

Влияние *Lactobacillus acidophilus* на индукцию эндотоксиновой толерантности культивируемых моноцитов человека

А.Г.Сукиасян, Т.К.Давтян, Ю.Т.Алексанян

НИИ эпидемиологии, вирусологии и медицинской
паразитологии им. А.Б.Алексаняна
0060, Ереван, ул. Худякова, 1
Исследовательский центр "Арменикум"
0084, Ереван, ул. Шерами, 2

Ключевые слова: *Lactobacillus acidophilus*, LPS, IL-10, IL-1 β , моноциты периферической крови человека

Иммунная система не только распознает патогены и отвечает индукцией провоспалительных медиаторов, но способна также подавлять воспаление, которое может вызывать тканевую деструкцию [3]. Показательный пример этого – эндотоксиновая толерантность, которая характеризуется пониженной способностью клеток-мишеней (моноциты, макрофаги) отвечать на активацию повторной дозой липополисахарида (LPS) после первичной экспозиции клеток с этим стимулятором. Эндотоксиновая толерантность выражается в способности клеток продуцировать противовоспалительные цитокины [6]. Моноциты обладают выраженной фагоцитарной функцией. Это самые крупные клетки периферической крови. Они могут поглощать относительно крупные частицы и клетки и, как правило, не погибают после фагоцитоза. Этим они отличаются от нейтрофилов и эозинофилов, способных поглощать лишь относительно небольшие частицы и, как правило, погибающих после фагоцитоза. Моноциты способны фагоцитировать микробы в кислой среде, когда нейтрофилы неактивны [1,2,4].

Проблема стимуляции иммунного ответа является важнейшей в иммунологии. В имеющейся литературе мы встретили лишь единичные данные, касающиеся иммуностимулирующей активности *Lactobacillus acidophilus*, и, поэтому, представляет значительный интерес его дальнейшее углубленное изучение с выяснением различных параметров иммунологической активности [5,7,8].

Целью настоящей работы явилось изучение влияния *Lactobacillus acidophilus* на индукцию эндотоксиновой толерантности культи-

вируемых моноцитов человека путем определения продукции IL-1 β и IL-10 эндотоксин-стимулированными моноцитами.

Материал и методы

Для культивации бактерий *Lactobacillus acidophilus* использовали *Lactobac* агар. После посева переносили чашки Петри в термостат при 37°C на 4 суток. Собирали бактерии, добавляя в чашки фосфатно-буферный раствор (PBS), разводили и переливали в стерильную пробирку. Центрифугировали при 3000 об/мин 7 минут, промывали 2 раза. Определяли мутность специальным устройством с оптической плотностью 600 нм (1.5), что соответствует 5×10^8 клеток в 6 мл. Для культивирования *Lactobacillus acidophilus* применяли питательную среду RPMI-1640, содержащую 10% эмбриональную телячью сыворотку (FCS), 2mM L-глутамина, 1mM пирувата натрия, 100U/мл пенициллина и 100 μ g/ml стрептомицина. При проведении эксперимента использовали 5 пробирок, одна из которых контрольная, куда добавляли лишь моноциты и питательную среду. В остальные 4 пробирки, кроме моноцитов и среды, добавляли также разные концентрации бактерий (3.125×10^3 ; 6.25×10^3 ; 12.5×10^3 ; 25×10^3). Пробирки переносили в термостат при 37°C на ночь. На следующий день собирали супернатанты и хранили в холодильнике при температуре -80°C.

Была использована гепаринизированная периферическая кровь здоровых доноров возрастной группы от 29 до 43 лет. Мононуклеары (моноциты) периферической крови здоровых доноров выделяли с помощью центрифугирования в градиенте плотности (histopaque), содержащей 6% CO₂ (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo), при 1500 об/мин в течение 45 мин при 25°C. Мононуклеары промывали 2 раза PBS и добавляли 1 мл описанной выше питательной среды. Затем инкубировали в термостате при 37°C в течение 50 минут. После окончания инкубации удаляли не адгезирующие на пластик лимфоциты, а к клеткам добавляли либо LPS, либо *Lactobacillus acidophilus* и инкубировали 18 часов при 37°C. Собирали супернатанты и хранили в холодильнике при температуре -80°C. Пробирки отмывали PBS и добавляли питательную среду или LPS и инкубировали в термостате при 37°C 5 часов, после чего снова собирали супернатанты и хранили в холодильнике при температуре -80°C.

