

## КОРЕННЫЕ ШТАММЫ БИФИДОБАКТЕРИЙ КИШЕЧНИКА ЧЕЛОВЕКА: ИНДИГЕННОСТЬ ЧЕРЕЗ ПРИЗМУ ПЕРСИСТЕНЦИИ

© 2023 г. О. В. Бухарин<sup>а,\*</sup>, Е. В. Иванова<sup>а,\*\*</sup>, Н. Б. Перунова<sup>а,\*\*\*</sup>

<sup>а</sup>Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург, Россия

\*E-mail: ofrc@list.ru

\*\*E-mail: walerewna13@gmail.com

\*\*\*E-mail: perunovanb@gmail.com

Поступила в редакцию 18.08.2023 г.

После доработки 28.08.2023 г.

Принята к публикации 06.09.2023 г.

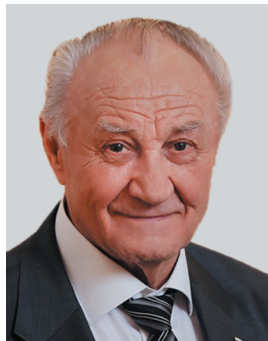
Индигенная микробиота человека — это природная кладовая штаммов бифидобактерий, залог нашего здоровья. Для определения индигенности симбиотных микроорганизмов предлагается оценивать их адаптивный потенциал (лизоцимрезистентность и биоплёнкообразование), поскольку адаптация свойственна всем живым системам, а в организме человека основной стратегией адаптации бактерий служит персистенция. Одним из механизмов персистенции индигенной бифидофлоры выступает устойчивость к действию лизоцима хозяина, реализуемая через модификацию пептидогликана — О-ацетилирование (широкий набор детерминант О-цетилата и семейство σ-факторов). Важная функция индигенных бифидобактерий в работе пищеварительного тракта человека — их способность участвовать в микробном распознавании “свой—чужой”. Полученные результаты позволили открыть доступ к источнику полезных индигенных микроорганизмов и использовать их при отборе культур для создания современных биопрепаратов.

**Ключевые слова:** индигенность, персистенция, адаптация, бифидобактерии, лизоцимрезистентность, микробное распознавание “свой—чужой”.

DOI: 10.31857/S0869587323110026, EDN: CMMRZI

В представленном обзоре рассматривается индигенность кишечных штаммов бифидобактерий человека. Стоит напомнить, что ещё И.И. Мечников говорил об их способности защищать наш организм. Однако вопрос об индигенности микроорганизмов, их адаптивном потенциале и экологической функции не поднимался. В предыдущей работе [1], посвящённой особенностям персистенции бифидобактерий, мы обратили внима-

ние на тот факт, что индигенность и персистенция тесно связаны: *индигенные микроорганизмы* — штаммы, которые длительно (десятилетиями) пребывают в кишечнике, *персистируют* и играют важную роль в работе пищеварительного тракта, а *индигенность* — свойство быть коренным, то есть природным, местным [2]. Кроме того, наша индигенная микробиота — это природная кладовая полезных штаммов, которые постоянно присут-



БУХАРИН Олег Валерьевич — академик РАН, научный руководитель ИКВС УрО РАН. ИВАНОВА Елена Валерьевна — доктор медицинских наук, заведующая лабораторией инфекционной симбиологии ИКВС УрО РАН. ПЕРУНОВА Наталья Борисовна — доктор медицинских наук, заместитель директора по научной работе ИКВС УрО РАН.

ствуют в кишечнике и создают своеобразный защитный барьер, залог нашего здоровья. К индигенным можно отнести бифидобактерии, поскольку именно они обеспечивают устойчивость тканей и органов к заселению патогенными возбудителями, обладают огромным метаболическим и иммунорегуляторным потенциалом, что позволяет по праву считать их “своими” микроорганизмами [3].

Для определения признаков индигенности кишечных штаммов бифидобактерий представляет интерес большое количество неизученных в плане персистенции аспектов. *Персистенция* – уникальное природное явление, пролонгирующее сохранение (адаптацию) и выживание микробных клеток в организме [4]. В лаборатории инфекционной симбиологии Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН (ИКВС УрО РАН) накоплены фактические материалы, свидетельствующие, что некоторые виды бифидобактерий стабильно обосновались в толстом кишечнике, участвуя в поддержании гомеостаза хозяина.

В своей работе мы остановились на следующих этапах изучения индигенности: оценка совокупности знаний об экологии бифидобактерий как первых колонизаторов кишечника человека; разбор основ индигенности через персистенцию (с синхронизацией этих двух явлений); определение важных функций бифидофлоры в организме.

**Бифидобактерии – первые колонизаторы кишечника человека.** Среди кишечных микроорганизмов особый интерес представляют бифидобактерии как ключевая модель для изучения взаимодействий “хозяин–микроб” в кишечнике млекопитающих. Современные достижения в исследованиях прокариот показывают, что культуры бифидобактерий *эволюционировали совместно* со своими хозяевами и многие физиологические характеристики могут быть обусловлены местом их обитания [5, 6]. Примечательно, что в природе они встречаются в различных экологических нишах, которые прямо или косвенно связаны с желудочно-кишечным трактом животных. Они широко распространены в кишечнике социальных животных (млекопитающих, птиц и насекомых), чьё потомство зависит от родительской заботы [7]. Возможно, их экологическое происхождение связано с наследованием материнских бифидобактериальных клеток, которые одними из первых заселили кишечник млекопитающих, включая человека.

