

Светлана Сергеевна КОЛЫВАНОВА<sup>1</sup>  
Людмила Фёдоровна КАЛЁНОВА<sup>2</sup>

УДК 615.331

### ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЕЙ ЦИТОКИНОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO* ПОД ВЛИЯНИЕМ МЕТАБОЛИТОВ БАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ МНОГОЛЕТНЕМЕРЗЛЫХ ПОРОД\*

<sup>1</sup> младший научный сотрудник отдела биоресурсов,  
Тюменский научный центр СО РАН;  
аспирант, Институт биологии,  
Тюменский государственный университет  
kolyvanova93@mail.ru

<sup>2</sup> доктор биологических наук, главный научный сотрудник отдела биоресурсов,  
Тюменский научный центр СО РАН;  
ведущий научный сотрудник, Международный центр криологии и криософии,  
Тюменский государственный университет  
lkalenova@mail.ru

#### Аннотация

Микробиологические исследования вечной мерзлоты показали наличие в породах данной экосистемы жизнеспособных микроорганизмов. Выживаемость бактерий в экстремально холодных условиях послужила основанием для изучения их продуктов

---

\* Работа выполнена при поддержке Фонда содействия инновациям по программе «УМНИК» (грант № 11073) и по госзаданию, согласно Плану НИР ТюмНЦ СО РАН на 2018-2020 гг., протокол № 2 от 08.12.2017 г. (Приоритетное направление IX.133. Программа IX.133.1. Проект: IX.133.1.4. Криобиологические процессы на суше и в прибрежной части Карского моря в условиях повышения среднегодовых температур).

---

**Цитирование:** Колыванова С. С. Изменение уровней цитокинов периферической крови человека *in vitro* под влиянием метаболитов бактерий, выделенных из многолетнемерзлых пород / С. С. Колыванова, Л. Ф. Калёнова // Вестник Тюменского государственного университета. Экология и природопользование. 2018. Том 4. № 4. С. 123-136.  
DOI: 10.21684/2411-7927-2018-4-4-123-136

---

жизнедеятельности (вторичных метаболитов). Известно, что количество бактериальных клеток и температура их культивирования значимо влияют на их биологическую активность. Например, экспериментальное изучение *Bacillus sp.* штамма МЗ, выделенного из многолетнемерзлых пород, показало, что изменение температурных условий культивирования влияло на ферментативные, иммуностропные и репаративные свойства бактерий *in vitro* и *in vivo*. В связи с этим, изучение влияния метаболитов микроорганизмов многолетнемерзлых пород на уровень секреции цитокинов как показателей иммунологической реактивности представляется актуальным в перспективе создания новых иммуностропных препаратов.

В статье анализируется влияние вторичных метаболитов бактерий *Bacillus sp.* (штамм МЗ) и *Bacillus megaterium* (штамм 8/75-1) из многолетнемерзлых пород на синтез моноклеарами про- (ФНО- $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-8, ИЛ-2, ИФН- $\gamma$ ) и противовоспалительных (ИЛ-4, ИЛ-10) цитокинов методом ИФА. Метаболиты получали из взвеси микроорганизмов, взятых в аликвотах по  $0,05 \cdot 10^6$  или  $500 \cdot 10^6$  м. кл./мл и инкубированных при температурах  $-5$  °С и  $37$  °С. Выявленные эффекты действия метаболитов находились в определенной зависимости от температуры инкубации микроорганизмов, их количества и видовой принадлежности. Метаболитами от  $0,05 \cdot 10^6$  м. кл. *Bacillus sp.* штамма МЗ было оказано стимулирующее влияние на синтез цитокинов, характеризующих реакции неспецифической (ИЛ-1 $\beta$  и ИЛ-8), клеточной (ИФН- $\gamma$ ) и гуморальной (ИЛ-4) иммунорезистентности, а действие метаболитов штамма 8/75-1 активировало деятельность клеточного иммунитета (ИЛ-2, ИФН- $\gamma$ ). Из метаболитов бактерий от  $500 \cdot 10^6$  м. кл. более активными стимуляторами секреции цитокинов оказались «тепловые» метаболиты штамма 8/75-1, а у штамма МЗ — «холодовые».

#### Ключевые слова

Цитокины, моноклеарные клетки, периферическая кровь, вторичные метаболиты бактерий, многолетнемерзлые породы.

DOI: 10.21684/2411-7927-2018-4-4-123-136

#### Введение

Одной из уникальных экосистем, характеризующейся отрицательными температурами на протяжении геологического времени, является вечная мерзлота [10]. Микробиологические исследования подтвердили наличие в многолетнемерзлых толщах жизнеспособных микроорганизмов разных родов и видов [1, 6, 10, 11]. Распространение их в экстремальных эконизах вечной мерзлоты можно объяснить уникальностью свойств данных бактерий и архей, использованных ими различных стратегий выживания, наличием полифункциональных систем адаптации и коммуникации [10]. Производство микроорганизмами вторичных метаболитов является одним из проявлений работы данных приспособительных систем. Состав бактериальных вторичных метаболитов представлен разнообразными компонентами и сигнальными молекулами, активность которых зависит от

природы микроорганизма, количества бактериальных клеток и температурных условий их культивирования [8, 12, 13]. Не до конца известна их роль для самих микроорганизмов, однако они находят широкое применение в различных сферах человеческой деятельности. В частности, представляет интерес использование метаболитов в качестве основы для лечебных препаратов [9].

