

productivity over 9500 kg of milk / L. V. Romanenko, V.I. Volgin, Z. L. Fedorova, E. A. Korochkina. *Genetika i razvedeniye zhivotnykh*. 2016. No 4. pp. 12-20 [in Russian]

5. Novikova N. A. Development trends of the dairy industry in Russia // International Scientific and Practical Journal "Agricultural and Food Economics". – 2017. – February. – URL: <http://apej.ru/article/17-02-17> (accessed 07.07.2019).

6. Plokhinsky N. A. Biometrics guide for animal technicians. Moscow. *Kolos*. 1969. pp. 232-239 [in Russian]

7. Productivity and the milk quality of Red-Motley cows of the Yenisei type/ A. I. Golubkov, S. V. Shadrin, E. G. Sirotinin, A. A. Golubkov. *Vestnik KrasGAU*. 2011. No 11. pp. 162-167 [in Russian]

8. Chosen biotic factors influencing raw cow milk freezing point / O. Hanuš, Y. Zhang, M. Bjelka, J. Kučera, P. Roubal, R. Jedelská. *Acta universitatis agriculturae et silviculturae mendelianae brunensis LIX*. 2011. No 5. pp. 65-81.

9. Genetic association between milk lactose, freezing point and somatic cell score in Italian Holstein cows. A. Costa, M. De Marchi, M. Cassandro, G. Visentin, N. Lopez-Villalobos, M. Penasa. 2018. URL: <https://www.researchgate.net/publication/324942411> (access date 13.05.2019).

10. Rasmussen M. D., Bjerring M. Development of bulk milk quality from herds with automatic milking system. *Physiological and Technical Aspects of Machine Milking*. 2005. No 10. pp. 71-86.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования России, номер государственного учёта НИОКТР: АААА-А19-119012290066-7.

УДК 579.86:579.22

DOI: 10.34655/bgsha.2019.57.4.004

Е.Е. Кочкина, М.В. Сычёва, Т.М. Пашкова, О.Л. Карташова

АНТИЦИТОКИНОВАЯ АКТИВНОСТЬ БАКТЕРИЙ РОДА *ENTEROCOCCUS*, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ЖИВОТНЫХ

Ключевые слова: энтерококки, цитокины, антицитокиновая активность, ИЛ-10, ФНО- α .

*Статья посвящена изучению антицитокиновой активности энтерококков различного происхождения. опыты in vitro проведены на 84 штаммах энтерококков разных видов, выделенных из фекалий здоровых продуктивных животных и от животных с инфекционно-воспалительными заболеваниями. Антицитокиновую активность бактерий рода *Enterococcus* в отношении фактора некроза опухоли и интерлейкина-10 определяли фотометрически по методике О.В. Бухарина с соавт. (2011). Полученные данные были обработаны статистически. Результаты исследования свидетельствуют о широком распространении антицитокинового признака в популяции фекальных и клинических изолятов энтерококков. Среди энтерококков кишечного происхождения отмечена широкая распространённость антицитокиновой активности в отношении фактора некроза опухоли, в то время как среди клинических изолятов доминировали культуры *Enterococcus* spp., способные деградировать/связывать интерлейкин-10. Полученные результаты не только расширяют представления об иммуномодулирующей и противовоспалительной функции симбиотических энтерококков кишечного биотопа, но и могут быть использованы для дифференциации бактерий рода *Enterococcus* на симбиотические и этиологически значимые штаммы.*

E. Kochkina, M. Sycheva, T. Pashkova, O. Kartashova

ANTI-CYTOKINE ACTIVITY OF GENUS *ENTEROCOCCUS* BACTERIA ISOLATED FROM ANIMALS

Keywords: enterococci, cytokine, anti-cytokine activity, IL-10, TNF- α .

The article is devoted to the study of the anti-cytokine activity of enterococci of various origin. In vitro experiments were carried out on 84 strains of enterococci of various species isolated from the feces of the healthy productive animals and from the animals with infectious and inflammatory diseases. The anti-cytokine activity of bacteria of the genus Enterococcus with respect to tumor necrosis factor and interleukin-10 was determined photometrically by the method of O.V. Bukharin et al. (2011). The data obtained was statistically processed. The results of the study indicate a wide distribution of the anti-cytokine trait in the population of fecal and clinical isolates of enterococci. The prevalence of anti-cytokine activity against tumor necrosis factor among enterococci of intestinal origin was noted, while Enterococcus spp. cultures, capable of degrading / binding interleukin-10 dominated among clinical isolates. The results obtained do not only expand the understanding of the immunomodulatory and anti-inflammatory functions of the symbiotic enterococci of the intestinal biotope, but can also be used to differentiate bacteria of the genus Enterococcus into symbiotic and etiologically significant strains.

