

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА МИКРООРГАНИЗМОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ
ИЗ ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ ПАРКИНСОНА, НА КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ U251**

Н.А. Перекуча^{1,2}, М.В. Гридина², О.П. Иккерт^{1,3}

¹Сибирский государственный медицинский университет,

Россия, г. Томск, Московский тракт, 2, 634050

²Томский политехнический университет,

Россия, г. Томск, проспект Ленина, 30, 634050

³Национальный исследовательский Томский государственный университет

Россия, г. Томск, пр. Ленина, 36, 634050

E-mail: olia.ikkert@yandex.ru

**DETERMINATION OF THE CYTOTOXIC EFFECT OF MICROORGANISMS ISOLATED FROM
PATIENTS WITH PARKINSON'S DISEASE ON THE CELLULAR U251 LINE**

N.A. Perekucha^{1,2}, M.V. Gridina², O.P. Ikkert^{1,3}

¹Siberian State Medical University, Russia, Tomsk, Moscow highway, 2, 634050

²National Research Tomsk Polytechnic University, Russia, Tomsk, Lenin str., 30, 634050

³Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenin str., 36, 634050

E-mail: olia.ikkert@yandex.ru

Abstract. *In the present study, the cytotoxicity of microbial communities and pure cultures of bacteria obtained by the method of cultivation from patients with Parkinson's disease was analyzed in a human U251 glioma cell line. Co-cultivation of the U251 cell line was carried out for four and eight hours with accumulative bacterial cultures and pure cultures of Clostridium symbiosum, obtained from the microbiota of patients with Parkinson's disease, and Escherichia coli, a collection strain XL-blue. The cytotoxicity of microorganisms belonging to the genus of Clostridium, Ruminococcus and Eggerthella, particularly to the Ruminococcus gnavus, Clostridium celatum, Eggerthella lenta and Clostridium symbiosum, was shown during co-cultivation with the cell line. A cytotoxic effect was also shown through the co-cultivated with the pure Clostridium symbiosum culture.*

Введение. Нейродегенеративные заболевания являются наиболее изучаемые, но эффективного лечения таких заболеваний, как болезни Альцгеймера или Паркинсона, не существует. Современные исследования раскрывают их многогранный характер, который требует сложного и разнонаправленного подхода к лечению. В одном из подходов наиболее важной задачей является понимание роли микробиоты кишечника при нейродегенеративных заболеваниях, в том числе болезни Паркинсона. Кроме того микрофлора кишечника может выступать как биомаркером развития нейродегенеративного заболевания, например болезни Паркинсона [1-3]. Так, например, при пересадке кишечной микробиоты от пациента с болезнью Паркинсона мышам, было показано развитие симптомов, похожих на проявление заболевания у этих мышей: моторного дефицита, активации микроглии и запуск агрегации альфа-синуклеина [4]. Микробиота кишечника может влиять как на запуск агрегации альфа-синуклеина, так и на гибель клеток нервной системы, приводящих к нарушениям когнитивным и двигательным расстройствам.

В связи с этим целью данной работы явилось изучение цитотоксического эффекта микробных сообществ и чистой культурой *Clostridium symbiosum*, полученных из микробиоты кишечника пациентов с болезнью Паркинсона, при сокультивировании с модельной клеточной линии глиомы человека U251.

Экспериментальная часть. Для получения накопительных культур пробы фекалий, пациентов с болезнью Паркинсона, помещали в раствор Рингера и дополнительно вносили 1% дрожжевой экстракт и субстраты: 1% триптон (2.22), 1% пептон, 1% сахара (2.23), 1% крахмал (2.32). Чистая культура *Clostridium symbiosum* была выделена ранее из микробиома кишечника пациентов с болезнью Паркинсона. В качестве контроля использовали лабораторный штамм *Escherichia coli XI blue*. Таксономическую принадлежность микроорганизмов в накопительных культурах определяли методом ампликонного секвенирования на приборе MiSeq (Illumina) с использованием набора MiSeq Reagent Kit v2 в режиме 2*150 согласно рекомендациям производителя. Обработка результатов секвенирования выполняли с использованием QIIME2 под операционной системой Linux [4, 5].

Сокультивирование клеточной линии с накопительными и чистыми культурами проводили в течении 4 и 8 часов в среде на основе DMEM/F12 (влажность, 5% CO₂, 37°C). Клетки рассаживали в 24-луночный планшет в количестве 5*10⁵ на одну лунку, при этом на одну клетку глиомы приходилось 10 клеток микроорганизмов. Количество микроорганизмов при сокультивировании определяли с помощью микроскопии. Цитотоксичность микробных сообществ измеряли на проточном цитофлуориметре по первому каналу (BD Accuri C6, США). Анализ жизнеспособности клеток U251 осуществляли с помощью красителя Sytox™ Green (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с инструкцией производителя.

