

Характеристика персистентного потенциала облигатно-анаэробных бактерий при эубиозе и дисбиозе кишечника*

А.В. Салгина, аспирантка, О.И. Рахматуллина, аспирантка, Н.Б. Перунова, д.м.н., профессор, ИКВС УрО РАН

Феномен персистенции (переживания) микроорганизмов в среде обитания является отражением их адаптационных возможностей [1], что является универсальным биологическим феноменом [2]. Поскольку при ассоциативном симбиозе микроорганизмы находятся в организме хозяина, на их взаимоотношения будут воздействовать условия среды хозяина. Но устойчивое сосуществование с организмом человека возможно при наличии определённых персистентных свойств микроорганизмов, с одной стороны, и дефектностью защиты хозяина – с другой. В этом случае можно говорить о персистентных характеристиках, направленных на деградацию механизмов резистентности хозяина [3].

Персистрирование возможно за счёт секретлируемых факторов микробной клетки. К таким факторам были отнесены антилизозимная, антилактоферриновая, антииммуноглобулиновая, антикомплементарная и другие активности [1, 4]. Данные персистентные свойства широко распространены

среди различных таксонов микроорганизмов и зависят как от их видовой принадлежности, так и от биотопа организма человека [5].

В настоящее время представлена персистентная характеристика микроорганизмов различных биотопов, в том числе и кишечника человека. Факторы персистенции рассматривались у таких групп микроорганизмов, как энтеробактерии [6], энтерококки [7], бифидобактерии [8] и неспорообразующие анаэробы кишечника человека [9].

Вместе с тем открытым остаётся вопрос о персистентных свойствах облигатно-анаэробных микросимбионтов дистального отдела толстого кишечника человека в зависимости от состояния микросимбиоза.

Цель исследования – изучить персистентный потенциал облигатно-анаэробных бактерий при эубиозе и дисбиозе кишечника человека.

Материал и методы исследования. В качестве исследуемых микроорганизмов было отобрано 100 штаммов облигатно-анаэробных бактерий, выделенных из фекалий пациентов при обследовании на дисбиоз кишечника: *Bifidobacterium* spp., *Eubacterium* spp., *Propionibacterium* spp., *Bacteroides* spp., *Clostri-*

* Работа выполнена при грантовой поддержке фундаментальных исследований УрО РАН – проект № 15-5-4-7 «Роль бифидофлоры в формировании гомеостаза человека» и Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере (проект конкурса «УМНИК»)

dium spp., *Prevotella* spp. и *Peptostreptococcus* spp. Видовую идентификацию бактерий осуществляли по прямому белковому профилированию с помощью времяпролётной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией с использованием масс-спектрометра MALDI TOF MS серии Microflex LT с программным обеспечением Maldi BioTyper 3,0 (Bruker Daltonics, Германия). Для каждого результата идентификации приводится ссылка на NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Для изучения антилизоцимной активности (АЛА) бактерий использовали фотометрический метод О.В. Бухарина с соавт. (1999).

Антилактоферриновую (АЛФА) активность бактерий определяли методом твердофазного иммуоферментного анализа на фотометре ИФА-ОЭП (Россия) при длине волны 450 нм с использованием наборов ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск, Россия), (Бухарин О.В. с соавт., 2005). Результаты АЛФА выражали в % инактивированного лактоферрина в опытной пробе по сравнению с контролем.

Изучение биоплёнкообразования (БПО) проводили по методике О “Tool G. (1998) [10].

Результаты исследования были подвергнуты статистической обработке непараметрическим методом с применением критерия Манна – Уитни.

Результаты исследования. Проведённое исследование показало, что антилизоцимная активность была выявлена у 87±1,5% исследуемых штаммов облигатно-анаэробных бактерий. Выраженность антилизоцимной активности варьировала в зависимости от вида исследуемых микроорганизмов и различалась при зубиозе и дисбиозе.

Среди исследуемых групп облигатно-анаэробных микроорганизмов толстого кишечника человека более высокий показатель АЛА наблюдался у бифидобактерий (1,01±0,2 мкг/мл·OD) и *Prevotella* spp. (1,0±0,1 мкг/мл·OD) (табл.). Самые низкие значения у исследуемых групп облигатно-анаэробных бактерий регистрировались у пропионибактерий (0,2±0,1 мкг/мл·OD). Другие облигатно-анаэробные бактерии имели средний уровень антилизоцимной активности.