Почему выбор эволюции пал на эти микроорганизмы? Чем же они лучше других? Почему именно они сформировали индигенную микробиоту и оказывают нам постоянную помощь? Прямого ответа на эти вопросы пока нет, но можно допустить, что их генетический паспорт в наи-

большей степени удовлетворяет нашу “цензорную службу”, не вызывая у неё особого протеста.

Известно, что образование изолированных лимфоидных фолликулов специализированных кишечных структур, составленных из дендритных клеток и агрегатов В-клеток, зависит от микробиоты [3]. Если учесть, что популяциям кишечных иммунных клеток для развития и функционирования требуется микробиота с её бифидобактериями, становится понятен её огромный вклад в формирование иммунной системы, которая и обеспечивает эти микроорганизмы “местами проживания”. Следовательно, механизмы хозяина и индигенной микробиоты вовлечены в тесное сотрудничество для *синергидного существования* в целях сохранения симбиоза. В пользу этого свидетельствует и тот факт, что в условиях истощения микробиоты (включая бифидобактерий) уменьшаются интестинальные иммунные ответы, которые контролируют кишечные инфекции, вызванные *Citrobacter spp.* и *Campilobacter spp.* [3], наблюдается развитие некротизирующего энтероколита, аллергии, астмы, атопического дерматита, сахарного диабета 1-го типа и ожирения [8]. Но тогда возникает вопрос о взаимодействиях микробиоты и иммунитета.

Известно, что в первые 1000 дней жизни человека одновременно протекают процессы созревания иммунной системы и кишечной микробиоты, в которой у здоровых детей, находящихся на грудном вскармливании, обычно преобладают бифидобактерии младенческого типа, включая *Bifidobacterium longum subsp. infantis*, *B. bifidum*, *B. breve* и *B. longum subsp. longum*. Это оказывает долгосрочное воздействие на здоровье, так как способствует стимуляции противовоспалительного генофонда человека [9]. Для колонизации кишечника бифидобактерии младенческого типа развили ряд сложных генетических путей осуществления метаболизма олигосахаридов грудного молока. Гликолитическая активность приводит к образованию анаэробной и кислой среды кишечника, которая ускоряет формирование иммунитета, изменяет микроокружение и влияет на развитие многих органов (например, печени и головного мозга) [10]. В кишечнике может установиться бактериальное сотрудничество *Bifidobacterium spp.* с *Bacteroides spp.* и/или *Lactobacillus spp.* для ферментации олигосахаридов и поддержания иммунного баланса кишечника новорождённых, что способствует увеличению бифидобактериального разнообразия и формированию микроокружения [11]. В целом это свидетельствует о том, что виды *Bifidobacterium spp.* обладают необходимым набором генов для деградации олигосахаридов, то есть *генетически адаптированы* к кишечнику младенцев и эффективно метаболизируют олигосахариды грудного молока, а их

присутствие обуславливает здоровье человека в течение долгого времени.

Как же штаммы попадают в организм новорождённого? Показано, что до рождения ребёнка материнский микробиом дистанционно, через бактериальные метаболиты (короткоцепочечные жирные кислоты) стимулирует развитие у плода дендритных клеток и регуляторных Т-лимфоцитов (Tregs). Кроме того, у ребёнка исходные антигены (иммуноглобулины класса А) благодаря трансплацентарному кровообращению появляются во время беременности и играют жизненно важную роль в защите от инфекций. После рождения первая передача микроорганизмов ребёнку происходит при контакте с вагинальной и фекальной микрофлорой матери, через её кожу и грудное молоко [9]. Таким образом, ещё в пренатальный период материнский микробиом обеспечивает “дистанционное обучение” (импринтинг) иммунной системы ребёнка и создаёт условия, необходимые для заселения его кишечника индигенными бифидобактериями.

Феномен иммунного импринтинга установлен и в период раннего возраста ребёнка (особенно в течение первых трёх месяцев жизни), который опосредован культурами бифидобактерий [10]. Показано, что у новорождённых низкая численность кишечных бифидобактерий и/или отсутствие у штаммов генов утилизации олигосахаридов грудного молока связаны с системным и кишечным воспалением. Введение штамма *B. infantis* EVC001, изолированного от здоровых детей, который экспрессирует все известные гены ферментации олигосахаридов, сопровождалось индукцией интерферона  $\beta$  (IFN $\beta$ ), подавлением воспалительных реакций кишечных Th2- и Th17-лимфоцитов и оказывало Th1-поляризующее действие на наивные<sup>1</sup> CD4+T-клетки, а также стимулировало продукцию IL-10 и IL-27, связанных с регуляторными Т-клетками. Таким образом, бифидобактерии, которые экспрессируют гены утилизации олигосахаридов грудного молока, посредством индукции толерантности способствуют формированию здорового иммунно-микробного интерфейса в кишечнике детей раннего возраста. Неслучайно в современной литературе детерминанты утилизации углеводов относят к пробиотическим генам, значимым при отборе перспективных культур кишечных бифидобактерий [12].

С возрастом количество бифидобактерий уменьшается, и у пожилых людей их относительная численность составляет не более 2–14%. В ос-

новном это виды бактерий взрослого типа, включая *B. adolescentis*, *B. catenulatum* и *B. pseudocatenulatum*. Присутствие представителей этого рода в составе микробиоты положительно коррелирует с состоянием здоровья хозяина и, напротив, дефицит бифидофлоры повышает риск развития иммуноопосредованных заболеваний в более позднем возрасте [13]. Однако причины обитания бифидобактерий как индигенных микроорганизмов в кишечнике человека на протяжении всей жизни, их адаптация и выживание в условиях желудочно-кишечного тракта остаются малоизученными.