Эндотоксиновую толерантность исследовали, измеряя продукцию IL-1 β стимулированными LPS моноцитами в присутствии или отсутствии 2 доз LPS. Моноциты, которые были промыты 3 раза эндотоксин-несодержащим PBS, в количестве 5×10^5 кл/мл культивировали в питательной среде в течение 18 часов в присутствии или отсутствии 100ng/ml LPS или живых *Lactobacillus acidophilus* (1×10^3 кл/мл).

Культуру отмывали 3 раза эндотоксин-несодержащим PBS и далее культивировали в течение 4 часов в присутствии $1\mu\text{g/ml}$ LPS. После этого собирали супернатанты и концентрацию IL-1 β и IL-10 исследовали методом иммуноферментного анализа, используя тест SET-Go (eBioscience).

Статистические данные анализировали методом GraphPad с использованием параметрических и непараметрических методов.

Результаты и обсуждение

Как показали результаты проведенных исследований (рис.1), при стимуляции непримированных моноцитов LPS наблюдается выраженная продукция IL-1 β , в то время как эндотоксиновая стимуляция LPS примированных моноцитов приводит к достоверному снижению продукции IL-1 β культивируемыми моноцитами человека. Исходя из этого, можно заключить, что повторная эндотоксиновая стимуляция моноцитов индуцирует эндотоксиновую толерантность моноцитов.

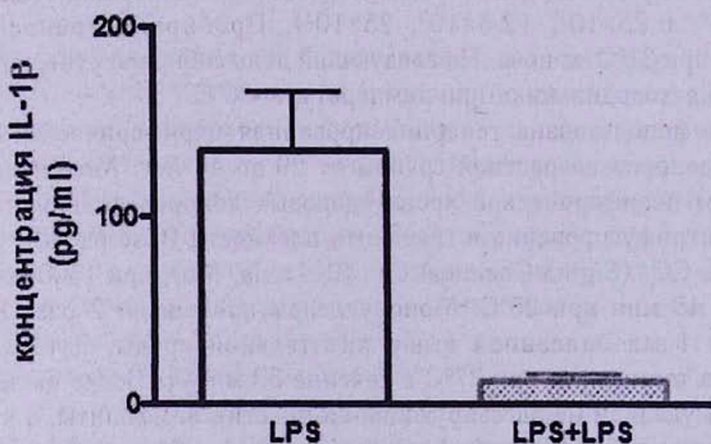


Рис.1. Индукция толерантности культивируемых моноцитов человека

На рис.2 представлены результаты исследования способности живых бактерий *Lactobacillus acidophilus* индуцировать эндотоксиновую толерантность моноцитов периферической крови человека. Как видно из приведенных данных, примированные *Lactobacillus acidophilus* моноциты усиливают синтез IL-1 β , в то время как эндотоксиновая стимуляция этих примированных моноцитов сопровождается достоверным снижением продукции IL-1 β .

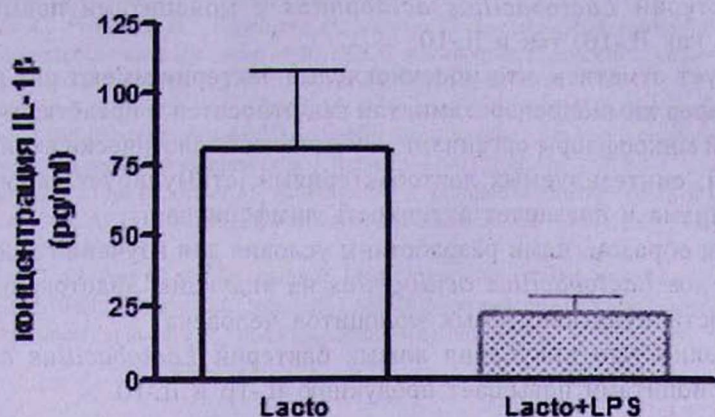


Рис.2. Индукция эндотоксиновой толерантности живыми бактериями *Lactobacillus acidophilus*

Далее нами был исследован возможный механизм воздействия бактерий *Lactobacillus acidophilus* на индукцию эндотоксиновой толерантности моноцитов. Мы предположили, что живые бактерии *Lactobacillus acidophilus* могут стимулировать продукцию противовоспалительных цитокинов моноцитами в течение короткого времени инкубации. Поэтому нами было исследовано влияние бактерий *Lactobacillus acidophilus* на продукцию IL-10 и IL-1β моноцитами периферической крови человека. Результаты проведенных исследований представлены на рис.3.

