-1 клеток с живыми энтерококками, и показатели экспрессии данного цитокина были сопоставимы по величине с данными, полученными при исследовании живых бифидобактерий. В то же время, в отличие от последних, *E. faecium* незначительно увеличивали экспрессию IL-8 и IL-10, а супернатант культуры энтерококка практически не оказывал влияния на экспрессию анализируемых цитокинов.

Оценка иммуномодулирующего эффекта пробиотиков при коррекции дисбиоза

Дисбиоз кишечника крыс был индуцирован введением анитимикробных препаратов. В дальнейшем проводилось сравнение микробиоты

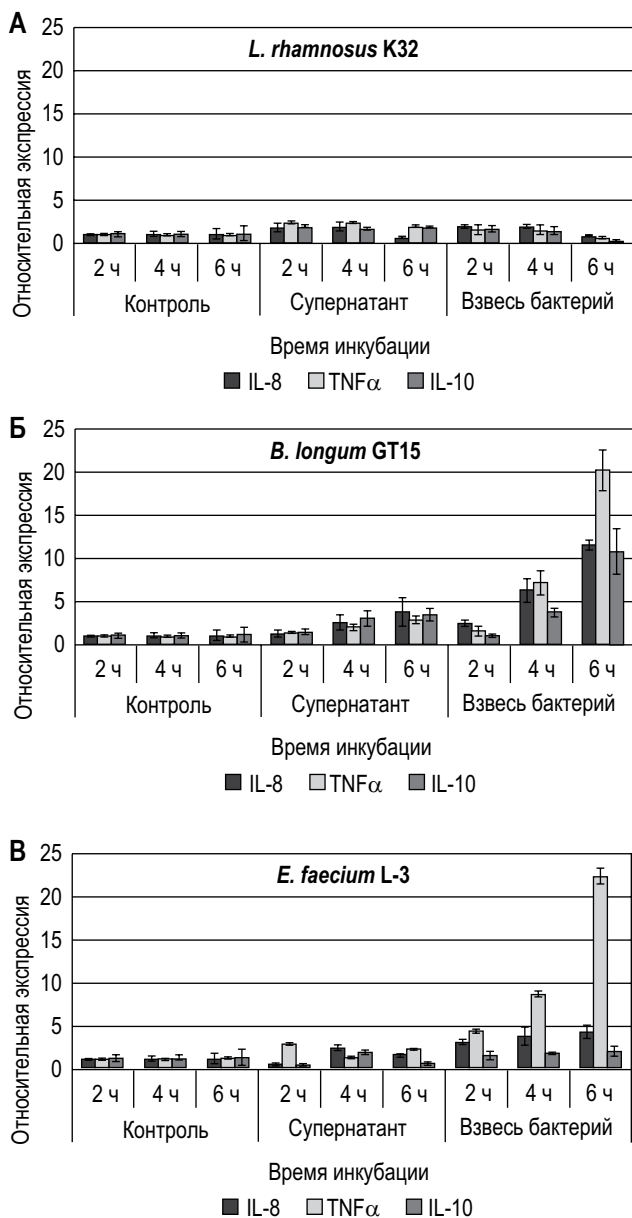


Рисунок 1. Изменение экспрессии генов цитокинов в клетках линии THP-1 при коинкубации с супернатантом и взвесью бифидобактерий (А), лактобацилл (Б) и энтерококков (В) через 2, 4 и 6 часов

Примечание. Данные представлены в виде средних значений для трех экспериментов ± стандартные отклонения. Для подтверждения различий между образцами использовали критерий Манна–Уитни ($P < 0,05$).

и цитокинового статуса на 9-й день исследования животных различных групп, которым вводили лактобациллы, бифидобактерии или энтерококки с целью коррекции нарушений микробиоты. Контрольные здоровые (К1) или животные с дисбиозом кишечника (К2) не получали пробиотиков.

Изменения микробиоты

При сравнении состава микробиоты после приема пробиотических бактерий при помощи

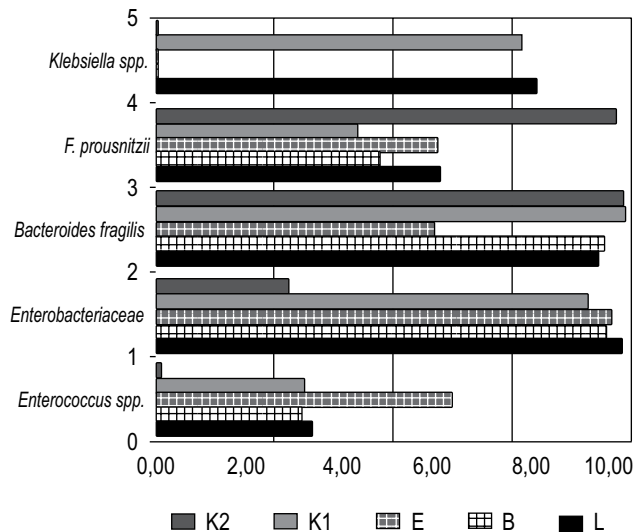


Рисунок 2. Количественное содержание отдельных представителей микробиоты после введения пробиотиков крысам с кишечным дисбиозом

Примечание. Представлены результаты исследования фекалий методом ПЦР в режиме реального времени.

