

УДК 579.61

Л. П. ТИТОВ¹, А. Е. ГОНЧАРОВ¹, А. С. МУРАШКО¹, Н. А. ГОЛОВНЕВА²,
И. А. НАЙДЕНКО², Э. И. КОЛОМИЕЦ²

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЛАКТОБАЦИЛЛ И ИХ КОМПОНЕНТОВ С НЕЙТРОФИЛАМИ, МОНОЦИТАМИ И ЛИМФОЦИТАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

¹Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь,

²Научно-исследовательский институт микробиологии НАН Беларуси, Минск

(Поступила в редакцию 12.06.2013)

Введение. Кишечник человека населен многими видами молочнокислых бактерий, в том числе относящихся к роду *Lactobacillus*. Вследствие экологических и коммерческих интересов в настоящее время значительные усилия исследователей сосредоточены на выделении из разных источников, идентификации и изучении молекулярно-генетических и иммунобиологических характеристик лактобацилл [1–6]. Штаммы некоторых видов лактобацилл (*L. acidophilus*, *L. johnsonii* и др.) используются для производства коммерческих пробиотических продуктов перорального применения при дисбактериозе желудочно-кишечного и урогенитального трактов [7–10], аллергических, аутоиммунных и онкологических заболеваниях [10–15]. Кроме того, пробиотические микроорганизмы и их продукты оказывают положительный эффект при местном применении, который проявляется в ускорении заживления ожоговых и других ран [16, 17].

Установление молекулярно-клеточных механизмов благоприятного эффекта пробиотиков на здоровье человека представляется весьма актуальной задачей. В эксперименте показано усиление иммунного ответа на ротавирусную вакцину у животных под влиянием пробиотиков на основе лактобацилл [18, 19]. Отмечается взаимосвязь повышенной адгезивной активности пробиотических бактерий к эпителию кишечника и влагляща с угнетением продукции интерлейкина-8 и других патогенетически значимых провоспалительных цитокинов при атопическом дерматите, псориазе и других аутоиммунных и аллергических заболеваниях [20–23]. Вместе с тем иммунобиологические свойства и взаимодействие лактобацилл различного происхождения с молекулами и клетками иммунной системы человека изучены недостаточно [24].

Цель исследования – изучение влияния штаммов лактобацилл, клеточных стенок бактерий и их лизатов на функциональные свойства клеток иммунной системы *in vitro*.

Объекты и методы исследования. Исследовано 14 штаммов бактерий рода *Lactobacillus*, полученных из коллекции лаборатории молочнокислых и бифидобактерий Института микробиологии НАН Беларуси. Для проведения исследований у добровольцев утром натощак производили забор 10 мл периферической (венозной) крови в стерильные пробирки с натриевой солью гепарина. Иммунобиологический эффект лактобацилл, их клеточных стенок и лизатов оценивали в отношении иммунокомпетентных клеток периферической крови: нейтрофилов, моноцитов и лимфоцитов.

Культивирование бактерий. Культуры лактобацилл выращивали на агаризованной питательной среде MRS при 37 °С в течение 24–48 ч [25].

Приготовление лизатов бактерий. Для приготовления лизатов культуры бактерий смывали с плотной питательной среды, несколько раз отмывали в большом объеме фосфатного буферного раствора (DPBS), затем ресуспендировали в 1 мл DPBS и помещали в стерильную пробирку. Суспензию бактерий лизировали путем 15-кратного замораживания-оттаивания в жидком азоте до просветления взвеси. Затем взвесь центрифугировали при 13 000 g 30 мин, отбирали супернатант и фильтровали через фильтры диаметром 0,2 мкм.

Получение фракции клеточных стенок. Клетки бактерий стационарной фазы роста (20–24 ч) отделяли путем центрифугирования при 10 000 g в течение 10 мин при 4 °С, дважды отмывали DPBS от остатков среды культивирования. Для разрушения клеток использовали ультразвуковой дезинтегратор «УЗДН-2Т». Режим обработки – 5 циклов по 30 с при 44 кГц. Клеточные стенки осаждали из полученного гомогената, осадок промывали в DPBS и хранили при –20 °С [26].

Определение концентрации белка лизатов. Концентрацию белка определяли спектрофотометрически при длине волны 280 нм на фотометре DU730 (Becton Dickinson, США) с использованием встроенных алгоритмов расчета концентрации [27].

Оценка фагоцитоза лактобацилл, меченных ФИТЦ. 1. Из суточной культуры бактерий в фосфатном буфере готовили суспензию, содержащую $3 \cdot 10^8$ /мл. Бактерии прогревали в течение 30 мин при 95 °С, отмывали в DPBS, ресуспендировали в карбонатно-бикарбонатном буфере, добавляли раствор флуоресцеинизотиоцианата (ФИТЦ) в диметилсульфоксиде в количестве 0,5 мг на 1 мл бактериальной суспензии, инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре и затем отмывали в большом объеме DPBS несколько раз. Клетки лактобацилл, меченные ФИТЦ, до их использования хранили в DPBS при 4 °С. Перед постановкой фагоцитарной реакции меченные ФИТЦ бактерии промывали несколько раз в большом объеме DPBS. 2. Для постановки реакции фагоцитоза смешивали 100 мкл крови и 30 мкл суспензии бактерий. Пробы инкубировали в течение 30 мин при температуре 37 °С. По завершении инкубирования лизировали эритроциты раствором хлорида аммония и учитывали пробы на проточном цитофлуориметре [28].