Несомненную значимость представляют микроорганизмы многолетнемерзлых пород как потенциальные продуценты уникальных биологически активных соединений. Так, в ранних исследованиях [3-5, 7] было показано, что при различных температурных условиях культивирования *Bacillus sp.* штамма МЗ, выделенного из проб многолетней мерзлоты позднего неогена (возраст пород 2,5-3 млн лет), значительно изменялись его биологические свойства *in vitro* и *in vivo*, в частности — ферментативная, иммуностропная и репаративная активности. Представляется актуальным изучение влияния метаболитов микроорганизмов из криолитозоны «вечной мерзлоты» на функциональную активность иммунных клеток человека *in vitro* в перспективе создания на их основе иммуностропных препаратов. Известно, что цитокины как медиаторы межклеточного «общения» обеспечивают регуляцию иммунных реакций и согласованное взаимодействие иммунокомпетентных клеток системы [2].

В связи с этим целью данного исследования является оценка влияния вторичных метаболитов бактериальных штаммов, выделенных из зоны многолетнемерзлых пород различного геологического возраста, на спектр и уровень секреции цитокинов мононуклеарами периферической крови человека *in vitro* в зависимости от температуры инкубации и дозы бактериальных клеток.

#### Материал и методы исследования

В работе использованы микроорганизмы из проб многолетнемерзлых пород (ММП) позднего неогена (геологический возраст пород 2,5-3 млн лет, опорный разрез Мамонтовой горы в Центральной Якутии) — *Bacillus sp.* (штамм МЗ), а также плейстоцен-голоценового периода (геологический возраст пород 35-40 тыс. лет, район Тарко-Сале Западной Сибири) — *Bacillus megaterium* (штамм 8/75-1) [1]. Микроорганизмы *Bacillus cereus* (штамм JP5832), полученные из современного лекарственного препарата «Бактисубтил» (Франция), использованы в качестве контроля сравнения.

Для получения вторичных метаболитов (МБ) взвесь микроорганизмов (МО) готовили в аликвотах по  $0,05 \cdot 10^6$  или  $500 \cdot 10^6$  м. кл./мл физиологического раствора и инкубировали при температурах  $-5$  °С («холодовые» метаболиты — ХМБ) и  $37$  °С («тепловые» метаболиты — ТМБ) 72 часа с 2-кратной выдержкой по 30 мин при  $t = 22$  °С. Метаболиты получали методом фильтрации, пропуская взвесь бактерий через миллиметровые фильтры диаметром пор  $0,22$  мкм (Millipore, USA). Контрольный посев на питательной среде подтвердил чистоту метаболитов.

Исследование проведено на мононуклеарных клетках (МНК) периферической крови (ПК) трех независимых доноров — мужчин возрастом 24-26 лет. По стандартной методике на градиенте плотности фиколл-пак ( $\rho = 1,077$ ) выделяли МНК

и ставили следующие опытные варианты реакции бласттрансформации лимфоцитов: спонтанная (контрольная группа); митоген-индуцированная — добавление 20 мкл поликлонального митогена для Т-клеток фитогемаглютинина (20 пг/мл, Serva) (группа ФГА); антиген-индуцированная — добавление 20 мкл ХМБ или ТМБ штаммов МЗ *Bacillus sp.* (группы ХМБ МЗ и ТМБ МЗ), 8/75-1 *Bacillus megaterium* (группы ХМБ 8/75-1 и ТМБ 8/75-1) или JP5832 *Bacillus cereus* (группы ХМБ JP5832 и ТМБ JP5832). Постановка реакции шла в триплетах 24 часа. Методом иммуноферментного анализа в супернатантах клеточных культур определяли содержание следующего спектра цитокинов: ФНО- $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-8, ИЛ-2, ИФН- $\gamma$ , ИЛ-4 и ИЛ-10 — с помощью тест-системы «ВекторБЕСТ» (Россия) на спектрофотометре Лусу-2 (Anthos, Австрия) согласно рекомендациям производителя. Статистическую оценку полученных данных проводили в программе SPSS 11,5 for Windows.

### Результаты исследования и их обсуждение

Полученные в результате исследования данные (таблица 1) показывают, что относительно спонтанного синтеза цитокинов МБ лекарственного штамма JP5832, независимо от температуры инкубации, оказали в той или иной степени стимулирующее влияние практически на весь спектр исследуемых показателей, за исключением ИФН- $\gamma$ , концентрация которого достоверно не изменилась. Также ТМБ лекарственного штамма не изменили концентрацию ИЛ-2 в периферической крови.

Общим действием всех МБ штамма 8/75-1 стало снижение концентрации хемоаттрактанта ИЛ-8 ( $p < 0,01$ ) и активная стимуляция секреции следующего ряда провоспалительных цитокинов: ФНО- $\alpha$  ( $p < 0,01$ ), ИЛ-1 $\beta$  ( $p < 0,01$ ), ИЛ-2 ( $p < 0,01$ ), ИФН- $\gamma$  (для группы ХМБ  $p < 0,05$ ; ТМБ  $p < 0,01$ ) относительно контроля. Секреция МНК противовоспалительного цитокина ИЛ-4 увеличилась под воздействием ХМБ бактерий штамма 8/75-1 ( $p < 0,01$ ), а ТМБ данного штамма не оказали достоверного влияния на синтез ИЛ-4. Уровень секреции другого противовоспалительного цитокина ИЛ-10, наоборот, в группе ХМБ 8/75-1 значимо не отличался от контроля, а в группе ТМБ 8/75-1 оказался выше контрольного значения ( $p < 0,05$ ).