Кочкина Елена Евгеньевна¹, аспирант кафедры микробиологии и заразных болезней; e-mail: alena-200838@mail.ru

Elena E. Kochkina, postgraduate student of the Chair of Microbiology and Infectious Diseases; e-mail: alena-200838@mail.ru

Сычёва Мария Викторовна^{1,2}, доктор биологических наук, доцент, заведующий кафедрой микробиологии и заразных болезней; старший научный сотрудник; e-mail: sycheva_maria@mail.ru

Mariya V. Sycheva, Doctor of Biological Sciences, Associate Professor, Head of the Chair of Microbiology and Infectious Diseases; Senior Researcher; e-mail: sycheva_maria@mail.ru

Пашкова Татьяна Михайловна^{2,1}, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник; доцент кафедры микробиологии и заразных болезней; e-mail: pashkova070782@mail.ru

Tatyana M. Pashkova, Doctor of Biological Sciences, Leading Researcher; Associate Professor of the Chair of Microbiology and Infectious Diseases e-mail: pashkova070782@mail.ru

Карташова Ольга Львовна^{2,1} доктор биологических наук, доцент, заведующий лабораторией; профессор кафедры микробиологии и заразных болезней; e-mail: labpersist@mail.ru

Olga L. Kartashova, Doctor of Biological Sciences, Associate Professor, Head of the Laboratory; Professor of the Chair of Microbiology and Infectious Diseases; e-mail: labpersist@mail.ru

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Оренбургский государственный аграрный университет», Оренбург, Россия
Orenburg State Agrarian University, Orenburg, Russia

² Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения РАН, Оренбург, Россия

Institute of cellular and intracellular symbiosis UB RAS, Orenburg, Russia

Введение. Цитокины – это большая группа полипептидных молекул, которые могут синтезироваться практически всеми ядродержащими клетками организма и обеспечивают регуляцию иммунного ответа макроорганизма [6]. В совокупности цитокины формируют разветвлён-

ную и многоуровневую цитокиновую сеть, для правильного функционирования которой необходимо строгое соблюдение баланса как самих цитокинов, так и их рецепторов [4]. Микроорганизмы не только являются одними из наиболее сильных индукторов синтеза цитокинов, но и

способны снижать концентрацию этих медиаторов иммунной системы за счёт супрессии их синтеза или использования в качестве ростовых факторов. Причём модифицировать цитокиновый статус способны не только патогенные бактерии, но и представители мутуалистической микробиоты [1]. Учитывая вышеизложенное, в качестве объекта исследования нами были выбраны бактерии рода *Enterococcus*, которые, с одной стороны, являются представителями симбиотической микрофлоры, а с другой, возбудителями эндогенных инфекций.

Изучение выше обозначенных процессов представляет значительный интерес, так как способствует пониманию закономерностей взаимодействия микроорганизмов с цитокиновой сетью и формирования ответных реакций макроорганизма. Поскольку в литературе довольно подробно освещены вопросы регулирующего влияния культур энтерококков на экспрессию цитокинов [7, 8, 9], целью нашей работы явилась сравнительная характеристика способности энтерококков, изолированных от здоровых животных и с инфекционно-воспалительными заболеваниями, к деградации/связыванию цитокинов.

Условия и методы исследования. Объектом исследования послужили 84 штамма энтерококков. 42 культуры были выделены из фекалий клинически здоровых продуктивных животных и представлены видами *E. faecium*, *E. hirae*, *E. durans*, *E. flavescens*, *E. faecalis* и *E. casseliflavus*. Кроме того, были использованы 42 культуры энтерококков – возбудителей инфекционно-воспалительных заболеваний животных. Из них 16 штаммов из экскрета половых органов самок с эндометритами (*E. faecium*, *E. faecalis*, *E. avium*, *E. durans*); 22 культуры видов *E. flavescens*, *E. faecalis*, *E. casseliflavus* из раневого отделяемого и 4 изолята из секрета молочных желёз при маститах

(*E. hirae*, *E. faecalis*, *E. casseliflavus*).