Определение продукции реактивных форм кислорода (ROS) фагоцитами осуществляли с использованием дигидрорадамина 123 (DHR123). Данное вещество не флуоресцирует, но, проникнув в цитоплазму фагоцитирующих клеток, под действием свободных радикалов кислорода окисляется в родамин 123, дающий яркое свечение в зеленом диапазоне видимого спектра. Для детекции ROS в пробирку с 250 мкл цельной венозной крови добавляли DHR123 в концентрации 10 мкМ и доводили объем смеси питательной средой RPMI-1640 до 500 мкл. Смесь инкубировали в термостате при 37 °С на протяжении 10 мин. Затем к образцам добавляли: а) DPBS – отрицательный контроль; б) форбол-12-миристат-13-ацетат (ФМА) в концентрации 30 нг/мл – положительный контроль; в) лизаты бактерий (1 мкг/мл по белку); г) клеточные стенки (50 мкг/мл). Реакционную смесь инкубировали в термостате при температуре 37 °С на протяжении 30 мин. Эритроциты лизировали, клетки промывали в DPBS и с помощью проточного цитофлуориметра проводили анализ полученных результатов [29, 30] (рис. 1).

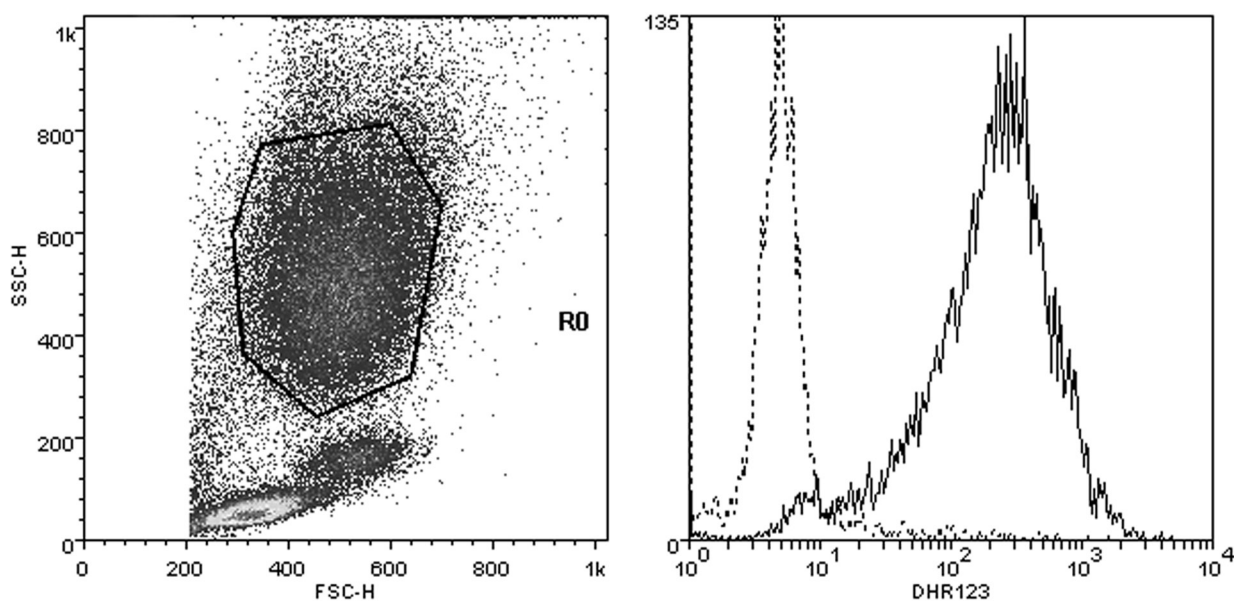


Рис. 1. Учет продукции нейтрофилами периферической крови свободных радикалов кислорода под действием компонентов клеточной стенки лактобацилл

Определение внутриклеточных цитокинов. К 500 мкл крови добавляли: 1) буфер DPBS; 2) липополисахарид кишечной палочки – LPS (1 мкг/мл); 3) клеточные стенки лактобацилл в концентрации 0,1 и 1 мкг/мл каждой, доводили объем средой RPMI-1640 до 1 мл и культивировали 20 ч при температуре 37 °С. Затем добавляли монензин (10 мкг/мл) и дополнительно инкубировали в течение 4 ч. Образцы крови объемом по 100 мкл инкубировали с моноклональными антителами к CD14 15 мин при температуре 4 °С. Эритроциты лизировали 15 мин раствором хлорида аммония, а затем осаждали путем центрифугирования и удаляли супернатант. Клетки фиксировали в 4 %-ном растворе параформальдегида 10 мин, объем клеточной взвеси доводили фосфатным буфером до 3 мл и центрифугировали пробирки для осаждения клеток. Удалив супернатант, клетки ресуспендировали в 0,1 %-ном растворе сапонина для пермеабилзации и инкубировали 15 мин, после чего отмывали в 3 мл DPBS. Надосадочную жидкость удаляли, клетки инкубировали с моноклональными антителами к внутриклеточным цитокинам (интерферон(ИНФ)- γ , фактор некроза опухолей(ФНО)- α) и соответствующими изотипическими контролями 30 мин при 4 °С. По истечении времени инкубации клетки отмывали от несвязавшихся антител, суспендировали в DPBS и исследовали на проточном цитофлуориметре [31].