**Персистенция и адаптивный потенциал индигенных бифидобактерий кишечника человека.** Очевидно, что при изучении индигенности микроорганизмов следует рассматривать их персистенцию и персистентные характеристики, поскольку бактерии, длительно сосуществуя с организмом хозяина, устанавливают с ним симбиотические взаимоотношения. Персистенция представляет собой форму симбиоза, способствующую длительному выживанию микроорганизмов в теле хозяина, то есть основную *стратегию выживания вида* [14].

Наиболее широко распространена бактериальная персистенция, которая проявляется в образовании в микробной культуре клеток-персистеров — фенотипических вариантов изогенной популяции. Это один из механизмов формирования резистентности бактерий к антимикробным препаратам [15, 16]. Однако, как было показано, проблема пролиферативного покоя микробных клеток вызывает особый интерес и с точки зрения экологии микробов и человека, так как именно в этом состоянии микроорганизмы находятся в природных биоценозах и автохтонных сообществах микрофлоры человека, животных и растений. Экологическая функция покоящихся клеток — минимализация затрат энергии на поддержание метаболической активности и высокая адаптивность к окружению [17].

Работы, на протяжении последних десятилетий проводившиеся в ИКВС УрО РАН, позволили определить природу и механизмы факторов персистенции бактерий [4]. Как прокариоты, так и хозяин обладают удивительной пластичностью, служащей основой их сложных взаимоотношений в процессе параллельной эволюции. Примером может служить *бактерионосительство патогенных микроорганизмов* (стафилококков, сальмонелл, шигелл и др.) — эволюционно прогрессивная форма симбиоза, направленная на взаимoadaptацию контактирующих систем. Благодаря экспериментальным и клиническим наблюдениям получены новые данные об адаптивных возможностях патогена во внутренней среде хозяина, реализуемых через персистентный потенциал. Однако сохранение патогена в организме сопровождается инактивацией естественных механизмов защиты хозяина и формированием его имму-

<sup>1</sup> Наивные Т-клетки (от англ. “naive T cells”) — Т-лимфоциты, успешно прошедшие позитивную и негативную селекцию в тимусе, попавшие на периферию организма, но не имевшие контакта с антигеном. Их основная функция — реакция на патогены, прежде не известные иммунной системе организма. После того как наивные Т-клетки распознают антиген, они становятся активированными.

нокомпрометируемого статуса. Всё это способствовало отнесению факторов персистенции к *малым факторам патогенности*, что нашло реальное воплощение в разработке и создании диагностических, прогностических и терапевтических технологий в инфекционной клинике [4].

Изучение экологической значимости персистентных характеристик бактерий показало, что *микробная персистенция* — универсальное, широко распространённое явление как среди патогенов, так и среди представителей индигенной микробиоты различных биотопов хозяина (бифидобактерии, лактобактерии и т.д.) [18]. Возможно, во внутренней среде происходит селекция штаммов по их персистентным характеристикам. Однако патогены, кратковременно пролонгируя своё пребывание в организме, способны элиминировать из биотопа и утрачивать эти признаки во внешней среде, а другие — индигенные штаммы — через процессы метаболической и генетической адаптации эволюционно закрепляются в определённой эконше хозяина.

Использование обширной коллекции штаммов бифидобактерий позволило нам приблизиться к пониманию индигенности микроорганизмов с учётом особенности их персистенции [1]. В лаборатории инфекционной симбиологии ИКВС УрО РАН накоплены уникальные данные, доказывающие, что некоторые виды бифидобактерий надёжно обосновались в толстом кишечнике и играют большую роль в поддержании гомеостаза хозяина. Было предложено рассматривать феномен персистенции индигенных бактерий как частный случай сформированного в процессе эволюции *адаптивного потенциала* прокариот в организме человека, не имеющего патогенетической основы и направленного исключительно на защиту микробной клетки от протективных факторов. Наличие секретлируемых начал у штаммов может обеспечивать селективное преимущество индигенной популяции бифидобактерий в толстом кишечнике, а также определять их *регуляторную роль* в поддержании баланса цитокинов и антимикробных факторов слизистых оболочек.

Определение эволюционно-экологической особенности индигенности прокариот в микросимбиозе хозяина связано с вопросом соотношения *факторов колонизации и персистенции* микроорганизмов. Это также позволяет выявить некоторые адаптивные черты индигенных штаммов, обеспечивающие их колонизацию и длительное выживание в условиях толстого кишечника. С помощью статистического анализа обширных экспериментальных материалов установлено, что для индигенных штаммов бифидобактерий, имеющих высокий уровень жизнеспособных клеток в кишечнике, характерны два информативных параметра: *лизоцимрезистентность* и *биоплёнокообразование*. И это неслучайно, учитывая, что лизо-

цим вездесущ в качестве первой линии иммунной защиты млекопитающих от микроорганизмов. Полученные данные позволяют сделать вывод о вкладе этих признаков в обеспечение процессов закрепления и длительного выживания индигенных штаммов в организме в результате эволюции прокариот совместно с иммунной системой хозяина.