Способность к деградации/связыванию цитокинов – антицитокиновую активность (АЦА) определяли фотометрически по методу О.В. Бухарина с соавторами [3]. Изучение способности супернатантов энтерококков вызывать изменение концентрации провоспалительного (ФНО- α) и противовоспалительного цитокина (ИЛ-10) проводили путём соинкубирования экзо-метаболизатов бактерий с рекомбинантными цитокинами (ФНО- α , ИЛ-10).

Полученные в ходе исследований данные были обработаны статистически. Достоверность различий сравниваемых показателей оценивалась по t-критерию Стьюдента [2].

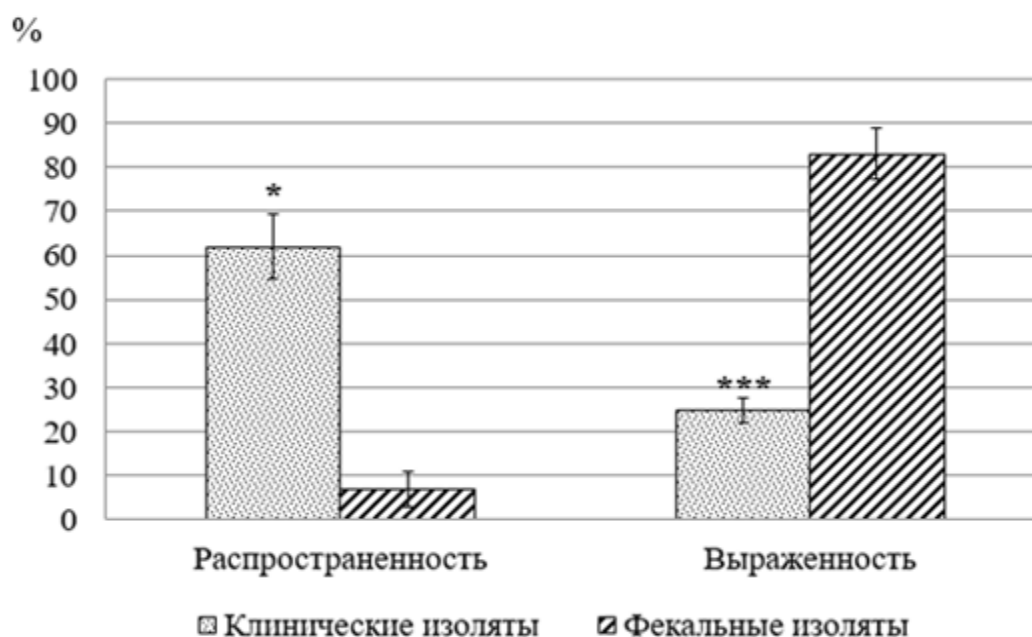
Результаты исследований и их обсуждения. При изучении антицитокиновой активности энтерококков установлено, что только три фекальных изолята (7,1 \pm 3,96%) обладали способностью деградировать ИЛ-10 (рис. 1).

Экспрессия признака составила для культуры *E. durans* 73,3%, изолята *E. faecalis* – 80,0% и штамма *E. hirae* – 95,6%.

Распространенность АЦА в отношении изучаемого противовоспалительного цитокина среди клинических изолятов была значимо больше, чем среди фекальных культур, и составила 62,0 \pm 7,50% ($p < 0,05$).

Диапазон экспрессии признака варьировал от 24,7 \pm 2,74% у этиологически значимых культур до 83,0 \pm 5,80% у изолятов, выделенных из фекалий здоровых продуктивных животных ($p < 0,001$).

Чаще способность к инактивации ИЛ-10 отмечалась у штаммов энтерококков, выделенных из гнойного экссудата (72,7 \pm 9,49%). Среди культур, изолированных из экскрета половых органов самок при эндометритах, антицитокиновый признак в отношении ИЛ-10 встречался у 56,0 \pm 12,40% энтерококков.



