

УДК 579.222.3:59.084

DOI: 10.31040/2222-8349-2018-0-3-52-56

**ВЛИЯНИЕ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ
НА ПРОЦЕСС ФАГОЦИТОЗА МАКРОФАГАМИ МЫШЕЙ**

© Г.Т. Урядова, Е.А. Горельникова, Н.А. Фокина, Л.В. Карпунина

Известно, что экзополисахариды (ЭПС) молочнокислых бактерий обладают рядом положительных свойств: противоопухолевым, иммуномодулирующим, противовирусным, антибактериальным. В настоящей работе исследовано влияние экзополисахаридов молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis* В-1662 и *Streptococcus thermophilus* на процесс фагоцитоза. Перитонеальные (ПМФ) и альвеолярные (АМФ) макрофаги выделяли из организма белых мышей через 1, 3, 5 и 7 сутки после введения им экзополисахаридов и моделировали процесс фагоцитоза. В качестве объекта фагоцитоза была использована односуточная культура *Staphylococcus aureus* 209-Р. Были определены фагоцитарный индекс, индекс завершенности фагоцитоза и индекс активации киллинга. Введение ЭПС в организм мышей способствовало завершению процесса фагоцитоза в более короткие сроки. При этом наиболее стимулирующее воздействие на перитонеальные и альвеолярные макрофаги оказывал экзополисахарид *S. thermophilus*.

Обнаруженная способность полисахаридов оказывать положительное влияние на процесс фагоцитоза бактерий может найти применение в ЭПС в медико-биологических исследованиях и ветеринарии.

Ключевые слова: молочнокислые бактерии, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, экзополисахариды, макрофаги, фагоцитоз.

Изучение экзополисахаридов (ЭПС) бактерий является перспективным направлением в микробиологии. Большое внимание уделяется в последнее время изучению физиологической роли этих биополимеров в организме животных и человека. Имеются сведения об их противоопухолевых, противовирусных, антибактериальных, иммуномодулирующих свойствах [1–3].

Молочнокислые бактерии, составляя нормальную микрофлору организма, как известно, играют значительную роль в животном организме, регулируя его жизнедеятельность [2–4] за счет ряда важных биологически активных веществ, в том числе и ЭПС, однако роль их не до конца изучена. Из литературы известно, что некоторые ЭПС молочнокислых бактерий способны оказывать влияние на скорость процесса фагоцитоза [4–6], однако эти работы в основном относятся к лактобациллам.

В связи с этим целью работы явилось изучение влияния ЭПС *Lactococcus lactis* В-1662 и *Streptococcus thermophilus* на процесс фагоцитоза *in vitro* макрофагами мышей.

Методика. Объектами исследования явились ЭПС, выделенные нами ранее [7, 8] из *Lactococcus lactis* В-1662 и *Streptococcus thermophilus*. Культура *Lactococcus lactis* В-1662 была получена из Всероссийской коллекции микроорганизмов (г. Пущино), а *Streptococcus thermophilus* – из ФГБНУ Всероссийского научно-исследовательского института молочной промышленности (г. Москва).

Экзополисахариды вводили лабораторным белым мышам (самцы массой 20 г, возрастом 2–3 месяца) в концентрации 0.6% по 0.2 мл внутрибрюшинно. Экспериментальные исследования выполнены в соответствии с требова-

УРЯДОВА Галина Тимофеевна, Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова, e-mail: eni_galina@mail.ru

ГОРЕЛЬНИКОВА Елена Александровна – к.б.н., Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова, e-mail: novela@mail.ru

ФОКИНА Надежда Александровна, Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова, e-mail: fockina.nadejda@yandex.ru

КАРПУНИНА Лидия Владимировна – д.б.н., Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова, e-mail: karpuninal@mail.ru

ниями Федерального закона от 01.01.1997 г. «О защите животных от жестокого обращения» и положениями Европейской конвенции по защите позвоночных животных (Страсбург, 18.03.1986 г.). Мыши содержались в стандартных условиях вивария ФГБОУ ВО СГАУ им. Н.И. Вавилова. Исследовали три группы животных: 1 группа – контрольная: интактные мыши; 2 группа – мыши, которым вводили ЭПС *L. lactis* В-1662; 3 группа – мыши, которым вводили ЭПС *S. thermophilus*. Животных умерщвляли транслокацией шейных позвонков. Перитонеальные (ПМФ) и альвеолярные (АМФ) макрофаги выделяли на 1, 3, 5 и 7 сутки после введения ЭПС по общепринятым методикам [9]. При моделировании процесса фагоцитоза использовали суточную культуру *Staphylococcus aureus* 209-Р, полученную из музея кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГБОУ ВО СГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава России. Бактериальные клетки добавляли во взвесь макрофагов в соотношении 50:1 и инкубировали при 37°C. Активность макрофагов на разных стадиях фагоцитоза оценивали через 30 минут, 1, 6 и 24 часа инкубации. Были определены: фагоцитарный индекс (ФИ), индекс завершенности фагоцитоза (ИЗФ) и индекс активации киллинга (ИАК) [9].

