

Г.И. Подопригора

НИИ цитохимии и молекулярной фармакологии, Москва, Российская Федерация

Микробиотический фактор развития системы мононуклеарных фагоцитов (гнотобиологические исследования)

Мононуклеарно-фагоцитарная система занимает важное место во врожденном иммунитете и неспецифических защитных реакциях организма на инфекции, однако экспериментальные исследования при использовании на обычных лабораторных животных с неконтролируемой микрофлорой не позволяют в полной мере оценить роль фактора аутофлоры (микробиоты) в развитии и функциональных проявлениях мононуклеарно-фагоцитарной системы. В обзоре систематических исследований показано значение экспериментов на лабораторных животных, контролируемых по микробиоте (гнотобиоты), раскрывающее многогранную роль микробиотического фактора в отношении фагоцитарной активности клеток мононуклеарно-фагоцитарной системы в возрастном аспекте и при патологических условиях (воспаление, ожоговый процесс), влияние на барьерную функцию организма и транслокацию микроорганизмов из кишечника, температурную реакцию, а также другие защитные реакции и механизмы организма. В комплексной защите организма подчеркивается важная роль клеточных и гуморальных факторов, активность которых в значительной степени модулируется микробиотическим фактором. Гнотобиологический подход перспективен для моделирования и анализа молекулярно-клеточных механизмов взаимодействия в системе «хозяин–микробиота», оценки эффективности разрабатываемых препаратов–кандидатов пробиотиков и контроля микробного влияния в клинической практике.

Ключевые слова: мононуклеарно-фагоцитарная система, фагоцитоз, гнотобиоты, микробиота, пробиотики.

26

Система мононуклеарных фагоцитов (СМФ), играющая важную роль как во врожденном, так и приобретенном иммунитете, объединяет семейство клеток миеломоноцитарной серии костномозгового происхождения, включающих моноциты крови, тканевые макрофаги и дендритные клетки, преобладающими из которых являются макрофаги. Со времен открытия И.И. Мечниковым явления фагоцитоза исследователи пытались систематизировать и выделить это семейство клеток в отдельную систему организма. Исторически наиболее устоявшимся было понятие ретикуло-эндотелиальной системы (РЭС), которое, по предложению экспертов Всемирной организации здравоохранения в 1970 г., было пересмотрено и заменено понятием СМФ [1, 2]. Тем не менее с совре-

менных позиций такое определение, в частности из-за недооценки роли гранулоцитов, также вызывает критику. Функциональную концепцию профессиональных фагоцитов, прежде учитывающую лишь мононуклеарные клетки, предлагается дополнить участием полинуклеарных лейкоцитов [3]. Единая фагоцитарная защитная система функционирует во взаимодействии моно- и полинуклеарных клеток, имеющих общее миелоидное происхождение. Эти клетки объединяет и общность рецепторов, распознающих консервативные образы (паттерны) специфических молекул внутриклеточных и внеклеточных патогенов [4]. К ним относится обширное семейство Toll- (ТЛР) и Nod-like рецепторов (НЛР), распознающих сигналы как вне- (ТЛР), так и внутриклеточной опасно-

G.I. Podoprigora

Research Institute of Cytochemistry and Molecular Pharmacology, Moscow, Russian Federation

Microbiotic Factor Influencing the Mononuclear Phagocyte System Development

Mononuclear-phagocyte system plays an important role in natural immunity and nonspecific resistance reactions of the organism against infection. The experimental studies using conventional laboratory animals with uncontrolled microflora have certain limitations to fully appreciate the role of autoflora (microbiota) in both development and functional activity of mononuclear-phagocyte system. In the present review of the author's systemic studies the value of microbiologically controlled animals (gnotobiotics) showing the multifaceted role of microbial factor on various manifestations of mononuclear-phagocyte system including phagocytic activity of the cells of both ageing aspects and pathology conditions (inflammation, burns), influence on the colonization resistance and barrier function against translocations of microorganisms from the intestines, temperature reactions and other host defense mechanisms to infection are demonstrated. In a complex body defence, activity of both cellular and humoral factors is being stimulated and modulated by microbiotic factor. Gnotobiotic modeling approach is prospective one for modeling and analysis of molecular and cellular mechanisms in an assessment of the «host-microbiota» interactions, evaluating the effectiveness of new probiotic candidates and further microbial control development in the clinical settings.

Key words: mononuclear-phagocyte system, phagocytosis, gnotobiotics, microbiota, probiotics.

сти, в т.ч. и немикробного происхождения (НЛР), например, мочевую кислоту. При контакте с микроорганизмами в макрофагах и нейтрофилах образуется особый белковый комплекс, **инфламмосома**, приводящий к каскадному механизму запуска воспалительной реакции [5]. Такие рецепторы, как ТЛР, найдены и на нейтрофилах, которые первыми реагируют на тканевое повреждение и запускают врожденный иммунный ответ [6]. Полинуклеарам, наряду с мононуклеарными фагоцитами, придается все более возрастающее значение в единой фагоцитарной клеточной системе и с учетом общего происхождения из миелоидного ростка крови и взаимодействия в ответных реакциях предлагается обобщить их в понятие «**миелоидная фагоцитарная система**» [7, 8].

Исследования на обычных (конвенциональных) лабораторных животных, микробиота которых в значительной степени является переменной величиной, затрудняют оценку роли микробиотического фактора в развитии и функционировании СМФ. Возможности такой оценки представляют биомодели с контролируемой микробиотой (гнотобиоты). Гнотобиотические животные нашли широкое применение в области иммунологии, микробиологии, патологии, биохимии и других областях биомедицинских исследований [9, 10]. В то же время благодаря развитию и внедрению новейших молекулярно-биологических методов детекции и идентификации микроорганизмов на основе таких чувствительных тестов, как полимеразная цепная реакция и амплифицированное секвенирование РНК, в современной микробиологии, в частности гнотобиологии, выявляют неопределяемые ранее традиционными методами культивирования виды. Этот факт коренным образом меняет наши представления о многообразии и реальном составе микробиоты, особенно подчеркивая значение микробиома для макроорганизма в целом. С началом эры метагеномики установлено, что аутомикробиота организма высокодиверсифицирована и индивидуальна в зависимости от генотипа хозяина и факторов окружающей среды. В настоящее время известно, что популяция кишечных бактерий значительно обширнее, чем выявлялось ранее, и независимыми от культивирования методами секвенционного анализа рРНК определено от 15 000 до 36 000 видов, а популяция кишечных бактерий доходит до 100 трлн клеток, что в 10 раз превышает число соматических клеток [11–13]. Все это обуславливает дальнейшее совершенствование гнотобиологических моделей и контроля их микробного статуса, в т.ч. в режиме реального времени.

