

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ АСПЕКТ ПЕРОРАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ ПРОБИОТИКА LACTOBACILLUS CASEI LB 148 ПРИ ХОЛОДОВОМ СТРЕССЕ У ЖИВОТНЫХ

Козловская Г.В., Зиневич М.И., Козловский Ю.Е., Хомякова Т.И., Магомедова А.Д.

Научно-исследовательский институт морфологии человека, г. Москва, Российская Федерация

Аннотация. Изменения структуры микробиома кишечника рассматривают как один из ведущих этиологических факторов стресс-ассоциированных заболеваний. Пробиотики обычно используют для коррекции нарушений в структуре микробиома. Целью исследования было изучение влияния перорального употребления лактобацилл *Lactobacillus casei* LB 148 на структуру микробиома, количество и площадь лимфоидных узелков тонкой кишки в нормальных условиях и при холодном стрессе у крыс Sprague Dawley.

Ключевые слова. Холодовой стресс, пробиотик, воспаление, крысы

IMMUNOLOGICAL ASPECT OF ORAL ADMINISTRATION OF THE PROBIOTIC LACTOBACILLUS CASEI LB 148 UNDER COLD STRESS IN ANIMALS

Kozlovskaya G.V., Zinevich M.I., Kozlovsky Y.E., Khomyakova T.I., Magomedova A.D.

Institute of human morphology, Moscow, Russian Federation

Summary. Gut microbiome changes is considered as a basic causative factor of stress-associated diseases. Probiotics are usually used for the correction of dysbiosis. The aim of the investigation was the study of the effects of oral probiotic *Lactobacillus casei* LB 148 use onto the gut microbiota as well as the number and total square of intestinal lymph nodules of rats Sprague Dawley at in health rats and under the cold stress

Key words. Cold stress, probiotic strain *Lactobacillus casei*, inflammation, rats

Введение. Холодовой стресс является одним из наиболее значимых факторов, вызывающим развитие воспалительного процесса в организме теплокровных животных. Острое холодное воздействие сопровождается развитием комплекса воспалительно-дистрофических изменений внутренних органов, характерных для стрессорной реакции: гипертрофией надпочечников, инволюцией тимуса, появлением язвенных повреждений желудка у крыс [1]. Одним из механизмов развития воспаления наряду с инфицированием являются иммунологические реакции на стресс, которые сопровождаются выбросом провоспалительных цитокинов. Известно, что холодный стресс может привести к воспалению кишечника, сопровождающемуся изменениями микробиома у перепелов [2], мышей [3, 4], крыс [5] и человека. Изменения структуры микробиома толстой кишки при остром стрессе у крыс характеризовались уменьшением количества лактобацилл и бифидобактерий и кишечных палочек с нормальной ферментативной активностью. При этом содержание эшерихий со сниженной ферментативной активностью увеличилось в 3,4 раза по сравнению с контролем [6]. Хронический стресс также ассоциирован с нарушениями в структуре микробиома кишечника и соответствующими метаболическими сдвигами как в эксперименте так и у человека. У мышей длительный стресс приводил к снижению уровня лактобацилл и повышению уровня циркулирующего кинуренина, поскольку продукты метаболизма лактобацилл могут модулировать метаболизм кинуренина хозяина, подавляя экспрессию метаболизирующего фермента IDO1 в кишечнике [7]. Употребление пробиотиков при дисбиозе, вызванном антибиотиками, является общепринятой практикой, однако, неизвестно, будет ли эффективным подход профилактического употребления пробиотиков до предполагаемого холодного воздействия с целью иммунорегуляции и снижения риска развития воспаления. FAO/WHO (кодекс алиментарийс) определяет пробиотики как живые микроорганизмы, которые приносят пользу здоровью хозяина, будучи введенными в адекватных количествах. Один из механизмов улучшения здоровья с помощью пробиотиков это регуляция экспрессии генов в специализированных тканях, в особенности в кишечнике и печени. Модуляция экспрессии генов, опосредованная пробиотиками, в особенности генов, связанных с иммунной системой, весьма актуальна.

Целью настоящего исследования было исследование эффекта перорального употребления пробиотика *Lactobacillus casei* LB 148 в условиях холодного воздействия на иммунную систему кишки

крыс линии Sprague Dawley. Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи: оценить эффект холодового воздействия на просветную микрофлору кишечника крыс Sprague Dawley и реакцию иммунной системы тонкой кишки. Оценить результат перорального введения пробиотика *Lactobacillus casei* LB 148 в условиях холодового стресса и в контрольной группе, не подвергавшейся холодовому воздействию. Эксперимент проводили в течение 21 дня.