Индекс завершенности фагоцитоза (ИЗФ) определяли по формуле 1:

$$\text{ИЗФ} = \frac{\text{ФИ}_1 - \text{ФИ}_2}{\text{ФИ}_1}, \quad (1)$$

где ФИ – фагоцитарный индекс, число макрофагов, захвативших бактерии; ФИ_1 – число активных макрофагов через 1 час; ФИ_2 – число активных макрофагов через 24 часов после инкубации.

С помощью ИЗФ определяли завершенный или незавершенный фагоцитоз. Если $\text{ИЗФ} \geq 1$ – процесс фагоцитоза завершенный, если $0 < \text{ИЗФ} < 1$ – частичное переваривание микробных клеток, а если $\text{ИЗФ} < 0$ – то фагоцитарный процесс не завершен.

Индекс активации киллинга рассчитывали по формуле 2:

$$\text{ИАК} = \text{ИЗФ (оп.)} - \text{ИЗФ (к.)}, \quad (2)$$

где ИЗФ (оп.) – индекс завершенности фагоцитоза в опыте; ИЗФ (к.) – индекс завершенности фагоцитоза в контроле.

Результаты. В процессе исследований было показано, что у контрольной группы мышей, которым не вводили внутривенно ЭПС, максимальная активность макрофагов как ПМФ, так и АМФ, наблюдалась через 24 часа, причем активность АМФ в процессе фагоцитоза *S. aureus* 209-Р через 30 минут, 1, 6 и 24 часа была выше по сравнению с ПМФ (табл. 1).

В опытной группе животных, которым вводили ЭПС *L. lactis* В-1662, активность ПМФ и АМФ достигала максимума уже к 6 часам фагоцитоза *S. aureus* 209-Р на протяжении всего эксперимента и было достоверно выше контроля (табл. 1). Количество активных ПМФ и АМФ было наибольшим на 3–5 сутки после введения ЭПС мышам и активность АМФ была так же, как и в контроле, выше активности ПМФ.

Т а б л и ц а 1

Влияние ЭПС *Lactococcus lactis* В-1662 на число фагоцитирующих макрофагов мышей в процессе фагоцитоза

| Время иммуногенеза | Макрофаги | Количество активных макрофагов | | | |
|--------------------|-----------|--------------------------------|----------|-----------|----------|
| | | 30 мин | 1 ч | 6 ч | 24 ч |
| контроль (без ЭПС) | ПМФ | 7.0±0.3 | 9.0±0.5 | 8.0±2.0 | 15.0±0.2 |
| | АМФ | 8.0±0.2 | 11.0±3.0 | 8.0±1.5 | 18.0±0.9 |
| 1 сутки | ПМФ | 4.0±1.5 | 5.0±2.0 | 22.0±2.0* | 8.0±1.1* |
| | АМФ | 4.0±1.0* | 7.0±1.5 | 23.0±1.0* | 9.0±0.5* |
| 3 сутки | ПМФ | 5.0±2.0 | 8.0±0.5* | 22.0±0.5 | 7.0±1.5* |
| | АМФ | 6.0±1.5 | 9.0±1.0 | 25.0±1.0* | 8.0±1.5* |
| 5 сутки | ПМФ | 8.0±2.0 | 7.0±2.0 | 16.0±0.7 | 6.0±2.5 |
| | АМФ | 8.0±0.5 | 7.0±1.5 | 19.0±0.6* | 5.0±0.5* |
| 7 сутки | ПМФ | 6.0±2.5 | 9.0±0.9 | 10.0±2.0 | 7.0±2.0* |
| | АМФ | 7.0±1.5* | 10.0±0.5 | 11.0±1.0 | 7.0±0.8* |

*Примечание: $P < 0.05$ относительно контроля.