Примечание: *** – достоверность различий распространённости и выраженности АЦА в отношении ИЛ-10 среди фекальных и клинических изолятов энтерококков – ($p < 0,001$); * – ($p < 0,05$)

Рисунок 1. АЦА в отношении ИЛ-10 фекальных и клинических изолятов *Enterococcus spp.*

Только у одной культуры (25,0±21,70%), выделенной из секрета молочных желёз при маститах, обнаружена способность разрушать интерлейкин-10 (рис. 2). Степень выраженности антицитокинового признака изменялась в зависимости от источника выделения, нарастая в ряду: гнойный экссудат (23,4±3,12%) – экскрет половых органов самок (24,2±5,78%) – секрет молочных желёз

(35,6%). Полученные результаты позволяют предположить, что клиническая значимость *non-faecalis* видов энтерококков, которые преимущественно выступают в роли этиологического фактора маститов и не обладают факторами вирулентности [5], во многом определяется способностью модифицировать цитокиновый статус макроорганизма.

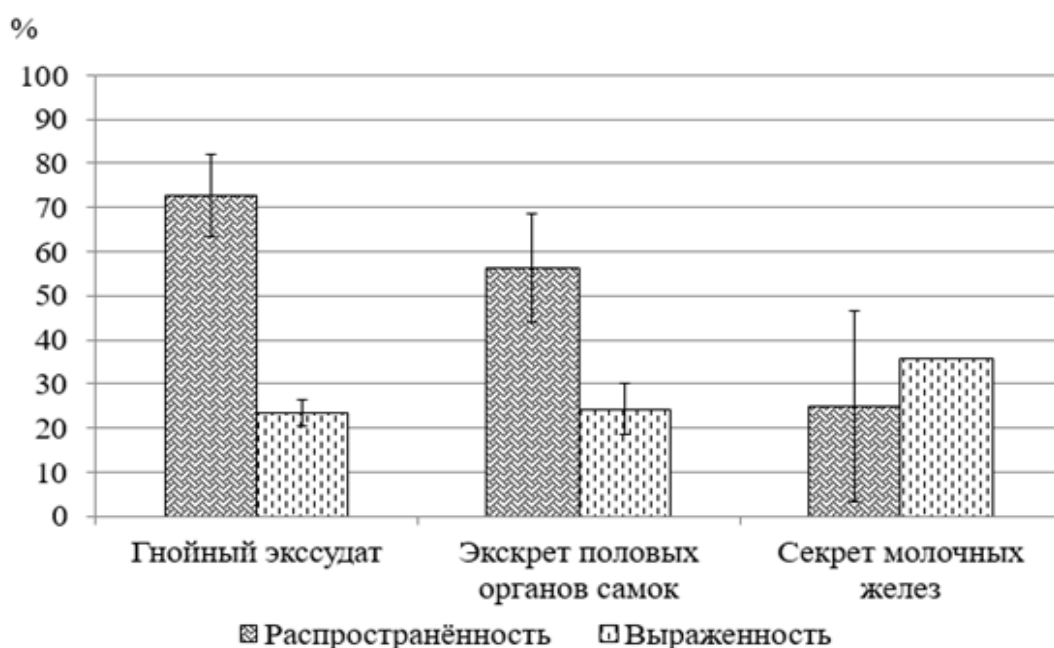
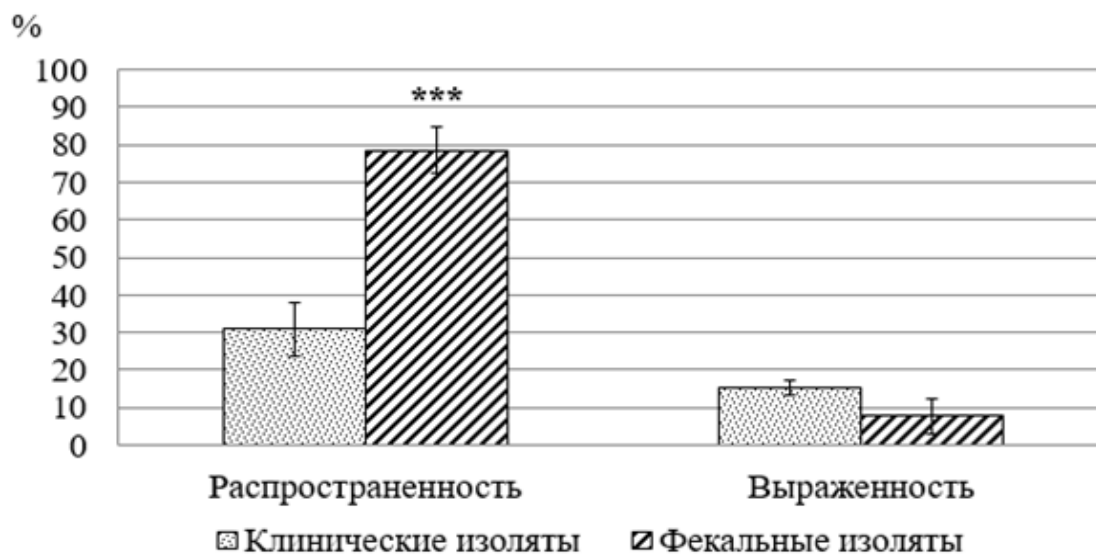