Результаты. В данной работе были получены накопительные культуры №№ 2.22, 2.23, 2.32, и определено таксономическое положение микроорганизмов в них, рода преобладающие в накопительных культурах представлены в таблице 1. При сокультивировании клеточной линии U251 с накопительными и чистыми культурами в течение четырех часов процент гибели клеток практически не отличался от контроля и составлял 10,65% в контроле с *E.Coli*, 10,41% – с *Clostridium symbiosum*, 6,15% – с 2.22, 9,59% – с 2.23, и 4,48% – с 2,32. При более длительном культивировании, в течении восьми часов наблюдали резкое увеличение процента гибели клеток при сокультивировании с накопительной культурой 2.22, содержащей преимущественно *Ruminococcus*, *Eggerthella* и *Clostridium*, и чистой культурой *Clostridium symbiosum*, 25,42% и 32,32%, соответственно. С накопительными культурами 2.23 и 2.32, содержащими преимущественно *Oscillospira*, *Tissierella/Soehngenia*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium*, наблюдали незначительный, но обратный эффект относительно контроля, так процент гибели клеток составлял 13,91% и 12,76%, соответственно, а в контроле – 15,23% (рисунок 1).

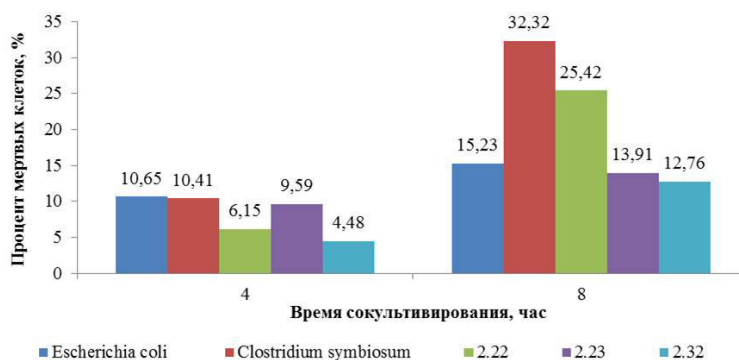


Рис. 1. Процент гибели клеток U251 при сокультивировании с бактериальными культурами

Таблица 1

Процентное соотношение родовой (видовой) принадлежности микроорганизмов, преобладающих в микробном сообществе накопительных культур 2.23, 2.32, 2.22

Рода (виды) бактерий	2.23	2.32	2.22
<i>Lactobacillus (Lactobacillus mucosae)</i>	33,78% (33,76%)	0,49%	≥ 0,01%
<i>Enterococcus</i>	9,56%	0,34%	≥ 0,01%
<i>Bifidobacterium</i>	9,16%	1,38%	0,46%
<i>Oscillospira</i>	3,33%	20,47%	5,94%
<i>Clostridium (Clostridium symbiosum)</i>	0,09% (≥ 0,01%)	2,86% (≥ 0,01%)	30,33% (30,32%)
<i>Ruminococcus (Ruminococcus gnavus)</i>	0,12% (0,03)	0,18% (0,04%)	14,05% (14,05%)
<i>Eggerthella (Eggerthella lenta)</i>	≥ 0,01%	0,9% (0,90%)	23,78% (23,78%)
<i>Tissierella/Soehngenia</i>	≥ 0,01%	19,46%	≥ 0,01%

Заключение. В результате проведенных исследований была показана цитотоксичность микроорганизмов принадлежащих к родам *Clostridium*, *Ruminococcus* и *Eggerthella*, в частности *Ruminococcus gnavus*, *Eggerthella lenta* и *Clostridium symbiosum*, преобладающие у пациентов с болезнью Паркинсона. Преобладание данных микроорганизмов в микробиоте кишечника вероятно может быть одним из факторов вызывающих гибель нейронов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и администрации Томской области в рамках научного проекта № 18-415-703004.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Scheperjans F, Aho V, Pereira PA, Koskinen K, Paulin L, Pekkonen E, Haapaniemi E, Kaakkola S, Eerola-Rautio J, Pohja M, Kinnunen E, Murros K, Auvinen P. Gut microbiota are related to Parkinson's disease and clinical phenotype // *Mov Disord.* – 2015. – 30(3):350-8.
2. Keshavarzian A., Green S.J., Engen P.A., Voigt R.M., Naqib A., Forsyth C.B., Mutlu E., Shannon K.M. // Colonic bacterial composition in Parkinson's disease // *Mov Disord.* – 2015. – 30 (10):1351-60.
3. Петров В.А., Алифирова В.М., Салтыкова И.В., Жукова И.А., Жукова Н.Г., Дорофеева Ю.Б., Тяхт А.В., Алтухов И.А., Кострюкова Е.С., Титова М.А., Миронова Ю.С., Ижболдина О.П., Никитина М.А., Перевозчикова Т.В., Файт Е.А., Сазонов А.Э. Сравнительный анализ кишечной микробиоты при болезни Паркинсона и других неврологических заболеваниях // *Бюллетень сибирской медицины.* 2016. – Т. 15., № 5. – С. 113-125.
4. Sampson TR, Debelius JW, Thron T, Janssen S, Shastri GG, Ilhan ZE, Challis C, Schretter CE, Rocha S, Gradinaru V, Chesselet MF, Keshavarzian A, Shannon KM, Krajmalnik-Brown R, Wittung-Stafshede P, Knight R, Mazmanian SK. Gut Microbiota Regulate Motor Deficits and Neuroinflammation in a Model of Parkinson's Disease // *Cell.* – 2016. – 1;167(6):1469-1480.e12.
5. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner FO. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools // *Nucl. Acids Res.* – 201341 (D1): D590-D596.