ХМБ и ТМБ штамма МЗ *Bacillus sp.* из ММП проявили активное стимулирующее влияние на секрецию МНК всего спектра про- и противовоспалительных цитокинов ( $p < 0,01$ ).

Независимо от температуры инкубации, МБ лекарственного штамма JP5832 сильнее стимулировали секрецию ИЛ-1 $\beta$  ( $p < 0,01$ ) и ИЛ-8 ( $p < 0,01$ ) и оказали меньшей силы воздействие на синтез ИФН- $\gamma$  и ФНО- $\alpha$  ( $p < 0,01$  во всех случаях) по сравнению с влиянием ФГА. Синтез ИЛ-4 под воздействием ХМБ и ТМБ современного МО значимо не отличался от аналогичного показателя в группе ФГА. Под влиянием ТМБ штамма JP5832 достоверно не отличилась активность синтеза ИЛ-10, а ХМБ на данный интерлейкин оказали явно более стимулирующее действие ( $p < 0,01$ ) по сравнению с ФГА. Параллельно было отмечено, что под влиянием ХМБ штамма JP5832 уровень секреции ИЛ-2 был значимо выше ( $p < 0,05$ ), а под влиянием ТМБ, наоборот, ниже ( $p < 0,01$ ), чем в группе с ФГА.

Таблица 1

Уровень цитокинов (пг/мл) в контрольной группе, ФГА и под влиянием метаболитов бактерий, взятых в дозе  $0,05 \cdot 10^6$  м. кл.,  $M \pm m$

Table 1

The level of cytokines (pg/ml) in the control group, PNA, and under the influence of bacterial metabolites taken in a dose of  $0.05 \cdot 10^6$  m.c.,  $M \pm m$

Цитокины Группы	ФНО- $\alpha$	ИЛ-1 $\beta$	ИЛ-8	ИЛ-2	ИФН- $\gamma$	ИЛ-4	ИЛ-10
Температура инкубации бактерий $-5^\circ\text{C}$							
Метаболиты	JP5832	$63,3 \pm 7,2$ **, <sup>^^</sup>	$364,0 \pm 35,0$ **, <sup>^^</sup>	$397,0 \pm 44,3$ **, <sup>^^</sup>	$1,3 \pm 0,1$ * <sup>,</sup> <sup>^^</sup>	$1,4 \pm 0,5$ ^^	$28,3 \pm 3,5$ **, <sup>^^</sup>
	8/75-1	$53,5 \pm 2,6$ **, <sup>^^</sup>	$285,2 \pm 23,2$ **, <sup>^^</sup>	$4,1 \pm 0,9$ **, <sup>^^</sup>	$4,0 \pm 0,4$ **, <sup>^^</sup>	$2,8 \pm 1,3$ * <sup>,</sup> <sup>^^</sup>	$2,9 \pm 1,3$ ^
	M3	$424,0 \pm 43,3$ **, <sup>^^</sup>	$263,0 \pm 31,0$ **, <sup>^^</sup>	$287,0 \pm 34,0$ **	$3,8 \pm 1,6$ **, <sup>^^</sup>	$26,3 \pm 3,2$ **, <sup>^^</sup>	$2,7 \pm 0,3$ **, <sup>^</sup>
Температура инкубации бактерий $37^\circ\text{C}$							
Метаболиты	JP5832	$44,3 \pm 5,2$ **, <sup>^^</sup>	$347,0 \pm 46,0$ **, <sup>^^</sup>	$359,0 \pm 39,0$ **, <sup>^^</sup>	$0,2 \pm 0,1$ ^^	$1,4 \pm 0,3$ ^^	$4,3 \pm 0,6$ *
	8/75-1	$142,2 \pm 20,7$ **, <sup>^^</sup>	$203,8 \pm 33,4$ **, <sup>^</sup>	$15,1 \pm 2,5$ **, <sup>^^</sup>	$6,1 \pm 0,5$ **, <sup>^^</sup>	$15,8 \pm 2,1$ **	$4,7 \pm 0,3$ *
	M3	$63,5 \pm 4,3$ **, <sup>^^</sup>	$261,0 \pm 33,0$ **, <sup>^^</sup>	$355,0 \pm 42,1$ **, <sup>^^</sup>	$1,8 \pm 0,1$ **, <sup>^^</sup>	$13,6 \pm 2,4$ **	$3,8 \pm 0,5$ **, <sup>^</sup>
Контроль	$4,4 \pm 0,6$	$24,9 \pm 3,3$	$25,4 \pm 4,6$	$0,1 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,2$	$2,3 \pm 0,4$
ФГА	$264,0 \pm 6,0$ **	$157,2 \pm 10,3$ **	$249,0 \pm 11,3$ **	$0,9 \pm 0,2$ **	$17,3 \pm 1,6$ **	$1,8 \pm 0,1$ *	$5,2 \pm 0,5$ *

Примечания: достоверность отличия показателя от уровня контроля: \* —  $p < 0,05$  и \*\* —  $p < 0,01$ ; достоверность отличия показателя от уровня ФГА: ^ —  $p < 0,05$  и ^^ —  $p < 0,01$ .  
Notes: the accuracy of indicator difference from control: \* —  $p < 0.05$  and \*\* —  $p < 0.01$ ; the accuracy of indicator difference from the level of PNA: ^ —  $p < 0.05$  and ^^ —  $p < 0.01$ .