Устойчивость к действию лизоцима хозяина у бифидобактерий реализуется в основном через модификацию пептидогликана (*О-ацетилирование пептидогликана*) и способность неспецифически с помощью ацетата изменять уровень лизоцима в среде [19]. Благодаря омиксным технологиям, применяемым в современной медицине и биологии, стало возможным получать информацию о молекулярно-генетической природе фенотипа бактерий, в том числе способности микробов проявлять резистентность к антимикробным факторам, например, лизоциму. В таблице 1 представлены детерминанты О-ацетилата в геномах секвенированных штаммов бифидобактерий из коллекции лаборатории инфекционной симбиологии ИКВС УрО РАН. Перечень известных гомологов в геномах индигенных штаммов составлен с помощью онлайн-сервиса RAST (коллекция NMPDR, США).

У грамположительных бактерий отмечено наличие бактериальных рецепторов — большое и разнообразное семейство  $\sigma$ -факторов, в отсутствие которых штаммы становятся более чувствительными к лизоциму и ряду антимикробных факторов хозяина [20].  $\sigma$ -факторы наделяют РНК-полимеразу промоторной специфичностью у бактерий. Большинство  $\sigma$ -факторов должны быть активированы в ответ на внешний сигнал (в основном на лизоцим). В таблице 2 представлены варианты генов семейства  $\sigma$ -факторов в геномах секвенированных штаммов бифидобактерий. Проведённый анализ показал, что секвенированные штаммы *Bifidobacterium spp.* демонстрируют выраженное разнообразие в наборе генов семейства  $\sigma$ -факторов.

Полученные результаты свидетельствуют о широком наборе известных генов О-ацетилата и семейства  $\sigma$ -факторов у секвенированных штаммов, что позволяет предположить их значимость в процессах формирования лизоцимрезистентности бифидобактерий. Однако данный вопрос остаётся открытым и в будущем может иметь перспективы при изучении молекулярных механизмов взаимодействия микробных клеток и лизоцима — универсального антисептика слизистых хозяина.

В целом выявление особенностей персистенции микроорганизмов позволило дать ответ на вопрос: как отличить “свои” микробы от “чужих”? Это весьма сложно ввиду недостатка знаний о деталях данного процесса. Возможно, дальнейшее исследование поверхностных структур и секретлируемых факторов микроорганизмов по-

Таблица 1. Варианты генов О-ацетилата в геномах секвенированных штаммов бифидобактерий

| Штамм                         | Белок                                    |                                                |                                                                               |                                                                  |                                 |                                                                |                                                      |                                           |
|-------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|---------------------------------|----------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|-------------------------------------------|
|                               | тРНК (цитидин(34)-2'-О)-метилтрансфераза | 16S рРНК (цитидин(1402)-2'-О)-метилтрансфераза | Сахар О-ацетилтрансфераза                                                     | Мультивиды: 23S рРНК (гуанозин(2251)-2'-О)-метилтрансфераза RlmB | Гомосерин-О-сукцинилтрансфераза | О-ацетилгомосеринаминокарбокси пропилтрансфераза/дистинсинтаза | 23S рРНК (гуанозин(2251)-2'-О)-метилтрансфераза RlmB | Гомосерин-О-сукцинилтрансфераза частичная |
| <i>B. longum</i><br>MC-42     | WP_007058488.1<br>(223)                  | WP_015512102.1<br>(336)                        | WP_007052445.1<br>(225)<br>WP_007052429.1<br>(210)<br>WP_007053629.1<br>(224) | WP_007051816.1<br>(330)                                          | WP_007051484.1<br>(334)         | WP_059280647.1<br>(438)                                        | —                                                    | —                                         |
| <i>B. bifidum</i><br>791      | WP_080959163.1<br>(215)                  | WP_061871118.1<br>(328)                        | —                                                                             | WP_003814978.1<br>(332)                                          | WP_003814315.1<br>(344)         | WP_061870472.1<br>(438)<br>WP_003814823.1<br>(425)             | —                                                    | —                                         |
| <i>B. bifidum</i><br>ICIS-643 | WP_080959163.1<br>(215)                  | WP_061871118.1<br>(328)                        | —                                                                             | —                                                                | WP_003814315.1<br>(344)         | WP_003814823.1<br>(4125)<br>WP_061870472.1<br>(438)            | WP_003814978.1<br>(332)                              | —                                         |
| <i>B. bifidum</i><br>ICIS 202 | WP_080959163.1<br>(215)                  | WP_061871118.1<br>(328)                        | —                                                                             | —                                                                | WP_003814315.1<br>(344)         | WP_003814823.1<br>(425)<br>WP_061870472.1<br>(438)             | WP_003814978.1<br>(332)                              | —                                         |
| <i>B. bifidum</i><br>ICIS 629 | WP_080959163.1<br>(215)                  | WP_061871118.1<br>(328)                        | —                                                                             | WP_003814978.1<br>(332)                                          | WP_003814315.1<br>(344)         | WP_061870472.1<br>(438)<br>WP_003814823.1<br>(425)             | —                                                    | WP_227760341.1<br>(79)                    |

