

*Активное гексозокоррелированное соединение (АНСС) способствует кишечному иммунному ответу у мышей BALB/c и в первичной культуре эпителиальных клеток кишечника с участием толл-подобных рецепторов TLR-2 и TLR-4.*

**Jean-François Mallet, Émilie Graham, Barry W. Ritz, Kohei Homma & Chantal Matar**

**European Journal of Nutrition**

ISSN 1436-6207

Eur J Nutr

DOI 10.1007/s00394-015-0832-2



Перевод оригинала исследования

# Активное гексокоррелированное соединение (АНСС) способствует кишечному иммунному ответу у мышей BALB/c и в первичной культуре эпителиальных клеток кишечника с участием толл-подобных рецепторов TLR-2 и TLR-4.

Jean-François Mallet · Émilie Graham · Barry W. Ritz ·  
Kohei Homma · Chantal Matar

Received: 12 September 2014 / Accepted: 8 January 2015  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

## Аннотация

Назначение Активного гексокоррелированного соединения (АНСС®) представляет собой экстракт культивируемых грибов, который коммерчески доступен, а так же рекламируется для поддержки иммунной системы.

Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что добавка АНСС влияет на популяции иммунных клеток и иммунные результаты, включая реакцию естественных клеток-киллеров на инфекцию. Механизм, с помощью которого АНСС оказывает свое действие, изучен недостаточно.

Настоящая работа была направлена на то, чтобы охарактеризовать иммуномодулирующую активность АНСС в кишечнике и изучить влияние АНСС на передачу сигналов толл-подобного рецептора (TLR) в эпителиальных клетках кишечника (IEC).

## Методы

Мышей BALB/c кормили АНСС через желудочный зонд. Активность *in vivo* оценивали с помощью иммуногистохимии и продукции белков цитокинов. Влияние АНСС на первичную клеточную культуру *ex vivo* из IEC исследовали после заражения только LPS или *E. coli* или в присутствии блокирующих антител против TLR-2 и TLR-4.

## Результаты

Употребление АНСС приводило к увеличению количества клеток IgA<sup>+</sup> в кишечнике и повышению уровня sIgA, IL-10 и IFN- $\gamma$  в кишечной жидкости. В IEC контакт с АНСС увеличивал продукцию IL-6, но не до провоспалительного уровня положительных контролей, LPS и *E. coli*. Блокирование TLR-2 и TLR-4 снижало индукцию IL-6 АНСС, что позволяет предположить, что эти врожденные рецепторы участвуют в формировании иммунного ответа IECs на АНСС.

## Выводы

АНСС может играть роль в организации иммунного ответа и поддержании иммунного гомеостаза частично за счет праймирования ворот TLR-2 и TLR-4 в кишечном эпителии.

Такая реакция, вероятно, связана с распознаванием непатогенных молекулярных паттернов, связанных с пищевыми продуктами, таких как обнаруженные, связанные с другими соединениями, полученными из грибов или дрожжей.

## Ключевые слова

АНСС · Толл-подобный рецептор · *E. coli* · Инфекция · Гриб · Врожденный · FAMP

J.-F. Mallet  
Cellular and Molecular Medicine, Faculty of Medicine, University of Ottawa, 451 Smyth  
Road, Ottawa, ON K1H 8M5, Canada

É. Graham · C. Matar (\*)  
Nutrition Sciences Program, Faculty of Health Sciences, University of Ottawa, 451 Smyth  
Road, Ottawa, ON K1H 8M5, Canada  
e-mail: chantal.matar@uottawa.ca

B. W. Ritz  
Nutrition Sciences Department, College of Nursing and Health Professions, Drexel University,  
245 N. 15th Street, Mail Stop 1030, Philadelphia, PA 19102, USA

K. Homma  
Amino Up Chemical Company, Ltd., 363-32 Shin-ei, Kiyota-ku, Sapporo 004-0839, Japan

## Введение

Использование природных соединений, таких как лекарственные грибы, для улучшения общего состояния здоровья, а также для предотвращения или облегчения симптомов различных болезней уже давно поощряется и практикуется различными видами традиционной медицины.

Как часть тенденции к более естественным профилактическим вмешательствам, использование лекарственных грибов и других подобных продуктов привлекает внимание западных практикующих врачей и потребителей, но требует дальнейшего изучения. Одним из таких соединений, полученных из грибов, является активное коррелированное соединение гексозы (АНСС), которое, как сообщается, оказывает ряд терапевтических, в первую очередь, иммуномодулирующих эффектов. Исследования на мышинных моделях показали, что АНСС стимулирует иммунную систему, особенно цитотоксическую функцию естественных киллеров (NK), модулируя ответ на патогены и увеличивая выживаемость после инфекций [1–3].

АНСС представляет собой культивированный экстракт мицелия гриба шиитаке (*Lentinula edodes*), который в основном состоит из углеводов (примерно 70 %), белков (13 %), минералов (9 %), жиров (2 %) и клетчатки (2 %). Значительную часть углеводов (около 20 %) составляют  $\alpha$ -1,4-глюканы [4–6]. Известно, что  $\beta$ -глюканы, например, из дрожжей, изменяют иммунные ответы, влияя на активацию толл-подобных рецепторов TLR-2 и TLR-4 посредством взаимодействия с Dectin-1 [7–9]. Основной активный компонент АНСС неизвестен, но предполагается, что это ацилированный  $\alpha$ -1,4-глюкан [10]. Количество  $\alpha$ -глюкана к  $\beta$ -глюкану в АНСС составляет почти 30:1, а относительно низкая молекулярная масса  $\alpha$ -глюкана (5000 дальтон) может способствовать его абсорбции в местной активности в кишечнике [11].