Определение маркеров активации и ко-стимуляции клеток действием лактобацилл. К 500 мкл крови добавляли: 1) DPBS; 2) LPS (1 мкг/мл); 3) ФМА (30 нг/мл); 4) клеточные стенки лактобацилл в количестве 1 мкг/мл каждой, доводили объем средой RPMI-1640 до 1 мл и культивировали 24 ч при температуре 37 °С. Активированную кровь в количестве 100 мкл инкубировали с моноклональными антителами к CD14, CD3, CD69 и CD80 15 мин при температуре 4 °С. Эритроциты лизировали 15 мин раствором хлорида аммония, а затем осаждали путем центрифугирования и удаляли супернатант [32].

Статистический анализ. Статистическую обработку данных проводили с использованием программ Statistica версии 10 (StatSoft, США) и StatPlus 4.9 (AnalystSoft). Показатели представлены в виде медианы (Me), 25-й и 75-й перцентилей. Нормальность распределения величин оценивали с использованием *W*-критерия Шапиро–Уилка. Для сравнения двух независимых выборок использовали непараметрический *U*-критерий Манна–Уитни, а для сравнения трех групп независимых данных – метод рангового анализа вариаций Краскела–Уоллиса (*H*-test). Кластерный анализ проводили методом *k*-средних. Этот метод кластеризации позволяет образовать нужное количество кластеров так, чтобы они были настолько различны, насколько это возможно. В общем случае метод *k*-средних позволяет построить ровно *k* различных кластеров, расположенных на возможно больших расстояниях друг от друга. Группировка объектов исследования в кластеры применяется в тех случаях, когда предполагается, что имеющаяся выборка гетерогенна, но причина этой гетерогенности неизвестна. Результатом применения процедуры кластеризации может быть формирование нескольких подгрупп (кластеров) объектов исследования, в каждой из которых содержатся сходные наблюдения. Дальнейший анализ подгрупп может выявить некоторые объективные признаки, по которым эти подгруппы различаются. Достоверность различий показателей считали значимой при $P < 0,05$ [33–35].

Результаты и их обсуждение. *Оценка способности культур лактобацилл фагоцитироваться нейтрофилами и моноцитами периферической крови.* Нейтрофилы периферической крови, являясь наиболее представительной популяцией, обеспечивающей постоянное инспектирование внутренней среды организма, обладают способностью быстро мобилизоваться из депо и мигрировать в зону воспаления, обнаруживать чужеродных агентов, захватывать их, умерщвлять и элиминировать из организма.

На рис. 2, а представлены данные о способности культур лактобацилл поглощаться нейтрофильными фагоцитами.

Моноциты периферической крови являются компонентом системы мононуклеарных фагоцитов иммунной системы, находятся на разных этапах созревания и миграции в ткани с целью осуществления контроля за гомеостазом организма неспецифическими механизмами и инициации адаптивного иммунного ответа. На рис. 2, б представлены данные фагоцитарной активности моноцитов периферической крови в отношении культур лактобацилл. Номера культур соответствуют таковым при оценке их фагоцитоза нейтрофильными лейкоцитами. Считается, что моноциты

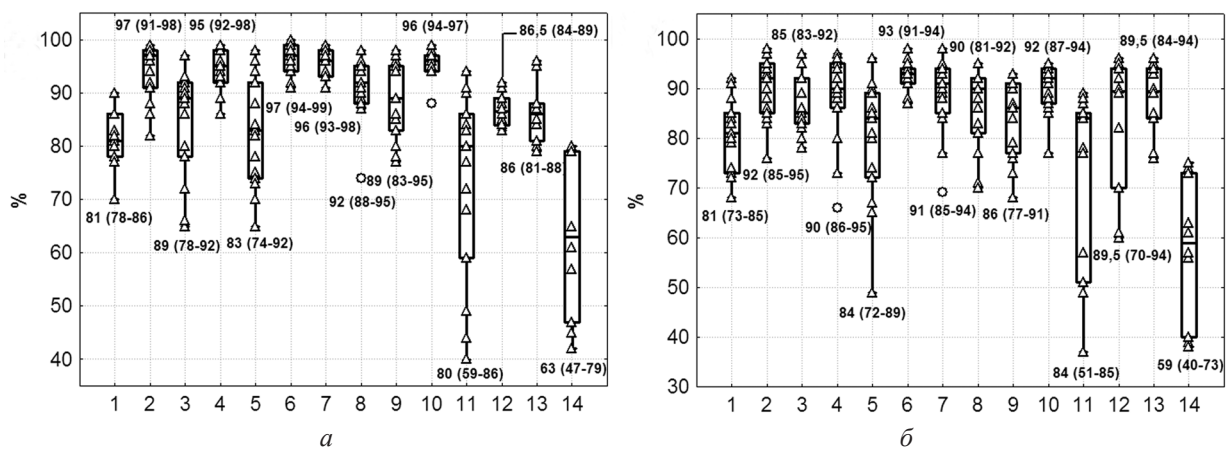


Рис. 2. Фагоцитарная активность клеток периферической крови (*a* – нейтрофилов; *б* – моноцитов) в отношении штаммов лактобацилл (№ 1–14)

обладают более эффективной внутриклеточной бактерицидной активностью в отношении поглощаемых бактерий в сравнении с нейтрофильными фагоцитами.

С целью определения культур лактобацилл, наиболее подверженных фагоцитозу нейтрофилами и моноцитами, был проведен кластерный анализ.

Разделение культур лактобацилл на два кластера по интенсивности фагоцитирования как нейтрофилами, так и моноцитами показало, что в первый кластер входили культуры № 11 и № 14, во второй – все остальные культуры.