При дисбиозе биотопа дистального отдела толстого кишечника человека отмечалось снижение свойства у бифидобактерий (с 1,01±0,2 мкг/мл·OD до 0,7±0,01 мкг/мл·OD) и превотелл (1,0±0,1 мкг/мл·OD до 0,9±0,08 мкг/мл·OD). Антилизоцимная активность у клостридий (с 0,9±0,1 мкг/мл·OD до 0,87±0,09 мкг/мл·OD) практически не изменялась (P<0,05).

Общий показатель распространённости антилактоферриновой активности регистрировался у 60±2,5% штаммов. При этом у *Bifidobacterium* spp. способность инактивировать лактоферрин встречалась у 46±1,8% культур, у *Propionibacterium* spp. – у 74±2,4% изолятов, у других исследуемых бактерий данный показатель регистрировался реже (от 12±1,2% до 15,3±1,8%).

При определении экспрессии АЛФА при зубиозе было установлено, что наибольшее среднее значение признака среди облигатно-анаэробных микроорганизмов было характерно для бифидобактерий, пропионибактерий и превотелл (от 21±1,6 до 24±1,4%).

У микроорганизмов родов *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Peptostreptococcus* и *Clostridium* были отмечены более низкие показатели антилактоферриновой активности, которые находились в диапазоне 12,8–15,3%.

При дисбиотических изменениях в микросимбиозе кишечника отмечалось увеличение антилактоферриновой активности у бактероидов (с 12,8±1,1 до 16,1±1,6%), превотелл (с 22±1,2 до 27±1,3%), пептострептококков (с 12±1,2 до 18±1,0%) и зубактерий (с 15,1±1,1 до 16,8±1,3%). У клостридий при дисбиозе в сравнении с зубиозом значения антилактоферриновой активности не изменялись (15,3±1,8%) (P<0,05).

Способность к биоплёнкообразованию представителей облигатно-анаэробной микробиоты определялась у 98±2,5% культур.

При изучении уровня экспрессии способности к биоплёнкообразованию у выделенных анаэробных штаммов было установлено, что наиболее высокий уровень БПО был характерен для превотелл (1,1±0,5 ед.), зубактерий (0,7±0,5 ед.), пропионибактерий (0,6±0,5 ед.) и пептострептококков (0,6±0,4 ед.).

Выраженность биологических свойств бактерий при зубиозе и дисбиозе толстого кишечника человека

| Штамм | Антилизоцимная активность, мкг/мл·OD | | Антилактоферриновая активность, % | | Биоплёнкообразование (ед.) | |
|--------------------------------------|--------------------------------------|-----------|-----------------------------------|-----------|----------------------------|-----------|
| | зубиоз | дисбиоз | зубиоз | дисбиоз | зубиоз | дисбиоз |
| <i>Bifidobacterium</i> spp. (n=6) | 1,01±0,2 | 0,7±0,01* | 23,8±1,6 | 20,1±1,9* | 0,5±0,4 | 0,78±0,7* |
| <i>Bacteroides</i> spp. (n=6) | 0,7±0,1 | 0,9±0,1 | 12,8±2,1 | 16,1±1,6* | 0,56±0,3 | 0,4±0,1* |
| <i>Eubacterium</i> spp. (n=6) | 0,9±0,1 | 1,3±0,4* | 15,1±1,1 | 16,8±1,3 | 0,7±0,5 | 0,65±0,2* |
| <i>Propionibacterium</i> spp. (n=6) | 0,2±0,1 | 0,4±0,1* | 21,0±4,5 | 18,1±1,2* | 0,6±0,5 | 0,65±0,3 |
| <i>Clostridium</i> spp. (n=6) | 0,9±0,1 | 0,87±0,09 | 15,3±1,8 | 15,3±1,8 | 0,4±0,1 | 0,55±0,1* |
| <i>Prevotella</i> spp. (n=6) | 1,0±0,1 | 0,9±0,08 | 22,0±1,2 | 27±1,3* | 1,1±0,5 | 0,9±0,2* |
| <i>Peptostreptococcus</i> spp. (n=6) | 0,8±0,09 | 0,7±0,1 | 12±1,2 | 18±1,0* | 0,6±0,4 | 0,7±0,3* |

Примечание: * – P<0,05; статистически достоверные различия между персистентными свойствами бактерий, изолированных при зубиозе и дисбиозе биотопа дистального отдела толстого кишечника человека

Низкие значения активности образования биоплёнок при эубиозе были характерны для культур *Clostridium* spp. ($0,4 \pm 0,1$ ед.).