Влияние ЭПС *Streptococcus thermophilus* на число фагоцитирующих макрофагов мышей в процессе фагоцитоза

| Время иммуногенеза | Макрофаги | Количество активных макрофагов | | | |
|--------------------|-----------|--------------------------------|----------|-----------|----------|
| | | 30 мин | 1 ч | 6 ч | 24 ч |
| контроль (без ЭПС) | ПМФ | 7.0±0.3 | 9.0±0.5 | 8.0±2.0 | 15.0±0.2 |
| | АМФ | 8.0±0.2 | 11.0±3.0 | 8.0±1.5 | 18.0±0.9 |
| 1 сутки | ПМФ | 6.0±1.5 | 8.0±2.0 | 24.0±2.0* | 7.0±1.1* |
| | АМФ | 8.0±1.0* | 10.0±1.5 | 29.0±1.0* | 8.0±0.5* |
| 3 сутки | ПМФ | 7.0±1.5 | 9.0±0.5* | 26.0±0.5 | 8.0±1.5* |
| | АМФ | 7.0±1.5 | 10.0±1.0 | 32.0±1.0* | 7.0±1.5* |
| 5 сутки | ПМФ | 7.0±2.0 | 9.0±2.0 | 19.0±0.7 | 7.0±2.5 |
| | АМФ | 8.0±0.5 | 10.0±1.5 | 23.0±0.6* | 6.0±0.5* |
| 7 сутки | ПМФ | 9.0±2.5 | 9.0±0.9 | 11.0±2.0 | 3.0±2.0* |
| | АМФ | 12.0±1.5* | 10.0±0.5 | 15.0±1.0 | 2.0±0.8* |

*Примечание: $P < 0.05$ относительно контроля.

Влияние ЭПС *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus* на индекс завершенности фагоцитоза и индекс активации киллинга

| Время иммуногенеза | Макрофаги | ЭПС | | ЭПС | |
|--------------------|-----------|-------------------------|------|------------------------|------|
| | | <i>L. lactis</i> В-1662 | | <i>S. thermophilus</i> | |
| | | ИЗФ | ИАК | ИЗФ | ИАК |
| контроль (без ЭПС) | ПМФ | -0.70 | 0 | -0.70 | 0 |
| | АМФ | -0.64 | 0 | -0.64 | 0 |
| 1 сутки | ПМФ | -0.60 | 0.10 | 0.13 | 0.83 |
| | АМФ | -0.30 | 0.34 | 0.20 | 0.84 |
| 3 сутки | ПМФ | 0.13 | 0.83 | 0.12 | 0.82 |
| | АМФ | 0.12 | 0.76 | 0.30 | 0.94 |
| 5 сутки | ПМФ | 0.14 | 0.84 | 0.23 | 0.93 |
| | АМФ | 0.17 | 0.81 | 0.40 | 1.04 |
| 7 сутки | ПМФ | 0.23 | 0.93 | 0.70 | 1.40 |
| | АМФ | 0.30 | 0.94 | 0.80 | 1.44 |

При введении ЭПС *S. thermophilus* в организм мышей была отмечена аналогичная тенденция, как и в случае с ЭПС *L. lactis* В-1662. Наблюдали увеличение активности макрофагов к 6 часам как для ПМФ, так и АМФ. Активность АМФ также была выше активности ПМФ (табл. 2).

В процессе дальнейших исследований были определены такие показатели, как индекс завершенности фагоцитоза и индекс активации киллинга. Было установлено, что в контрольной группе животных к концу эксперимента (7 суток) ИЗФ для ПМФ составил -0.70 и для АМФ -1.50, что свидетельствовало о незавершенности фагоцитарного процесса (табл. 3). В опытной

группе мышей, которым вводили ЭПС *L. lactis* В-1662, ИЗФ для ПМФ составил 0.23 и для АМФ 0.30, что говорило о частичном переваривании микробных клеток. На 7 сутки эксперимента ИАК увеличивался в 9.3 раза для ПМФ и в 1.5 раза для АМФ по сравнению с 1 сутками.

У опытных мышей, которым вводили ЭПС *S. thermophilus*, процесс фагоцитоза был частично завершен уже на 3 сутки, завершался к 7 суткам (табл. 3) и составлял 0.70 для ПМФ и 0.80 для АМФ, что свидетельствовало практически о завершении фагоцитоза. Наблюдали увеличение переваривания микробных клеток (ИАК) для ПМФ и АМФ в 1.7 раз в обоих случаях по сравнению с 1 сутками. ИАК на 7 сутки

у ПМФ и АМФ был в 1.5 раза выше по сравнению с аналогичными показателями в опыте с ЭПС *L. lactis* В-1662.