По оси абсцисс: содержание бактерий в lg КОЕ/г. Группа К1 – после введения антимикробных препаратов и фосфатного буфера. Группа К2 – intactные животные (введены вода, затем фосфатный буфер). Группы Группы L, В и Е – после введения антимикробных препаратов, животные получали пробиотики: *L. rhamnosus* K32, *B. longum* GT15 или *E. faecium* L-3, соответственно.

ПЦР-РВ и культуральных методов не удалось выявить различий в содержании лактобацилл и бифидобактерий в кишечнике животных, их количество незначительно варьировало в пределах 9,0-10,0 lg КОЕ/г. Однако были обнаружены различия между группами по другим видам бактерий (рис. 3). Так, содержание *Enterococcus sp.* в фекалиях группы Е было на 1,0-1,2 lg КОЕ/г больше, чем у остальных животных. Важно также, что у крыс из группы К1 отмечался высокий уровень содержания грамотрицательных бактерий, принадлежащих к семейству *Enterobacteriaceae* (*Enterobacter sp.*, *Acinetobacter sp.*, *Klebsiella sp.* и атипичных эшерихий). После воздействия пробиотических штаммов содержание этих бактерий было низким, и только в группе L были обнаружены клебсиеллы в количестве более 5,3 lg КОЕ (как и в группе К1). В то же время обращало на себя внимание снижение количества представителя семейства *Clostridiaceae* *Faecalobacterium prousnitzii* в фекалиях у всех крыс по сравнению с группой К2. Было выявлено высокое (8,1-9,0 lg КОЕ/г) содержание этих бактерий в группе К2 и лишь частичное восстановление (2,2-6,0 lg КОЕ/г) после отмены антимикробных препаратов у остальных крыс. У животных, получавших лактобациллы и энтерококки, содержание *F. prousnitzii* было выше, чем в группах В и К1

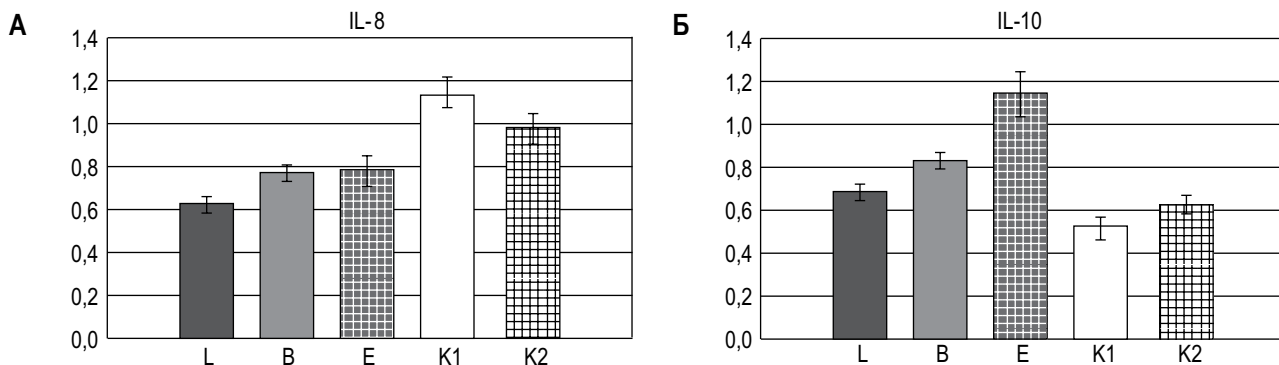


Рисунок 3. Уровень экспрессии IL-8 (А) и IL-10 (Б) в брыжеечных узлах крыс различных групп

Примечание. По оси ординат: IL-8/ β актин, IL-10/ β актин в условных единицах. Группа K1 – после введения антимикробных препаратов и фосфатного буфера. Группа K2 – интактные животные (введены вода, затем фосфатный буфер). Группы L, B и E – после введения антимикробных препаратов, животные получали пробиотики: *L. rhamnosus* K32, *B. longum* GT15 или *E. faecium* L-3, соответственно.

