

УДК: 576.852.24: 599.323.4: 612.112.3

## ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ РОДА *LACTOBACILLUS* НА ФАГОЦИТАРНУЮ АКТИВНОСТЬ МАКРОФАГОВ БЕЛЫХ МЫШЕЙ

© 2011 М.И. Правдивцева<sup>1</sup>, Е.А. Горельникова<sup>1</sup>, О.В. Абросимова<sup>2</sup>, Л.В. Карпунина<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова, Саратов

<sup>2</sup> Саратовский государственный технический университет, Саратов\*

Поступила 03.02.2011

Показано влияние экзополисахаридов молочнокислых бактерий – лаксаранов 1596, 1936, Z, выделенных из культур *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* В-1596, *L. delbrueckii* В-1936 и *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, на фагоцитарную активность альвеолярных и перитонеальных макрофагов мышей. Установлено, что наибольшее стимулирующее воздействие на перитонеальные и альвеолярные макрофаги оказывает лаксаран Z.

**Ключевые слова:** экзополисахариды молочнокислых бактерий, альвеолярные и перитонеальные макрофаги, индекс активации киллинга, индекс завершенности фагоцитоза.

Рядом исследователей показано, что экзополисахариды (ЭПС) бактерий, являясь важнейшими компонентами клеток, обладают антионкологическими, противовирусными, иммуномодулирующими свойствами [7-9]. Сведения по влиянию ЭПС молочнокислых бактерий на процесс фагоцитоза в макрофагах животных практически отсутствуют [5, 6]. В связи с этим целью данной работы явилось изучение влияния экзополисахаридов молочнокислых бактерий рода *Lactobacillus* на активность макрофагов мышей в процессе фагоцитоза *in vitro* стафилококков.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали экзополисахариды молочнокислых бактерий – лаксараны 1596, 1936, Z, которые были выделены нами ранее из *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* В-1596, *L. delbrueckii* В-1936 и *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* по методу [3].

Лаксараны в концентрации 0,006 г/мл вводили белым мышам (самцы, возраст 2 – 3 месяца, масса 20 – 22 грамма) по 0,2 мл внутривенно. Через 1, 3, 5 и 7 суток после иммунизации выделяли альвеолярные (АМФ) и перитонеальные (ПМФ) макрофаги по общепринятым методикам [2]. Животных умерщвляли транслокацией шейных позвонков. При моделировании *in vitro* процесса фагоцитоза использовали суточную культуру *S. aureus* 209-Р, полученную из музея микроорганизмов кафедры микробиологии и физиологии растений Саратовского государственного университета им. Н.Г. Чернышевского. Бактериальные клетки добавляли во взвесь макрофагов в соотношении 50:1 и инкубировали при 37 °С. Активность макрофагов на

разных стадиях фагоцитоза оценивали через 30 минут, 1 и 6 часов инкубации. Фагоцитарный индекс (ФИ), индекс завершенности фагоцитоза (ИЗФ) и индекс активации киллинга (ИАК) определяли по [2]. Статистическую обработку результатов проводили методами вариационной статистики с применением t-критерия Стьюдента [1].

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В процессе исследований было показано, что у контрольной группы мышей, которым не вводили внутривенно ЭПС бактерий активность АМФ в процессе фагоцитоза *S. aureus* 209-Р через 30 минут, 1 час и 6 часов составила 8, 19 и 24% соответственно. Значения ИЗФ (-0,26) свидетельствовали о не завершенности фагоцитарного процесса (табл.1). Наибольшая активность ПМФ контрольной группы мышей была отмечена через 1 час фагоцитоза бактерий и составляла 25%, а к 6 часам количество активных ПМФ снижалось до 9%, при этом ИЗФ был равен 0,64, что позволило говорить о частичном переваривании микробных клеток (табл. 1).

В опытной группе животных, которым вводили лаксаран 1596, было обнаружено изменение активности макрофагов. Через 1 и 3 суток эксперимента активность АМФ была максимальной через 1 час фагоцитоза *in vitro* бактерий и составила 72 и 81% соответственно, что было достоверно выше контроля (табл. 1). Значения ИАК составили 0,85 и 0,52 соответственно, что было выше, чем в контроле. Данные ИЗФ свидетельствовали о частичном переваривании микробных клеток. На 5 и 7 сутки эксперимента максимальная активность АМФ отмечена на начальных этапах фагоцитоза (через 30 минут), а значения ИАК (-0,11 и - 0,09) были ниже контрольных показателей, что свидетельствовало о снижении фагоцитарной активности на завершающих этапах фагоцитоза.