Разделение культур на три кластера позволило выявить культуры как с высокой способностью захватываться фагоцитами, так с низкой и средней способностью (рис. 3).

Результаты анализа показали, что низкой способностью фагоцитироваться нейтрофилами обладали культуры лактобацилл № 11 и № 14, средней – культуры № 1, 3, 5, 9, 12, 13, высокой – культуры № 2, 4, 6–8, 10. В отношении показателя фагоцитарной активности моноцитов средняя и низкая активность характерна для культур № 5, 11, 14, высокая – для культур № 1–4, 6–10, 12, 13. Таким образом, наибольшей способностью поглощаться фагоцитирующими клетками периферической крови обладали культуры лактобацилл № 2, 4, 6–8 и 10.

Для выявления культур молочнокислых бактерий, обладающих высокой и низкой способностью к фагоцитозу нейтрофилами, помимо кластерного анализа был проведен расчет 25-й и 75-й перцентилей. За слабую способность к фагоцитозу принимали значения показателя менее 82,0 %, за умеренную – 82,0–99,0, за высокую – более 96,0 %. Расчеты показали, что слабой активностью обладали культуры лактобацилл № 1, 11, 14, высокой – № 2, 6, 7, 10, умеренной – все остальные культуры. Полученные данные в целом соответствуют результатам кластерного анализа.

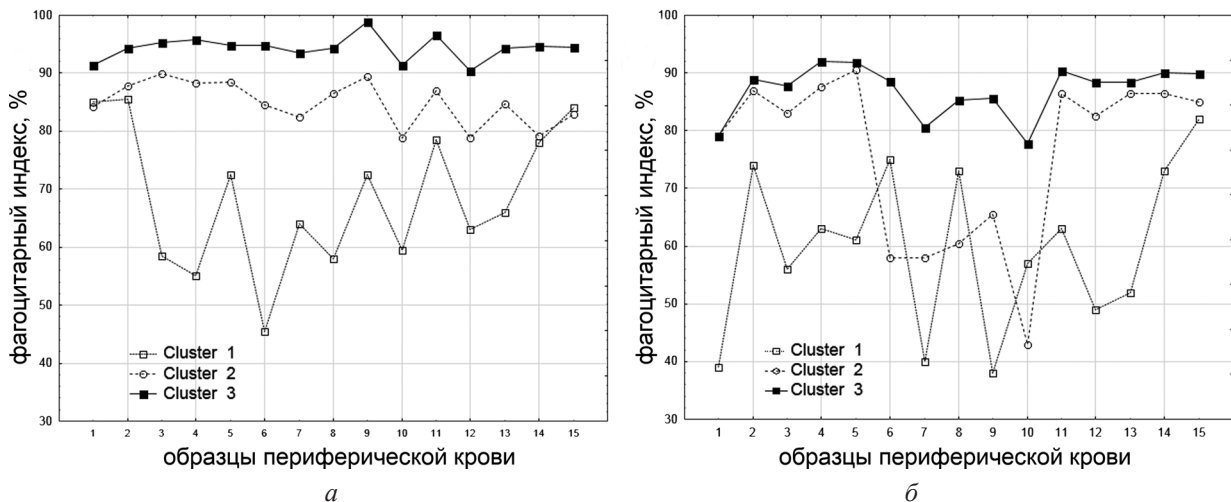


Рис. 3. Кластерный анализ культур лактобацилл по способности фагоцитироваться нейтрофилами (*a*), моноцитами (*б*)

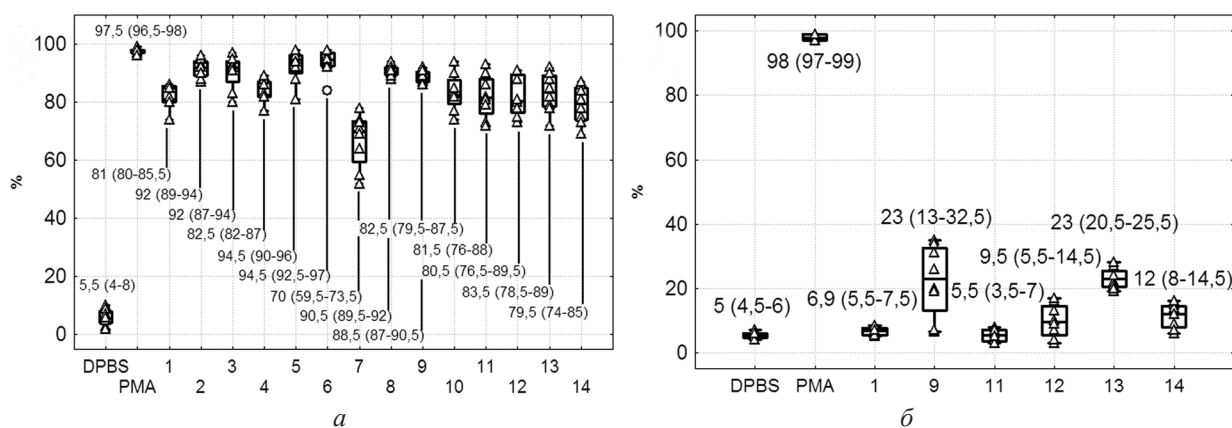


Рис. 4. Стимуляция респираторного взрыва нейтрофилов в ответ на взаимодействие с клеточными стенками (а) и лизатами лактобацилл (б)

Выявлена корреляция показателя фагоцитоза одних и тех же штаммов между нейтрофилами и моноцитами для всех исследованных культур бактерий, за исключением № 1, 10 и 14. Это подтверждает схожую фагоцитарную активность как нейтрофилов, так и моноцитов у одного и того же пациента.