Таблица 1. Окончание

| Белок                         |                                          |                                                |                                                                                                          |                                                                  |                                 |                                                                   |                                                      |                                           |
|-------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| Штамм                         | тРНК (цитидин(34)-2'-О)-метилтрансфераза | 16S рРНК (цитидин(1402)-2'-О)-метилтрансфераза | Сахар О-ацетилтрансфераза                                                                                | Мультивиды: 23S рРНК (гуанозин(2251)-2'-О)-метилтрансфераза RlmB | Гомосерин-О-сукцинилтрансфераза | О-ацетилгомосеринаминоксикарбокси пропилтрансфераза/цистинсинтаза | 23S рРНК (гуанозин(2251)-2'-О)-метилтрансфераза RlmB | Гомосерин-О-сукцинилтрансфераза частичная |
| <i>B. bifidum</i><br>ICIS 504 | WP_013389580.1<br>(215)                  | WP_047271099.1<br>(328)                        | —                                                                                                        | WP_003814978.1<br>(332)                                          | WP_047270984.1<br>(344)         | WP_047272398.1<br>(438)<br>WP_003814823.1<br>(425)                | —                                                    | —                                         |
| <i>B. longum</i><br>ICIS-500  | WP_007058488.1<br>(223)                  | WP_008783206.1<br>(336)                        | WP_010080813.1<br>(224)<br>WP_007052445.1<br>(225)                                                       | WP_007051816.1<br>(330)                                          | WP_117717796.1<br>(344)         | WP_227248979.1<br>(438)                                           | —                                                    | —                                         |
| <i>B. longum</i><br>ICIS-206  |                                          | WP_008783206.1<br>(336)                        | WP_061870380.1<br>(225)<br>WP_007052429.1<br>(210)<br>WP_010080813.1<br>(224)<br>WP_007058488.1<br>(223) | WP_007051816.1<br>(330)                                          | WP_007051484.1<br>(344)         | WP_007052070.1<br>(438)                                           |                                                      |                                           |
| <i>B. longum</i><br>ICIS-1113 | WP_007053738.1<br>(220)                  | WP_008783206.1<br>(336)                        | WP_007053629.1<br>(224)<br>WP_007052429.1<br>(210)<br>WP_007052445.1<br>(225)                            | WP_007051816.1<br>(330)                                          | WP_007054763.1<br>(344)         | WP_007053427.1<br>(438)                                           | —                                                    | —                                         |

**Таблица 2.** Варианты генов семейства  $\sigma$ -факторов в геномах секвенированных штаммов бифидобактерий

| Штамм                      | $\sigma$ -фактор                 |                                                         |                                                                   |
|----------------------------|----------------------------------|---------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
|                            | РНК-полимераза, $\sigma$ -фактор | РНК-полимераза семейства $\sigma$ -70, $\sigma$ -фактор | РНК-полимераза семейства $\sigma$ -70, $\sigma$ -фактор частичный |
| <i>B. longum</i> MC-42     | WP_007055162.1 (474)             | WP_038426465.1 (250)                                    | —                                                                 |
| <i>B. bifidum</i> 791      | WP_003813773.1 (500)             | WP_014760022.1 (237)                                    | —                                                                 |
| <i>B. bifidum</i> ICIS-643 | WP_003813773.1 (550)             | WP_014760022.1 (237)                                    | —                                                                 |
| <i>B. bifidum</i> ICIS 202 | WP_003813773.1 (500)             | —                                                       | —                                                                 |
| <i>B. bifidum</i> ICIS 629 | WP_003813773.1 (500)             | WP_014760022.1 (237)                                    | WP_227760329.1 (139)                                              |
| <i>B. bifidum</i> ICIS 504 | WP_182430256.1 (499)             | WP_014760022.1 (237)                                    | —                                                                 |
| <i>B. longum</i> ICIS-500  | WP_007055162.1 (474)             | WP_007057260.1 (250)                                    | —                                                                 |
| <i>B. longum</i> ICIS-206  | WP_007055162.1 (474)             | WP_007054434.1 (264)                                    | —                                                                 |
| <i>B. longum</i> ICIS-1113 | WP_065438664.1 (474)             | WP_007057260.1 (250)                                    | —                                                                 |

может расширить и пополнить наши представления о персистенции индигенной флоры.

Таким образом, для определения индигенности симбионтных микроорганизмов необходимо оценивать их способность к персистенции — основную стратегию выживания микробных клеток, связанную с процессом их адаптации к внутренней среде хозяина. Как известно, адаптация характерна для всего живого, но мы предложили практическое использование знаний об адаптивном потенциале бактерий — лизоцимрезистентности и биоплёнкообразовании, которые оказались информативными при отборе индигенных штаммов. Мы смогли открыть доступ к ценному источнику полезных микроорганизмов, которые укрепляют нашу микробиоту и организм в целом. Индигенные штаммы бифидобактерий (патенты РФ № 2670054, 2704423, 2726653) могут быть включены в состав пробиотических препаратов (регистрационная заявка на патент № 2023109383) с использованием метода биосовместимости (патент РФ № 2676910) и найти широкое применение в различных лечебно-профилактических мероприятиях и функциональном питании.

**Микробное распознавание “свой—чужой” — важная функция индигенных штаммов бифидобактерий.** Наряду с выраженным адаптивным потенциалом одним из основных признаков индигенных микроорганизмов может служить их способность *регулировать микроокружение* и являться *функционально значимыми в биоценозе*. Бифидобактерии обладают мощным набором свойств, обеспечивающих их протективное действие в отношении заселения патогенными возбудителями, огромным метаболическим потенциалом (синтез витаминов, аминокислот, карбоновых кислот и биогенных аминов) и иммунорегуляторной активностью [3].