В данном обзоре обобщены результаты многолетних исследований на гнотобиологических моделях с использованием методов классической иммунологии, микробиологии, патоморфологии и других, показавшие существенное влияние микробиотического фактора на СМФ и иные защитные механизмы на различных уровнях интеграции макроорганизма в нормальных и патологических условиях.

Гнотобиологические модели

В экспериментах использовались безмикробные мыши, крысы, морские свинки и миниатюрные поросята как первой генерации, так и полученные путем воспроизведения в безмикробных условиях. Технология получения гнотобиотов различных видов первой генерации, а также воспроизведения, выращивания и контроля описана ранее [14]. Для изучения влияния представителей нормальной микрофлоры гнотобиотов ассоциировали

с пробиотическими штаммами бактерий, такими как молочнокислые, бифидумбактерии, непатогенная кишечная палочка и др. Состояние СМФ экспериментальных и контрольных животных оценивали по численности популяций циркулирующих клеток в крови, соотношению фиксированных макрофагов (купферовских клеток) с гепатоцитами, а также по соотношению внутриэпителиальных лейкоцитов (ВЭЛ) с эпителиоцитами в кишечнике. Фагоцитарную активность циркулирующих и фиксированных клеток СМФ оценивали с помощью киллинг- и клиренс-тестов *in vitro* и *in vivo* [15]. В качестве объекта фагоцитоза использовали непатогенные и патогенные микроорганизмы: различные штаммы *Escherichia coli* S16, 055, B41, *Salmonella typhimurium*. Воспалительные изменения оценивали в морфологических исследованиях, включая электронную микроскопию, а микроциркуляторные реакции изучали при помощи биомикроскопии.

Микробиота и активность системы фагоцитов

На моделях гнотобиотических животных показано стимулирующее влияние аутофлоры и отдельных ее представителей на фагоцитарную активность как лейкоцитов крови, так и фиксированных макрофагов (рис. 1). Это выражалось в увеличении числа клеток, способных к фагоцитозу, и их активности, а также в повышении опсонической активности сыворотки крови.

Пролиферогенное влияние микрофлоры в отношении лейкоцитов крови показано у естественно контаминированных в сравнении со свободными от микробной контаминации животными в различных возрастных группах (2, 5, 9 и 35 мес) [16]. У гнотобиотов всех возрастных групп отмечено значительно сниженное (в 1,5–3 раза) число лейкоцитов (прежде всего гранулоцитов) по сравнению с естественно контаминированными животными. При этом увеличение числа лейкоцитов в основном происходило за счет нейтрофилов.

Микрофлора оказывает пролиферогенное влияние и на фиксированные макрофаги, в частности на купферовские клетки печени. Изучение возрастной динамики соотношения купферовских клеток с гепатоцитами продемонстрировало отставание этого показателя у гнотобиотов по сравнению с обычными животными (табл. 1) [17].

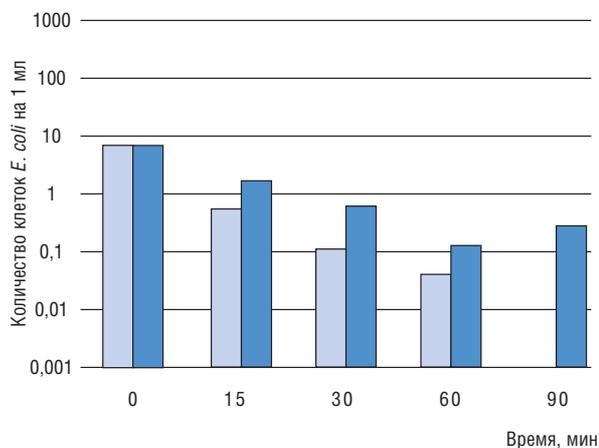


Рис. 1. Клиренс крови от бактерий *E. coli* B41 у безмикробных (темные столбики) и моноассоциированных с *L. acidophilus* (светлые столбики) мышей [14].

Таблица 1. Содержание купферовских клеток, приходящихся на 1500 просмотренных гепатоцитов безмикробных и обычных крыс линии Wistar в возрастном аспекте ($M \pm m$) [17].

Возраст животных, дни	Категория животных (крысы)	
	Безмикробные	Обычные
15	9,6±0,4*	18,5±0,8
30	15,2±0,07*	24±1
90	17,2±0,8*	33,3±1,4
300	16,3±0,7*	26,4±1,1

Примечание. * $p < 0,05$ — достоверность различий между безмикробными и обычными животными одной возрастной группы.

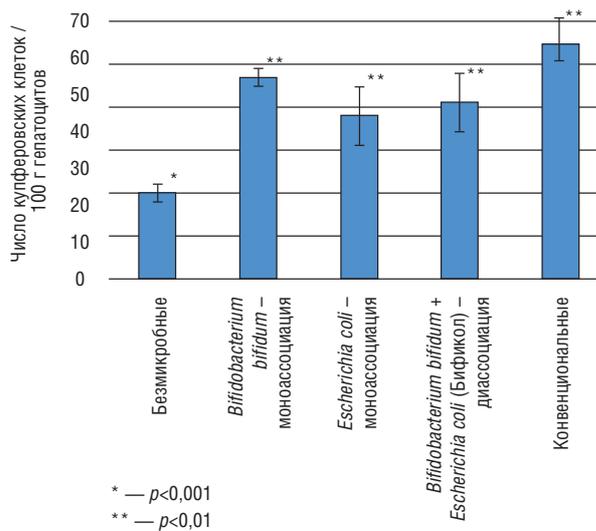


Рис. 2. Влияние микробиотического фактора на популяцию купферовских клеток в печени мышей (по вертикали — число купферовских клеток на 100 гепатоцитов; различные микробиологически контролируемые категории мышей обозначены подписями под столбиками) ($M \pm m$) [18].