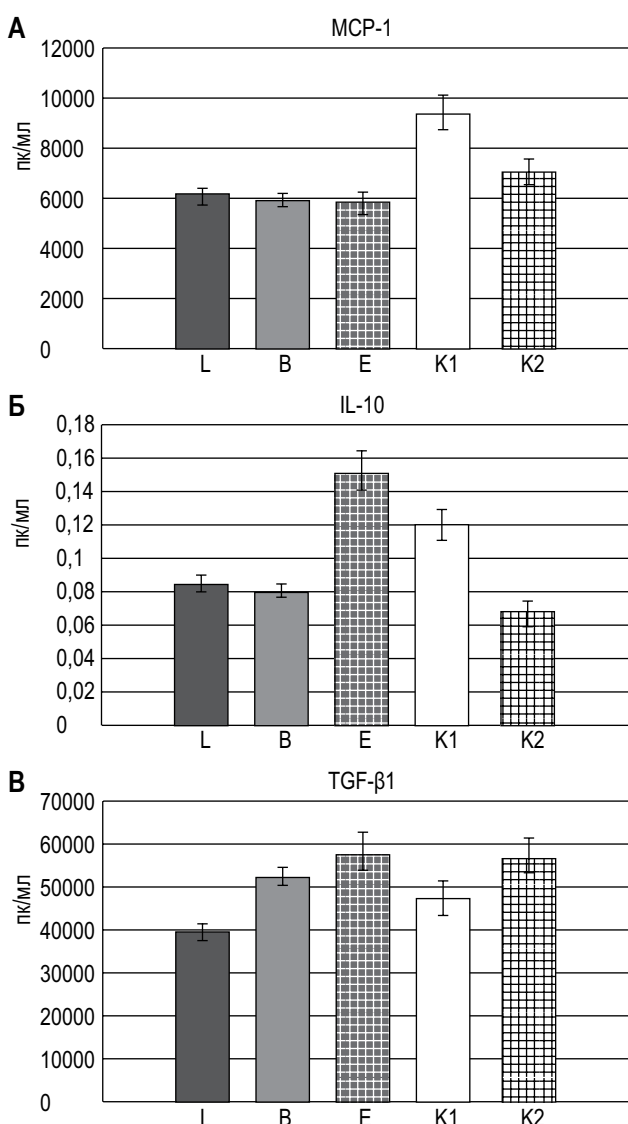


Рисунок 4. Содержание в сыворотке крови крыс различных групп MCP-1 (А), IL-10 (Б), TGF- β 1 (В)

Примечание. Группа K1 – после введения антимикробных препаратов и фосфатного буфера. Группа K2 – интактные животные (введены вода, затем фосфатный буфер). Группы L, B и E – после введения антимикробных препаратов, животные получали пробиотики: *L. rhamnosus* K32, *B. longum* GT15 или *E. faecium* L-3, соответственно.

(рис. 2). Также было отмечено снижение количества *Bacteroides fragilis* после введения энтерококков.

Экспрессия цитокинов в мезентериальных узлах

В данном исследовании для оценки иммуномодулирующих свойств пробиотических бактерий по аналогии с анализом в системе *in vitro* проводилась оценка экспрессии генов, обеспечивающих продукцию трех цитокинов: TNF α , IL-8 и IL-10.

При помощи ОТ-ПЦР показано (рис. 3А), что экспрессия IL-8 достоверно увеличивалась только в группе K1. Стимуляция продукции TNF α происходила во всех группах в одинаковой степени (данные не показаны).

В то же время выявлена более выраженная экспрессия генов, кодирующих IL-10 в клетках мезентериальных узлов крыс, получающих энтерококки и бифидобактерии (рис. 3Б).

Исследование содержания цитокинов в сыворотке крови

При исследовании содержания цитокинов в сыворотке после воздействия различных пробиотических штаммов (рис. 4) были выявлены различия при сравнении как с контрольными группами, так и при анализе проб, взятых из групп L, B, E. Маркер воспаления цитокин MCP-1 был выявлен в высоких концентрациях только в группе K1, у животных, не получавших пробиотик. Максимальное содержание противовоспалительных цитокинов было выявлено в группе E (IL-10) и TGF- β группы E и B.

Обсуждение

В данной работе проведено сравнительное исследование иммуномодулирующих свойств пробиотических штаммов *Bifidobacterium longum* GT15, *Lactobacillus rhamnosus* K32 и *Enterococcus faecium* L-3. Геномы всех трех исследуемых штаммов полностью просеквенированы и депонированы в GenBank, что важно для изучения природы тонкого взаимодействия этих бактерий с организмом млекопитающих и его микро-

биотой при лечении различных заболеваний. В штаммах *B. longum* GT15 в геноме выявлены гены, обеспечивающие продукцию бактериоцинов (epicidin 280), а также гены компонентов внешней мембраны, пилей и экзополисахаридов, участвующие в модуляции иммунной системы [12, 13, 17, 19].

В геноме штамма *E. faecium* L-3 также обнаружены гены, обеспечивающие продукцию бактериоцинов (А, В, EpxA, EpxB и лактобина), четырех белков, участвующих в синтезе энтерококковых экзополисахаридов и четырех белков, необходимых для формирования фимбрий. В геноме *Lactobacillus rhamnosus* K32 не удалось обнаружить генов, кодирующих ранее описанные бактериоцины и поверхностные белки с иммуномодулирующими свойствами.

Наличие перечисленных генов антимикробных пептидов, у исследуемых в данной работе штаммов бифидобактерий и энтерококков, вероятно, обеспечивало проявление их высокой антимикробной активности по отношению к микроорганизмам, заселяющим кишечник при дисбиозе. Представители микробиоты, а также сами пробиотические бактерии, у которых выявлен ряд генов, кодирующих белки, способные взаимодействовать с рецепторами иммунной системы или регуляторными молекулами, по-видимому, оказывают существенное влияние на иммунную систему организма хозяина. Это было доказано в настоящей работе при оценке воздействия рассматриваемых пробиотических штаммов бактерий на продукцию цитокинов, на двух взаимодополняющих моделях: культуры ткани человека и лабораторных животных (крыс) с индуцированным дисбиозом.