Эффект бактериальных клеток и лизатов лактобацилл на продукцию свободных радикалов кислорода нейтрофилами. Результаты оценки продукции активных форм кислорода нейтрофилами в ответ на воздействие клеточных стенок лактобацилл представлены на рис. 4, а.

Исследованы клеточные стенки 14 культур лактобацилл в сравнении со стимулирующей активностью физиологического раствора и ФМА (контроли). Базовая стимулирующая активность физиологического раствора составила 5,5 (4,0–8,0) %, тогда как стимулирующая активность ФМА максимальной – 97,5 (96,5–98,0) %. В целом отмечалась высокая способность компонентов клеточных стенок активировать респираторный взрыв нейтрофилов, сравнимая с таковой ФМА.

Для подтверждения выявления культур лактобацилл, клеточные стенки которых вызывали максимальную и минимальную продукцию свободных радикалов кислорода, применяли кластерный анализ. Его результаты позволили разделить культуры молочнокислых бактерий по степени стимуляции респираторного взрыва. В наименьшей степени индуцировали образование свободных радикалов кислорода нейтрофилами клеточные стенки культуры лактобацилл № 7. Умеренной активностью обладали клеточные стенки культур № 1, 4, 10–14, высокой – № 2, 3, 5, 6, 8, 9.

Для отбора культур молочнокислых бактерий, обладающих высокой и низкой способностью стимулировать образование свободных радикалов кислорода нейтрофилами, был произведен расчет 25-й и 75-й перцентилей. Результаты показали, что клеточные стенки культуры № 7 характеризовались слабой активностью, клеточные стенки № 3–6 – высокой, а культуры № 1, 2, 8–14 – умеренной. Так же как и при анализе показателя фагоцитоза, результаты в целом совпадают с таковыми, полученными при помощи кластерного анализа, что подтверждает возможность использования этих двух подходов для дифференциации культур бактерий по степени воздействия на клетки иммунной системы.

Для оценки стимуляторной активности лизатов лактобацилл были избирательно исследованы культуры № 1, 9, 12–14 (рис. 4, б). Несмотря на то что выявлены статистически достоверные различия в способности вызывать респираторный взрыв между отрицательным контролем (клетки с буферным раствором DPBS) и клетками, инкубированными с лизатами культур № 1, 9, 13 и 14 ($P < 0,05$), в целом результаты исследования свидетельствуют об относительно невысокой их способности стимулировать респираторный взрыв.

Влияние клеточных стенок лактобацилл на экспрессию активационных и ко-стимуляторных молекул лимфоцитами и моноцитами. Оценку влияния клеточных стенок лактобацилл на экспрессию лимфоцитами поверхностной активационной молекулы CD69 проводили с культурами № 12–14. Как свидетельствуют представленные в табл. 1 данные, медианные значения

Т а б л и ц а 1. Экспрессия молекул CD69 и CD80 лимфоцитами и моноцитами периферической крови под воздействием компонентов клеточных стенок молочнокислых бактерий

| Группа | CD69 ⁺ лимфоциты, % | CD80 ⁺ моноциты, % |
|------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| Контроль (DPBS) | 4,6 (3,0–7,0)* | 2,0 (1,0–3,0)* |
| Положительный контроль (ФМА) | 98,5 (97,0–99,0)** | Нет данных |
| Положительный контроль (LPS) | Нет данных | 89,5 (86,0–90,7)** |
| № 12 (1 мкг/мл) | 7,2 (5,6–10,0)*,** | 76,8 (70,5–80,4)** |
| № 13 (1 мкг/мл) | 8,5 (7,0–10,6)*,** | 86,8 (72,1–89,4)** |
| № 14 (1 мкг/мл) | 8,9 (6,5–11,2)*,** | 82,1 (75,2–90,1)** |

П р и м е ч а н и е. Достоверность различий ($P < 0,05$): * – по сравнению с ФМА/LPS *E. coli*; ** – по сравнению с DPBS.

относительного содержания клеток, экспрессирующих молекулу активации CD69 в сравнении с отрицательным контролем, достоверно возрастали в 1,5–2 раза ($P < 0,05$).

Добавление ФМА в качестве положительного контроля увеличивало число активированных лимфоцитов до 97 % и выше. Число активированных лимфоцитов не отличалось при использовании клеточных стенок разных культур лактобацилл ($H = 0,47$; $P = 0,79$).

Пример анализа экспрессии молекулы CD80 моноцитами представлен на рис. 5.

Данные о стимуляторном эффекте клеточных стенок штаммов лактобацилл № 12–14 на экспрессию моноцитами периферической крови молекулы ко-стимуляции CD80 представлены в табл. 1. Как видно из таблицы, значения относительного содержания моноцитов, экспрессирующих CD80, под влиянием клеточных стенок лактобацилл и LPS достоверно повышались в сравнении с отрицательным контролем. Клеточные стенки культуры лактобацилл № 12 обладали более слабым стимуляторным действием на моноциты по сравнению с LPS ($P = 0,01$), а эффект клеточных стенок культур № 13 и 14 не отличался достоверно от LPS ($P > 0,05$). Различий между препаратами клеточных стенок в стимуляции экспрессии CD80 моноцитами не выявлено ($H = 3,19$; $P = 0,20$).