В экспериментах по моноассоциации гнотобиотических мышей с пробиотиками показано стимулирующее влияние отдельных штаммов бактерий в отношении этого показателя (рис. 2) [18, 19].

Изучение активности фагоцитирующих клеток показало, что ее пик у обычных животных приходится на молодой и зрелый возраст. В условиях микробной изоляции нарастание активности фагоцитоза происходит позднее, превышая значения у обычных животных аналогичной возрастной группы, что коррелирует с большей максимальной продолжительностью жизни крыс в отсутствии патогенной микрофлоры [16]. Стимулирующее влияние естественная микробная контаминация оказывает не только на поглощающую, но и на переваривающую способность фагоцитов, что в значительной мере определяется более высокой опсонической активностью сыворотки крови, в частности за счет повышенного содержания компонентов комплемента, иммуноглобулинов и нормальных антител. Если для фагоцитоза непатогенных бактерий достаточно участия неспецифических опсоинов, таких как комплемент, то для завершеного фагоцитоза патогенных бактерий необходимо присутствие специфических опсоинов. Предварительная опсонизация бактерий с помощью добавления разведений специфической антисыворотки, не проявляющей в концентрации собственного бактерицидного эффекта, повы-

шала фагоцитарную активность у гнотобиотов до уровня обычных животных. Зависимость фагоцитарной активности по отношению к патогенным штаммам кишечной палочки (*E. coli* 055, *S. typhimurium* и др.) от специфических опсоинов выявлена в экспериментах на безмикробных мышах, морских свинок, крысах и поросятах *in vivo* и *in vitro* [14]. Показано, что стимулирующее воздействие микрофлоры обеспечивается активацией как самих фагоцитов, так и системы опсоинов. Способность к выработке нормальных антител и комплемента, обеспечивающих опсоническую активность и повышающих способность к фагоцитозу непатогенных и патогенных бактерий у различных представителей микрофлоры, различна, что показано моноассоциацией гнотобиотов с бактериями *Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericus*, *Staphylococcus albus*, *Streptococcus faecalis* и др. [20].

Наряду с комплементом стимулирующее влияние микрофлоры имеется и в отношении других гуморальных факторов неспецифического иммунитета, таких как пропердин и лизоцим. У обычных миниатюрных поросят 2–2,5-месячного возраста содержание гемолитического комплемента в сыворотке составляло $17,5 \pm 1,3$ ед., в то время как у безмикробных поросят его концентрация ($3,46 \pm 1,04$ ед.) была в 5 раз ниже ($p < 0,01$). Если пропердин у обычных поросят выявлялся на низких уровнях (около 0,8 ед.), то у гнотобиотов он отсутствовал [21]. Изучение показателей лизоцима в сыворотке крови показало значительно сниженное его содержание у безмикробных поросят (более чем в 2,5 раза) по сравнению с обычными животными [21].

На примере непатогенного штамма *E. coli* 083 показано стимулирующее влияние представителей нормофлоры на образование комплемента. Содержание комплемента у моноассоциированных гнотобиотов постепенно повышалось, достигая максимума к концу 4-й нед ассоциации, приближаясь к показателям у обычных животных. В отношении концентрации лизоцима каких-либо специфических закономерностей под влиянием указанного штамма кишечной палочки обнаружено не было. Значительное повышение содержания лизоцима в сыворотке крови происходило под влиянием общей микробной нагрузки спустя 1 мес после выведения безмикробных животных в обычную среду (т.н. экс-безмикробные животные), указывая на наличие в окружающей микробной среде и других стимуляторов лизоцима.

Микробная нагрузка, испытываемая гнотобиотами в результате конвенционализации, является мощным стрессовым фактором, вызывающим каскад неспецифических реакций, характерных для общего воспаления. Одним из ранних проявлений таких реакций служит включение медиаторных субстанций, в частности циклических нуклеотидов, играющих в развитии стресс-реакции роль вторичных мессенджеров, значительный выброс которых происходит во внеклеточную среду. Фактор аутофлоры влияет и на процесс выработки ци-

клического аденозинмонофосфата (цАМФ) в слизистой оболочке кишечника и перитонеальных макрофагах, как бы тренируя реакцию макроорганизма на микробное воздействие, играющую важную роль в иммунологическом гомеостазе. Сравнительные эксперименты на обычных, естественно контаминированных морских свинках, и безмикробных животных того же вида показали повышенное содержание этого циклического нуклеотида в макрофагах и слизистой оболочке кишечника, подвергающихся микробному воздействию. В то же время значительное повышение интенсивности выработки цАМФ в слизистой оболочке безмикробных животных происходило под влиянием липополисахарида (ЛПС) при его локальной аппликации в изолированной петле тонкой кишки. Повышение интенсивности выработки цАМФ после воздействия ЛПС отмечалось и в макрофагах безмикробных мышей. Способность цАМФ тормозить некоторые клеточные функции, возможно, выполняет защитную функцию, предохраняя организм от опасных последствий избыточного или неконтролируемого ответа клеточных гомеостатических реакций еще до формирования специфических иммунных защитных механизмов. Повышение уровня цАМФ с учетом сигнальной роли этого вторичного мессенджера отражает его участие в неспецифических реакциях макроорганизма на микробное воздействие, протекающих по типу шока (т.н. микробный или эндотоксический шок) [22]. Одним из распространенных тестов на активность СМФ в эксперименте является изучение динамики очищения крови от внутривенно введенных бактерий или инертных частиц (клиренс-тест). Использование живых бактерий в качестве объекта фагоцитоза позволяет оценить динамику и активность фагоцитирующих клеток на различных стадиях фагоцитарного процесса. При этом ориентация только на показатели поглощающей способности фагоцитов не позволяет достоверно судить о реальном состоянии защитной фагоцитарной системы, т.к. ряд патогенных бактерий может быть поглощен в большом количестве, но при этом сохранять и проявлять свою активность. Поэтому при оценке эффективности фагоцитоза важно оценить завершенность процесса.