До сих пор неизвестно, необходимо ли присутствие  $\alpha$ -глюкана или его абсорбция для активности АНСС. TLR функционируют как рецепторы распознавания образов, группа рецепторов, экспрессируемых на поверхности эпителиальных клеток, а также на внутри- и внеклеточных поверхностях некоторых иммунных клеток, которые всегда распознают молекулярные фрагменты, обычно связанные с патогенами и отсутствующие у позвоночного хозяина (патоген-хозяин). ассоциированные молекулярные паттерны, PAMPs). Таким образом, активация TLR способствует первой линии, врожденному различению себя и чужого и последующему иммунному ответу. Они играют фундаментальную роль в побуждении врожденной иммунной системы к защите хозяина от широкого спектра патогенов [12]. TLR-2 связывает большое количество лигандов, включая липотейхоевую кислоту, пептидогликан и бактериальные липопротеины, присутствующие в клеточной стенке грамположительных и грамотрицательных бактерий [13]. Липополисахарид (LPS), наиболее изученный лиганд TLR, находится на поверхности бактерий и распознается белком TLR-4, индуцируя сильный

провоспалительный иммунный ответ через NF- $\kappa$ B [14]. *Escherichia coli* — грамотрицательные факультативно-анаэробные бактерии (кишечная палочка), встречающиеся в здоровой флоре кишечника млекопитающих и птиц [15, 16]. Большинство *E. coli* непатогенны в своем обычном хозяине, но некоторые штаммы (например, O157:H7) могут вызывать болезни пищевого происхождения и могут приводить к тяжелым последствиям, таким как геморрагическая диарея и почечная недостаточность [17, 18].

Эпителиальные клетки кишечника экспрессируют TLR-2 и TLR-4 на своей апикальной поверхности [19]. Как TLR-2, так и белок TLR-4 индуцируют продукцию и высвобождение IL-6 посредством активации фактора транскрипции NF- $\kappa$ B. Эти TLR могут участвовать в иммунном праймировании и гомеостазе, оставаясь при этом способными распознавать патогены и при необходимости индуцировать эффекторный ответ [20, 21].

В качестве сложного биологически активного пищевого продукта, содержащего глюканы, было высказано предположение, что эффекты АНСС на иммунный ответ могут быть опосредованы TLR [4]. В этом эксперименте мы впервые установили иммуномодулирующие эффекты АНСС в кишечном эпителии мышей. Затем мы заблокировали TLR-2 и TLR-4 в первичной культуре эпителиальных клеток кишечника (IECs) *ex vivo*, чтобы лучше понять роль распознавания образов в ответе IECs на контакт с АНСС. Мы также оценили влияние АНСС на ответ на инфекцию *E. coli* IECs *ex vivo*. Насколько нам известно, это первый раз, когда эффекты АНСС и его взаимодействие с TLR оценивались в первичной культуре IEC.

## Материалы и методы

### Животные и процедуры кормления

Самки мышей BALB/c в возрасте от шести до восьми недель весом 18–20 г были получены из реки Чарльз (Монреаль, Квебек, Канада). Мышей лечили в соответствии с рекомендациями Канадского совета по уходу за животными, а план эксперимента был одобрен Комитетом по уходу за животными Университета Оттавы в соответствии с протоколом ME-260. Мышей содержали вместе в пластиковых клетках - микроизоляторах в контролируемой атмосфере (температура:  $22 \pm 2$  °C; влажность:  $55 \pm 2$  %) с 12-часовым циклом свет/темнота и кормили обычной сбалансированной диетой (2018 Teklad Global 18). % Белковая диета для грызунов, Harlan Laboratories Inc, Мэдисон, Висконсин, США) и вода по желанию. Водный раствор АНСС вводили через зонд (0,1, 0,5 или 1,0 г/кг массы тела) животным в течение 7 дней подряд. Контрольной группе вместо суспензии АНСС давали воду.

В конце каждого периода кормления животных анестезировали внутрибрюшинными инъекциями кетамина (100 мг/мл), ксилазина (20 мг/мл) и ацепромазина (10 мг/мл) и умерщвляли смещением шейных позвонков для получения различных тканей. (кишечный эпителий, сыворотка, кишечная жидкость и легочный смыв) для использования в иммунологических анализах.

### Идентификация клеточных популяций IgA<sup>+</sup> и IgG<sup>+</sup>

Тонкие кишки были удалены для гистологического исследования, как описано ранее [22]. Вкратце, ткань была подготовлена с использованием метода Сент - Мари для парафина, и парафиновые блоки были разрезаны на срезы размером 4 мкм.

Методом прямой иммунофлуоресценции определяли количество IgA - продуцирующих (IgA<sup>+</sup>) и IgG<sup>+</sup> клеток на гистологических срезах образцов из области подвздошной кишки вблизи пейеровой бляшки. Иммунофлуоресцентные тесты проводили с использованием конъюгированного с FITC козьего (специфического для  $\alpha$ -цепи) поликлонального антитела против IgA мыши или конъюгированного с FITC козьего ( специфичного для  $\gamma$ -цепи ) поликлонального антитела против мышинового IgG (Sigma-Aldrich, St. Louis, США). Гистологические срезы депарафинизировали и регидратировали в градуированной серии этанола (от 95 до 40 %). Депарафинированные гистологические образцы исследовали с помощью люминесцентного светового микроскопа.

Результаты выражали как количество клеток IgA<sup>+</sup> или IgG<sup>+</sup> (положительные: флуоресцентные клетки) на 10 полей зрения (увеличение 1000 $\times$ ).

Данные представляют собой среднее значение трех гистологических срезов от каждого животного для каждого периода кормления.