Несмотря на достаточную изученность вопроса о защитной роли бифидобактерий в биотопе толстого кишечника человека от патогенов различной природы, появляется всё новая информация об их функциях. Так, они способны сами осуществлять отбор микросимбионтов через феномен *микробного распознавания “свой—чужой”* [21], формируя тем самым своё микроокружение. Микробное распознавание и механизмы самоидентификации бактерий активно изучаются. В работах Л.М. Венрен с соавторами описаны результаты исследования роста культур *Proteus mirabilis* на поверхности агаровых сред [22]. А.Е. Шанк и Р. Колтер [23] связывают регуляторные взаимодействия микроорганизмов с наличием в их супернатанте “сигнальных” молекул. Очевидно, что изменение фенотипа микробных популяций при межмикробном взаимодействии осуществляется с помощью различных молекул, впоследствии использующихся микробиотой в качестве индукторов новых метаболитов-посредников, что в конечном счёте оказывает влияние на формирование антагонистических либо синергидных связей между бактериями. Исходя из этого внедрение микроорганизма в тело хозяина и его выживание будут зависеть не только от результата распознавания бактерий иммунной системой человека, но и от итога его взаимоотношений с индигенной бифидофлорой.

Доказательством индигенности кишечных бифидобактерий служат экспериментальные исследования на модели микробного распознавания “свой—чужой”, основанной на принципе индукции метаболитов в результате предварительного соинкубирования доминантов (бифидобактерий) с супернатантом ассоциантов (кишечные изоляты бактерий и грибов) и формировании обратной связи (синергизм/антагонизм) в паре “доминант—ассоциант”. Обратная связь оценивалась с использованием микробиологического метода по

**Таблица 3.** Результаты оценки микробного распознавания “свой–чужой” в условиях *in vivo*

| Виды ассоциативной (распознаваемой) микробиоты кишечника | Частота обнаружения ассоциантов в начале исследования | Показатель микробной обсеменённости (ПМО) ассоциантов в начале исследования, КОЕ/мл | Результат, полученный с помощью модели “свой–чужой” | Результат обследования микросимбиотоза через 14–30 дней                                                                                                                                                                                          |
|----------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>E. coli</i> (лактозопозитивные негемолитические)      | 100%<br>(20 штаммов)                                  | $10^5$ – $10^7$                                                                     | “свой”                                              | <ul style="list-style-type: none"> <li>• сохранение численности (ПМО) ассоцианта на прежнем уровне (16 штаммов)</li> <li>• увеличение численности (ПМО) ассоцианта (3 штамма)</li> <li>• отсутствие высеваемости ассоцианта (1 штамм)</li> </ul> |
| <i>E. coli</i> (лактозонегативные гемолитические)        | 25%<br>(5 штаммов)                                    | $10^3$ – $10^5$                                                                     | “чужой”                                             | отсутствие высеваемости ассоцианта (5 штаммов)                                                                                                                                                                                                   |
| <i>K. pneumoniae</i>                                     | 10%<br>(2 штамма)                                     | $10^7$ – $10^8$                                                                     | “чужой”                                             | отсутствие высеваемости ассоцианта (2 штамма)                                                                                                                                                                                                    |
| <i>E. faecium</i>                                        | 55%<br>(11 штаммов)                                   | $10^5$ – $10^7$                                                                     | “свой”                                              | <ul style="list-style-type: none"> <li>• сохранение численности (ПМО) ассоцианта на прежнем уровне (10 штаммов)</li> <li>• отсутствие высеваемости ассоцианта (1 штамм)</li> </ul>                                                               |
| <i>E. faecalis</i> (гемолитические)                      | 20%<br>(4 штамма)                                     | $10^5$ – $10^7$                                                                     | “чужой”                                             | отсутствие высеваемости ассоцианта (4 штамма)                                                                                                                                                                                                    |
| <i>C. albicans</i>                                       | 20%<br>(4 штамма)                                     | $10^4$                                                                              | “чужой”                                             | снижение численности ассоцианта (4 штамма)                                                                                                                                                                                                       |

изменению базовых параметров физиологических функций микросимбионтов: ростовые свойства (рост/размножение, РС), биоплёнокообразование (БПО) и антилизоцимная активность (АЛА). Если происходило снижение (антагонизм) РС, АЛА и БПО ассоциантов, то штаммы относили к “чужим” видам, а при увеличении (синергизм) показателей – к “своим” [21].

Способность бифидобактерий к микробному распознаванию “свой–чужой” была успешно воспроизведена в условиях *in vitro* на оппозитных штаммах *E. coli* М-17 и *E. coli* ЛЭГМ-18 [24], которые различаются по наличию острова патогенности (pks), кодирующего генотоксин колибактин. Было определено преимущественное усиление исследуемых биологических характеристик у *E. coli* ЛЭГМ-18 (pks –) и подавление у *E. coli* М-17 (pks +). Соответственно штамм *E. coli* ЛЭГМ-18 отнесён к “своим” видам, а культура *E. coli* М-17 – к “чужим”.

Способность индигенных штаммов сортировать кишечные бактерии на “свои” и “чужие” была определена и в условиях *in vivo* на основании анализа численности различных видов кишечных микроорганизмов (ассоцианты) толстого кишечника у 20 пациентов в динамике (на 1 и 14–30 день) (табл. 3). Во время проведения исследований приём антибактериальных препаратов и коррекция микросимбиотоза иммунобиологическими препаратами не проводились. Установлено, что микроорганизмы, которые по результату воздействия на них индигенных штаммов бифидобактерий были отнесены к категории “чужие”, при повторном исследовании микросимбиотоза кишечника через 14–30 дней снижали свою численность либо не обнаруживались, тогда как “свои” виды микросимбионтов достоверно не изменяли численность и сохранялись в ассоциации с индигенной бифидофлорой на протяжении данного времени.