Использование живых микроорганизмов позволяет изучить транслокацию, диссеминацию и дальнейшую судьбу поглощенных микроорганизмов в различных органах СМФ. Предварительная опсонизация живых микроорганизмов позволяет оценить роль специфических и неспецифических опсонинных, стимуляторов и модуляторов активности СМФ, а с другой стороны — учесть тормозящее влияние патогенных факторов микроорганизмов на результативную активность СМФ. При этом торможение активности СМФ при бактериальных или паразитарных инфекциях может реализовываться посредством различных клеточных механизмов [15], включая связывание клеточных рецепторов циркулирующими иммунными комплексами, подавление активности ферментов клеточных мембран, таких как эстеразы, и др. Важную роль в молекулярно-клеточных механизмах модуляции активности фагоцитов играет система циклических нуклеотидов и их взаимодействие с другими поверхностными рецепторными и внутриклеточными ферментами (фосфодиэстераза) и структурами. При этом отмечаются реципрокные взаимоотношения в системах аденилат- и гуанилатциклаз и результирующих цАМФ и циклических гуанозинмонофосфатов (цГМФ), влияние которых на фагоцитарную активность СМФ во многом прямо противоположное.

Колонизационная резистентность и микробная транслокация

Гнотобиологические модели нашли успешное применение в изучении процессов взаимодействия организма хозяина с микробиотой на слизистых оболочках, включая механизмы резистентности макроорганизма к микробной колонизации и транслокации микроорганизмов из кишечника. При воздействии микробного фактора в месте внедрения инфекционного агента включаются барьерные механизмы организма хозяина, включая СМФ, направленные на фиксацию, деструкцию и элиминацию возбудителя. О стимулирующей роли аутофлоры говорит сниженная барьерная способность поверхностных и глубоких защитных систем, включая лимфатические узлы, селезенку, печень и других органов СМФ. Состояние барьерно-фиксирующей способности лимфоидной ткани, оцениваемое по возникновению и уровням бактериемии после перорального или внутривенного введения патогенных бактерий, значительно отличалось в зависимости от микробного статуса животных. Так, при введении минимальной дозы патогенных бактерий *E. coli* 055, вызывающей у обычных животных лишь незначительную транзитную бактериемию, у гнотобиотических мышей и морских свинок развивался сепсис, приводящий к их гибели [23].

Интерес представляли особенности воспалительной реакции у гнотобиотов. Уже при воспроизведении асептического воспаления (модификация модели очагового воспаления по Селье) у безмикробных животных отмечено преобладание деструктивного компонента и значительное подавление экссудативно-пролиферативных проявлений [24]. Аналогичным образом при инфекционном воспалении, вызванном воздействием патогенных бактерий *E. coli* 055, у гнотобиотов развивались более выраженные деструктивные изменения. Изучение особенностей микроциркуляции в брыжейке тонкой кишки продемонстрировало сниженную реактивность микрососудов у безмикробных животных, что может лежать в основе измененного воспалительного ответа у гнотобиотов [25].

Различия в ответной воспалительной реакции отчасти объясняют и повышенную транслокацию патогенных микроорганизмов из кишечника гнотобиотов. Электронно-микроскопические исследования показали, что под воздействием бактерий *E. coli* 055 происходят резкие нарушения целостности энтероцитарного барьера у гнотобиотов, играющие важную роль в повышении его проницаемости для микробов (рис. 3) [26].

Наряду с взаимодействием самих микроорганизмов, включающим естественный микробный антагонизм и конкуренцию и действующим по принципу «микроб против микроба», а также наличием химико-механических барьеров эпителиальных мукозных поверхностей, в комплексный защитный механизм включаются и опосредованные реакции хозяина. Эти реакции представлены факторами врожденного иммунитета, как гуморальными (лизоцим, лактоферрин, иммуноглобулины, в т.ч. секреторные и антитела), так и клеточными элементами, включая ВЭЛ в кишечнике и их продукты (цитокины). Число ВЭЛ у обычных животных в соотношении с энтероцитами значительно превышает таковое у контрольных безмикробных животных, а на стимулирующую роль кишечной микрофлоры и отдельных ее представителей указывает увеличение числа ВЭЛ под влиянием пробиотиков в тонкой кишке моноассоциированных гнотобиотических мышей (рис. 4, 5) [18]. Наличие таких клеток и миграция

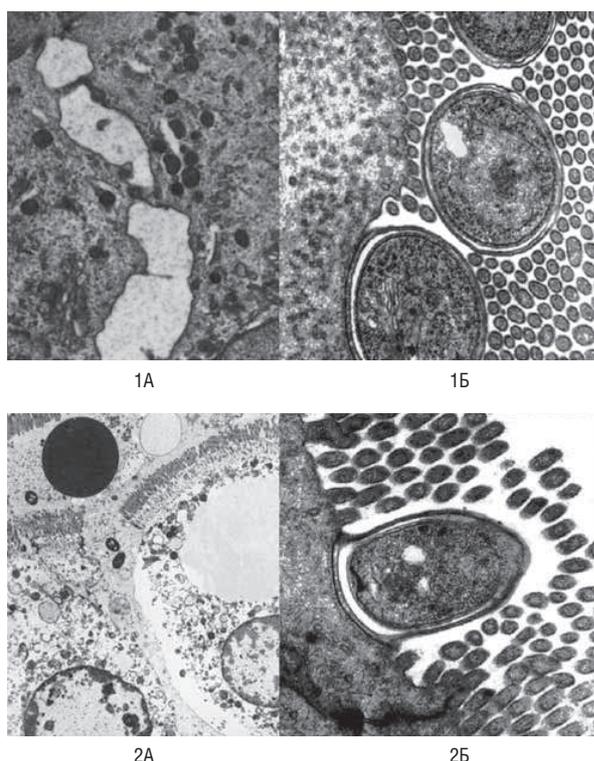


Рис. 3. Электронная микроскопия тонкой кишки у гнотобиотической (А) и обычной (Б) морской свинки при воздействии *E. coli* 055 [26].