Важнейшая роль цитокинов в регуляции иммунного ответа к настоящему времени хорошо изучена и доказана. Так, повышение концентрации провоспалительных IL-1, IL-6, IL-8, TNF α цитокинов играет ведущую роль в иммунной регуляции и коррелирует с наличием кишечной патологии [9, 10, 39]. Увеличение продукции IL-10 имеет существенное значение в сохранении кишечного гомеостаза, вызывает супрессию адаптивного и врожденного иммунных ответов, участвует в тонкой регуляции взаимоотношений между отдельными звеньями иммунной системы [25].

В качестве сравнительно простой модельной тест-системы для изучения иммуномодулирующих свойств пробиотических штаммов была выбрана линия клеток ТНР-1. Она представляет собой промоноциты, выделенные при острой промоноцитарной лейкемии человека, способные дифференцироваться в макрофаги или дендритные клетки [2, 42]. ТНР-1 линия клеток дает выраженное изменение в экспрессии цитокинов в ответ на стимуляцию провоспалительным фактором, ЛПС (компонент клеточной стенки грамотрицательных бактерий). ТНР-1 клетки имеют

большое сходство с популяцией макрофагов в желудочно-кишечном тракте, реагирующих на присутствие бактерий и регулирующих иммунные реакции организма. Схожий набор рецепторов и способность продуцировать те же цитокины, что и макрофаги позволяют использовать линию ТНР-1 для выявления *in vitro* иммуномодулирующей активности у пробиотических бактерий [6, 7].

В представленной работе проведено изучение способности пробиотических бактерий *B. longum* GT15, *L. rhamnosus* K32, *E. faecium* L-3 индуцировать экспрессию цитокинов IL-8, TNF α и IL-10 в клетках ТНР-1 на фоне воздействия ЛПС стимулирующего в системе *in vivo* воспалительные реакции за счет взаимодействия с TLR4 рецепторами эукариотических клеток.

Наиболее выраженное иммуномодулирующее действие в рамках используемой тест-системы оказывали суспензии живых бактерий *B. longum* GT15 и *E. faecium* L-3. Воздействие живых *B. longum* GT15 приводило к увеличению экспрессии одновременно IL-8, TNF α и IL-10 цитокинов, а *E. faecium* L-3 – к увеличению количества мРНК, кодирующей TNF α . Культура лактобацилл оказывала слабый эффект, в отличие от ее супернатанта, проявившего слабое, но статистически достоверное стимулирующее действие на продукцию TNF α .

Условия проведения эксперимента с исследованием динамики экспрессии цитокинов в течение 2, 4 и 6 часов коинкубации пробиотиков с индуцированной ЛПС культурой клеток позволили выявить зависимость иммунных реакций от времени воздействия пробиотиков. В данных условиях воздействие было кратковременным, и эффект пробиотиков к 6 часам наблюдений продолжал нарастать. Ранее уже было отмечено, что на специфический иммуномодулирующий эффект пробиотиков в системе *in vitro* оказывают влияние культуры клеток, каждая из которых может в большей степени продуцировать специфические цитокины [4, 26, 37]. Также было указано, что важное значение для оценки влияния пробиотиков на иммунный ответ имеют продолжительность, условия коинкубации, внесенная доза и фаза роста пробиотической культуры [8, 14, 27, 41].

В ходе исследования был выявлен феномен одновременной стимуляции *B. longum* GT15 про- и противовоспалительных цитокинов. Это согласуется с данными, полученными в работе Medina et al. [28], в которой было показано, что живые клетки всех изученных штаммов *B. longum* вызывали значительное повышение продукции IL-10 и TNF α в мононуклеарных клетках периферической крови. Аналогичный феномен был отмечен при исследовании иммуномодулирующих эффектов некоторых штаммов энтерококков, лактобацилл и бифидобактерий на экспериментальных моделях и при терапии различных

заболеваний, что отражено в ряде публикаций и обзоров [4, 14, 26, 35, 37]. Он может быть объяснен многофункциональностью действия каждого из цитокинов и сложностью регуляторных реакций при иммунном ответе, в том числе в ответ на введение пробиотиков.

Энтерококки и продукты метаболизма лактобацилл в системе *in vitro* стимулировали только экспрессию одного из самых многофункциональных провоспалительных цитокинов TNF α , синтезируемого в основном моноцитами и макрофагами. Этот цитокин активирует универсальный фактор транскрипции NF- κ B, контролирующий экспрессию генов иммунного ответа, апоптоза и клеточного цикла. Нельзя исключить, что выявленное в системе *in vitro* увеличение экспрессии TNF α , обусловленное бифидобактериями, энтерококками и метаболитами лактобацилл, а в случае с бифидобактериями дополнительная экспрессия IL-8 и IL-10, происходит и в условиях *in vivo*, как проявление феномена «физиологического воспаления кишечника». В основе этого феномена лежит слабая, но устойчивая стимуляция провоспалительных цитокинов для подготовки эпителия кишечника к возможному взаимодействию с потенциально патогенными микроорганизмами.

Несколько иную картину влияния пробиотиков на иммунитет можно получить при проведении исследований на лабораторных животных, контролируя их воздействие на организм и его микробиоту. Известно, что и сама микробиота, которая трактуется в настоящее время как новый сателлитный орган [10], и пробиотические бактерии своими рецепторами, компонентами поверхностных структур, метаболитами, секретруемыми неповрежденными клетками и высвобождающимися при их гибели, оказывают мощное воздействие на иммунную систему.