Исследование влияния клеточных стенок лактобацилл на продукцию цитокинов моноцитами и лимфоцитами. Число ИНФ- γ -продуцирующих лимфоцитов после культивирования с клеточными стенками лактобацилл в разных концентрациях не отличалось достоверно от отрицательного контроля (пробы с буфером DPBS) ($H = 4,4$; $P = 0,5$) (табл. 2).

Во всех исследованных образцах, за исключением культуры № 9 (100 нг/мл), число ФНО- α^+ лимфоцитов после культивирования клеток с LPS и клеточными стенками увеличивалось в 2 раза ($P < 0,05$), вероятно, за счет В-клеток. Достоверных различий в способности LPS и клеточных стенок исследуемых культур лактобацилл стимулировать продукцию ФНО- α лимфоцитами не выявлено.

Активность клеточных стенок лактобацилл в отношении продукции ФНО- α моноцитами была сравнима с эффектом LPS, на что указывает отсутствие достоверных различий между исследованным показателем после стимуляции LPS и клеточными стенками в разных концентрациях ($P > 0,05$).

Не выявлено различий в продукции цитокинов клетками при стимуляции бактериальными клеточными стенками в двух концентрациях: 100 нг/мл и 1 мкг/мл, что, вероятно, связано с тем, что минимальная концентрация 100 нг/мл оказалась достаточна для активации всех потенциально отвечающих на данные стимулы клеток в культуре.

Т а б л и ц а 2. Продукция цитокинов лимфоцитами и моноцитами под действием препаратов клеточных стенок лактобацилл

| Группа | Субпопуляция, % | | |
|--------------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|
| | ИНФ- γ^+ лимфоциты | ФНО- α^+ лимфоциты | ФНО- α^+ моноциты |
| Контроль (DPBS) | 2,0 (1,1–2,3) | 12,8 (12,5–17,1)** | 33,6 (23,5–36,4)** |
| LPS <i>E. coli</i> (100 нг/мл) | 2,3 (1,1–2,4) | 21,4 (18,1–26,5)* | 94,9 (93,4–96,6)* |
| № 8 (100 нг/мл) | 2,2 (1,3–3,1) | 24,3 (21,7–25,7)* | 92,3 (87,0–92,9)* |
| № 8 (1 мкг/мл) | 2,8 (1,6–4,5) | 21,1 (20,0–28,7)* | 84,1 (83,7–88,3)* |
| № 9 (100 нг/мл) | 3,2 (3,1–3,5) | 17,9 (15,1–21,4) | 90,8 (88,2–92,2)* |
| № 9 (1 мкг/мл) | 2,3 (0,6–5,2) | 24,9 (22,9–26,0)* | 90,0 (88,0–93,6)* |

П р и м е ч а н и е. Достоверность различий ($P < 0,05$): * – по сравнению с DPBS; ** – по сравнению с LPS *E. coli*.