Примечание. 1 А — полное нарушение межклеточных контактов смежных энтероцитов (ув. $\times 13\ 000$); 2 А — тела кишечных палочек в образованном межэнтероцитарном пространстве (ув. $\times 13\ 000$); 1 Б — бактерии *E. coli* у поверхности энтероцитов среди микроворсинок (ув. $\times 30\ 000$); 2 Б — тесный контакт тела бактерии с поверхностью энтероцита (ув. $\times 30\ 000$).

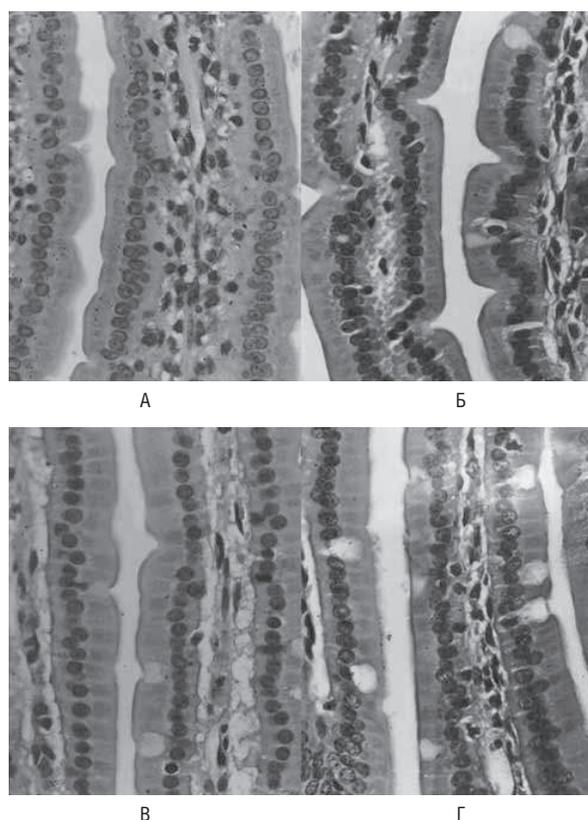


Рис. 4. Тонкая кишка обычных (А), безмикробных (Б) и моноассоциированных с *B. bifidum* (В) и непатогенной *E. coli* (симбиофлора 2) (Г) гнотобиотических мышей. [18].

Примечание. У гнотобиотов снижено число воспалительных клеток в собственной пластинке слизистой оболочки (показаны стрелками). Окраска гематоксилином и эозином (ув. $\times 115$).

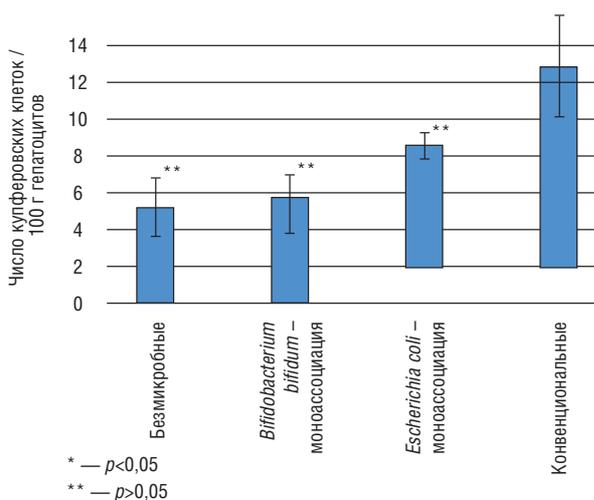


Рис. 5. Содержание внутриэпителиальных лимфоцитов в слизистой оболочке тонкой кишки у безмикробных, ассоциированных с пробиотическими штаммами нормальной микрофлоры и конвенциональных (обычных) мышей ($M \pm m$) (по вертикали — число лимфоцитов на 100 энтероцитов; различные категории мышей, контролируемых по микробиоте, обозначены подписями под столбиками) [18].

их в просвет кишечника обеспечивают защитный эффект за счет фагоцитоза, цитотоксической, киллерной активности с участием цитокинов, ферментов и других бактерицидных факторов. Рецепторы распознавания патогенов и дифференциации их от комменсальной микрофлоры, относящиеся к семейству ТЛР, на поверхности клеток, в т.ч. СМФ и эпителиоцитов, обеспечивают поддержание микробиологического гомеостаза на мукозных поверхностях.

Способностью к транслокации из кишечника при определенных условиях обладают и представители нормальной микрофлоры. Такое кратковременное явление наблюдалось нами у молодых гнотобиотических морских свинок, моноассоциированных с *B. subtilis*, *B. mesentericus*, *S. albus* и *S. faecalis*, у которых эти микроорганизмы выявлялись в крови (до 10^2 – 10^3 /мл) и органах СМФ (мезентериальные лимфатические узлы, селезенка) на протяжении 1–2 сут. Это явление, по-видимому, носит физиологический характер, обеспечивая формирование естественного иммунитета [14]. Подобная физиологическая реакция, проявляющаяся со стороны сосудистых и клеточных элементов и напоминающая воспалительную, развивается у обычных животных в слизистых оболочках, в норме контактирующих с микробной средой, и поддерживается постоянным микробным воздействием. Эксперименты на гнотобиологических моделях подтверждают концепцию физиологического воспаления,

выдвинутую И.И. Мечниковым в отношении реакции макроорганизма на собственную микрофлору. Физиологический смысл этой реакции заключается в том, что она является ключевым звеном в сложной адаптационной цепи иммунобиологических перестроек организма, направленных на поддержание его резистентности к потенциальной инфекции (рис. 6). В отличие от такого физиологического состояния воспаления как патологическая реакция направлено на дифференциацию «своего» от «чужого» и устранение последнего.

Наличие и взаимодействие с индигенной микрофлорой оказывает определенное влияние и на другие проявления неспецифической резистентности и барьерных функций макроорганизма. В частности, как показали гнобиологические эксперименты, микрофлора и отдельные ее представители влияют на кислотность содержимого желудка, обеспечивающую химический барьер для патогенных бактерий, поступающих пероральным путем. Уровень лизоцима, вырабатываемого клетками СМФ, а также клетками Панета, в значительной степени зависит от микробиоты и таких ее представителей, как *B. bifidum*, чем во многом определяется защитный эффект бифидофлоры у детей раннего возраста.