### Определение продукции цитокинов *in vivo*

Кровь собирали у мышей под наркозом путем пункции сердца. Кровь коагулировали путем выдерживания в течение 30 мин при комнатной температуре, а затем центрифугировали в течение 10 мин при 1000 g. Сыворотку хранили при -20 $^{\circ}$ C до анализа. Тонкий кишечник промывали 3 мл ледяного PBS, а легкие перфузировали 1 мл ледяного PBS. Полученные жидкости центрифугировали при 1000 g в течение 5 мин. Цитокины (IL-6, IL-10, IL-12 и IFN- $\gamma$ ) определяли количественно с помощью ELISA (eBioscience, Inc., Сан-Диего, Калифорния, США). Секреторный IgA (sIgA) анализировали с помощью DAS-ELISA с использованием аффинно-очищенных антител козы против IgA мыши (Sigma Chemical Co., Сент-Луис, Мичиган, США).

### Первичная культура эпителиальных клеток тонкого кишечника мыши

Первичные культуры энтероцитов готовили, как описано ранее [23], с небольшими модификациями, которые описаны здесь. После периода кормления (АНСС или вода) животных подвергали эвтаназии, как описано выше.

Тонкий кишечник удаляли и помещали в буфер для переваривания сбалансированного солевого раствора Хэнкса (HBSS) (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США) с 2% глюкозой (Sigma-Aldrich), 100 ЕД/мл пенициллина (Sigma-Aldrich) и 0,1 мг/мл стрептомицина (Sigma-Aldrich). Кишечник шесть раз промывали 10 мл буфера для расщепления. Затем их нарезали на фрагменты размером от 2 до 3 мм и расщепляли в 20 мл буфера для расщепления с добавлением 300 ЕД/мл коллагеназы XI типа (Sigma-Aldrich) и 0,1 мг/мл диспазы (Gibco, Grand Island, NY, США) при 25  $^{\circ}$ C при 150 об/мин в течение 45 мин. Пищеварение останавливали добавлением 20 мл среды Игла, модифицированной Дульбекко (DMEM) без фенолового красного ( Gibco ), с добавлением 10 % инактивированной нагреванием фетальной бычьей сыворотки (ATCC, Манассас, Вирджиния, США), 10 нг/мл эпидермальный фактор роста (US Biological, Swampscott, MA, USA), инсулин-трансферрин-селен-А (2,50, 0,55 мкг/мл и 1,68 пг/мл соответственно) из 100-кратного готового к использованию раствора (Gibco) ,100 ЕД/мл пенициллина (Sigma-Aldrich), а так же 0,1мг/мл стрептомицина (Sigma-Aldrich). Крупные фрагменты удаляли, оставляя их на 2 мин на дне колбы. Супернатант центрифугировали 3 мин при 300 об/мин. Осадок дважды промывали раствором DMEM, а затем повторно суспендировали в той же культуральной среде в концентрации от 4 x 10<sup>5</sup> до 6 x 10<sup>5</sup> органоидов (одиночных клеток или кластеров МЭК) на мл. Подвески ИЕС затем переносили в 96-луночные планшеты для культивирования клеток (200 мкл/лунку) и инкубировали в течение 8 ч (37  $^{\circ}$ C, 5 % CO<sub>2</sub>). Набор для токсикологического анализа *in vitro*, анализ на основе 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид (МТТ) (Sigma-Aldrich) и исключение трипанового синего (0,4%), использовали для оценки жизнеспособности клеток. Как сообщалось ранее, клеточная суспензия на 83 % состоит из МЭК с некоторым количеством клеточного дебриса и иммунных клеток [24]. Все анализы были завершены в течение 8 часов.

## Оспаривание тестируемыми веществами и блокирование анти-TLR-2 и анти-TLR-4

Эксперименты по заражению и блокированию проводили, как описано ранее, с продукцией ИЛ-6 в качестве меры ответа [20]. Суспензии первичных ИЭК получали, как описано выше, и обрабатывали АНСС (в указанных концентрациях), стандартным липополисахаридом из *Escherichia coli* 0111:B4 (0,01 мкг/мл, Sigma) или *E. coli* MM294 (105 клеток/мл). Для экспериментов по блокированию ИЕС сначала инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре в присутствии 40 мкг/мл очищенных антимышиных белков TLR-2 или TLR-4/MD2 функциональной степени чистоты (eBioscience) или DMEM (контроль). После периода блокирования с использованием анти-TLR к супернатанту добавляли 0,1 мкг/мл АНСС. ЛПС, мощный индуктор ИЛ-6, использовали в качестве положительного контроля. Суспензии ИЕС инкубировали в течение 8 часов (37 °C; 5 % CO<sub>2</sub>), супернатанты извлекали и замораживали до количественного определения уровней ИЛ-6 с помощью ELISA (BD OptEIA, BD Biosciences Pharmingen, Сан-Диего, Калифорния, США).

## Статистический анализ

Данные анализировали с использованием процедуры одностороннего дисперсионного анализа с использованием программного обеспечения SPSS (IBM, Armonk, NY). Различия между средними значениями были обнаружены с помощью многодиапазонного критерия Дункана со значимостью при значении  $p < 0,05$ .

## Результаты

Кормление мышей BALB/c АНСС через желудочный зонд в течение 7 дней увеличивало количество клеток, которые продуцируют IgA, в собственной пластинке, что оценивалось при помощи иммуногистохимии (рис. 1). Увеличение количества IgA<sup>+</sup>-клеток в собственной пластинке тонкой кишки после периода кормления сопровождалось повышением люминального содержания общего sIgA, определяемого методом ИФА. Повышенная продукция IgA также была подтверждена в сыворотке крови. Не было зарегистрировано значительного увеличения IgA в бронхиальной жидкости мышей, которых кормили АНСС. Не было никакого влияния на количество продуцирующих IgG клеток в тонкой кишке (рис. 1) или на уровне IgG (не показано).

