

М.В. Лахтин, А.Л. Байракова, В.М. Лахтин, А.В. Алешкин, С.С. Афанасьев, В.А. Алешкин

КОФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ЛЕКТИНОВ МУЛЬТИКОМПОНЕНТНОГО ПРОБИОТИКА И ПОТЕНЦИАЛЬНОГО ПРОБИОТИЧЕСКОГО КОМПАРТМЕНТА БИОТОПА НА ПРИМЕРЕ АУТОРЕГУЛЯТОРНОЙ ЛАКТОБАЦИЛЛЯРНОЙ СИСТЕМЫ

Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского (Москва)

С помощью лектинов Ацилакта проведен скрининг клинических изолятов лактобацилл влагалищного биотопа человека. Популяции лактобацилл биотопа классифицированы в функциональные группы по способности реагировать на присутствие лектинов. Результаты указывают на ауторегуляторные сигнальные свойства лектинов пробиотических микроорганизмов.

Ключевые слова: лектины, пробиотик, лактобациллы, микробиоценоз, биотоп

CO-FUNCTIONING OF LECTINS OF MULTICOMPONENT PROBIOTIC AND POTENTIAL PROBIOTIC COMPARTMENT OF BIOTOPE ON THE EXAMPLE OF AUTOREGULATOR LACTOBACILLUS SYSTEM

M.V. Lakhtin, A.L. Bayrakova, V.M. Lakhtin, A.V. Aleshkin, S.S. Afanasiev, V.A. Aleshkin

G.N. Gabrichevsky Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow

Using lectins of Acilact, clinical isolates of Lactobacillus from vaginal biotope were screened. Lactobacilli of the biotopes were classified to functional groups. Results indicate autoregulation signal properties of probiotic microbial lectins.

Key words: lectins, probiotic, lactobacilli, microbiocenosis, biotope

ВВЕДЕНИЕ

Лектиновые процессы распознавания глико-конъюгатов и регуляции их функционирования широко распространены в биоэкосистемах [3, 9, 11]. Нами из пробиотических штаммов лактобацилл и бифидобактерий человека были впервые выделены и охарактеризованы имитирующие пробиотики синергидные препараты лектинов с набором регуляторных свойств метаболомбиотиков, включающих антимикробное и антипатогенное действие [4, 8, 13]. Однако взаимоотношения лектинов пробиотиков и потенциального пробиотического компартмента биотопа не исследовались.

Цель — изучение влияния лектинов лактобацилл (ЛЛ) пробиотических штаммов на популяции лактобацилл нормофлоры урогенитального биотопа человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Источниками лектинов служили ингредиенты штаммы лактобациллярного пробиотика «Ацилакт», видовая принадлежность которых была установлена как *L. casei/paracasei* K₃III₂₄, *L. helveticus* 100аш и *L. helveticus* NK1 [2]. Препараты ЛЛ получали как описано ранее [8]. Исходная концентрация лектинов в физрастворе была 100 мкг/мл. В работе использовали штаммы лактобацилл нормофлоры урогенитального тракта. Лактобациллы выращивали 2–3 суток при 37 °С в анаэробных генбоксах (GENbox, BioVerieux, Франция) на среде *Lactobacillus* MRC Agar (HiMedia Lab., Индия), а также с использованием среды Шадлера [Shaedler] на агаровой основе. Бактерии культивировали в стандартных условиях в присутствии диск-лектинов на агаре или после внесения лектинов в суспензии

бактерий с известной оптической плотностью (D_{540}). Рассчитывали количество колониеобразующих единиц (КОЕ)/мл с учетом разведений.

Использовали метод серийных разведений для оценки антагонистической активности ЛЛ (табл. 1).

Таблица 1
Взаимодействие ЛЛ с суспензиями штаммов лактобацилл

Штаммы (Группы*)	Разведения препарата					
	1:10 А	1:100 Б	1:1000 В	1:10 Г	1:100 Д	1:1000 Е
2 (II)	5 × 10 ⁷	4 × 10 ⁶	10 ⁶	10 ⁹	3 × 10 ⁸	10 ⁸
9 (I)	5 × 10 ⁸	5 × 10 ⁸	5 × 10 ⁸	5 × 10 ⁹	5 × 10 ⁹	5 × 10 ⁹
14 (II)	5 × 10 ⁶	4 × 10 ⁶	10 ⁶	5 × 10 ⁶	3 × 10 ⁶	10 ⁶
15 (I)	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸	5 × 10 ⁹	5 × 10 ⁹	5 × 10 ⁹
21 (II)	5 × 10 ⁷	3 × 10 ⁷	10 ⁷	5 × 10 ⁸	4 × 10 ⁸	10 ⁸
30 (III)	5 × 10 ⁵	5 × 10 ⁵	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵
51 (II)	5 × 10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁹	5 × 10 ⁸	3 × 10 ⁸
53 (II)	5 × 10 ⁷	4 × 10 ⁷	10 ⁷	5 × 10 ⁸	3 × 10 ⁸	10 ⁸
54 (I)	5 × 10 ⁷	5 × 10 ⁷	5 × 10 ⁷	5 × 10 ⁸	5 × 10 ⁸	5 × 10 ⁸
215 (I)	5 × 10 ⁷	5 × 10 ⁷	5 × 10 ⁷	5 × 10 ⁷	5 × 10 ⁷	5 × 10 ⁷
239 (III)	10 ⁷	10 ⁷	5 × 10 ⁷	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸
288 (I)	5 × 10 ⁸	5 × 10 ⁸	5 × 10 ⁸	5 × 10 ⁹	5 × 10 ⁹	5 × 10 ⁹
296 (I)	5 × 10 ⁷	5 × 10 ⁷	5 × 10 ⁷	5 × 10 ⁹	5 × 10 ⁹	3 × 10 ⁸
664 (I)	5 × 10 ⁷	5 × 10 ⁷	5 × 10 ⁷	5 × 10 ⁹	5 × 10 ⁹	5 × 10 ⁹
683 (III)	10 ⁷	5 × 10 ⁷	6 × 10 ⁷	5 × 10 ⁸	5 × 10 ⁸	5 × 10 ⁸
856 (II)	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷	5 × 10 ⁷	5 × 10 ⁶	10 ⁶