Формирование и функционирование физиологического воспаления как ключевого звена во взаимодействии хозяина и микробиоты упрощенно можно представить в виде схемы: установление индигенной аутофлоры во взаимодействии микробиоты с хозяином >динамическая реакция на мукозных оболочках макроорганизма по типу физиологического воспаления >нейрогуморальное и им-

муногенное воздействие сигнально-медиаторных и антигенных субстанций >иммунобиологические перестройки и реакции организма >состояние микроэкологического и иммунологического гомеостаза. Этот механизм представлен лишь в общем схематическом виде, в естественных условиях действуя в неразрывной связи с другими адаптационно-гомеостатическими реакциями организма. Детализированный анализ молекулярно клеточных связей в процессе становления аутофлоры и взаимодействий организма хозяина и микробиоты становится доступным с применением современных методов моделирования и системной биологии. Пониманию тонких процессов становления аутофлоры и развития натурального иммунитета способствуют успехи последних лет в области информатики и системной биологии. В целом дальнейшее изучение механизмов формирования и регуляторной роли «физиологического» воспаления под влиянием естественных адьювантов и иммуномодуляторов особенно важно для разработки новых эффективных пероральных вакцин против инфекций, входными воротами которых являются слизистые оболочки.

Особенности температурной реакции у безмикробных животных

Наряду с морфофункциональными проявлениями воспалительной реактивности нормальная микрофлора влияет и на развитие способности к температурной реакции как одного из фундаментальных патофизиологиче-

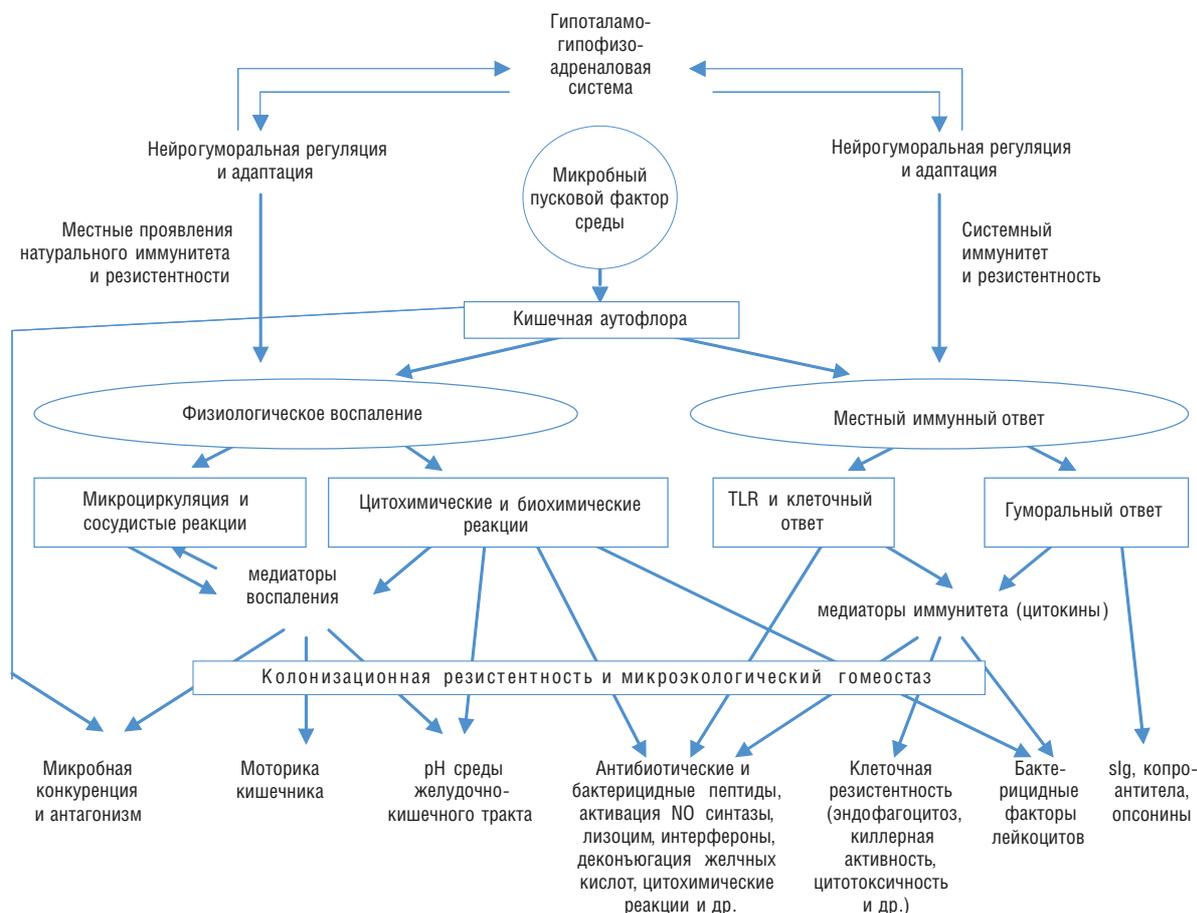


Рис. 6. Факторы местного иммунитета, колонизационной резистентности и микроэкологического гомеостаза в кишечнике.

ских критериев воспаления. Проведенные нами первые сравнительные исследования температурной реакции на стандартный пироген у безмикробных и обычных животных показали, что в ответ на внутрибрюшинное введение стандартного раствора пирогенала у обычных мышей и миниатюрных поросят, в отличие от безмикробных животных, закономерно повышается температура тела. Исходная температура тела у безмикробных животных также была несколько ниже, чем у обычных контаминированных особей ($p < 0,001$). Эти наблюдения прямо указывают на важную роль аутофлоры в развитии способности организма к температурной реакции и механизмов лихорадки, что, вероятно, связано с высвобождением эндогенных пирогенов в условиях микробной контаминации макроорганизма. Эта особенность объясняется сниженной способностью к фагоцитозу и выработке эндогенных пирогенов в полиморфно-ядерных лейкоцитах и клетках СМФ у гнотобиотов [27].