Цитокиновый ответ оценивали в кишечной и легочной жидкостях с помощью ИФА. Отмечалась тенденция к повышению интестинального ИЛ-6. ИЛ-6 значительно повышался в бронхиальной жидкости в дозе 0,5 г/кг массы тела, и имела тенденция к снижению ИЛ-12 в легких. АНСС в дозе 1,0 г/кг массы тела приводил к увеличению ИЛ-10, ИЛ-12 и ИФН- $\gamma$  в кишечной жидкости (рис. 2).

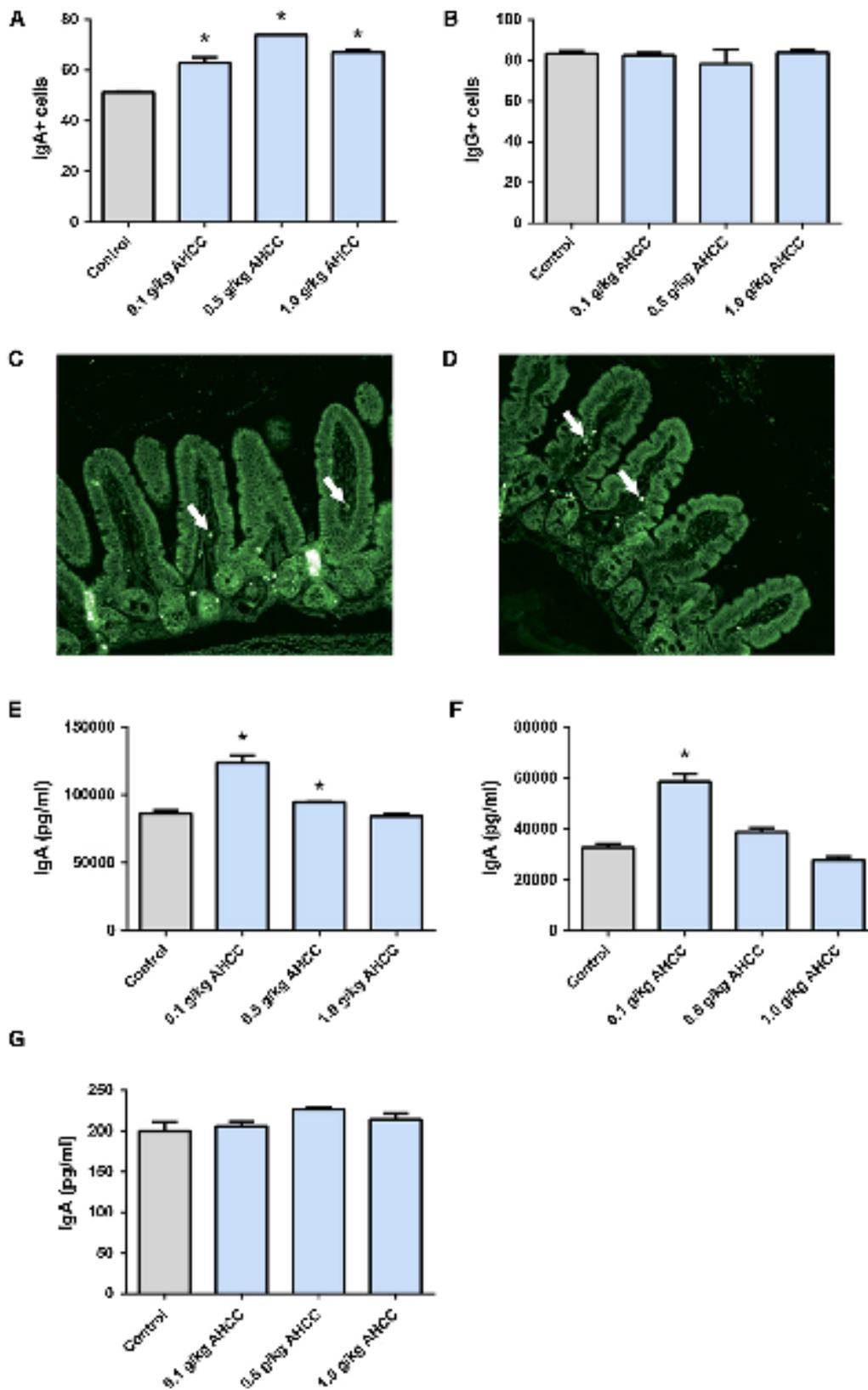
Чтобы установить оптимальную дозу приема АНСС, первичные ИЕС были выделены из мышей BALB/c и подвергнуты заражению в контакте с различными концентрациями АНСС. Заражение АНСС в дозах 0,1 и 1 мг/мл увеличивало продукцию ИЛ-6 по сравнению с контролем (рис. 3).

Наивные ИЕС предварительно обрабатывали анти-TLR-2 или анти-TLR-4, а затем совместно культивировали в контакте с АНСС (0,1 мг/мл) или LPS в качестве положительного контроля (0,01 мкг/мл).