В работе была использована модель экспериментального антибиотико-ассоциированного дисбиоза кишечника у крыс [16]. Воздействие ампициллином и метронидазолом приводило к нарушениям в составе микробиоты кишечника крыс, компенсация которых после введения различных пробиотиков и частично происходящая спонтанно была неравноценной. Так, чрезмерный рост грамотрицательных бактерий, и прежде всего клебсиелл, был отмечен только у животных, не получавших пробиотиков (группа K2) или после воздействия лактобацилл. Возможно, низкая антагонистическая активность *L. rhamnosus* K32 по отношению к энтеробактериям связана с отсутствием у этих лактобацилл, в отличие от бактериоциногенных штаммов пробиотических энтерококков и бифидобактерий, способности продуцировать антимикробные пептиды, ингибирующие рост клебсиелл и других грамотрицательных бактерий.

Особого внимания заслуживают *F. prausnitzii*, комменсал кишечника млекопитающих, наличие которого многие авторы связывают с благоприятным прогнозом в развитии и течении неспецифического язвенного колита и болезни Крона [29, 32]. Выявлена корреляция между наличием в желудочно-кишечном тракте млекопитающих *F. prausnitzii* (так же как *Butyricoccus pulliaecorum* и других продуцирующих бутират бактерий) и снижением уровня TNF α и IL-8, а также увеличением продукции IL-10 [15, 29]. Следовательно, можно предположить, что одной из причин проявления противовоспалительного эффекта *B. longum* GT15 и *E. faecium* L-3 является их действие на микробиоту, при котором было отмечено увеличение содержания *F. prausnitzii*. Обращало на себя внимание отсутствие стимуляции энтерококками продукции IL-10 при кратковременном воздействии на культуру макрофагоподобных клеток.

Влияние *E. faecium* L-3 в системе *in vivo* оказалось более эффективным. Это проявилось в более выраженной, чем в остальных группах животных (исключая группу В), экспрессии генов, кодирующих данный цитокин, в брыжеечных узлах крыс групп В и Е и высоком содержании IL-10 в сыворотке животных группы Е.

О проявлении противовоспалительного эффекта штаммов *E. faecium* L-3 и *B. longum* GT15 при введении животным после индукции дисбиоза свидетельствовали: низкий уровень экспрессии и содержания в сыворотке провоспалительных цитокинов IL-8, TNF α , MCP-1, а также увеличение в сыворотке крови крыс из группы Е и В противовоспалительного цитокина TGF- β .

Исследование иммуномодулирующих эффектов пробиотиков на модели экспериментального дисбиоза позволило дать более объективную картину иммунного ответа при сравнительно длительном воздействии пробиотиков. Это было не 6-часовое наблюдение при коинкубации пробиотиков с макрофагоподобными клетками, а 5-дневное воздействие на желудочно-кишечный тракт, кишечную микробиоту и на весь организм в целом. Принципиально важным является возможность попадания биологически активных субстанций (короткоцепочечных жирных кислот, участков ДНК, коротких пептидов экзополисахаридов и других потенциальных иммуностимулирующих молекул) в кровотоки [20].

С использованием культуры клеток и модели экспериментального кишечного дисбиоза показано, что пробиотические бактерии могут поддерживать баланс про- и противовоспалительных цитокинов, предупреждая интенсивный воспалительный ответ на собственное присутствие и проявляя антагонистическую активность по отношению к патогенным микроорганизмам. Особенности описанных эффектов и полиари-

зация иммунного ответа в сторону стимуляции иммунных реакций или их ингибирования являются штаммоспецифичными. Они могут быть оценены в полной мере только при комплексном подходе с использованием различных условий проведения взаимодополняющих друг друга экспериментов *in vitro* и *in vivo*.

В данной работе выявлены индивидуальные особенности иммуномодулирующих эффектов трех пробиотических штаммов, оказывающих неодинаковое влияние на микробиоту кишечника. Выявленные особенности их иммуномодулирующего действия позволяют предположить, что штаммы *E. faecium* L-3 и *B. longum* GT15 могут

быть рассмотрены как эффективные терапевтические препараты для обеспечения коррекции аутоиммунных, аллергических нарушений иммунной системы, а в случае возникновения дисбиотических состояний как средства, способствующие быстрому восстановлению микробиоты и стабилизации гомеостаза организма.

Возможно, использование подобных пробиотиков, индуцирующих продукцию ИЛ-10 клетками организма хозяина, станет альтернативой применению рекомбинантных пробиотических штаммов лактобацилл и лактококков, в геном которых введены гены, обеспечивающие его продукцию [22, 40].