Активность ПМФ в опытной группе животных на 1 сутки эксперимента через 30 минут, 1 час и 6 часов процесса фагоцитоза *S. aureus* 209-Р составляла 43%, 47% и 46%, что достоверно выше кон-

Правдивцева Мария Ивановна, асп., e-mail: prav-85@rambler.ru; Горельникова Елена Александровна, к.б.н., ст. преподаватель, e-mail: novela@mail.ru; Абросимова Ольга Владимировна, к.б.н., доц., e-mail: Olga.Abrosimova@gmail.com; Карпунина Лидия Владимировна, д.б.н., проф., e-mail: karpuninal@mail.ru

трольных значений. На 3 сутки после введения лаксарана 1596 наибольшая активность ПМФ отмечена через 6 часов процесса фагоцитоза *S. aureus* 209-Р. На 5 сутки эксперимента активность ПМФ у белых мышей была на всех этапах процесса фагоцитоза достоверно выше контрольных значений. Максимальная активность зафиксирована через 1

час процесса фагоцитоза. Наибольшая активность ПМФ отмечена на 7 сутки через 30 минут от начала фагоцитоза бактериальных клеток, процесс фагоцитоза был не завершен (табл. 1). Скорость фагоцитоза во все сроки исследования была ниже, чем у контрольных макрофагов, ИАК имел отрицательные значения.

**Таблица 1.** Влияние лаксарана 1596 на альвеолярные и перитонеальные макрофаги в процессе фагоцитоза *S. aureus* 209-Р

Время иммуногенеза	Макрофаги	с <i>S. aureus</i> 209-Р		
		30 минут	1ч	6ч
контроль (без ЭПС)	АМФ	8,00±0,15	19,00±1,22	24,13±2,13
	ПМФ	6,00±0,18	25,13±2,00	9,51±1,00
1 сутки	АМФ	63,11±4,21*	72,12±5,21*	29,23±2,21
	ПМФ	43,23±4,11*	47,51±3,53*	46,31±3,0*
3 сутки	АМФ	72,31±5,13*	81,13±6,0*	60,24±5,0*
	ПМФ	13,32±1,02*	8,00±0,43*	35,41±3,1*
5 сутки	АМФ	43,25±4,31*	27,60±2,21	37,32±3,41
	ПМФ	52,11±4,15*	78,13±5,22*	46,22±4,2*
7 сутки	АМФ	46,22±4,21*	20,11±2,21	27,41±2,31
	ПМФ	43,13±4,11*	13,23±1,23	5,31±0,53*

Примечание: \* - достоверные различия по сравнению с контролем при  $p < 0,05$ .

**Таблица 2.** Влияние лаксарана 1936 на перитонеальные и альвеолярные макрофаги в процессе фагоцитоза *S. aureus* 209-Р

Время иммуногенеза	Макрофаги	с <i>S. aureus</i> 209-Р		
		30 минут	1ч	6ч
контроль (без ЭПС)	АМФ	8,00±0,15	19,00±1,22	24,13±2,13
	ПМФ	6,00±0,18	25,13±2,00	9,51±1,00
1 сутки	АМФ	24,21±2,51*	28,32±3,52	40,32±4,51*
	ПМФ	48,32±3,54*	32,41±4,00*	34,41±4,00*
3 сутки	АМФ	72,14±5,00*	58,42±3,21*	37,26±1,01*
	ПМФ	50,31±4,52*	32,34±2,13*	30,41±2,00*
5 сутки	АМФ	39,14±2,00*	10,11±1,00	7,21±0,41*
	ПМФ	11,22±1,51	42,61±3,21*	6,00±0,34
7 сутки	АМФ	25,31±2,52*	12,43±0,14	18,12±1,25
	ПМФ	11,24±1,04	28,91±2,41	15,21±1,22

Примечание: \* - достоверные различия по сравнению с контролем при  $p < 0,05$ .