Материалы и методы. Исследование проведено на самцах крыс линии Sprague Dawley с массой тела 100-120 г (4-5 мес), в работе использовали штамм *L.casei* LB 148 из коллекции лаборатории инфекционной патологии и молекулярной микробиологии ФГБНУ НИИМЧ. Для культивирования лактобактерий использовали среду MRS (HiMedia, Индия). Содержание, уход за животными и выведение их из эксперимента осуществляли в соответствии с рекомендациями ARRIVE (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments, 2010) и требованиями Министерства здравоохранения РФ № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики» от 2016 г.

Для проведения эксперимента животным распределили в 4 группы по 5 голов с использованием метода пар-аналогов.

Крысы контрольной группы (I группа) в течение 21 дня получали перорально апиригенный физиологический раствор в объеме, соответствующем объему пробиотика, который вводили животных опытных групп. Холодовой стресс осуществляли, помещая крыс в морозильную камеру ($t^{\circ}\text{C}$ -20-25 $^{\circ}\text{C}$) на 15 мин. Накануне выведения крыс из эксперимента у них производили забор фекалий для оценки качественного и количественного состава просветной микрофлоры кишечника. Для изучения уровня экспрессии генов методом ПЦР в реальном времени были отобраны пробы тонкой и толстой кишки. Статистическая обработка данных проводилась в программе Statistica 6.0 ("Statsoft Inc.", США). Статистическую значимость различий между двумя группами устанавливали при помощи U-критерия Манн-Уитни. Значения $p \leq 0,05$ принимались как статистически значимые. Состояние иммунной системы кишечника оценивали морфометрически. Для этого тонкий кишечник извлекали целиком от желудка до слепой кишки, делили на три отдела, промывали содержимое и фиксировали в жидкости Буэна, кишку разрезали вдоль по всей длине, расправляли на черной бумаге и фотографировали.

Лимфоидные узелки тонкой кишки имели вид небольшого овального или округлого образования, видимого со стороны серозной оболочки кишки. Количество узелков подсчитывали и заносили в таблицы отдельно по дистальному, медиальному и проксимальному отделам. Площадь лимфоидных узелков оценивали с использованием программы ImagePro Plus 6.0 (рис. 1)

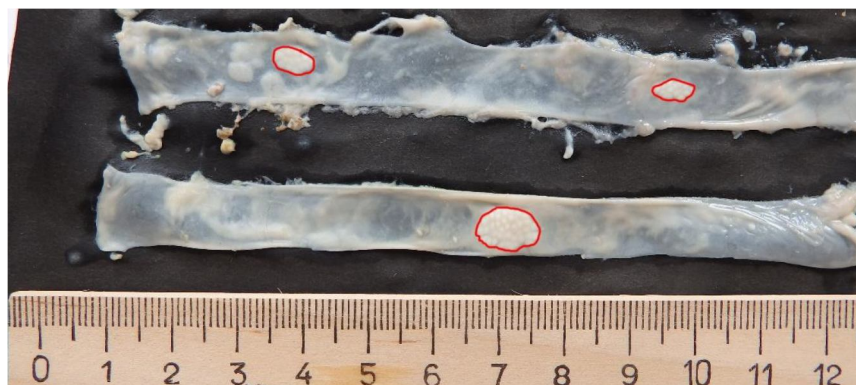


Рисунок 1 - Морфометрия лимфоидных узелков тонкой кишки

РНК из тканей кишечника выделяли в соответствии с инструкцией к набору реагентов «ExtractRNA» фирмы Евроген. Для подготовки к выделению нуклеиновой кислоты отбирали 250 мг фекалий, добавляли 1 мл физиологического раствора и гомогенизировали, после чего образцы центрифугировали при 1000 г 3 мин, супернатант переносили в пробирку объемом 1,5 мл, вновь центрифугировали при 13500 об/мин в течение 10 мин, удаляли надосадочную жидкость, из осадка выделяли нуклеиновые кислоты по стандартной методике комплектом реагентов «ПРОБА-НК-ПЛЮС» фирмы ДНК-технология.

Результаты. По результатам анализа микробиома эффект холодового стресса в отсутствие пробиотика (группа II) проявлялся в снижении количества лактобактерий в составе просветной микрофлоры. Введение *L.casei* LB148 в группе III (только пробиотик) не влияло достоверно на содержание лактобактерий в составе просветной микробиоты к концу исследования у животных при нормальных температурах, но нормализовало их число при сочетанном действии с холодовым стрессом. При этом введение *L.casei* LB148 приводило к уменьшению соотношения общей доли фирмикут к доле бактероидов в просветной микрофлоре. Эти данные согласуются с результатами по оценке действия

стресса на структуру микробиома у мышей [4] Отсутствие эффекта от введения пробиотика мышам, не подвергнувшимся холодному стрессу, объясняется отсутствием мест для их адгезии в здоровой кишке.

При оценке суммарного количества лимфоидных узелков и их площади в тонкой кишке достоверных различий между группами не было обнаружено, однако при анализе этих параметров по отдельным компартментам было показано, что в медиальном отделе тонкого кишечника как холодовой стресс так и пероральное введение пробиотика привело к достоверному росту числа узелков по сравнению с контролем ($p < 0,01$).