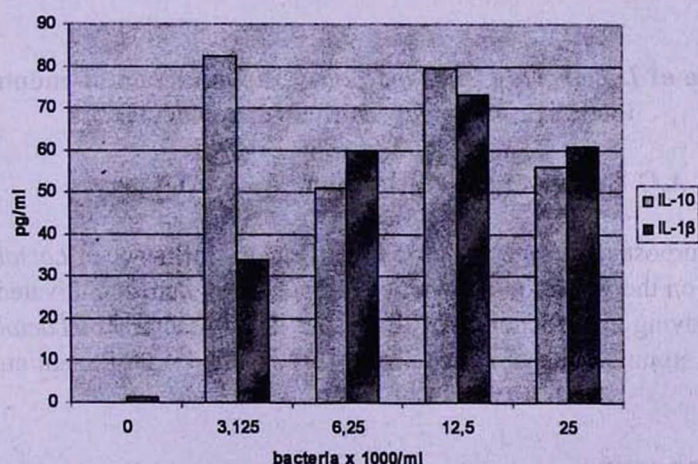


Рис.3. Влияние живых бактерий *Lactobacillus acidophilus* на синтез IL-1β и IL-10 моноцитами периферической крови человека

Из представленных данных следует, что инкубация низких доз живых бактерий *Lactobacillus acidophilus* с моноцитами повышает продукцию как IL-1 β , так и IL-10.

Следует отметить, что молочнокислые бактерии имеют ряд преимуществ перед химиопрепаратами, так как относятся к представителям нормальной микрофлоры организма, и комплекс биологически активных соединений, синтезируемых лактобактериями, стимулирует защитные силы организма и повышает активность лимфоцитов.

Таким образом, нами разработаны условия для изучения влияния различных доз *Lactobacillus acidophilus* на индукцию эндотоксиновой толерантности культивируемых моноцитов человека.

Показано, что инкубация живых бактерий *Lactobacillus acidophilus* с моноцитами повышает продукцию IL-1 β и IL-10.

Поступила 09.08.10

***Lactobacillus acidophilus*-ի ազդեցությունը մարդու կուլտիվացվող մոնոցիտների էնդոտոքսինային տոլերանտության ինդուկցիայի վրա**

Ա.Գ.Սուրիասյան, Տ.Կ.Դավթյան, Յու. Թ. Ալեքսանյան

Սույն աշխատանքի նպատակն է հանդիսացել ուսումնասիրել *Lactobacillus acidophilus*-ի ազդեցությունը մարդու կուլտիվացվող մոնոցիտների կողմից էնդոտոքսինային տոլերանտության ինդուկցիայի վրա, գնահատելով IL-1 β -ի և IL-10-ի պրոդուկցիան: *Lactobacillus acidophilus* բակտերիաները խթանում են մարդու կուլտիվացվող մոնոցիտների կողմից IL-10 և IL-1 β -ի պրոդուկցիան:

Influence of *Lactobacillus acidophilus* on the induction of endotoxin tolerance of human cultivated monocytes

A.G. Sukiasyan, T. K. Davtyan, Yu. T. Aleksanyan

The purpose of this study was to investigate the influence of *Lactobacillus acidophilus* on the induction of endotoxin tolerance by human cultivated monocytes by studying the production of IL-1 β and IL-10. Bacteria of *Lactobacillus acidophilus* stimulate the production of IL-10 and IL-1 β by human cultivated monocytes.

Литература

1. Абелев Г.И. Основы иммунитета. М., 1996.
2. Галактионов В.Г. Иммунология, М., 1998.
3. Hanson C.V., Nishiyama Y., Paul S. Catalytic antibodies and their applications. Curr. Opin.

Biotechnol., 2005, 16(6):631-637.

4. *Jeneway Ch.A., Travers P.* Immunology. 1994.
5. *Klein A., Friedrich U., Vogelsang H., Jahreis G.* Lactobacillus acidophilus 74-2 and Bifidobacterium animalis subsp lactis DGCC 420 modulate unspecific cellular immune response in healthy adults. Eur. J. Clin. Nutr., 2008, 62(5):584-593.
6. *Medvedev A.E., Lentschat A., Wahl L.M., Golenbock D.T., Vogel S.N.* Dysregulation of LPS-induced Toll-like receptor 4-MyD88 complex formation and IL-1 receptor-associated kinase 1 activation in endotoxin-tolerant cells. J. Immunol., 2002; 169:5209-5216.
7. *Paturi G., Phillips M., Jones M., Kailasapathy K.* Immune enhancing effects of Lactobacillus acidophilus LAFTI L10 and Lactobacillus paracasei LAFTI L26 in mice. Int. J. Food Microbiol., 2007, 115(1):115-118.
8. *Paturi G., Phillips M., Kailasapathy K.* Effect of probiotic strains Lactobacillus acidophilus LAFTI L10 and Lactobacillus paracasei LAFTI L26 on systemic immune functions and bacterial translocation in mice. J. Food Prot., 2008, 71(4):796-801.