Полученные данные свидетельствуют, что по сравнению с митогенным воздействием МБ штамма 8/75-1 из пород плейстоцен-голоценового периода по большей части оказались менее активными стимуляторами цитокин-секретирующей функции иммунокомпетентных клеток, чем ФГА. Независимо от температуры инкубации бактерий, более стимулирующее влияние МБ данного штамма оказали на секрецию ИЛ-1 $\beta$  (для ХМБ  $p < 0,01$ ; для ТМБ  $p < 0,05$ ) и ИЛ-2 ( $p < 0,01$  во всех случаях). Под влиянием ХМБ штамма 8/75-1 концентрация противовоспалительного ИЛ-4 ( $p < 0,01$  в обоих случаях) оказалась выше, а уровень ИЛ-10, напротив, ниже, чем в митоген-индуцированной группе. Цитокин-стимулирующая активность всех исследуемых метаболитов плейстоцен-голоценового штамма в отношении секреции ФНО- $\alpha$  ( $p < 0,01$ ), ИЛ-8 ( $p < 0,01$ ) и ИФН- $\gamma$  ( $p < 0,05$ ) оказалась меньше, чем у ФГА.

Результаты показали, что как ХМБ, так и ТМБ *Bacillus sp.* штамма МЗ оказали сходное или более выраженное влияние на продукцию большинства цитокинов МНК ПК человека, чем митоген для Т-лимфоцитов. Исключением стал провоспалительный ФНО- $\alpha$ , концентрация которого под влиянием ТМБ штамма МЗ была достоверно ниже ( $p < 0,01$ ), чем в группе с митогеном.

В результате анализа полученных данных выявлено, что в большинстве случаев метаболиты исследуемых штаммов МО не оказали чрезмерной по сравнению с ФГА активации на синтез ФНО- $\alpha$ , что может свидетельствовать об их умеренной способности системного воздействия на организм.

В данном эксперименте нами было отмечено, что, независимо от температурных условий получения, метаболиты *Bacillus sp.* штамма МЗ из пород позднего неогена индуцировали МНК человека *in vitro* на синтез цитокинов, ответственных за стимуляцию факторов неспецифической иммунорезистентности (ИЛ-1 $\beta$  и ИЛ 8), развитие реакций клеточного (ИФН- $\gamma$ ) и гуморального (ИЛ-4) иммунитета. Анализируя полученные данные, предположили, что действие метаболитов штамма 8/75-1 было направлено преимущественно на активацию клеточного иммунитета, что подтверждается повышением продукции МНК ИЛ-2 и ИФН- $\gamma$ . Под влиянием метаболитов лекарственного штамма JP5832 в большей степени активировался синтез цитокинов, направленных на включение неспецифического звена иммунной системы (ИЛ-1 $\beta$  и ИЛ-8), ингибирование (ИЛ-10) реакций клеточного иммунитета и излишнего синтеза провоспалительных цитокинов.

Полученные в результате эксперимента данные, представленные в таблице 2, по влиянию бактериальных метаболитов, выделенных из  $500 \cdot 10^6$  м. кл., на цитокинсекретирующую функцию мононуклеарных клеток *in vitro* показали, что под воздействием ХМБ современного штамма JP5832 концентрация ИФН- $\gamma$  остается на уровне контроля и достоверно снижается под влиянием ТМБ ( $p < 0,05$ ). Параллельно с этим метаболиты штамма JP5832, вне зависимости от температурных условий инкубирования, повышают секрецию ФНО- $\alpha$  ( $p < 0,01$ ), ИЛ-1 $\beta$  ( $p < 0,01$ ) и ИЛ-2 ( $p < 0,01$ ).

Таблица 2

Уровень цитокинов (пг/мл) в контрольной группе, ФГА и под влиянием метаболитов бактерий, взятых в дозе  $500 \cdot 10^6$  м. к.л.,  $M \pm m$

Table 2

The level of cytokines (pg/ml) in the control group, PNA, and under the influence of bacterial metabolites taken in a dose of  $500 \cdot 10^6$  m.c.,  $M \pm m$

Цитокины Группы	ФНО- $\alpha$	ИЛ-1 $\beta$	ИЛ-8	ИЛ-2	ИФН- $\gamma$	ИЛ-4	ИЛ-10
Температура инкубации бактерий $-5^\circ\text{C}$							
Метаболиты	JP5832	226,1 $\pm$ 5,4 **, ^	178,8 $\pm$ 15,1 **, ^^	1,5 $\pm$ 0,1 **, ^	1,2 $\pm$ 0,4 ^^	1,2 $\pm$ 0,4 ^	17,6 $\pm$ 2,3 **, ^^
	8/75-1	103,5 $\pm$ 15,4 **, ^^	141,9 $\pm$ 24,9 **, ^^	0,8 $\pm$ 0,2 *	11,5 $\pm$ 1,2 **, ^	2,1 $\pm$ 0,8	1,8 $\pm$ 0,4 ^^
	M3	285,1 $\pm$ 15,3 **	270,5 $\pm$ 21,2 **, ^^	78,5 $\pm$ 6,1 **, ^^	9,1 $\pm$ 2,2 **, ^	19,4 $\pm$ 4,3 **, ^^	8,7 $\pm$ 2,9 **, ^
Температура инкубации бактерий $37^\circ\text{C}$							
Метаболиты	JP5832	65,6 $\pm$ 4,3 **, ^^	331,3 $\pm$ 40,1 **, ^^	2,1 $\pm$ 0,7 **, ^^	1,5 $\pm$ 0,2 **, ^	0,9 $\pm$ 0,3 ^	3,1 $\pm$ 0,8 ^
	8/75-1	198,9 $\pm$ 21,2 **, ^^	211,3 $\pm$ 33,7 **, ^^	282,1 $\pm$ 8,6 **, ^^	3,2 $\pm$ 1,1 **, ^^	16,9 $\pm$ 3,9 **, ^^	3,7 $\pm$ 0,7 *, ^
	M3	54,9 $\pm$ 2,7 **, ^^	247,8 $\pm$ 18,6 **, ^^	26,4 $\pm$ 7,9 ^^	0,9 $\pm$ 0,1 **	21,8 $\pm$ 3,1 **	2,4 $\pm$ 0,3 *, ^
Контроль	4,4 $\pm$ 0,6	24,9 $\pm$ 3,3	25,4 $\pm$ 4,6	0,1 $\pm$ 0,0	1,4 $\pm$ 0,1	1,1 $\pm$ 0,2	2,3 $\pm$ 0,4
ФГА	264,0 $\pm$ 6,0 **	157,2 $\pm$ 10,3 **	249,0 $\pm$ 11,3 **	0,9 $\pm$ 0,2 **	17,3 $\pm$ 1,6 **	1,8 $\pm$ 0,1 *	5,2 $\pm$ 0,5 *