Рисунок 2. Распространенность и выраженность АЦА в отношении ИЛ-10 среди клинических изолятов энтерококков в зависимости от источника выделения

На следующем этапе нашей работы мы предприняли попытку оценить распространённость и выраженность в популяции фекальных и клинических изолятов энтерококков антицитоклиновой активности в отношении фактора некроза опухоли.

Установлено, что способностью деградировать ФНО- α обладало $78,6 \pm 6,33\%$ энтерококков, выделенных из кишечного биотопа здоровых животных (рис. 3).

Вероятно, способность снижать концентрацию провоспалительного цитокина ФНО- α энтерококками в условиях здорового организма можно рассматривать как один из феноменов, обеспечивающих формирование иммунологической толерантности организма хозяина к индигенной микрофлоре. Обладая указанной способностью, микросимбионты адаптируются в макроорганизме.



Примечание: *** достоверность различий распространённости АЦА в отношении ФНО- α среди фекальных и клинических изолятов энтерококков ($p < 0,001$).

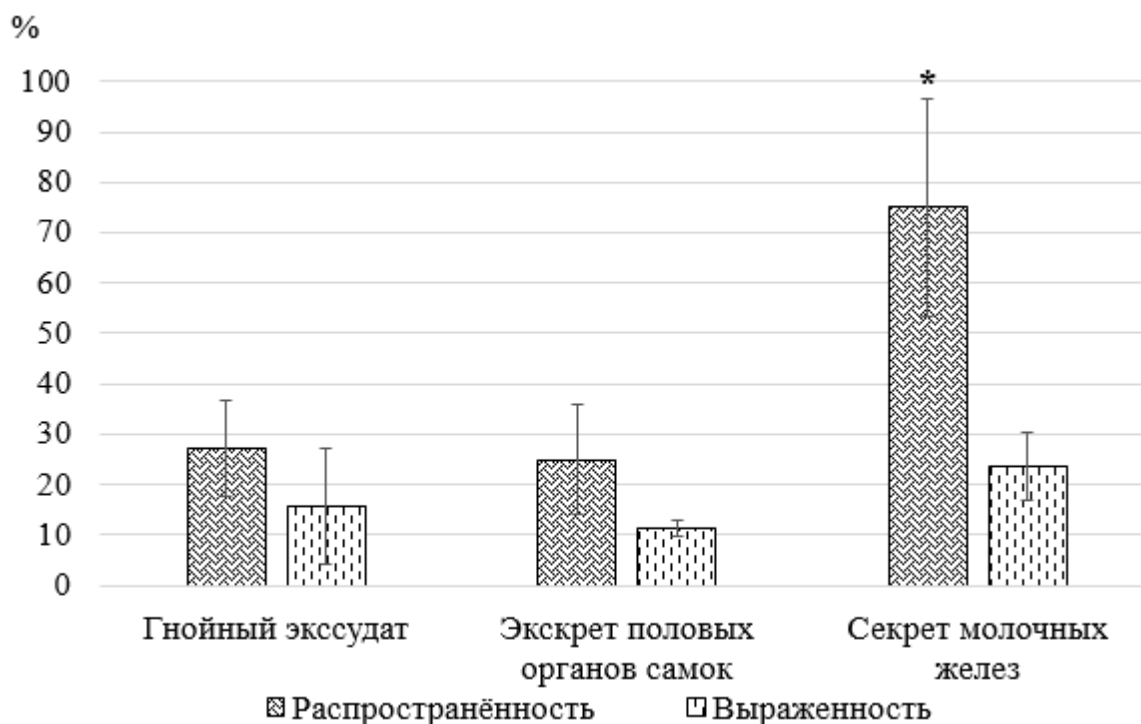
Рисунок 3. АЦА в отношении ФНО- α фекальных и клинических изолятов *Enterococcus spp.*