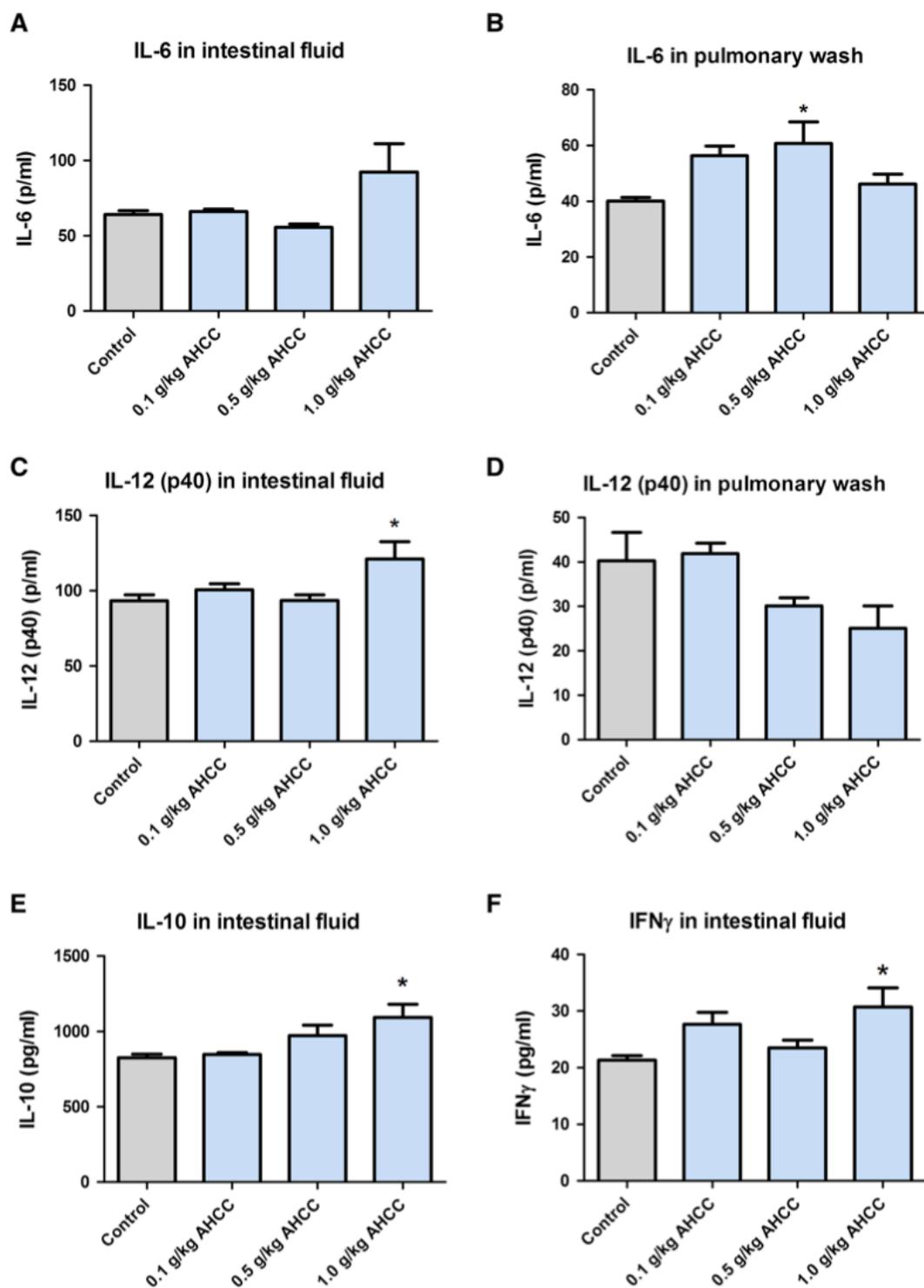
АНСС приводил к пятикратной индукции ИЛ-6 по сравнению с необработанным контролем, что было значительно меньше, чем ответ, вызванный LPS, как и ожидалось (рис. 4). Как анти-TLR-2, так и анти-TLR-4 ингибировали продукцию ИЛ-6 ИЕС в ответ на АНСС по сравнению с необработанным контролем. Блокирование любого TLR полностью устраняло индукцию ИЛ-6 с помощью АНСС.

Не было никакого аддитивного эффекта, когда оба TLR были заблокированы в комбинации (не показано).

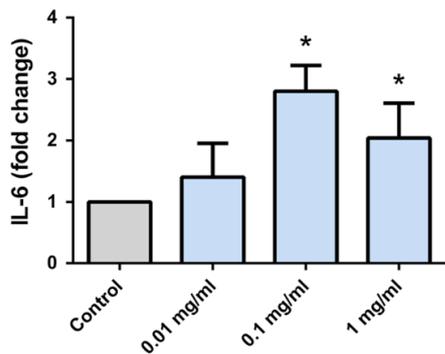
Чтобы определить, повлияет ли воздействие АНСС на реакцию ИЕС на стимулы, зависящие от распознавания TLR-2 и TLR-4, *ex vivo* культуру ИЕС от мышей, ранее получавших АНСС, подвергали заражению *E. coli* в присутствии или в отсутствие АНСС. АНСС устранял продукцию ИЛ-6 в ответ ИЕС на *E. coli* (рис. 5). Этот результат в культуре был очевиден только тогда, когда ИЕС были получены от мышей, предварительно получавших АНСС. Такой эффект не наблюдался в ИЕС, обработанных АНСС и зараженных *E. coli*, что указывает на то, что требовался праймирующий ответ (не показано).



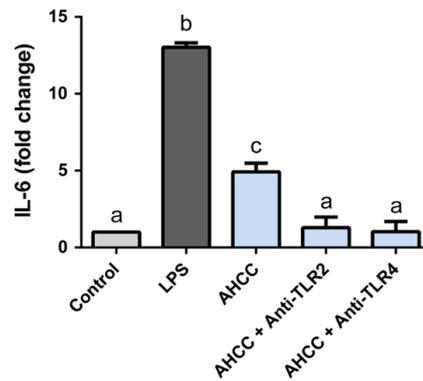
**Рис. 1** Количество IgA (а) и IgG (б) положительных клеток в тонком кишечнике мышей BALB/c, получавших ANCC в течение 7 дней. Репрезентативное изображение слайдов иммуногистохимии IgA+ контрольных мышей (с) и мышей, получавших ANCC (д). Примеры положительных клеток указаны белой стрелкой. Концентрация sIgA в сыворотке (е), кишечной жидкости (ф) и легочном смыве (г) мышей, получавших ANCC в течение 7 дней. Значения представляют собой среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего,  $n = 3$  мыши, \*  $p < 0,05$  по сравнению с контролем.