Примечание: достоверность отличия показателя от уровня контроля: \* —  $p < 0,05$  и \*\* —  $p < 0,01$ ; достоверность отличия показателя от уровня ФГА: ^ —  $p < 0,05$  и ^^ —  $p < 0,01$ .

Notes: the accuracy of indicator difference from control: \* —  $p < 0.05$  and \*\* —  $p < 0.01$ ; the accuracy of indicator difference from the level of PNA: ^ —  $p < 0.05$  and ^^ —  $p < 0.01$ .



Под влиянием ТМБ штамма JP5832 уровни противовоспалительных цитокинов ИЛ-4 и ИЛ-10 достоверно не отличались от контроля. ХМБ МО из лекарственного препарата стимулировали секрецию ИЛ-10 ( $p < 0,01$ ) и не оказали достоверного влияния на секрецию ИЛ-4. Разнонаправленной оказалась секреция МНК цитокина ИЛ-8, концентрация которого под влиянием ТМБ штамма JP5832 достоверно снизилась ( $p < 0,01$ ), а под влиянием ХМБ, наоборот, повысилась ( $p < 0,01$ ).

МБ штамма 8/75-1, как «холодовые», так и «тепловые», повысили секрецию большинства исследуемых цитокинов. Однако концентрации ИЛ-4 и ИЛ-10 под влиянием ХМБ достоверно не отличались от контроля.

Относительно спонтанной продукции цитокинов МНК контрольной группы ХМБ и ТМБ штамма МЗ оказали в разной степени выраженности стимулирующее действие практически на весь исследуемый спектр цитокинов, за исключением ИЛ-8, концентрация которого под влиянием ТМБ сохранилась на уровне контроля.

В сравнении с группой ФГА метаболиты из дозы  $500 \cdot 10^6$  м. кл. лекарственного штамма оказали менее активное воздействие на цитокинпродуцирующие клетки. Независимо от температурных условий получения метаболитов, секреция ФНО- $\alpha$ , ИЛ-8, ИФН- $\gamma$  и ИЛ-4 во всех случаях была достоверно ниже, чем в митоген-индуцированном варианте. Однако под влиянием МБ штамма JP5832 отметили более повышенные концентрации ИЛ-1 $\beta$  ( $p < 0,01$ ) и ИЛ-2 ( $p < 0,05$ ). Концентрация противовоспалительного цитокина ИЛ-10 под воздействием ХМБ была значимо выше ( $p < 0,01$ ), а под влиянием ТМБ, наоборот, ниже ( $p < 0,05$ ), чем в варианте с ФГА.

ХМБ штамма 8/75-1 по сравнению с митоген-стимулированной секрецией по большей части оказали равное или менее выраженное действие на выработку цитокинов. Исключением стал параметр ИЛ-1 $\beta$ , концентрация которого оказалась значимо выше ( $p < 0,01$ ), чем в опыте с ФГА. ТМБ штамма 8/75-1 оказали меньшей силы воздействие на уровень секреции ФНО- $\alpha$  ( $p < 0,01$ ) и ИЛ-10 ( $p < 0,05$ ) на фоне более высоких уровней ИЛ-1 $\beta$  ( $p < 0,01$ ), ИЛ-8 ( $p < 0,05$ ), ИЛ-2 ( $p < 0,01$ ) и ИЛ-4 ( $p < 0,05$ ) относительно группы с митогеном. В свою очередь, активность синтеза ИФН- $\gamma$  достоверно не отличалась в группах между ТМБ 8/75-1 и ФГА.

ХМБ штамма МЗ проявили более активное действие на секрецию четырех цитокинов: двух провоспалительных — ИЛ-1 $\beta$  и ИЛ-2 ( $p < 0,01$  в обоих случаях) и двух противовоспалительных — ИЛ-4 ( $p < 0,01$ ) и ИЛ-10 ( $p < 0,05$ ) по сравнению с митоген-индуцированной группой. При этом секреции ИЛ-8 ( $p < 0,01$ ) и ИФН- $\gamma$  ( $p < 0,05$ ) были значимо ниже, чем в группе ФГА. ТМБ штамма МЗ сравнительно с митоген-индуцированным воздействием сильнее стимулировали МНК на секрецию ИЛ-1 $\beta$  ( $p < 0,01$ ), обоих противовоспалительных цитокинов (для ИЛ-4  $p < 0,05$ ; для ИЛ-10  $p < 0,01$ ). При этом они слабее активировали на синтез ФНО- $\alpha$  и ИЛ-8 (в обоих случаях  $p < 0,01$ ). Концентрации ИЛ-2 и ИФН- $\gamma$  достоверно не отличались в группах между ТМБ МЗ и ФГА.