Список литературы / References

1. Бельтюков П.П., Абдурасулова И.Н., Тарасова Е.А., Суворов А.Н., Захарова Е.Т., Соколов А.В., Карпенко М.Н., Ермоленко Е.И. Исследование влияния пробиотических эшерихий и энтерококков на иммунную систему здоровых крыс // Ученые записки Санкт-Петербургского государственного медицинского университета имени академика И.П. Павлова, 2009. Вып. 16, № 2. С. 54-58. [Belyukov P.P., Abdurasulova I.N., Tarasova E.A., Suvorov A.N., Zakharova E.T., Sokolov A.V., Karpenko M.N., Ermolenko E.I. Influence of probiotic *Escherichia* and *Enterococci* on the immune system of healthy rats. *The Record of the I.P. Pavlov St. Petersburg State Medical University*, 2009, Vol. 16, no. 2, pp. 54-58. (In Russ.)]
2. Волошина Е.В., Зубова С.В., Прохоренко С.В. Сравнение эффектов разных хемотипов липополисахаридов *Escherichia coli* и *Salmonella* на синтез TNF α и IL-6 макрофагоподобными клетками ТНР-1 // Медицинская иммунология, 2009. Т. 11, № 6. С. 509-514. [Voloshina E.V., Zubova S.V., Prokhorenko S.V. A comparison of different lipopolysaccharide chemotypes from *Escherichia coli* and *Salmonella* upon synthesis of TNF α and IL-6 by macrophage-like ТНР-1 cells. *Meditsinskaya Immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2009, Vol. 11, no. 6, pp. 509-514. doi: 10.15789/1563-0625-2009-6-509-514 (In Russ.)]
3. Грачева Н.М., Бондаренко В.М. Пробиотические препараты в терапии и профилактике дисбактериоза кишечника // Инфекционные болезни, 2004. № 2. С. 53-58. [Gracheva N.M., Bondarenko V.M. Probiotics in therapy and prevention of intestinal dysbiosis. *Infectionnyye bolezni = Infectious Diseases*, 2004, no. 2, pp. 53-58. [In Russ.]
4. Ермоленко Е.И. Иммуномодулирующее действие пробиотических бактерий при заболеваниях желудочно-кишечного тракта // Вестник Санкт-Петербургского университета, Серия 11: Медицина, 2014. Вып. 4. С. 5-18. [Ermolenko E.I. Immunomodulatory effect of probiotic bacteria in case of the diseases of gastrointestinal tract. *Bulletin of St. Petersburg State University*, 2014, Vol. 4, pp. 5-18. (In Russ.)]
5. Ермоленко Е.И., Донец В.Н., Дмитриева Ю.В., Ильясов Ю.Ю., Суворова М.А., Громова Л.В. Влияние пробиотических энтерококков на функциональные характеристики кишечника крыс при дисбиозе, индуцированном антибиотиками // Вестник Санкт-Петербургского университета, Серия 11: Медицина, 2009. Вып. 1. С. 157-167. [Ermolenko E.I., Donets V.N., Dmitrieva Y.V., Ilyasov Yu.Yu., Suvorov M.A., Gromova L.V. Influence of probiotic enterococci on functional characteristics of rat bowel under disbiosis induced by antibiotics. *Bulletin of St. Petersburg State University*, 2009, Vol. 1, pp. 157-167. (In Russ.)]
6. Федорова И.А., Даниленко В.Н. Иммуногенные свойства пробиотического компонента микробиоты желудочно-кишечного тракта человека // Успехи современной биологии, 2014. Т. 134, № 2. С. 99-110. [Fedorova I.A., Danilenko V.N. Immunogenic Properties of a Probiotic Component of the Human Gastroenteric Tract Microbiota. *Uspekhi sovremennoy biologii = Biology Bulletin Reviews*, 2014, Vol. 134, no. 2, pp. 99-100. (In Russ.)]
7. Auwerx J. The human leukemia cell line, ТНР-1: a multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. *Experientia*, 1991, Vol. 47, pp. 22-31.
8. Baken K.A., Ezendam J., Gremmer E.R., de Klerk A., Pennings J.L.A., Matthee B., Peijnenburg A.A.C.M., van Loveren H. Evaluation of immunomodulation by *Lactobacillus casei* Shirota: Immune function, autoimmunity and gene expression. *Int. J. Food Microbiol.*, 2006, Vol. 112, no. 1, pp. 8-18.
9. Bassaganya-Riera J., Viladomiu M., Pedragosa M., De Simone C., Carbo A., Shaykhtudinov R., Jobin C., Arthur J.C., Corl B.A., Vogel H., Storr M., Hontecillas R. Immunoregulatory mechanisms underlying prevention of colitis-associated colorectal cancer by probiotic bacteria. *PLoS One*, 2012, Vol. 7, no. 4, e34676.
10. Bengmark S. Gut microbiota, immune development and function. *Pharmacological Research*, 2013, Vol. 69, pp. 87-113.
11. Caselli M., Vaira D., Cassol F., Calò G., Vaira G., Papini F., Holton J. Recombinant probiotics and their potential in human health. *Int. J. Probiotics Prebiotics*, 2012, Vol. 7, pp. 53-58.