**Таблица 3.** Влияние лаксарана Z на альвеолярные и перитонеальные макрофаги в процесса фагоцитоза *S. aureus* 209-Р

Срок иммуногенеза	Макрофаги	Фагоцитарный индекс, (M±m) в %		
		с <i>S. aureus</i> 209-Р		
		30 минут	1ч	6ч
контроль (без ЭПС)	АМФ	8,00±0,15	19,00±1,22	24,13±2,13
	ПМФ	6,00±0,18	25,13±2,00	9,51±1,00
1 сутки	АМФ	47,12±4,11*	19,31±2,44	13,15±2,36
	ПМФ	41,21±4,21*	15,42±1,26	17,23±2,34
3 сутки	АМФ	41,33±4,13*	18,14±1,30	12,41±2,00
	ПМФ	81,34±6,21*	62,41±5,01*	30,22±2,13*
5 сутки	АМФ	80,43±6,14*	31,46±2,31	19,16±2,41
	ПМФ	70,21±5,21*	42,31±3,00	41,32±3,42*
7 сутки	АМФ	22,43±2,11*	10,42±0,14	5,21±0,21*
	ПМФ	31,47±3,25*	28,34±2,17	18,44±1,18*

Примечание: \* - достоверные различия по сравнению с контролем при  $p < 0,05$ .

При изучении активности макрофагов, выделенных от животных, которым вводили лаксаран 1936 в концентрации 0,006 г/мл, показано, что на 1 сутки эксперимента к 6 часам фагоцитоза активность АМФ была равна 40%, что в 1,6 раз выше контрольных значений, процесс фагоцитоза был не завершен (табл. 2). На 3, 5 и 7 сутки наибольшая активность АМФ наблюдалась через 30 минут фагоцитоза *S. aureus* 209-Р. ИЗФ на 3 и 5 сутки иммуногенеза после введения животным лаксарана 1936

был равен 0,3, что позволило говорить о частичном переваривании микробных клеток. На 7 сутки ИЗФ имел отрицательные значения и процесс фагоцитоза был незавершенным. ИАК для АМФ у мышей, которым вводили лаксаран 1936, на 1 и 7 сутки имел отрицательные значения -0,16 и -0,24, соответственно. Скорость фагоцитоза *S. aureus* 209-Р была ниже контрольных значений, в отличие от 3 и 5 суток эксперимента, когда ИАК был выше контроля и равен 0,62 и 0,56, соответственно. Актив-

ность ПМФ у мышей на 1 и 3 сутки достигла максимума через 30 минут процесса фагоцитоза *S. aureus* 209-Р, процесс фагоцитоза был не завершенным (-0,06 и 0,06). На 5 и 7 сутки через 1 час содержание ПМФ составляло 42% и 28%, соответственно и наблюдалось частичное переваривание микробных клеток также как и в контроле. ИЗФ был равен 0,85 и 0,46. ИАК имел отрицательные значения на 1, 3 и 7 сутки. На 5 сутки скорость фагоцитоза была выше, чем в контроле в 1,3 раза (ИАК равен 0,21).

При введении животным лаксарана Z максимальное число активных АМФ во все сроки исследований наблюдалось через 30 минут фагоцитоза *S. aureus* 209-Р, к 6 часам фагоцитоза *S. aureus* 209-Р количество активных АМФ снижалось, что говорило о частичном переваривании микробных клеток. Было отмечено, что активность ПМФ у белых мышей этой группы была максимальной через 30 минут фагоцитоза *S. aureus* 209-Р во все сроки исследований (табл. 3). ИЗФ на 1 сутки эксперимента имел отрицательные значения, фагоцитоз был не завершен. На 3, 5 и 7 сутки наблюдали частичное переваривание микробных клеток. По оценке активации киллинга показано, что скорость фагоцитоза АМФ была выше, чем ПМФ.