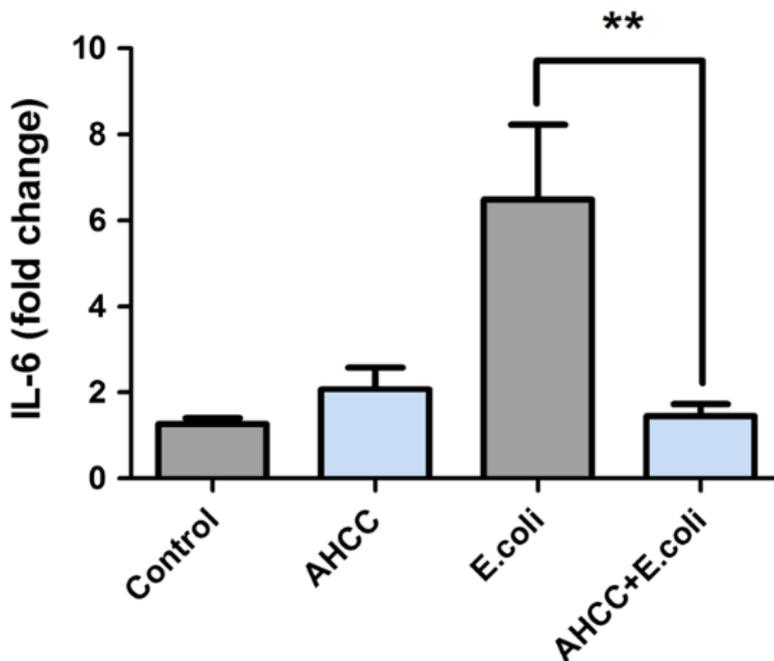
**Рис. 2.** Уровни цитокинов в кишечной жидкости и легочной жидкости мышей BALB/c, получавших АНСС в течение 7 дней. Значения представляют собой среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего,  $n = 3$  мыши, \*  $p < 0,05$  по сравнению с контролем.



**Рис.3** Продукция IL-6 ex vivo эпителиальными клетками тонкого кишечника, подвергнутыми воздействию различных концентраций АНСС. Продукция ИЛ-6 культивируемыми ИЭК, выделенными от наивных мышей, после обработки полной средой (контроль) и 0,01, 0,1 и 1,0 мг/мл АНСС. Значения представляют собой средние результаты трех повторностей, нормализованные на кратность изменения  $\pm$  стандартная ошибка среднего, \* $p \leq 0,05$  по сравнению с контролем.



**Рис. 4** Ассоциированная с АНСС продукция IL-6, опосредованная TLR. Продукция IL-6 культивируемыми ИЕСs, выделенными от наивных мышей, после обработки полной средой (контроль), LPS (0,01 мкг/мл), АНСС (0,1 мг/мл) или АНСС + анти-TLR-2 или анти-TLR- 4. Значения представляют собой средние результаты трех повторств, нормализованные на кратность изменения  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Столбцы, не имеющие общих букв, достоверно отличаются друг от друга ( $p \leq 0,05$ ).



**Рис. 5.** Ингибирование индуцированной E. coli продукции IL-6 с помощью АНСС в ex vivo культуре ИЕС от мышей. Продукция IL-6 культивируемыми ИЭК, выделенными от мышей, после обработки полной средой (контроль), АНСС (0,1 мг/мл), E. coli MM294 (105 клеток/мл) или АНСС (0,1 мг/мл) + E. coli MM294 (105 клеток/мл). Значения представляют собой средние результаты двух экспериментов, нормализованные на кратность изменения  $\pm$  стандартная ошибка среднего, \*\* $p \leq 0,01$ .

## Дискуссия

Эти результаты подтверждают, что АНСС является иммуномодулирующим соединением, как показано ранее, и такие эффекты проявляются в месте контакта, эпителии кишечника, а также системно. Дополнительный прием пищевой добавки АНСС увеличивал количество IgA<sup>+</sup> клеток в эпителии кишечника, а также продукцию sIgA. Выработка sIgA, по-видимому, сильно зависит от диетических вмешательств, и были описаны преимущества для здоровья, такие как усиление защиты слизистой оболочки и снижение инфекций [25, 26]. Добавление АНСС также оказало небольшое, но значительное влияние на выработку цитокинов воспаления в эпителии, а также в легких.

Эти ответы указывали на местный и системный иммунный ответ АНСС, но не на физиологический провоспалительный ответ, поскольку увеличение было умеренным и сомнительным. Предыдущие отчеты на мышинных моделях показали, что прием АНСС связан с усиленным ответом на инфекцию, уменьшением тяжести симптомов и увеличением выживаемости [2, 3].

Эффекты АНСС на инфекционную нагрузку оценивали *ex vivo* в первичной модели ИЕС с использованием *E. coli*. Когда ИЕС от мышей, предварительно получавших АНСС, обрабатывали АНСС перед заражением *E. coli*, ответ IL-6 на *E. coli* устранялся до уровня необработанного контроля. Интересно, что этот результат наблюдался только тогда, когда ИЕС были впервые обработаны АНСС *in vivo*.

Это согласуется с предыдущими наблюдениями на инфекционных моделях, в которых было показано, что АНСС проявляет эффекторный ответ, такой как повышенная активность НК-клеток, только когда животных заражали инфекцией [1].