Активность системы мононуклеарных фагоцитов при ожогах и гнотобиология в клинической практике

Гнотобиологические модели оказались незаменимыми в дифференциации роли микробных и тканевых факторов в патогенезе ожоговой болезни и понимании природы ожоговой токсемии. Показано, что токсемия у обожженных животных имела место в течение всего периода наблюдения — до 7–9 сут (с максимумом на 5-е сут) независимо от их микробного статуса, что указывает на ее гистиогенную природу [28]. В то же время наблюдали существенные различия в очищении крови от внутривенно введенных патогенных бактерий *E. coli* 055 в течение острой фазы ожогового процесса, при котором у обычных животных отмечено выраженное торможение клиренса. У контрольных безмикробных животных в первые дни после ожога отмечалось даже некоторое повышение активности СМФ, объясняемое неспецифической стимуляцией фагоцитоза и участием опсонин, таких как компоненты комплемента, α_2 -кислый гликопротеин, фибронектин и другие, а также отсутствием блокады СМФ микробными продуктами [29]. Особенно заметно фагоцитарная активность у обожженных гнотобиотов повышалась в стадии реконвалесценции (табл. 2). У обычных контаминированных животных в острый период ожоговой болезни на передний план выступает блокада СМФ микробными продуктами в результате массивной транслокации кишечных микроорганизмов и повышенной проницаемости кишечного барьера, что оказывает тормозящее влияние на защитные механизмы СМФ.

Таким образом, природа ожоговой токсемии, наряду с микробным фактором, определяется и токсическими продуктами тканевого происхождения [28].

Были сделаны важные наблюдения о различии в сроках и эффективности заживления ожоговых ран у животных в зависимости от микробного фактора. Так, у животных в безмикробных условиях заживление ожоговых ран шло первичным натяжением и наступало быстрее. Эти наблюдения, включая установленные закономерности повышения неспецифической резистентности организма при ожогах в гнотобиологических условиях, легли в основу разработки и успешного применения клинической гнотобиологической изоляции для лечения ожоговых и других инфицированных ран в качестве самостоятельного и дополнительного метода [14, 30].

Разработка и внедрение гнотобиологических моделей представляют собой незаменимый биоинструмент для исследований места и роли микробно-антигенных факторов микробиоты в жизнедеятельности организма, в частности в развитии и активности СМФ как важнейшего структурно-функционального компонента иммунной системы и неспецифической защиты организма от инфекции. Изучение активности СМФ на таких моделях может служить важным показателем эффективности новых препаратов-кандидатов пробиотиков. Среди приоритетных направлений исследований СМФ находятся вопросы гетерогенности и пластичности макрофагов, механизмы их поляризации на провоспалительные M_1 - и альтернативно активируемые M_2 -макрофаги. Особенно актуальным является изучение рецепторно-сигнальной функции макрофагов с учетом рецепторов распознавания паттернов патогенности и тканевого повреждения, а также расшифровка генетической программы их участия во врожденном и специфическом иммунитете против онкогенов, ВИЧ и других инфекций, а также в воспалительном ответе и поддержании иммунологического и микроэкологического гомеостаза организма на основе взаимодействия с его аутофлорой. В последние годы с обнаружением новых регуляторных молекул, в частности эпидермального фактора роста E8 (MFG-E8) [31], открываются новые возможности для изучения механизмов взаимодействия с ТЛР и фагоцитоза апоптотических клеток элементами СМФ. Молекулярные клеточные структуры, в т.ч. рецепторы, распознающие патогенные паттерны, в настоящее время активно анализируют при помощи системно-биологического подхода [32]. Получаемые данные гнотобиологических исследований, наряду с достижениями современной омйки и развитием системной биологии, представляют новый фактологический материал, необходимый для понимания интимных механизмов взаимодействия фагоцитарной системы и микробиоты макроорганизма. Дальнейшие углубленные исследования на гнотобиотах с привлечением новейших методов молекулярной биологии помогут раскрыть тонкие молекулярные механизмы формирования микробиоты и взаимодействия врожденного и приобретенного иммунитета организма хозяина.

32

Таблица 2. Фагоцитоз бактерий *E. coli* 055 клетками мононуклеарно-фагоцитарной системы *in vitro* у безмикробных и обычных крыс при экспериментальной ожоговой травме ($M \pm m$) [29].

Наличие и стадия экспериментальных ожогов	Категория животных и показатели фагоцитарной активности					
	Безмикробные крысы (БК)*		Обычные крысы (ОК)*		Повышение фагоцитарной активности	
	30 мин	120 мин	30 мин	120 мин	БК**	ОК**
Интактные животные	9,9±0,8	5,35±1,7	23,8±6,1	4,3±3,5	1,8	5,5
Первичный ожог	26,6±6,9	6,7±3,5	35,5±2,7	9,0±7,8	3,9	3,9
Реконвалесценты	16,8±1,0	1,3±0,6	41,1±16,5	7,5±4,7	13***	5,5

Примечание. * — данные представлены в тыс. КОЕ бактерий *E. coli*/106 макрофагов спустя 30 и 120 мин от начала фагоцитоза. ** — сравнительная оценка фагоцитарной активности у безмикробных и обычных животных в виде кратности повышения показателей фагоцитоза в соответствующей категории животных через 30 и 120 мин от начала фагоцитоза. *** — $p < 0,001$.