При дисбиозе биотопа дистального отдела толстого кишечника человека отмечалось увеличение биоплёнкообразования микроорганизмов, таких, как: бифидобактерии (с $0,5 \pm 0,4$ до $0,78 \pm 0,7$ ед.) и клостридии (с $0,4 \pm 0,1$ до $0,55 \pm 0,1$ ед.) ($P < 0,05$). Снижение БПО было характерно для штаммов бактероидов (с $0,56 \pm 0,3$ до $0,4 \pm 0,1$ ед.) и превотелл (с $1,1 \pm 0,5$ до $0,9 \pm 0,2$ ед.).

Вывод. При эубиозе бифидобактерии имели более высокие значения антилизоцимной, антилактоферриновой активности, а превотеллы всех трёх изучаемых свойств. При дисбиозе происходило снижение показателя свойств бифидобактерий – антилизоцимной и антилактоферриновой активности, что подтверждают данные литературы. Клостридии и пептострептококки при дисбиозе увеличивали уровень биоплёнкообразования. Эубактерии при дисбиозе снижали уровень БПО и увеличивали показатель антилизоцимной активности. Пропионибактерии увеличивали показатель антилизоцимной активности и снижали антилактоферриновую активность по сравнению с эубиозом.

Таким образом, при дисбиозе толстого кишечника человека в сравнении с эубиозом происходит изменение персистентных свойств облигатно-анаэробных микроорганизмов, что отражает их приспособительные возможности при изменении условий кишечного биотопа.

Высокая распространённость и выраженность факторов персистенции у облигатно-анаэробных бактерий фекальной микробиоты связана, вероятно, с постоянным взаимодействием бактерий и бактерицидных факторов гуморальной и клеточной природы хозяина. Учитывая, что лизоцим, лактоферрин подавляют рост и размножение микроорганизмов, наличие факторов персистенции бактерий может, по-видимому, определять состав и стабильность микросимбиоза кишечника человека.

Литература

1. Бухарин О.В. Персистенция патогенных бактерий. М.: Медицина; Екатеринбург: Уро РАН, 1999. 365 с.
2. Бухарин О.В., Перунова Н.Б. Микросимбиоз. Екатеринбург: Уро РАН, 2014. 260 с.
3. Бухарин О.В. и др. Механизмы выживания бактерий. М.: Медицина, 2005. 365 с.
4. Брудастов Ю.А. Анतिकомплементарная активность бактерий: автореф. дисс. ... канд. мед. наук. Челябинск, 1992.
5. Андрущенко С.В. Генетические детерминанты специфических секретлируемых ингибиторов лизоцима в антилизоцимной активности энтеробактерий: автореф. дисс. ... канд. мед. наук. Оренбург, 2012.
6. Бондаренко В.М., Лиходед В.Н. Идеи И.И. Мечникова и современная микробиология кишечника человека // Микробиология. 2008. № 5. С. 23–29.
7. Вальшев А.В. Факторы патогенности энтерококков кишечной микрофлоры человека // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2012. № 4. С. 41–43.
8. Иванова Е.В. Биологические особенности бифидобактерий и их взаимодействие с микросимбионтами кишечной микрофлоры человека: автореф. дисс. ... канд. мед. наук. Оренбург, 2010.
9. Елагина Н.Н. Факторы персистенции непорообразующей анаэробной микрофлоры кишечника человека: автореф. дисс. ... канд. мед. наук. Оренбург, 2000.
10. O'Toole H.B., Kolter R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas*. Mol. Microbiol., 1998. Vol. 30. P. 295–304.