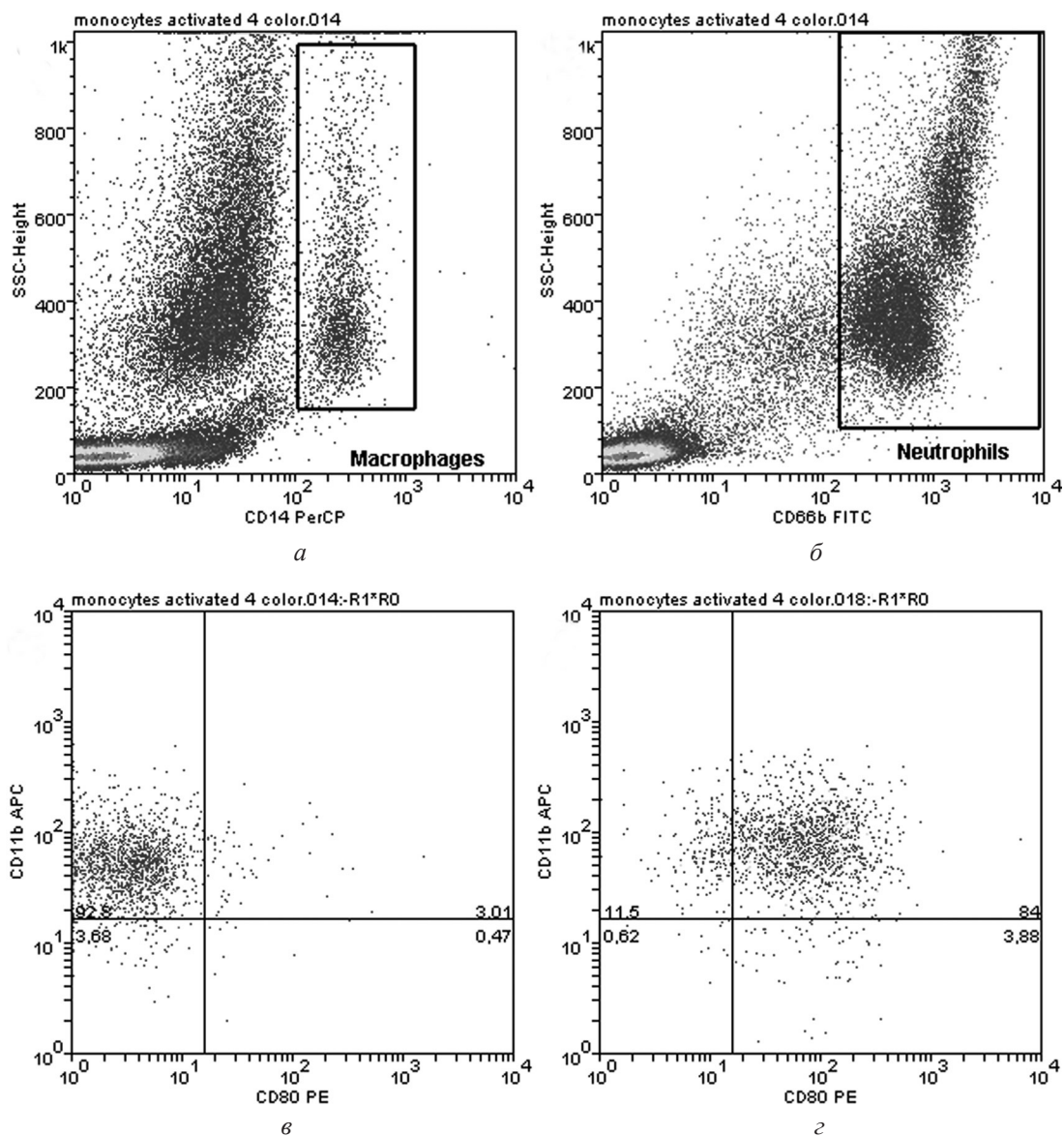


Рис. 5. Оценка экспрессии CD80 моноцитами периферической крови под воздействием клеточных стенок лактобацилл: *a, б* – цитограммы в координатах CD66b/SSC и CD14/SSC, выделены регионы, включающие моноциты/макрофаги и нейтрофилы (для их исключения из анализа); *в* – цитограмма в координатах CD80/CD11c – моноциты/макрофаги, отрицательный контроль (DPBS); *г* – макрофаги, стимулированные клеточной стенкой культуры № 4

Положительный эффект лактобацилл на состояние здоровья индивидуума реализуется на многих уровнях и обусловлен следующими их способностями: а) продуцировать и удовлетворять потребности организма хозяина в витаминах группы В (биотине, ниацине – В3, пиридоксине – В6 и фолиевой кислоте); б) контролировать размножение и колонизацию болезнетворных микроорганизмов; в) контролировать уровень холестерина в крови и таким образом защищать от развития сердечно-сосудистых заболеваний; г) обладать радиопротекторным и противораковым эффектом; д) улучшать функциональные параметры желудочно-кишечного и урогенитального трактов; е) участвовать в обмене ряда гормонов (например, эстрогенов) [2–4, 11, 12]. Очевидно, что многие из перечисленных свойств лактобацилл обусловлены их длительной ко-эволюцией с иммунной системой человека и способностью оказывать регуляторный эффект на ее функцию [24, 36, 37].

Заключение. В результате изучения взаимодействия поли- и моноклеарных клеток периферической крови человека с клетками лактобацилл и их компонентами установлено:

а) наличие штаммовых различий лактобацилл, обусловленное их способностью поглощаться нейтрофилами и моноцитами;

б) высокая способность клеточных стенок лактобацилл активировать нейтрофилы и индуцировать образование свободных радикалов кислорода (респираторный взрыв) и относительно низкая активность лизатов этих микроорганизмов;

в) слабый эффект клеточных стенок лактобацилл на экспрессию молекул CD69 лимфоцитами крови и выраженный эффект клеточных стенок штаммов лактобацилл на экспрессию молекулы CD80 молекулы моноцитами крови;

г) высокая способность клеточных стенок лактобацилл стимулировать продукцию ФНО- α моноцитами.

Проведенный кластерный анализ позволил дифференцировать культуры лактобацилл по их способности поглощаться нейтрофилами и стимулировать в этих клетках образование свободных радикалов кислорода. Полученные данные, указывающие на значительный иммуномодулирующий эффект как бактериальных клеток лактобацилл, так и препаратов клеточных стенок, позволят разработать иммуномодуляторы на основе наиболее активных штаммов лактобацилл.