Таким образом, воздействие ЭПС стрептококка на макрофаги, как видно из представленных данных, было более выраженным, чем ЭПС лактококка.

Выводы. Обнаружено, что активность макрофагов мышей, которым вводили экзополисахариды *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus* на 1, 3, 5 и 7 сутки существенно отличалась от контрольных значений на завершающих стадиях процесса фагоцитоза *S. aureus* 209-Р. Исследуемые ЭПС, влияя на ПМФ и АМФ, оказывают значительное воздействие на процесс фагоцитоза, что хорошо коррелирует с литературными данными относительно молочнокислых бактерий других родов и бактериями других видов [4, 5]. Установлено, что наибольшее воздействие данные ЭПС оказывали на АМФ, подобная тенденция прослеживалась и в случае с ЭПС лактобацилл [6]. И наиболее выраженное влияние на процесс фагоцитоза оказывал ЭПС *S. thermophilus*. Ранее нами была обнаружена способность ЭПС *S. thermophilus* в значительной мере, по сравнению с ЭПС лактококка, оказывать влияние и на синтез провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 α и ФНО- α) [10]. Вполне возможно предположить, что ЭПС молочнокисло-го стрептококка влияет на активность макрофагов через стимуляцию продукции провоспалительных цитокинов и тем самым приводит к увеличению поглотительной функции макрофагов. Способность экзополисахаридов молочнокислых бактерий оказывать положительное влияние на процесс фагоцитоза бактерий открывает перспективы возможного применения этих ЭПС в медико-биологических исследованиях и ветеринарной практике.

Литература

1. Coconnier M.H., Lievin V., Bernet-Camard M.F., Hudault S., Servin A.L. Antibacterial effect of the adhering human *Lactobacillus acidophilus* strain LB // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1997. V. 41, No. 5. P. 1046–1052.
2. Oh M.H., Lee S.G., Paik S. Antiviral activity of *Lactobacillus* spp. and polysaccharide // J. Bacteriol. Virol. 2010. No. 140. P. 145–50.
3. Makino S., Ikegami S., Kano H. Immunomodulatory effects of polysaccharides produced by *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* OLL

1073R-1 // J. Dairy Sci. 2006. V. 89. Issue 8. P. 2873–2881.

4. Nishimura-Uemura J., Kleerebezem E., Sralowska B. Functional alteration of murine macrophages stimulated with extracellular polysaccharides from *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* OLL1073R-1 // Food Microbiology. 2003. No. 20. P. 267–273.

5. Im S.-A., Wang W., Lee Ch.-K., Lee Y.N. Activation of macrophages by exopolysaccharide produced by MK1 bacterial strain isolated from Neungee mushroom, *Sarcodon aspratus* // Immune Netw. 2010. N10 (6). P. 230–238.

6. Горельникова Е.А., Карпунина Л.В. Действие экзополисахаридов лактобацилл на фагоцитарную и цитокиновую активность *in vitro* и в организме животных при моделировании инфекционного процесса // ЖМЭИ. 2015. № 5. С. 44–50.

7. Урядова Г.Т., Тяпкин А.Ю., Фокина Н.А., Карпунина Л.В. Выделение экзополисахарида *Streptococcus thermophilus* // Актуальные проблемы ветеринарной медицины, пищевой и биотехнологий: материалы Всероссийской научно-практической конференции. Саратов, 2015. С. 109–113.

8. Фокина Н.А., Урядова Г.Т., Карпунина Л.В. Выделение экзополисахарида из *Lactococcus lactis* при различных условиях культивирования // Аграрный научный журнал. 2016. № 12. С. 40–42.

9. Кондратьева И.А., Воробьева И.В., Буракова О.В., Фрезе К.В., Егорова С.Г., Мойсенович М.М., Киркин А.Ф., Пинегин Б.В., Симонова А.В., Киташов А.В., Рокк Ф. Практикум по иммунологии. М.: МГУ, 2001. 224 с.

10. Урядова Г.Т., Горельникова Е.А., Фокина Н.А., Долмашкина А.С., Карпунина Л.В. Влияние экзополисахаридов молочнокислых бактерий на синтез провоспалительных цитокинов макрофагами мышей при фагоцитозе *Staphylococcus aureus* // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2018. № 1. С. 67–70.