В проксимальном отделе количество узелков при введении пробиотика достоверно снижалось по сравнению с группой, получавшей пробиотики и подвергнутой действию холодowego стресса ($p < 0,01$), достоверных различий между другими группами выявлено не было, хотя отмечалась некоторая тенденция к снижению количества узелков при холодом воздействии.

В дистальном отделе кишечника как при холодом стрессе, так и при введении штамма *L.casei* LB148 количество лимфоидных узелков достоверно снижалось, однако суммарное воздействие стресса и пробиотиков приводило к нормализации этого показателя.

Суммарная площадь лимфоидных узелков в проксимальном отделе тонкой кишки крыс, подвергнутых холодому стрессу статистически отличалась от площади узелков у крыс, получавших пробиотик до стрессорного воздействия ($p < 0,01$). Данный показатель в дистальном отделе тонкой кишки крыс II и IV групп, получавших пробиотики, была меньше по сравнению с группами, не получавшими лактобацилл.

Анализ экспрессии провоспалительных и противовоспалительных цитокинов проводили методом qPCR на амплификаторе RotorGene 600. В качестве референсного гена использовали ген 18S rRNA. Экспрессию вычисляли методом определения $2(-\Delta\Delta C(T))$ [8]. Анализ экспрессии провоспалительных и противовоспалительных цитокинов по группам показал, что штамм *L.casei* обладал противовоспалительным действием у животных, подвергшихся холодому стрессу за счет повышения экспрессии противовоспалительного цитокина IL-10 с одновременным снижением экспрессии IL-1 α .

Таким образом, применение пробиотика – штамма лактобацилл *L.casei* LB148 может иметь превентивное действие в отношении стресс - индуцированного нарушения в структуре микробиома и последующего воспаления в кишечнике, что позволяет обосновать его профилактический и терапевтический эффект при заболеваниях ЖКТ, ассоциированных со стрессом у человека, а именно при синдроме раздраженного кишечника, язвенной болезни двенадцатиперстной кишки и неспецифическом язвенном колите.

Список использованных источников

1. Солодкова О.А., Зенкина В.Г. Холодовой стресс и его коррекция гидролизатом кукумарии японской //Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований No 3, 2016.-с.591-594
2. Luo B., Shi H., Zhang K., Wei Q., Niu J., Wang J., Hammond S.K., Liu S. Cold stress provokes lung injury in rats co-exposed to fine particulate matter and lipopolysaccharide//Ecotoxicol Environ Saf. 2019 Jan 30;168:9-16. doi: 10.1016/j.ecoenv.2018.10.064. Epub 2018 Oct 25.
3. Joo SY, Park MJ, Kim KH, Choi HJ, Chung TW, Kim YJ, Kim JH, Kim KJ, Joo M, Ha KT Cold stress aggravates inflammatory responses in an LPS-induced mouse model of acute lung injury// Int J Biometeorol. 2016 Aug;60(8):1217-25. doi: 10.1007/s00484-015-1116-5. Epub 2015 Nov 30.
4. Абдулаева С.О., Макарова О.В., Добрынина М.Т.,Хомякова Т.И. Структурные изменения толстой кишки и уровень продукции цитокинов при холодом воздействии у мышей BALB/C // Медицинская иммунология.-2011- Т. 13, № 4-5-с.303-304
5. Messmer M.N., Kokolus K.M., Eng J.W., Abrams S.I., Repasky E.A. Mild cold-stress depresses immune responses: Implications for cancer models involving laboratory mice// Bioessays. 2014 Sep;36(9):884-91. doi: 10.1002/bies.201400066. Epub 2014 Jul 25
6. Мухина А.Ю., Медведева О.А., Свищева М.В., Шевченко А.В., Ефремова Н.Н., Бобынцев И.И., Калущий П.В., Оценка состояния микробиоценоза толстой кишки экспериментальных животных в условиях иммобилизационного стресса// Астраханский медицинский журнал. 2019. №1. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/otsenka-sostoyaniya-mikrobiotsenoza-tolstoy-kishki-eksperimentalnyh-zhivotnyh-v-usloviyah-immobilizatsionnogo-stressa> (дата обращения: 06.02.2020).
7. Marin I., Goertz J., Ren T., Rich S., Onengut S.,Farber E., Wu M., Overall Ch., Kipnis Jon. Gaultier A. Microbiota alteration is associated with the development of stress-induced despair behavior.//Scientific Reports. 2017.-7.- 43859. 10.1038/srep43859.
8. Livak K.J. and Schmittgen T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real Time. Quantative PCR and the $2(-\Delta\Delta C(T))$ Method//Methods. 2001.- Dec;25(4):402-8.

Работа выполнена в рамках инициативной НИР.