Сложилось представление о роли бифидофлоры в формировании иммунного гомеостаза кишечника человека, где первичная дискриминация чужеродного материала бифидобактериями — инициальный этап последующего иммунологического сигналинга [25]. Большое значение во взаимодействии бифидобактерий и организма человека отводится цитокинам и способности бифидофлоры изменять численность данных регуляторных молекул во внутренней среде хозяина [26]. Учитывая, что в последнее время появляется всё больше сведений о роли цитокинов в формировании различной патологии (метаболические нарушения, патология опорно-двигательной системы, нарушение организации соединительной ткани, аутоиммунные заболевания, сердечно-сосудистые заболевания, сахарный диабет и др.) [3, 27], становится понятен всеобщий интерес к индигенной микробиоте кишечника человека, которая оказывается вовлечённой в мировую гонку за здоровьем.

\* \* \*

Поскольку индигенная микробиота человека — это природная кладовая штаммов бифидобактерий и залог нашего здоровья, явление индигенности привлекает внимание учёных как недостатком сведений о ней, так и новыми подходами в инфектологии и экологии. Неслучайно говорят: здоровый кишечник — здоровый хозяин. Индигенные микроорганизмы — штаммы, которые, длительно (годами) пребывая в нашем кишечнике, персистируют и выполняют важные функции в работе пищеварительного тракта.

Использование обширной коллекции штаммов бифидобактерий (около 300) от здорового контингента позволило приблизиться к пониманию индигенности микроорганизмов с учётом особенности их персистенции. Определение индигенности симбионтных бактерий оценивают по их адаптивному потенциалу, поскольку адаптация свойственна всем живым системам. Адаптация микробных клеток в организме человека тесно связана с их длительным выживанием — персистенцией, информативными параметрами которой в случае бифидобактерий являются лизоцимрезистентность и биоплёнкообразование. Именно эти способности характеризуют адаптивный потенциал микробных клеток и могут учитываться при отборе индигенных штаммов для включения их в состав пробиотических препаратов.

Основной стратегией персистенции индигенной бифидофлоры служит устойчивость к действию лизоцима хозяина, реализуемая через О-ацетилирование пептидогликана. В геномах секвенированных штаммов индигенных бифидобактерий широко распространены детерминанты О-ацетилов и семейства  $\sigma$ -факторов, регулирующих процессы формирования лизоцимрези-

стентности бактерий. И это неслучайно, потому что лизоцим — универсальный антимикробный белок, первая линия иммунной защиты млекопитающих от патогенов.

Важная функция индигенных микроорганизмов как функционально значимых штаммов в микробиоценозе хозяина — способность регулировать кишечный гомеостаз человека через микробное распознавание “свой—чужой”. Микробное распознавание и механизмы самоидентификации бактерий активно изучаются, однако нетрудно заметить, что в зависимости от результата взаимоотношений с индигенной бифидофлорой (антагонистические либо синергидные связи) формируются микробные ассоциации толстого кишечника. Кроме того, полученные данные открывают перспективу использования микробного распознавания “свой—чужой” в качестве базового метода при отборе штаммов для создания новых микробных композиций.

Таким образом, экспериментально установлено явление индигенности кишечных микроорганизмов хозяина — бифидобактерий — как результат адаптации микробных клеток в организме, где основу их стратегии составляют персистенция и реализация феномена микробного распознавания. Оценивать индигенность штаммов бифидобактерий необходимо по их адаптивному потенциалу и способности к распознаванию микробиоты толстого кишечника. Точное определение индигенности симбионтных микроорганизмов человека открывает возможность теоретического осмысления знаний микроэкологии хозяина и новых прикладных аспектов в области создания биопрепаратов на бактериальной основе, позволяет систематизировать знания о симбионтной микробиоте человека и определить информативные признаки “своих” (коренных) штаммов, тем самым укрепляя микробиоту новыми полезными микроорганизмами.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бухарин О.В., Иванова Е.В. Особенности персистенции индигенных штаммов бифидобактерий кишечника человека // Вестник РАН. 2023. № 6. С. 549–556.
2. Дворецкий И.Х. Латинско-русский словарь. М.: Русский язык, 1986.
3. Бухарин О.В., Перунова Н.Б., Иванова Е.В. Бифидофлора при ассоциативном симбиозе человека. Екатеринбург: УрО РАН, 2014.
4. Бухарин О.В. Персистенция патогенных бактерий. М.: Медицина, 1999.
5. Duranti S., Longhi G., Ventura M. et al. Exploring the ecology of Bifidobacteria and their genetic adaptation to the mammalian gut // Microorganisms. 2020. V. 9 (1). P. 8.
6. Sun Z., Zhang W., Guo C. et al. Comparative Genomic Analysis of 45 Type Strains of the Genus *Bifidobacterium*: A Snapshot of Its Genetic Diversity and Evolution // PLOS ONE. 2015. V. 10 (2). e0117912.