12. Collado M.C., Gueimonde M., Hernández M.S., Salminen S. Adhesion of selected Bifidobacterium strains to human intestinal mucus and the role of adhesion in enteropathogen exclusion. *Journal of Food Protection*, 2005, Vol. 12, pp. 2502-2720.
13. Cronin, M., Ventura M., Fitzgerald G.F. and van Sinderen D. Progress in genomics, metabolism and biotechnology of bifidobacteria. *Int. J. Food Microbiol.*, 2011, Vol. 149, pp. 4-18.
14. de Moreno de LeBlanc, A., LeBlanc J. G., Perdigon, G., Miyoshi, A., Langella P., Azevedo V., Sesma, F. Oral administration of a catalase-producing *Lactococcus lactis* can prevent a chemically induced colon cancer in mice. *J. Med. Microbiol.*, 2008, Vol. 57, pp. 100-105.
15. Eeckhaut V., Machiels K., Perrier C., Romero C., Maes S., Flahou B., Steppe M., Haesebrouck F., Sas B., Ducatelle R., Vermeire S., Van Immerseel F. *Butyricoccus pullicaecorum* in inflammatory bowel disease. *Gut*, 2013, Vol. 62, no. 12, pp. 1745-1752.
16. Ermolenko E., Gromova L., Borschev Y., Voeikova A., Ermolenko K., Gruzdkov A., Suvorov A. Influence of different probiotic lactic acid bacteria on microbiota and metabolism of rats with dysbiosis. *Bioscience of Microbiota, Food and Health*, 2013, Vol. 32, no. 2, pp. 41-49.
17. Fanning S., Hall L.J., Cronin M., Zomer A., MacSharry J., Goulding D., Motherway M.O., Shanahan F., Nally K., Dougan G., van Sinderen D. Bifidobacterial surface-exopolysaccharide facilitates commensal-host interaction through immune modulation and pathogen protection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2012, Vol. 109, no. 6, pp. 2108-2113.
18. Foligne B. A Key Role of Dendritic Cells in Probiotic Functionality. *PLoS One*, 2007, Vol. 2, no. 3, e313.
19. Foroni E., Serafini F., Amidani D., Turroni F., He F., Bottacini F., O'Connell M.M., Viappiani A., Zhang Z., Rivetti C., van Sinderen D., Ventura M. Genetic analysis and morphological identification of pilus-like structures in members of the genus *Bifidobacterium*. *Microbiol. Cell Factories*, 2011, Vol. 10, pp. 1-13.
20. Galdeano C.M., de Moreno de Blance A., Vinderola G., Bonet M.E., Perdigon G. Proposed model: mechanisms of immunomodulation induced by probiotic bacteria. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2007, Vol. 14, no. 5, pp. 484-492.
21. Hardy H., Harris J., Lyon E., Beal J., Foey A.D. Probiotics, Prebiotics and Immunomodulation of Gut Mucosal Defences: Homeostasis and immunopathology. *Nutrients*, 2013, Vol. 5, pp. 1869-1912.
22. Huijbregtse I.L., Zaat S.A., Kapsenberg M.L., Maria A. Sartori da Silva M.A.S., Peppelenbosch M.P., Sander J.H., van Deventer S.J.H., Braat H. Genetically modified *Lactococcus lactis* for delivery of human interleukin-10 to dendritic cells. *Gastroenterology Research and Practice*, 2012, Article ID 639291, 7 p.
23. Jones S. and Versalovic J. Probiotic *Lactobacillus reuteri* biofilms produce antimicrobial and anti-inflammatory factors. *BMC Microbiology*, 2009, Vol. 9, p. 35.
24. Khokhlova E.V., Smeianov V.V., Efimov B.A., Kafarskaia L.I., Pavlova S.I. Anti-inflammatory properties of intestinal *Bifidobacterium* strains isolated from healthy infants. *Microbiol. Immunol.*, 2012, Vol. 56, no. 1, pp. 27-39.
25. Kole A., Maloy K.J. Control of intestinal inflammation by interleukin-10. *Curr Top Microbiol Immunol.*, 2014, Vol. 380, pp. 19-38.
26. Lan J.-G., Cruickshank S.M., Singh J.C.I., Farrar M., Lodge J.P.A., Felsburg P.J., Carding S.R. Different cytokine response of primary colonic epithelial cells to commensal bacteria. *World Gastroenterol.*, 2005, Vol. 11, no. 22, pp. 3375-3384.
27. Maassen C., Claassen E. Strain-dependent effects of probiotic lactobacilli on EAE autoimmunity. *Vaccine*, 2008, Vol. 26, no. 17, pp. 2056-2057.
28. Medina M., Izquierdo E., Ennahar S., Sanz Y. Differential immunomodulatory properties of *Bifidobacterium longum* strains: relevance to probiotic selection and clinical applications. *Clin. Exp. Immunol.*, 2007, Vol. 150, no 3, pp. 531-538.
29. Miquel S., Martín R., Rossi O., Bermúdez-Humarán L., Chatel J., Sokol H., Thomas M., Wells J., Langella P. Faecalibacterium prausnitzii and human intestinal health. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2013, Vol. 16, no. 3, pp. 255-261.
30. Ouwehand A.C., Salminen S., Isolauri E. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2002, Vol. 82, pp. 279-289.
31. Pagnini C., Saeed R., Bamias G., Arseneau K.O., Pizarro T.T., Cominelli F. Probiotics promote gut health through stimulation of epithelial innate immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2010, Vol. 107, no. 1, pp. 454-459.
32. Qiu X., Zhang M., Yang X., Hong N., Yu C. Faecalibacterium prausnitzii upregulates regulatory T cells and anti-inflammatory cytokines in treating TNBS-induced colitis. *J. Crohns. Colitis.*, 2013, Vol. 7, pp. 558-568.
33. Saleh M., Elson C.O. Experimental inflammatory bowel disease: insights into the host-microbiota dialog. *Immunity*, 2011, Vol. 34, no. 3, pp. 293-302.
34. Sartor R.B. Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.*, 2006, Vol. 3, pp. 390-407.
35. Silva V. de O., Foureaux R.C., Araujo T.S., Peconick A.P., Zangeronimo M.G., Pereira L.J. Effect of Probiotic Administration on the Immune Response. A Systematic Review of Experimental Models in Rats. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 2012, Vol. 55, no. 5, pp. 685-694.
36. Suvorov A. Gut Microbiota, Probiotics, and Human Health. *Bioscience of Microbiota, Food and Health*, 2013, Vol. 32, no. 3, pp. 81-91.
37. Wang S., Mei Ng L.H., Chow W.L., Lee Y.K. Infant intestinal *Enterococcus faecalis* down-regulates inflammatory responses in human intestinal cell lines. *World J. Gastroenterology*, 2008, Vol. 14, no. 7, pp. 1067-1076.