Среди энтерококков, выделенных из клинического материала, распространённость АЦА в отношении фактора некроза опухоли была значимо ниже, чем среди фекальных изолятов, и составила $31,0 \pm 7,14\%$ ($p < 0,001$).

Достоверно чаще ($p < 0,05$) способность к инактивации фактора некроза опухоли отмечалась у штаммов, выделенных из секрета молочных желёз при маститах ($75,0 \pm 21,70\%$ культур), в то время как среди бактерий рода *Enterococcus*, изолированных из раневого отделяемого и экскрета половых органов самок при эндометритах, антицитоклиновый признак

встречался лишь у четверти штаммов ($27,3 \pm 9,49\%$ и $25,0 \pm 10,80\%$, соответственно) (рис. 4).

Степень выраженности антицитоклиновой активности изменялась в зависимости от источника выделения. Так, у бактерий рода *Enterococcus*, выделенных из секрета молочных желёз при маститах, изучаемый фактор персистенции был в 2 раза выше, чем у микроорганизмов, выделенных из раневого отделяемого и из экскрета половых органов самок, составив $23,6 \pm 6,62\%$ против $15,6 \pm 11,47\%$ и $11,5 \pm 1,56\%$, соответственно.



Примечание: * достоверность различий распространённости АЦА в отношении ФНО-α среди изолятов энтерококков, выделенных из секрета молочных желёз, по сравнению с культурами энтерококков из гнойного экссудата ($p < 0,05$).

Рисунок 4. Распространенность и выраженность АЦА в отношении ФНО-α среди клинических изолятов энтерококков в зависимости от источника выделения

Нами установлена обратная корреляционная зависимость между распространённостью антицитокинового признака в отношении интерлейкина-10 и антицитокиновой активности в отношении фактора некроза опухоли у исследуемых культур кишечных и фекальных энтерококков ($r = 0,30$, при $p < 0,01$).

Выводы. 1. Бактерии рода *Enterococcus* способны деградировать цитокины организма хозяина (ФНО-α, ИЛ-10), оказывая регулирующее влияние на цитокиновый статус макроорганизма.

2. Энтерококки, выделенные из клинического материала, обладают значимо более высоким потенциалом к инактивации противовоспалительного цитокина интерлейкина-10, чем кишечные изоляты, что, вероятно, позволяет им ослабить действие иммунной системы и может существенно влиять на течение и исход инфекционного процесса.

3. Фекальные культуры энтерококков характеризуются достоверно более высокими значениями распространённости

АЦА в отношении провоспалительного цитокина ФНО-α по сравнению с клиническими изолятами *Enterococcus sp.*, что, вероятно, обуславливает их адаптацию в кишечном биотопе организма хозяина и обеспечивает формирование иммунологической толерантности макроорганизма к симбиотической микробиоте.

Предложения. Полученные данные сравнительного анализа частоты встречаемости и уровней выраженности АЦА могут быть использованы для дифференциации бактерий рода *Enterococcus*, выделенных из организма животных, на этиологически значимые штаммы и представителей мутуалистической микробиоты, что открывает перспективы для отбора авирулентных производственно-ценных культур энтерококков.

Библиографический список

1. Антипептидная активность пробиотических штаммов бифидо- и лактобактерий / Н.Б. Перунова, Е.В. Иванова, И. Н. Чайникова, Т.А. Бондаренко // Гастроэнтерология

Санкт-Петербурга. – 2017. – № 1. – С. 98–99.

2. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. – Л.: Гос. изд-во мед. лит., 1962. – 180 с.

3. Антицитокиновая активность микроорганизмов / О.В. Бухарин, Н.Б. Перунова, И.Н. Чайникова, Е.В. Иванова, А.И. Смолягин // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2011. – № 4. – С. 56-61.