REFERENCES

1. Mononuclear phagocytes. R. van Furth (ed.) *Kluwer Academic Publishers: Amsterdam*. 1992.
2. Hume D.A. The mononuclear phagocyte system. *Curr. Opin. Immunol.* 2006; 18 (1): 49–53.
3. Rabinovitch M. Professional and non-professional phagocytes: an introduction. *Trends Cell Biol.* 1995; 5: 85–87.
4. Medzhitov R., Janeway C.A., Jr. Innate immunity: the virtues of a mononuclear system of recognition. *Cell.* 1997; 91: 295–298.
5. Schroder K., Jurg T. The Inflammasomes. *Cell.* 2010; 140: 821–832.
6. Akira S., Takeda K., Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat. Immunol.* 2001; 2: 675–680.
7. Silva M.T. When two is better than one: macrophages and neutrophils work in concert in innate immunity as complementary and cooperative partners of a myeloid phagocyte system. *J. Leukoc. Biol.* 2010; 87: 93–106.
8. Silva M.T., Correia-Neves M. Neutrophils and macrophages: the main partners of phagocyte cell systems. *Front. Immunol.* 2012; 3: 174.
9. Wostmann B.S. Germfree and gnotobiotic animal models. Background and applications. *CRC Press, Inc., Boca Raton. New York, London, Tokyo.* 1996.
10. Podoprigora G.I., Kafapskaya L.I., Bainov N.A. Gnotobiology in modern biomedical research. *Vestnik RAMN - Annals of the Russian Academy of Medical Sciences.* 2012; 5: 63–70.
11. Ley R.E., Peterson D.A., Gordon J.I. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell.* 2006; 124: 837–848.
12. O'Hara A.M., Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep.* 2006; 7: 688–693.
13. Frank D.N., Pace N.R. Gastrointestinal microbiology enters the metagenomics era. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 2008; 24: 4–10.
14. Podoprigora G.I. Meditsinskaya gnotobiologiya [Medical gnotobiology]. Moscow: MIA. 2003. 271 p.
15. Podoprigora G.I., Godot V., Harraga S. et al. The host mononuclear phagocyte system (MPS) activity in mice C57BL/6J in an early stage of *E. multilocularis* infection under experimental treatment. *Baltic J. Lab. Anim. Sci.* 2002; 12: 143–153.
16. Podoprigora G.I., Kovtun A.I. Age features of peripheral blood and phagocytosis indices in gnotobiotic and conventional Wistar rats. *Byulleten' eksperimental'noi biologii - Bulletin of Experimental Biology.* 1981; 92 (8): 81–83.
17. Podoprigora G.I., Zaitsev T.I. Morphological and functional status of elements of the reticuloendothelial system of gnotobiotic animals. *Folia Microbiologica.* 1979; 24: 55–56.
18. Podoprigora G.I., Communian L.B., Pimentel E.F. et al. Stimulatory effect of *Bifidobacteria* on the host mononuclear phagocyte system using gnotobiotic animal models. *Anaerobe.* 1999; 5: 509–512.
19. Podoprigora G.I., Communian L.B., Pimentel E.F. et al. Stimulatory effect of gram-positive and gram-negative probiotics on the host mononuclear phagocyte system in gnotobiotic mice. *Microecol. Ther.* 1999; 28: 177–191.
20. Andreev V.N., Podoprigora G.I. Effect of association of germ-free guinea pigs with individual representatives of the intestinal microflora on antibody and complement levels. *Byulleten' eksperimental'noi biologii - Bulletin of Experimental Biology.* 1976; 82 (9): 1100–1102.
21. Podoprigora G.I. The state of nonspecific resistance in germ-free and monocontaminated miniature piglets. *Byulleten' eksperimental'noi biologii - Bulletin of Experimental Biology.* 1978; 9: 341–344.
22. Podoprigora G.I., Gofman Ya., Yanechek I., Naperstka I. Cyclic 3', 5'-adenosine monophosphate in macrophages, mucosa and blood plasma of germ-free and ordinary animals. *Byulleten' eksperimental'noi biologii - Bulletin of Experimental Biology.* 1980; 7: 17–19.
23. Podoprigora G.I. Barrier-fixing function in germ-free animals. *Byulleten' eksperimental'noi biologii - Bulletin of Experimental Biology.* 1977; 6: 706–709.
24. Podoprigora G.I. Characteristics of aseptic inflammation in germ-free guinea pigs. *Byulleten' eksperimental'noi biologii - Bulletin of Experimental Biology.* 1970; 11: 35–38.
25. Podoprigora G.I. The role of microbial factors in non-specific resistance of the host to infection. *Microecol. Ther.* 1996; 24: 207–217.
26. Chernukh A.M., Podoprigora G.I., Kranchev A.K. The study of routes of *E. coli* 055 bacterial penetration through the intestinal wall in gnotobiotic and conventional animals. *Byulleten' eksperimental'noi biologii - Bulletin of Experimental Biology.* 1978; 86 (6): 654–657.
27. Podoprigora G.I. Body temperature and the reaction to pyrogenal in germ-free and conventional animals. *Byulleten' eksperimental'noi biologii - Bulletin of Experimental Biology.* 1978; 3: 263–264.
28. Fedorov N.A., Koryakina I.K., Podoprigora G.I. Study of the nature of toxic factors in burns in conditions of a gnotobiologic experiment. *Byulleten' eksperimental'noi biologii - Bulletin of Experimental Biology.* 1973; 10: 81–84.
29. Podoprigora G.I. Phagocytic activity of the mononuclear phagocyte system in gnotobiotic animals under conditions of aging and experimental burn injury. *Microecol. Ther.* 1990; 20: 203–211.
30. Isakov Yu.F., Stepanov E.A., Podoprigora G.I., Nemsadze V.P., Ginodman G.A. Gnotobiologiya v khirurgii [Gnotobiology in surgery]. Moscow: Meditsina. 1982. 223 p.31. Kusunoki R., Ishihara S., Aziz M., Oka A., Tada Y., Kinoshita Y. Roles of milk fat globule-epidermal growth factor 8 in intestinal inflammation. *Digestion.* 2012; 85:103–107.
32. Zak D.E., Aderem A. Systems biology of innate immunity. *Immunol. Rev.* 2009; 227 (1): 264–282.

FOR CORRESPONDENCE

Podoprigora Gennadii Ignat'evich, PhD, Professor, Full Member of Academy of Medical and Technical Sciences of the Russian Federation, Director of Research Institute of Cytochemistry and Molecular Pharmacology
Address: 115404, Moscow, 6th Radialnaya St., 24/14; **tel.:** (495) 327-49-87; **e-mail:** gipodoprigora@yandex.ru