Важно отметить, что АНСС сам по себе, по-видимому, не вызывает физиологически значимого иммунного эффекторного ответа, но, по-видимому, усиливает ответ при наложении на инфекцию. Необходимо рассмотреть вопрос о том, приведет ли снижение IL-6-ответа к заражению *E. coli* к положительному или отрицательному ответу на инфекцию у животного. Хотя в текущем исследовании это не оценивалось, было показано, что АНСС усиливает бактериальный клиренс и постоянно увеличивает выживаемость у мышей, зараженных острой инфекцией [2, 27]. Таким образом, мы предполагаем, что наблюдаемое снижение IL-6 в ответ на *E. coli* представляет собой менее воспалительный ответ, потенциально менее повреждающий ответ, который может уменьшить тяжесть инфекции, но не будет препятствовать клиренсу и выздоровлению.

Важно отметить, что способность АНСС при контакте с ИЕС индуцировать продукцию IL-6 зависела от взаимодействия либо с TLR-2, либо с TLR-4. Блокировка доступа TLR-2 или TLR-4 полностью устранила реакцию ИЕС на АНСС.

Таким образом, ясно, что иммуномодулирующая активность АНСС опосредована, по крайней мере, частично посредством контакта с рецепторами

распознавания образов, присутствующими на кишечном эпителии. Необходимо определить, могут ли быть вовлечены другие белки TLR, но TLR-2 и TLR-4 являются разумными первыми кандидатами, поскольку известно, что оба они реагируют на типы поверхностных фрагментов, которые присутствуют в АНСС, такие как  $\alpha$ - и  $\beta$ - глюканы [4, 7]. Ранее мы продемонстрировали аналогичные реакции на другие пищевые биоактивные вещества, включая молочные пептиды [20, 28], и выдвинули гипотезу о том, что большое семейство сложных пищевых продуктов, включающее не только дрожжевые глюканы, грибы и молочные пептиды, но также пробиотики / пребиотики, полифенолы и их метаболиты и некоторые жирные кислоты могут также участвовать в распознавании врожденным иммунитетом как особая категория пищевых (патогеноподобных) молекулярных паттернов или FAMP.

Эти общие пищевые модели служат непатогенными, неопасными сигналами, которые вместо того, чтобы вызывать сильную и потенциально опасную реакцию, участвуют в поддержании правильного иммунного ответа активным, сбалансированным и толерантным образом.

В исследовании было показано, что  $\beta$ -глюканы изменяют микробиоту кишечника и повышают присутствие бактерий, которые, как считается, помогают хозяину оставаться в добром здравии [29]. Трудно отделить влияние АНСС на эпителиальные клетки от возможного воздействия на микробиоту кишечника, поскольку они могут использовать одни и те же рецепторы для индукции своего эффекта [20]. Необходимы дальнейшие исследования для изучения влияния АНСС на полезные бактерии, присутствующие в кишечнике. Сильной стороной этой работы было сочетание измерения иммунного ответа в эпителии кишечника *in vivo* с анализом *ex vivo* с использованием первичной культуры ИЕС. Такие исследования трудно проводить, но они помогают установить механизм контролируемого анализа в первичной ткани, в отличие от репрезентативной модели клеточной культуры. Существенным ограничением является то, что культура ИЕС не воспроизводит переваривание сложного пищевого продукта, такого как АНСС. Таким образом, все еще трудно сравнивать результаты ИЕС-теста с тестируемыми веществами, такими как АНСС, с опытом *in vivo*. Далее исключен потенциальный клинический опыт на людях. Мы не пытались определить конкретный активный компонент АНСС, ответственный за эти результаты. Хотя из этого следует, что глюканы могут быть ответственны, по крайней мере, за некоторые из эффектов, мы предполагаем, что АНСС как сложный пищевой продукт, вероятно, взаимодействует с иммунной системой через несколько механизмов, и действительно, что именно это множество делает такие природные соединения эффективным в поддержании естественной защиты организма и гомеостатических механизмов, а не вызывает гиперстимулированный, потенциально опасный ответ.

АНСС и другие сложные натуральные пищевые соединения предлагают захватывающую новую область исследований для понимания того, как врожденная иммунная система взаимодействует с пищевой средой и как мы можем извлечь выгоду из таких достижений для укрепления здоровья.

### Благодарность

Мы хотели бы поблагодарить г-на Хайро Дуарте за помощь в выделении эпителиальных клеток кишечника. Эта работа стала возможной благодаря неограниченному исследовательскому гранту от производителя АНСС, Amino Up Chemical Company, Саппоро, Япония.

### Конфликт интересов

Доктор Кохей Хомма работает в Amino Up Chemical Co., Ltd. научным сотрудником. Amino Up Chemical является разработчиком и производителем продукта АНСС, используемого в этом исследовании. Автор не получил личной финансовой выгоды от продажи продукта АНСС. Все выводы и мнения, выраженные в этой статье, принадлежат только авторам и не обязательно отражают точку зрения Amino Up Chemical. В качестве вице-президента по научным и нормативным вопросам Atrium Innovations доктор Барри Ритц занимается коммерциализацией многих натуральных продуктов, включая АНСС.

В настоящее время две атриумные компании, Douglas Laboratories, а так же Pure Encapsulations, реализуют продукты, содержащие АНСС в качестве ингредиента. Другие авторы не имеют конфликта интересов, чтобы заявить об этом.