7. Turroni F., Duranti S., Bottacini F. et al. *Bifidobacterium bifidum* as an example of a specialized human gut commensal // Front. in microbiol. 2014. V. 5. P. 437.
8. Russell J.T., Roesch L.F.W., Ordborg M. et al. Genetic Risk for Autoimmunity is Associated with Distinct Changes in the Human Gut Microbiome // Nat. Commun. 2019. № 10. P. 3621.
9. Lin C., Lin Y., Zhang H. et al. Intestinal 'Infant-Type' Bifidobacteria Mediate Immune System Development in the First 1000 Days of Life // Nutrients. 2022. № 14. P. 1498.
10. Henrick B.M., Rodriguez L., Lakshmikanth T. et al. Bifidobacteria-Mediated Immune System Imprinting Early in Life // Cell. 2021. V. 184 (15). P. 3884–3898.
11. Yao Y., Cai X., Ye Y. et al. The Role of Microbiota in Infant Health: From Early Life to Adulthood // Front. Immunol. 2021. № 12. P. 708472.
12. Беляева Е.А., Червинец Ю.В., Червинец В.М. и др. Характеристика пробиотических свойств штаммов рода *Bifidobacterium*, выделенных из желудочно-кишечного тракта жителей Центрального региона России // Клиническая лабораторная диагностика. 2015. № 2. С. 53–58.
13. Hidalgo-Cantabrana C., Delgado S., Ruiz L. et al. Bifidobacteria and their health-promoting effects // Microbiol. Spectr. 2017. № 5. P. 3.
14. Бухарин О.В., Вальшиев А.В., Гильмутдинова Ф.Г. и др. Экология микроорганизмов человека / Отв. ред. О.В. Бухарин. Екатеринбург: УрО РАН, 2006.
15. Эль-Регистан Г.И., Николаев Ю.А., Мулюкин А.Л. и др. Явление персистенции – формы и механизмы выживаемости популяций // Медицинский алфавит. Эпидемиология и гигиена. 2014. № 2. С. 49–54.
16. Андрюков Б.Г., Ляпун И.Н. Молекулярные механизмы персистенции бактерий // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2020. № 3. С. 271–279.
17. Бухарин О.В., Гинцбург А.Л., Романова Ю.М., Эль-Регистан Г.И. Механизмы выживания бактерий. М.: Медицина, 2005.
18. Бухарин О.В., Лобакова Е.С., Немцева Н.В., Черкасов С.В. Ассоциативный симбиоз. Екатеринбург: УрО РАН, 2007.
19. Бухарин О.В., Андрющенко С.В., Перунова Н.Б., Иванова Е.В. Механизм персистенции индигенных бифидобактерий под действием ацетата в кишечном биотопе человека // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2021. № 3. С. 276–282.
20. Kaus G.M., Snyder L.F., Müh U. et al. Lysozyme Resistance in *Clostridioides difficile* is Dependent on Two Peptidoglycan Deacetylases // J. Bacteriol. 2020. V. 202 (22). e00421-20.
21. Бухарин О.В., Перунова Н.Б. Микросимбиоз. Екатеринбург: УрО РАН, 2014.
22. Wenren L.M., Sullivan N.L., Cardarelli L. et al. Two independent pathways for self-recognition in *Proteus mirabilis* are linked by type VI-dependent export // mBio. 2013. V. 4 (4). e00374-13.
23. Shank A.E., Kolter R. New developments in microbial interspecies signaling // Curr. Opin. Microbiol. 2009. V. 12 (2). P. 205–214.
24. Бухарин О.В., Перунова Н.Б., Иванова Е.В., Андрющенко С.В. Межмикробное распознавание “своей-чужой” в паре “доминант–ассоциант” пробиотических штаммов *Escherichia coli* М-17 и *Escherichia coli* ЛЭГМ-18 // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2016. № 3. С. 3–9.
25. Бухарин О.В., Иванова Е.В., Перунова Н.Б., Чайникова И.Н. Роль бифидобактерий в формировании иммунного гомеостаза человека // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2015. № 67. С. 98–104.
26. Бухарин О.В., Иванова Е.В., Перунова Н.Б. и др. Иммунорегуляторные свойства метаболитов бифидобактерий при зубиозе и дисбиозе толстого кишечника человека // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2015. № 4. С. 89–96.
27. Teng M.W., Bowman E.P., McElwee J.J. et al. IL-12 and IL-23 cytokines: from discovery to targeted therapies for immune-mediated inflammatory diseases // Nat. Med. 2015. V. 21 (7). P. 719–729.

## NATIVE STRAINS OF HUMAN INTESTINAL BIFIDOBACTERIA: INDIGENEITY THROUGH THE PRISM OF PERSISTENCE

O. V. Bukharin<sup>1,\*</sup>, E. V. Ivanova<sup>1,##</sup>, and N. B. Perunova<sup>1,###</sup>

<sup>1</sup>Institute for Cellular and Intracellular Symbiosis, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russia

\*E-mail: ofrc@list.ru

##E-mail: walerewna13@gmail.com

###E-mail: perunovanb@gmail.com

The indigenous human microbiota is a natural storehouse of bifidobacteria strains, the key to our health. To determine the indigeneity of symbiont microorganisms, it is proposed to evaluate their adaptive potential (lysozyme resistance and biofilm formation), since adaptation is characteristic of all living systems, and in the human body the main adaptation strategy for bacteria is persistence. One of the mechanisms of persistence of indigenous bifidoflora is resistance to the action of host lysozyme, realized through the modification of peptidoglycan — O-acetylation (a wide range of O-cetylolate determinants and a family of  $\sigma$ -factors). An important function of indigenous bifidobacteria in the functioning of the human digestive tract is their ability to participate in microbial recognition of “friend or foe”. The results obtained made it possible to open access to a source of beneficial indigenous microorganisms and use them in the selection of cultures for the creation of modern biological products.

**Keywords:** indigeneity, indigeneity, persistence, adaptation, bifidobacteria, lysozyme resistance, microbial recognition of “self–non-self”.