При изучении температурного воздействия на иммуномодулирующие свойства метаболитов микроорганизмов из многолетнемерзлых пород выявлено, что ТМБ штамма 8/75-1 по сравнению с ХМБ являются более активными стимуляторами большей части исследуемого спектра цитокинов. Исключение составил только ИЛ-1 $\beta$ , концентрация которого в основном была выше под влиянием ХМБ плейстоцен-голоценового штамма ( $p < 0,05$ ). В эксперименте с метаболитами штамма МЗ наблюдали следующие эффекты: действие метаболитов бактерий, выдержанных при температуре 37 °С, в большей степени, чем ХМБ, повышают секрецию ИФН- $\gamma$  и ИЛ-10 ( $p < 0,01$  в обоих случаях). Концентрация ИЛ-1 $\beta$  достоверно не отличалась между группами ХМБ и ТМБ штамма МЗ. На секрецию остальных цитокинов — ФНО- $\alpha$ , ИЛ-8, ИЛ-2 и ИЛ-4 — ХМБ *Bacillus sp.* штамма МЗ было оказано более стимулирующее влияние по сравнению с группой ТМБ МЗ.

Анализируя полученные данные, нами было выявлено различие эффектов у метаболитов от  $500 \cdot 10^6$  м. кл. с метаболитами от дозы  $0,05 \cdot 10^6$  м. кл. Метаболиты современного штамма от дозы  $500 \cdot 10^6$  м. кл. оказали блокирующий эффект на синтез цитокинов, характеризующих активацию клеточного (ИФН- $\gamma$ ) и гуморального (ИЛ-4) иммунитета, но при этом способствовали модулированию неспецифической резистентности (ИЛ-8) организма и противовоспалительной активности (ИЛ-10) в зависимости от температурных условий их получения. Так, «холодовые» метаболиты МО из лекарственного препарата являются стимуляторами данных звеньев иммунитета, а «тепловые» — их ингибиторами. Действие метаболитов плейстоцен-голоценового штамма на активность факторов противовоспалительного характера оказалось строго зависимым от температуры инкубации бактерий. Действие метаболитов штамма 8/75-1, полученного при -5 °С, в большей степени направлено на развитие каскада воспалительных реакций. «Тепловые» метаболиты штамма 8/75-1 значительно повышают пролиферативную активность клеток (ИЛ-2) и способны стимулировать развитие реакций противовоспалительного характера (ИЛ-10), неспецифического (ИЛ-1 $\beta$ ) и гуморального (ИЛ-4) иммунитета. Метаболиты бактерий штамма МЗ из мерзлоты позднего неогена, независимо от температурных условий инкубации МО, индуцировали МНК человека *in vitro* на синтез цитокинов, активирующих различные звенья иммунорезистентности. При этом ХМБ штамма МЗ проявили себя более активными стимуляторами.

### Заключение

В результате эксперимента было выявлено, что метаболиты бактерий способствовали в большинстве случаев увеличению синтеза исследуемых про- и противовоспалительных цитокинов, таких как ФНО- $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-8, ИЛ-2, ИФН- $\gamma$ , ИЛ-4 и ИЛ-10. Выявленные эффекты действия продуктов жизнедеятельности микроорганизмов находились в определенной зависимости от

температурных условий инкубации МО, количества и видовой принадлежности бактерий. Данные предыдущих исследований [3-5, 7] и полученные результаты настоящего эксперимента являются основанием для постановки ряда вопросов о механизмах действия метаболитов микроорганизмов на иммунокомпетентные клетки человека, а в перспективе позволяют рассматривать вторичные метаболиты бактерий *Bacillus sp.* штамма МЗ в качестве основы для разработки препаратов с иммуномодулирующим эффектом.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Брушков А. В. Биогеохимия мерзлых пород Центральной Якутии / А. В. Брушков, В. П. Мельников, М. В. Щелчкова, Г. И. Грива, В. Е. Репин, Е. В. Бреннер, М. Танака // Криосфера Земли. 2011. Том 15. № 4. С. 90-100.
2. Будчанов Ю. И. Гормоны и медиаторы иммунной системы. Регуляция иммунного ответа: учеб.-метод. пособие по общей иммунологии / Ю. И. Будчанов. Тверь: Издательство Тверского государственного медицинского университета, 2008. 10 с.
3. Калёнова Л. Ф. Влияние бактерий из многолетнемерзлых пород разного геологического возраста на иммунную систему / Л. Ф. Калёнова, А. М. Субботин, А. С. Бажин // Вестник новых медицинских технологий (электронное издание). 2013. № 1.
4. Калёнова Л. Ф. Влияние метаболитов бактерий *Bacillus sp.* из вечной мерзлоты на скорость репарации кожной раны / Л. Ф. Калёнова, А. С. Бажин, М. А. Новикова // Вестник новых медицинских технологий. 2014. Том 21. № 4. С. 53-61.
5. Калёнова Л. Ф. Влияние температуры инкубации на биологическую активность микроорганизмов из вечной мерзлоты / Л. Ф. Калёнова, А. М. Субботин, М. А. Новикова, А. С. Бажин // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2014. Том 158. № 12. С. 737-741.
6. Караевская Е. С. Изучение бактериальных сообществ многолетнемерзлых пород оазисов Антарктиды методами культивирования / Е. С. Караевская, Н. Э. Демидов, Д. Г. Шмелев, Е. М. Ривкина, С. А. Булат // Проблемы Арктики и Антарктиды. 2017. № 2 (112). С. 27-42.
7. Кольванова С. С. Влияние штаммов бактерий рода *Bacillus*, выделенных из многолетнемерзлых пород разного геологического возраста, на иммунологические показатели лабораторных животных / С. С. Кольванова, В. С. Соловьёв, Л. Ф. Калёнова // Российский иммунологический журнал. 2015. Том 9 (18). № 3 (1). С. 105-107.
8. Николаев Ю. А. Ауторегуляция стрессового ответа микроорганизмов: автореф. дисс. ... д. б. н. М., 2011. 50 с.
9. Орлова Т. И. Вторичные метаболиты микроорганизмов — потенциальный резерв фармацевтических препаратов / Т. И. Орлова, В. Г. Булгакова, А. Н. Полин // Антибиотики и химиотерапия. 2014. № 3-4. С. 39-44.
10. Щербакова В. А. Анаэробные бактерии и археи в многолетнемерзлых отложениях Арктики: автореф. дисс. ... д. б. н. М., 2018. 48 с.