Таким образом, как показали экспериментальные данные, лаксараны 1596, 1936 и Z оказывают влияние на активность макрофагов при фагоцитозе *S. aureus* 209-Р. Как видно из полученных результатов наибольшее воздействие на макрофаги оказывал лаксаран Z. Он приводил к увеличению числа активных макрофагов, как альвеолярных, так и перитонеальных, способствовал увеличению переваривания микробных клеток и повышению индекса активации киллинга. Ранее было показано [4], что лаксаран Z оказывает влияние на продукцию провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 $\alpha$ , ФНО- $\alpha$ ) в сыворотке крови мышей при стафилококковой ин-

фекции. Вполне возможно предположить, что лаксаран Z влияет на активность макрофагов через стимуляцию продукции цитокинов и тем самым приводит к увеличению поглотительной функции макрофагов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Зайцев Т.Н. Математический анализ биологических данных. М.: Наука, 1991. 268 с.
2. Кондратьева И.А., Самуилова В.Д. Практикум по иммунологии. М.: МГУ, 2001. 173 с.
3. Полукаров Е.В., Карпунина Л.В., Жемеричкин Д.А. Выделение экзополисахаридов *Lactobacillus delbrueckii subsp. ssp. bulgaricus* при различных условиях культивирования // Вест. Саратов. гос. агр. ун-та. 2009. № 4. С. 20-23.
4. Полукаров Е.В. Экзополисахариды молочнокислых бактерий и их функциональная значимость в организме животных: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. Саратов, 2009. 22 с.
5. Chabot S., Yu H., Leseleuc L. et al. Exopolysaccharide from *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M stimulate TNF, IL-6 and IL-12 in human and mouse cultured immunocompetent cells, and IFN-g in mouse splenocytes // Lait. 2001. № 81. P. 683 – 697.
6. Kitazawa H., Roberts R., Dabour N. et al. Induction of IFN-gamma and IL-1- $\alpha$  production in macrophages stimulates with phosphopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* // Int. J. Food Microbiol. 1996. № 31. P. 99-106.
7. Makino S., Ikegami S., Kano H. Immunomodulatory Effects of Polysaccharides Produced by *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* OLL1073R-1 // J. Dairy Sci. 2006. № 89. P. 2873-2881.
8. Nishimura-Uemura J., Kleerebezem E., Sralowska B. Functional alteration of murine macrophages stimulated with extracellular polysaccharides from *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* OLL1073R-1 // Food Microbiology. 2003. № 20. P. 267-273.
9. Vinderola G., Perdígona A., Duarlec J. Effects of the oral administration of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefirifaciens* on the gut mucosal immunity // Cytokine. 2006. № 36. P. 254-260.

#### ASSESSING THE EXOPOLYSACCHARIDES BY LACTIC ACID BACTERIA OF THE GENUS *LACTOBACILLUS* ON THE PHAGOCYtic ACTIVITY OF MACROPHAGES OF WHITE MICE

© 2011 M.I. Pravdivtseva<sup>1</sup>, E.A. Gorelnikova<sup>1</sup>, O.V. Abrosimova<sup>2</sup>, L.V. Karpunina<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Saratov State Agrarian University in honor of N.I. Vavilov, Saratov

<sup>2</sup>Saratov State Technical University, Saratov

Shows the effect of exopolysaccharides of lactic acid bacteria - laksarans 1596, 1936, Z, isolated from cultures of *Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii* B-1596, *L. delbrueckii* B-1936 and *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*, on the phagocytic activity of alveolar and peritoneal macrophages of mice. Set, that greatest stimulating influence on peritoneal and alveolar macrophages has laksaran Z.

**Key words:** exopolysaccharides lactic acid bacteria, alveolar and peritoneal macrophages, activation code killing, index of completeness of phagocytosis.

---

Pravdivtseva Mariya Ivanovna, Post-graduate Student, E-mail: Prav-85@rambler.ru; <sup>1</sup>Gorelnikova Elena Aleksandrovna, Saratov State Agrarian University in honor of N.I. Vavilov, Eldest Teacher, Candidate of Biology. Sciences. E-mail: novela@mail.ru; <sup>2</sup>Abrosimova Olga Vladimirovna, Professor, Candidate of Biology. Sciences, e-mail: Olga Abrosimova@gmail.com; <sup>1</sup>Karpunina Lidiya Vladimirovna, Professor, Doctor of. Biology. Sciences, e-mail: karpuninal@mail.ru