### Использованная литература

1. Ritz BW, Nogusa S, Ackerman EA, Gardner EM (2006) Sup- plementation with active hexose correlated compound increases the innate immune response of young mice to primary influenza infection. *J Nutr* 136(11):2868–2873
2. Ritz BW (2008) Supplementation with active hexose correlated compound increases survival following infectious challenge in mice. *Nutr Rev* 66(9):526–531
3. Nogusa S, Gerbino J, Ritz BW (2009) Low-dose supplementation with active hexose correlated compound improves the immune response to acute influenza infection in C57BL/6 mice. *Nutr Res* 29(2):139–143
4. Daddaoua A, Martínez-Plata E, Ortega-González M, Ocón B, Aranda CJ, Zarzuelo A et al (2013) The nutritional supple- ment Active Hexose Correlated Compound (АНСС) has direct immunomodulatory actions on intestinal epithelial cells and mac- rophages involving TLR/MyD88 and NF-κB/MAPK activation. *Food Chem* 136(3–4):1288–1295
5. Miura T, Kitadate K, Nishioka H, Wakame K (2010) Basic and clinical studies on active hexose correlated compound. In: Bagchi D, Lau FC, Ghosh DK (eds) *Biotechnology in functional foods and nutraceuticals*. CRC Press, Boca Raton, pp 51–60
6. Okuyama T, Yoshigai E, Ikeya Y, Nishizawa M (2013) Active Hexose Correlated Compound extends the lifespan and increases the thermotolerance of nematodes. *Funct Foods Health Dis* 3(6):166–182
7. Shah VB, Williams DL, Keshvara L (2009) β-Glucan attenuates TLR2- and TLR4-mediated cytokine production by microglia. *Neurosci Lett* 458(3):111–115
8. Shah VB, Huang Y, Keshwara R, Ozment-Skelton T, Williams DL, Keshvara L (2008) Beta-glucan activates microglia without inducing cytokine production in Dectin-1-dependent manner. *J Immunol* 180(5):2777–2785
9. Zhu W, Ma H, Miao J, Huang G, Tong M, Zou S (2013) β-Glucan modulates the lipopolysaccharide-induced innate immune response in rat mammary epithelial cells. *Int Immunopharmacol* 15(2):457–465
10. Spierings ELH, Fujii H, Sun B, Walshe T (2007) A Phase I study of the safety of the nutritional supplement, active hexose corre- lated compound, АНСС, in healthy volunteers. *J Nutr Sci Vita- minol (Tokyo)* 53(6):536–539
11. Shah SK, Walker PA, Moore-Olufemi SD, Sundaresan A, Kulkarni AD, Andrassy RJ (2011) An evidence-based review of a *Lentinula edodes* mushroom extract as complementary therapy in the surgical oncology patient. *J Parenter Enter Nutr* 35(4):449–458
12. Kay E, Scotland RS, Whiteford JR (2014) Toll-like recep- tors: role in inflammation and therapeutic potential. *BioFactors* 40(3):284–294
13. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O (2006) Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124(4):783–801
14. Tapping RI, Akashi S, Miyake K, Godowski PJ, Tobias PS (2000) Toll-like receptor 4, but not Toll-like receptor 2, is a signaling receptor for *Escherichia* and *Salmonella* lipopolysaccharides. *J Immunol* 165(10):5780–5787
15. Gould D. (2010) Causes, prevention and treatment of *Escherichia coli* infections. *Nurs Stand* 7;24(31):50–56; quiz 58
16. Dho-Moulin M, Fairbrother JM (1999) Avian pathogenic *Escher- ichtia coli* (APEC). *Vet Res* 30(2–3):299–316
17. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT (2004) Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2(2):123–140
18. Sherman PM, Johnson-Henry KC, Yeung HP, Ngo PSC, Gou- let J, Tompkins TA (2005) Probiotics reduce enterohemor- rhagic *Escherichia coli* O157:H7- and enteropathogenic *E. coli* O127:H6-Induced changes in polarized T84 epithelial cell mon- olayers by reducing bacterial adhesion and cytoskeletal rear- rangements.

19. Abreu MT, Thomas LS, Arnold ET, Lukasek K, Michelsen KS, Arditi M (2003) TLR signaling at the intestinal epithelial interface. *J Endotoxin Res* 9(5):322–330
20. Vinderola G, Matar C, Perdígón G (2005) Role of intestinal epithelial cells in immune effects mediated by Gram-positive probiotic bacteria: involvement of Toll-like receptors. *Clin Diagn Lab Immunol* 12(9):1075–1084
21. Otte J-M, Cario E, Podolsky DK (2004) Mechanisms of cross hyporesponsiveness to Toll-like receptor bacterial ligands in intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 126(4):1054–1070
22. Sainte-Marie G (1962) A paraffin embedding technique for studies employing immunofluorescence. *J Histochem Cytochem* 10(3):250–256
23. Slorach EM, Campbell FC, Dorin JR (1999) A mouse model of intestinal stem cell function and regeneration. *J Cell Sci* 112(18):3029–3038
24. Dogi CA, Galdeano CM, Perdígón G (2008) Gut immune stimulation by non pathogenic Gram(+) and Gram(–) bacteria. Comparison with a probiotic strain. *Cytokine*. 41(3):223–231
25. Mantis NJ, Rol N, Corthésy B (2011) Secretory IgA's complex roles in immunity and mucosal homeostasis in the gut. *Mucosal Immunol* 4(6):603–611
26. Brandtzaeg P (2007) Induction of secretory immunity and memory at mucosal surfaces. *Vaccine* 25(30):5467–5484
27. Aviles H, O'Donnell P, Orshal J, Fujii H, Sun B, Sonnenfeld G (2008) Active hexose correlated compound activates immune function to decrease bacterial load in a murine model of intramuscular infection. *Am J Surg* 195(4):537–545
28. Wong EB, Mallet J-F, Duarte J, Matar C, Ritz BW (2014) Bovine colostrum enhances natural killer cell activity and immune response in a mouse model of influenza infection and mediates intestinal immunity through toll-like receptors 2 and 4. *Nutr Res* 34(4):318–325
29. Wang Y, Ames N, Li S, Jones P, Khafipour E (2014) High molecular weight barley  $\beta$ -glucan supports bacterial populations beneficial for gut health. *FASEB J* 28(1 Supplement):647.45