38. Xu X.R., Liu C.Q., Feng B.S., Liu Z.J. Dysregulation of mucosal immune response in pathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.*, 2014, Vol. 20, no. 12, pp. 3255-3264.
39. Young V.B. The intestinal microbiota in health and disease. *Opin. Gastroenterol*, 2012, Vol. 28, pp. 63-69.
40. Zhi-bing Q., Liang Z., Chen J., Lan R., Jian C. Construction of a recombinant *Lactobacillus* strain expressing IL-10. *Infect. Immun.*, 2004, Vol. 72, no. 9, pp. 5308-5314.
41. Zhipeng L., Guangyu L., Hanlu L., Jiaping Z., Yi J., Fuhe Y. The analysis of the impacting factors of probiotics on immune responses. *African Journal of Microbiology Research*, 2012, Vol. 6, no. 11, pp. 2735-2743.
42. Zughhaier S.M., Zimmer S.M., Datta, A., Carlson, R.W., Stephens D.S. Differential induction of the toll-like receptor 4-MyD88-dependent and -independent signaling pathways by endotoxins. *Infect. Immun*, 2005, Vol. 73, pp. 2940-2950.

Авторы:

Аверина О.В. — д.б.н., старший научный сотрудник, лаборатория генетики микроорганизмов ФГБУН «Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова» Российской академии наук, Москва, Россия

Ермоленко Е.И. — д.м.н., заведующий лабораторией биомедицинской микроэкологии, отдел молекулярной микробиологии, ФГБУН «Институт экспериментальной медицины»; профессор кафедры физиологии, медицинский факультета, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Тарасова Е.А. — научный сотрудник, отдел нормальной физиологии, ФГБУН «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Ратушный А.Ю. — студент 5 курса МГУ, ФГБУН «Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова» Российской академии наук, Москва, Россия

Борщев Ю.Ю. — к.б.н., научный сотрудник, отдел молекулярной микробиологии, ФГБУН «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Леонтьева Г.Ф. — к.б.н., ведущий научный сотрудник, отдел молекулярной микробиологии, ФГБУН «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Крамская Т.А. — к.б.н., старший научный сотрудник, отдел молекулярной микробиологии, ФГБУН «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Котылева М.П. — научный сотрудник, отдел молекулярной микробиологии, ФГБУН «Институт экспериментальной медицины»; Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Даниленко В.Н. — д.б.н., профессор, заведующий лабораторией генетики микроорганизмов, ФГБУН «Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова» Российской академии наук, Москва, Россия

Суворов А.Н. — д.м.н., профессор, заведующий отделом молекулярной микробиологии, ФГБУН «Институт экспериментальной медицины»; заведующий кафедрой фундаментальных проблем медицины и медицинской технологии, ФГБУН «Институт экспериментальной медицины»; Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Averina O.V., PhD, MD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Genetics of Microorganisms, N.I. Vavilov Research Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Ermolenko E.I., PhD, MD (Medicine), Head, Laboratory of Biomedical Microecology, Research Institute of Experimental Medicine; Professor, Faculty of Medicine, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

Tarasova E.A., Research Associate, Department of Normal Physiology, Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Ratushnyi A. Yu., Student Moscow State University, Research Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Borshev Yu. Yu., PhD (Biology), Research Associate, Department of Molecular Microbiology, Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Leontieva G.F., PhD (Biology), Leading Research Associate, Department of Molecular Microbiology, Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Kramskaya T.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Department of Molecular Microbiology, Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Kotyleva M.P., Research Associate, Department of Molecular Microbiology, Research Institute of Experimental Medicine; St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

Danilenko V.N., PhD, MD (Biology), Professor, Chief, Laboratory of Genetics of Microorganisms, Research Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Suvorov A.N., PhD, MD (Medicine), Professor, Chief of Department of Molecular Microbiology, Research Institute of Experimental Medicine; head of the Department of Fundamental medicine and medical technologies in Saint Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 25.03.2015

Отправлена на доработку 29.04.2015

Принята к печати 06.07.2015

Received 25.03.2015

Revision received 29.04.2015

Accepted 06.07.2015