4. Мордвинов В.А., Фурман Д.П. Цитокины: Биологические свойства и регуляция экспрессии гена интерлейкина-5 человека / Информационный вестник ВОГиС. – 2009. – Т. 13. – № 1. – С. 53-67.

5. Пошвина Д.В., Сычёва М.В. Распространение генетических детерминант вирулентности среди клинических изолятов энтерококков, выделенных от животных // Сборник трудов VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика 2014». – 2014. – Т.2. – С. 464-465.

6. Симбирцев А.С. Цитокины: классификация и биологические функции // Цитокины и воспаление. – 2004. – Т. 3. – № 2. – С. 16-22.

7. Altered Cytokine Expression and Barrier Properties after In Vitro Infection of Porcine Epithelial Cells with Enterotoxigenic Escherichia coli and Probiotic Enterococcus faecium / M. Kern, D. Günzel, J.R. Aschenbach, K. Tedin, A. Bondzio, U. Lodemann // Mediators of Inflammation. – 2017. - doi: 10.1155/2017/2748192.

8. Immunomodulatory properties of cell wall extract from Enterococcus faecalis CECT7121 / M. Sparo, G. Delpech, S. Batistelli, J.B. Basualdo // Brazilian Journal of Infectious Diseases. – 2014. – No 18(5). – P. 551-555.

9. The influence of probiotic Enterococcus faecium strain L5 on the microbiota and cytokines expression in rats with dysbiosis induced by antibiotics / E. Tarasova, E. Yermolenko, V. Donets, Z. Sundukova, A. Bochkareva, I. Borshev, M. Suvorova, I. Ilyasov, V. Simanenkova, A.N. Suvorov // Beneficial microbes. – 2010. – No. 1(3). – P. 265-270.

1. Perunova N.B., Ivanova E.V., Chainikova I.N., Bondarenko T.A. Antipeptide activity of the probiotic strains of bifidobacteria and lactobacilli. *Gastroenterologiya Sankt-Peterburga*. 2017. No 1. pp. 98–99 [in Russian]

2. Ashmarin I.P., Vorobyov A.A. Statistic methods in microbiology. Leningrad. *Gos.izd.med. lit.* 1962. 177 p. [in Russian]

3. Bukharin O.V., Peru-Nova N.B., Chaynikova I.N., Ivanova E.V., Smolyagin A.I. Anticytokine activity of microorganisms. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2011. No 4. pp. 56-61 [in Russian]

4. Mordvinov V. A., Furman D. P. Cytokines: biological properties and regulation of interleukin-5 gene expression. *Informatsionnyy vestnik VOGiS*. 2009. Vol. 13. No 1. pp. 53-67 [in Russian]

5. Poshvina D.V., Sycheva M.V. Distribution of genetic determinants of virulence among clinical isolates of enterococci isolated from animals. Proc. of VIII All-Russian Sci. and Pract. Conf. "Molecular diagnostics 2014". 2014. Vol. 2. pp. 464-465 [in Russian]

6. Simbirtsev A.S. Cytokines: classification and biological functions. *Tsitokiny i vospaleniye*. 2004. Vol. 3. No 2. pp. 16-22 [in Russian]

7. M. Kern, D. Günzel, J.R. Aschenbach, K. Tedin, A. Bondzio, U. Lodemann. Altered Cytokine Expression and Barrier Properties after In Vitro Infection of Porcine Epithelial Cells with Enterotoxigenic Escherichia coli and Probiotic Enterococcus faecium. *Mediators of Inflammation*. 2017. doi: 10.1155/2017/2748192.

8. M. Sparo, G. Delpech, S. Batistelli, J.B. Basualdo. Immunomodulatory properties of cell wall extract from Enterococcus faecalis CECT7121. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2014. No 18(5). pp. 551-555.

9. E. Tarasova, E. Yermolenko, V. Donets, Z. Sundukova, A. Bochkareva, I. Borshev, M. Suvorova, I. Ilyasov, V. Simanenkova, A.N. Suvorov. The influence of probiotic Enterococcus faecium strain L5 on the microbiota and cytokines expression in rats with dysbiosis induced by antibiotics. *Beneficial microbes*. 2010. No 1(3). pp. 265-270.

Исследование выполнено при поддержке Правительства Оренбургской области в рамках гранта для финансирования инновационных проектов научных коллективов в 2019 г.