11. Эль-Регистан Г. И. Адаптогенные функции внеклеточных ауторегуляторов микроорганизмов / Г. И. Эль-Регистан, А. Л. Мулюкин, Ю. А. Николаев, Н. Е. Сузина, В. Ф. Гальченко, В. И. Дуда // Микробиология. 2006. Том 75. № 4. С. 446-456.
12. Erin K. Interkingdom Signaling: Deciphering the Language of Acyl Homoserine Lactones / K. Erin, A. Shiner, P. Kendra // Microbiology Reviews. 2005. Vol. 29. Pp. 935-947.
13. Levin B. R. Non-Inherited Antibiotic Resistance / B. R. Levin, D. E. Rozen // Nature Reviews Microbiology. 2006. Vol. 4. Pp. 556-562. DOI: 10.1038/nrmicro1445

Svetlana S. KOLYVANOVA<sup>1</sup>  
Lyudmila F. KALENOVA<sup>2</sup>

UDC 615.331

**CHANGES IN THE LEVEL OF CYTOKINES OF HUMAN PERIPHERAL BLOOD *IN VITRO* UNDER THE INFLUENCE OF METABOLITES OF BACTERIA ISOLATED FROM PERMAFROST\***

<sup>1</sup> Junior Researcher, Department of Bioresources Cryosphere, Tyumen Scientific Centre of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences; Postgraduate Student, Department of Anatomy and Physiology of Humans and Animals, University of Tyumen  
kolyvanova93@mail.ru

<sup>2</sup> Dr. Sci. (Biol.), Chief Researcher, Department of Bioresources Cryosphere, Tyumen Scientific Centre of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences; Leading Researcher, International Center of Cryology and Cryosophy, University of Tyumen  
lkalenova@mail.ru

**Abstract**

Microbiological research has shown viable microorganisms in the permafrost. The survival of bacteria in extremely cold conditions was the basis for the study of their byproduct (secondary metabolites). It is known that the bacterial cells' number and their cultivation their cultivation temperature significantly affect their biological activity. For example, an

---

\* This research was supported by the Innovation Support Fund under the UMNİK program (grant no 11073) and was performed according to the state assignment, according to the Research Plan of Tyumen Scientific Centre of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences for 2018-2020, protocol No 2 of 8 December 2017 (Priority direction IX.133. Program IX.133.1. Project: IX.133.1.4. Cryobiological Processes on Land and in the Coastal Part of the Kara Sea in Conditions of Increasing Average Annual Temperatures).

---

**Citation:** Kolyvanova S. S., Kalenova L. F. 2018. "Changes in the Level of Cytokines of Human Peripheral Blood *In Vitro* under the Influence of Metabolites of Bacteria Isolated from Permafrost". Tyumen State University Herald. Natural Resource Use and Ecology, vol. 4, no 4, pp. 123-136. DOI: 10.21684/2411-7927-2018-4-4-123-136

---

experimental study of M3 strain of the *Bacillus sp.*, isolated from permafrost, showed that the changes in cultivation temperature affected the enzymatic, immunotropic, and reparative properties of bacteria *in vitro* and *in vivo*. In this regard, the study of the effect of metabolites of microorganisms at the level of cytokine secretion, as indicators of immunological reactivity, seems relevant to create new immunotropic drugs in the future.

The effect of secondary metabolites of the bacteria *Bacillus sp.* (strain M3) and *Bacillus megaterium* (strain 8/75-1), isolated from permafrost of different geological ages, on the synthesis inflammatory (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-2, IFN- $\gamma$ ) and anti-inflammatory (IL-4, IL-10) cytokines by mononuclear cells of human peripheral blood by ELISA was analyzed in the article. Microorganisms *Bacillus cereus* (strain JP5832), isolated from the modern drug Bactisubtil, were used as control for comparison. Metabolites were obtained from a suspension of microorganisms taken in aliquots of  $0.05 \cdot 10^6$  or  $500 \cdot 10^6$  m. cl./ml, which incubated at temperatures of  $-5$  °C and  $37$  °C. The revealed effects of the action of secondary metabolites were in a certain dependence on the temperature conditions of incubation of microorganisms, their number, and species. Metabolites of strain M3, used at a dose of  $0.05 \cdot 10^6$  m. cl., induced the synthesis of cytokines of nonspecific immunity (IL-1 $\beta$  and IL-8), the development of cell-mediated (IFN- $\gamma$ ) and antibody-mediated (IL-4) immune reaction, and the action of metabolites strain 8/75-1 to a greater extent was aimed at increasing the secretion of IL-2, IFN- $\gamma$  by mononuclear cells. The “warm” metabolites of strain 8/75-1 and the “cold” metabolites of strain M3, taken in a dose of  $500 \cdot 10^6$  m. cl., have shown themselves to be active stimulants of secretion of practically the entire investigated spectrum of cytokine.