Литература

1. Головнева Н. А., Щетко В. А. // Микробные биотехнологии: фонд. и прикл. аспекты: сб. науч. тр. Минск, 2009. Т. 2. С. 48–58.
2. Денисенко В. В., Найдено И. А. // Микробные биотехнологии: фонд. и прикл. аспекты: сб. науч. тр. Минск, 2007. Т. 1. С. 233–241.
3. Драник Г. Н. // Клиническая иммунология и аллергология. Одесса, 2003. – 604 с.
4. Корнеева О. С., Черемушкина И. В., Глуценко А. С и др. // ЖМЭИ. 2012. № 5. С. 67–70.
5. Soleimani N. A., Kermanshahi. R. K., Yakhchali B. et al. // Afr. J. of Microbiol. Res. 2010. Vol. 4, N 20. P. 2169–2173.
6. De Vrese M., Marteau P. R. // The J. of Nutrition. 2007. Vol. 137, N 3. P. 803–811.
7. Горелов А. В., Усенко Д. В. // Вопр. совр. педиатрии. 2003. Т. 2, № 4. С. 87–90.
8. Ajmal S., Ahmed N. // Afr. J. of Microbiol Res. 2009. Vol. 3, N 12. P. 851–855.
9. Allen S. J., Jordan S., Storey M. et al. // The J. of Nutrition. 2010. Vol. 140, N 3. P. 483–488.
10. De Vrese M., Winkler P., Rautenberg P. et al. // Clin. Nutrition. 2005. Vol. 24, N 4. P. 481–491.
11. Пащенко М. В., Будихина А. С., Голубева Н. М. и др. // Иммунология. 2012. Т. 33, № 4. С. 199–203.
12. Тутов Л. П. // Иммунология: терминологический словарь. М., 2008. – 512 с.
13. Delcenserie V., Martel D., Lamoureux M. et al. // Curr. Iss. Mol. Biol. 2008. Vol. 10, N 1–2. P. 37–54.
14. Ozdemir O. // Clin. Exp. Immunol. 2010. Vol. 160, N 3. P. 295–304.
15. Shu Q., Gill H. S. // Med. Microbiol. Immunol. 2001. Vol. 189, N 3. P. 147–152.
16. Tang H., Ren J., Yuan J. et al. // Afr. J. of Microbiol. Res. 2010. Vol. 4, N 12. P. 1251–1256.
17. Vamanu E., Vamanu A. // Afr. J. Med. Res. 2010. Vol. 4, N 7. P. 534–537.
18. Anding K., Rost J. M., Jacobs E. et al. // Med. Microbiol. 2003. Vol. 35, N 2. P. 147–152.
19. Baken K. A., Ezendam. J., Gremmer E. R. et al. // Int. J. of Food Microbiol. 2006. Vol. 112, N 1. P. 8–18.
20. Corthesy B., Gaskins H. R., Mercenier A. // The J. of Nutrition. 2007. Vol. 137, N 3. P. 781–790.
21. Li Y., Qu X., Yang H. et al. // Cell. and Mol. Immunol. 2005. Vol. 2, N 6. P. 473–478.
22. Mileti E., Matteoli G., Iliev I. D. et al. // PLoS One. [Electronic resource]. 2009. Vol. 4, N 9. – Mode of access: <http://www.plosone.org/article/info:doi/10.1371/journal.pone.0007056>. – Date of access: 10.07.2013.
23. Otero M. C., Nader-Macias M. E. // Comm. Curr. Res. and Educational Topics and Trends in Appl. Microbiol. 2007. Vol. 2. P. 749–757.
24. Wells J. M. // Microbiol. Cell Factories. 2011. Vol. 10, N 1. P. 17–32.
25. Man J. C., Rogosa M., Sharpe M. E. // J. Appl. Bacteriol. 1960. Vol. 23, N 1. P. 130–135.
26. Tejada-Simon M. V., Pestka J. J. // J. of Food Protection. 1999. Vol. 62, N 12. P. 1435–1444.
27. Walker J. M. // The Protein Protocols Handbook. New York, 2002. P. 3–6.
28. Augustyniak D., Jankowski A., Mackiewicz P. et al. // BMC Immunol. [Electronic resource]. 2012. Vol. 13, N 24. – Mode of access: <http://www.biomedcentral.com/1471-2172/13/24>. – Date of access: 22.01.2013.
29. Vowells S. J., Sekhsaria S., Malech H. L. et al. // J. of Immunol. Meth. 1995. Vol. 178, N 1. P. 89–97.
30. Gomes A., Fernandes E., Lima J. L. F. C. // J. Biochem. Biophys. Meth. 2005. Vol. 65, N 2–3. P. 45–80.
31. Гончаров А. Е., Шпаковская Н. С., Тутов Л. П. и др. // Мед. панорама. 2011. № 9. С. 31–33.
32. Гончаров А. Е., Тутов Л. П., Кошелев С. В. и др. // Весці НАН Беларусі. Сер. мед. навук. 2012. № 2. С. 63–69.
33. Электронный учебник по статистике // StatSoft, Inc. [Electronic resource]. 1984–2013. – Mode of access: <http://www.statsoft.ru/home/textbook/modules/stcluan.html>. – Date of access: 10.07.2013.
34. Реброва О. Ю. // Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. М., 2008.
35. Genser B., Cooper P. J., Yazdanbakhsh M. et al. // BMC Immunol. [Electronic resource]. 2007. Vol. 8, N 27. – Mode of access: <http://www.biomedcentral.com/1471-2172/8/27>. – Date of access: 10.07.2013.

36. *Evrard B., Coudeyras S., Dosqilbert A. et al. // PLoS One. [Electronic resource]. 2011. Vol. 6, N 4. – Mode of access: <http://www.plosone.org/article/info:doi/10.1371/journal.pone.0018735>. – Date of access: 10.07.2013.*
37. *Vincenti J. E. // Biosci. Horizons. 2010. Vol. 3, N 2. P. 105–112.*

L. P. TITOV, A. Y. HANCHAROU, A. S. MURASHKO, N. A. GOLOVNYOVA, I. A. NAIDENKO, E. I. KOLOMIETS

**INTERACTION OF LACTOBACILLI AND THEIR COMPONENTS WITH NEUTROPHILES,
MONOCYTES AND LYMPHOCYTES OF HUMAN PERIPHERAL BLOOD**

Summary

The aim of the investigation was to study the influence of lactobacilli strains and their cell walls on the function of immune cells *in vitro*. Experiments showed the presence of inter-strain changes due to the ability of lactobacteria to be absorbed by neutrophils and monocytes of the human blood. The high ability of lactobacteria cell wall components to activate neutrophils and to stimulate the generation of reactive oxygen species was shown. The weak effect of lactobacilli cell wall components on the expression of CD69 by lymphocytes was established. Lactobacilli cell walls enhanced the CD80 expression by monocytes. The results obtained demonstrate the significant immunomodulatory effect of the lactobacilli strains studied, as well as their isolated cell walls.