

УДК 66.047

БАКТЕРИИ *BACILLUS SUBTILIS* – ПРОДУЦЕНТЫ ЦИТОКИНОПОДОБНЫХ ВЕЩЕСТВ**С.А. Лазарев, Е.О. Калинин, С.А. Сходова, Н.А. Михайлова**

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, Россия

Введение

Бактерии *Bacillus subtilis* известны своим положительным влиянием на иммунную систему человека. С одной стороны, данный эффект связан с высокой антагонистической активностью сенной палочки в отношении патогенных микроорганизмов и способностью стимулировать рост индигенной микробиоты. Это приводит к нормализации микробиоценоза, который, в свою очередь, обеспечивает колонизационную резистентность организма. С другой стороны, ряд исследований демонстрирует, что бактерии *B. subtilis* способны повышать неспецифический и специфический иммунный ответ. Введение сенной палочки вызывает активацию макрофагов, что приводит к усилению синтеза и высвобождению провоспалительных цитокинов. В результате развивается комплексный воспалительный ответ, направленный на уничтожение патогена. Кроме того, бактерии *B. subtilis* способствуют активации и пролиферации Т- и В – лимфоцитов за счет прямого действия пептидогликанов и тейхоевых кислот, и усиленного высвобождения цитокинов из макрофагов [1, 2]. Механизмы, с помощью которых сенная палочка активирует макрофаги, продолжают изучаться.

В научной литературе обсуждается вопрос о способности бактерий продуцировать цитокины (цитокино-подобные вещества – ЦПВ) [3]. В ряде исследований показано их наличие в культуральных супернатантах некоторых условно патогенных бактерий: стафилококки, энтерококки, эшерихии и др. [4, 5]. Поскольку *B. subtilis* являются мощными продуцентами различных биологически активных веществ, можно предположить, что их иммуностимулирующее действие обусловлено синтезом ЦПВ.

Цель работы – исследовать метаболиты штаммов *B. subtilis* 3Н и *B. subtilis* 1719 на наличие в них ЦПВ.

Материалы и методы

В работе использовали пробиотические штаммы *B. subtilis* 3Н и *B. subtilis* 1719 из коллекции ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова. Для получения метаболитов проводили глубинное периодическое культивирование. Полученную биомассу отделяли центрифугированием с последующей микрофльтрацией супернатантов [6, 7].

Наличие ЦПВ в культуральных фильтратах определяли на проточном цитометре FC-500 («Beckman Coulter», США) с использованием набора «Human Inflammation 18-Plex Kit» («Antigenix America», США). В качестве контроля использовали стерильную питательную среду.

Результаты представляли средним арифметическим \pm стандартное отклонение ($M \pm SD$). Статистическую обработку результатов проводили с использованием непараметрического критерия «Манна-Уитни» при уровне достоверности $p \leq 0,05$.

Результаты

Из полученных данных, представленных в таблице 1, видно, что в фильтратах культуральных супернатантов *B. subtilis* 3Н и *B. subtilis* 1719 определяются вещества, подобные цитокинам. При этом наличие и концентрация выявленных ЦПВ зависели от штамма сенной палочки. Наиболее активными продуцентами оказались штамм *B. subtilis* 1719, в фильтратах которого идентифицировали IL-1 β в относительно высокой концентрации (1741,25 пкг/мл), IL-1 α (109,55 пкг/мл), IL-31 (52,07 пкг/мл), IL-13 (28,24 пкг/мл) и IL-33 (5,73 пкг/мл). Культура *B. subtilis* 3Н также синтезировала IL-1 β и IL-31. Однако концентрация первого ЦПВ в сравнении со штаммом *B. subtilis* 1719 была значительно ниже – в 9,3 раза (186,43 пкг/мл). Достоверных различий по содержанию в фильтратах цитокина IL-31 не выявили ($p > 0,5$). При этом у штамма *B. subtilis* 3Н определено наличие IL-8 (6,74 пкг/мл), отсутствующего в метаболитах *B. subtilis* 1719. Так как все идентифицированные вещества относятся к провоспалительным цитокинам, можно предположить, что именно за счет их продукции сенная палочка оказывает иммуностимулирующее действие. Ранее, при изучении влияния клеток штамма *B. subtilis* 1719 на показатели иммунитета в опытах *in vivo*, установлено, что однократное пероральное введение культуры приводило к увеличению цитокинов IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IFN γ