References

1. Coconnier M.H., Lievin V., Bernet-Camard M.F., Hudault S., Servin A.L. Antibacterial effect of the adhering human *Lactobacillus acidophilus* strain LB. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1997, vol. 41, no. 5, pp. 1046–1052.
2. Oh M.H., Lee S.G., Paik S. Antiviral activity of *Lactobacillus* spp. and polysaccharide. J. Bacteriol. Virol., 2010, no. 140, pp. 145–150.
3. Makino S., Ikegami S., Kano H. Immunomodulatory effects of polysaccharides produced by *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* OLL 1073R-1. J. Dairy Sci., 2006, vol. 89, issue 8, pp. 2873–2881.
4. Nishimura-Uemura J., Kleerebezem E., Sralowska B. Functional alteration of murine macrophages stimulated with extracellular polysaccharides from *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*

OLL1073R-1. Food Microbiology, 2003, no. 20, pp. 267–273.

5. Im S.-A., Wang W., Lee Ch.-K., Lee Y.N. Activation of macrophages by exopolysaccharide produced by MK1 bacterial strain isolated from Neungee mushroom, *Sarcodon aspratus*. Immune Netw., 2010, no. 10 (6), pp. 230–238.4.

6. Gorelnikova E.A., Karpunina L.V. The effect of exopolysaccharides of lactobacilli on phagocytic and cytokine activity *in vitro* and in animals in modelling the infectious process. Zhurnal mikrobiologii, 2015, no. 5, pp. 44–50.

7. Uryadova G.T., Tyapkin A.Yu., Fokina N.A., Karpunina L.V. Isolation of exopolysaccharide *Streptococcus thermophiles*. Aktualnye problemy veterinarnoy meditsiny, pishchevykh i biotekhnologiy. Materialy Vserossiyskoy nauchno-prakticheskoy konferentsii. Saratov, 2015, pp. 109–113.

8. Fokina N.A., Uryadova G.T., Karpunina L.V. Isolation of exopolysaccharide from *Lactococcus lactis* under various cultivation conditions. Agrarnyy nauchnyy zhurnal, 2016, no. 12, pp. 40–42.

9. Kondratyeva I.A., Vorobyeva I.V., Burakova O.V., Freze K.V., Egorova S.G., Moysenovich M.M., Kirkin A.F., Pinegin B.V., Simonova A.V., Kitashov A.V., Rokk F. Workshop on immunology. Moscow, Moskovskiy gosudarstvennyy universitet, 2001. 224 p.

10. Uryadova G.T., Gorelnikova E.A., Fokina N.A., Dolmashkina A.S., Karpunina L.V. Influence of exopolysaccharides of lactic acid bacteria on the synthesis of proinflammatory cytokines by macrophages of mice with phagocytosis by *Staphylococcus aureus*. Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii, 2018, no. 1, pp. 67–70.



THE EFFECT OF EXOPOLYSACCHARIDES PRODUCED BY LACTIC ACID BACTERIA ON MACROPHAGE PHAGOCYTOSIS IN MICE

© G.T. Uryadova, E.A. Gorelnikova, N.A. Fokina, L.V. Karpunina

Vavilov Saratov State Agrarian University,
1, Teatralnaya ploshchad, 410012, Saratov, Russian Federation

It is known that the exopolysaccharides (EPS) of lactic acid bacteria have a number of positive properties, such as antitumor, immunomodulatory, antiviral and antibacterial. This paper studies the effect of exopolysaccharides of lactic acid bacteria *Lactococcus lactis* B-1662 and *Streptococcus thermophilus* on the process of phagocytosis. Peritoneal (PMF) and alveolar (AMP) macrophages were isolated from the body of white mice in 1, 3, 5 and 7 days after the administration of exopolysaccharides to simulate the process of phagocytosis. A one-day culture of *Staphylococcus aureus* 209-P was used as an object of phagocytosis. The phagocytic index, index of phagocytosis completeness and activation index of killing were determined. The administration of EPS to mice facilitated the completion of the process of phagocytosis in a shorter time. In this case the exopolysaccharide produced by *S. thermophilus* exerted the highest stimulating effect on peritoneal and alveolar macrophages.

The ability of polysaccharides revealed to have a positive effect on the process of phagocytosis of bacteria can find its application in EPS in medical and biological research and veterinary medicine.

Key words: lactic acid bacteria, *Lactococcus lactis* B-1662, *Streptococcus thermophilus*, exopolysaccharide (EPS), macrophages, phagocytosis.