#### Keywords

Cytokines, mononuclear cells, peripheral blood, secondary metabolites of bacteria, permafrost.

DOI: 10.21684/2411-7927-2018-4-4-123-136

#### REFERENCES

1. Brushkov A. V., Mel'nikov V. P., Shchelchkova M. V., Griva G. I., Repin V. E., Brenner E. V., Tanaka M. 2011. “Biogekhimiya merzlykh porod Tsentral'noy Yakutii” [Biogeochemistry of Permafrost of Central Yakutia]. *Earth's Cryosphere*, vol. 15, no 4, pp. 90-100.
2. Budchanov Yu. I. 2008. *Gormony i mediatory immunnogo sistema. Regulyatsiya immunnogo otveta* [Hormones and Mediators of the Immune System. Regulation of the Immune Response]. Tver: TSMA.
3. Kalenova L. F., Subbotin A. M., Bazhin A. S. 2013. “Vliyanie bakteriy iz mnogoletnemerzlykh porod raznogo geologicheskogo vozrasta na immunnuyu sistemu” [Influence of Bacteria from Perennial Frozen Species of Different Geological Age on the Immune System]. *Journal of New Medical Technologies*, no 1.
4. Kalenova L. F., Bazhin A. S., Novikova M. A. 2014. “Vliyanie metabolitov bakteriy *Bacillus sp.* iz vechnoy merzloty na skorost' reparatsii kozhnoy rany” [Effects of Metabolites of Bacteria *Bacillus sp.* from Permafrost on Speed Repair of Skin Wound]. *Journal of New Medical Technologies*, vol. 21, no 4, pp. 53-61.

5. Kalenova L. F., Subbotin A. M., Novikova M. A., Bazhin A. S. 2014. "Vliyanie temperatury inkubatsii na biologicheskuyu aktivnost' mikroorganizmov iz vechnoy merzloty" [Effect of Incubation Temperature on the Biological Activity of Microorganisms Isolated from Permafrost]. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, vol. 158, no 12, pp. 737-741.
6. Karaevskaya E. S., Demidov N. E., Shmelev D. G., Rivkina E. M., Bulat S. A. 2017. "Izuchenie bakterial'nykh soobshchestv mnogoletnemerzlykh porod oazisov Antarktidi metodami kul'tivirovaniya" [The Study of the Bacterial Communities in the Antarctic Oases' Permafrost by Means of Culturing]. *Arctic and Antarctic Research*, no 2 (112), pp. 27-42.
7. Kolyvanova S. S., Solovyov V. S., Kalenova L. F. 2015. "Vliyanie shtammov bakteriy roda *Bacillus*, vydelennykh iz mnogoletnemerzlykh porod raznogo geologicheskogo vozrasta, na immunologicheskie pokazateli laboratornykh zhivotnykh" [Effect of Bacterial Strains of the Genus *Bacillus*, Isolated from Permafrost of Different Geological Ages, on the Immunological Parameters of Laboratory Animals]. *Russian Journal of Immunology*, vol. 9 (18), no 3 (1), pp. 105-107.
8. Nikolaev Yu. A. 2011. "Autoregulaciya stressovogo otveta mikroorganizmov" [Autoregulation of the Stress Response of Microorganisms]. *Dr. Sci. (Biol.) diss.* Moscow: S. N. Winogradsky Institute of Microbiology RAS.
9. Orlova T. I., Bulgakova V. G., Polin A. N. 2014. "Vtorichnyye metabolity mikroorganizmov — potentsialnyy rezerv farmatsevticheskikh preparatov" [Microbial Secondary Metabolites as Potential Reserve of Pharmaceuticals]. *Antibiotics and Chemotherapy*, no 3-4, pp. 39-44.
10. Shcherbakova V. A. 2018. "Anaerobnye bakterii i arkhei v mnogoletnemerzlykh otlozheniyakh Arktiki" [Anaerobic Bacteria and Archaea in Arctic Permafrost]. *Dr. Sci. (Biol.) diss.* Moscow: S. N. Winogradsky Institute of Microbiology RAS.
11. El-Registan G. I., Mulyukin A. L., Nikolaev Yu. A., Suzina N. E., Galchenko V. F., Duda V. I. 2006. "Adaptogennyye funktsii vnekletochnykh autoregulyatorov mikroorganizmov" [Adaptogenic Functions of Extracellular Autoregulators of Microorganisms]. *Microbiology*, vol. 75, no 4, pp. 446-456.
12. Erin K., Shiner A., Kendra P. 2005. "Interkingdom Signaling: Deciphering the Language of Acylhomoserine Lactones". *Microbiology Reviews*, vol. 29, pp. 935-947.
13. Levin B. R., Rozen D. E. 2006. "Non-Inherited Antibiotic Resistance". *Nature Reviews Microbiology*, vol. 4, pp. 556-562. DOI: 10.1038/nrmicro1445