в сыворотках лабораторных животных. При этом наиболее значимо возросло количество IL-1 β [2]. Эти данные, на наш взгляд, коррелируют с полученными результатами данного эксперимента и могут подтверждать биологическое действие ЦПВ сенной палочки.

Таблица 1. Концентрация цитокинов в фильтратах *B. subtilis*

Заключение

Цитокин	Концентрация (пкг/мл) (M \pm SD)	
	<i>subtilis</i> 3Н	<i>subtilis</i> 1719
IL-8	6,74 \pm 1,93	0*
MIP-1 β	0	0
IL-4	0	0
TNF α	0	0
IP-10	0	0
IL-17A	0	0
IL-13	0	28,24 \pm 13,55*
MCP-1	0	0
IL-27	0	0
IL-31	39,36 \pm 11,45	52,07 \pm 9,54
IL-33	0	5,73 \pm 1,98*
IL-1 β	186,43 \pm 83,42	1741,25 \pm 167,33*
IL-10	0	0
IL-6	0	0
IL-1 α	0	109,55 \pm 9,29*
IFN γ	0	0
MIP-1 α	0	0

В результате проведенного эксперимента установлено, что пробиотические бактерии *B. subtilis* 3Н и *B. subtilis* 1719 в процессе роста продуцируют штаммоспецифические вещества, подобные цитокинам. Полученные данные открывают дальнейшую перспективу для изучения ЦПВ, синтезируемых бактериями *B. subtilis*. Представляет интерес выявить их сходства / различия с цитокинами макроорганизма и с ЦПВ условно патогенных бактерий, а также изучить возможность их биотехнологического применения.

Примечание. «*» – p \leq 0,05

Литература

1. Савустьяненко А.В. Механизмы действия пробиотиков на основе *Bacillus subtilis*. Актуальная инфектология. 2016, 2(11):35–44.
2. Гатауллин А.Г. Биологические свойства штаммов *Bacillus subtilis*, перспективных для создания новых пробиотиков. Дис. на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Москва, 2005. 131 С.
3. Михайлова Н.А., Воеводин Д.А., Лазарев С.А. Современные представления о про-/эукариотических взаимодействиях организма человека – основа создания нового поколения пробиотических препаратов. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2020, 4:346–355. DOI: 10.36233/0372–9311–2020–97–4–7.
4. Зурочка А.В., Дукардт В.В., Зурочка В.А. Бактерии как продуценты цитокино-подобных веществ. Российский иммунологический журнал. 2017, 11; 3(20):374–376.
5. Зурочка А.В., Зурочка В.А., Фомина Л.О. Оценка цитокиноподобной активности *Staphylococcus aureus* в зависимости от наличия генетических детерминант стафилококкового белка А. Российский иммунологический журнал. 2019, 13; 3(22):1163–1167. DOI: 10.31857/S102872210007247–6
6. Лазарев С.А., Арзуманян В.Г., Михайлова Н.А. Влияние состава питательной среды на прирост биомассы и синтез противомикробных метаболитов пробиотических штаммов *Bacillus subtilis*. Бактериология. 2021, 6(2):38–42. DOI: 10.20953/2500–1027–2021–2–38–42.
7. Lazarev S.A., Mikhailova N.A., Voevodin D.A. The Effect of Biologically Active Substances on *Bacillus subtilis* Growth and Functional activity. KNE life sciences. Vol. 2022. P. 501–506. DOI: 10.18502/kl.v7i1.10472.