Примечание: суспензии с мутностью 0.5 (А, Б, В) или 5.0 (Г, Д, Е). Даны значения КОЕ/мл. *Группы штаммов с противоположным ответом (II, III) или резистентные к ЛЛ (I).

Определение концентрации культуры по оптической плотности проводили на денсифометре (Densi-la-Meter, Erba Lachema, Чешская Республика). Диск-лектины получали и использовали, как описано ранее [13]. Измеряли на агаре диаметры зон вокруг дисков с отсутствием роста бактерий (табл. 2). Результаты усреднены по трем измерениям.

Таблица 2
Взаимодействие дисковых ЛЛ и изолятов лактобацилл

Штаммы (Группы**)	Разведения препарата			
	1:10 А*	1:10 Б	1:100 В	1:100 Г
2 (II)	14 ± 1	17 ± 1	14 ± 1	19 ± 1
9 (III)	14 ± 1	21 ± 2	14 ± 1	14 ± 1
14 (I)	18 ± 1	14 ± 1	14 ± 1	14 ± 1
15 (II)	14 ± 1	14 ± 1	22 ± 2	24 ± 2
21 (II)	14 ± 1	14 ± 1	16 ± 1	18 ± 1
30 (II)	21 ± 2	35 ± 2	14 ± 1	14 ± 1
51 (I)	14 ± 1	14 ± 1	14 ± 1	14 ± 1
53 (II)	14 ± 1	14 ± 1	14 ± 1	21 ± 2
54 (II)	14 ± 1	14 ± 1	14 ± 1	19 ± 1
215 (I)	14 ± 1	14 ± 1	14 ± 1	14 ± 1
239 (III)	16 ± 1	17 ± 1	16 ± 1	16 ± 1
288 (I)	14 ± 1	14 ± 1	14 ± 1	14 ± 1
296 (II)	18 ± 1	17 ± 1	19 ± 1	21 ± 2
664 (I)	14 ± 1	14 ± 1	14 ± 1	14 ± 1
683 (I)	17 ± 1	17 ± 1	17 ± 1	17 ± 1
856 (III)	14 ± 1	33 ± 2	14 ± 1	25 ± 2

Примечание: * – исходные суспензии лактобацилл с мутностью 2 (А, В) или 1 (Б, Г). Даны диаметры зон отсутствия роста (мм). **Группы: штаммы с противоположным ответом на ЛЛ (II, III) или резистентные к ЛЛ (I).

РЕЗУЛЬТАТЫ

В таблице 1 приведены данные о взаимодействии ЛЛ с лактобациллами в суспензиях. Препарат ЛЛ в разбавлениях в 10 – 1000 раз проявлял бактериоста-

тическое действие в отношении штаммов 296, 2, 14 и 30. Препарат оказывал умеренное бактериостатическое действие на штаммы 21 и 51 при разбавлениях 1:100 и выше. Исследование ЛЛ в более широком диапазоне концентраций в отношении изолята 856 показало выраженное бактериостатическое действие препарата в разбавлениях в 10 – 1000 раз. Значение мутности суспензии (D_{540}) лактобацилл до внесения лектинов мало влияла на характер взаимодействия препарата с клетками, однако более низкая плотность суспензии была предпочтительной при исследовании расширенного спектра свойств лектинов.

Результаты дополнительных исследований различных концентраций препарата в условиях роста культуры на плотной дифференциальной среде в присутствии дисков с ЛЛ подтвердили антагонистическое действие катионных ЛЛ в отношении лактобацилл в разбавлениях 1:10 и 1:100. Результаты приведены в таблице 2. Полученные данные были сходны с результатами, полученными другим методом (табл. 1). Препарат ЛЛ оказывал выраженное или умеренное бактериостатическое действие в отношении ряда штаммов. Суспензии лактобацилл с плотностью 2 позволяли более отчетливо выявлять эффект супрессии роста по сравнению с суспензиями с плотностью 1.

По результатам таблиц 1 и 2 все штаммы были разделены на функциональные группы (табл. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В работе установлены взаимоотношения между лектинами, продуцируемыми пробиотическими бактериями (их консорциумами, как в случае пробиотика «Ацилакт») и варьирующими популяциями потенциально полезной микрофлоры (на примере лактобацилл). С 2004 года нами было впервые показано, что лектиновые системы потенциального пробиотического компартмента биотопов (на примере лактобацилл и бифидобактерий) реализуют спектр полезных для человека активностей и тем самым участвуют в сигнальных коммуникациях в направлениях «Микроб – Микроб» и «Микроб – Хозяин» [4, 8, 13]. Другими авторами подтверждено наличие у лактобацилл наборов (муцин слизистой

Таблица 3
Группирование популяций лактобацилл нормофлоры урогенитального биотопа лектинами пробиотических лактобацилл человека

Группы	Штаммы	Отношение к лектинам	Предполагаемые функции популяций в биотопе
I	215, 664, 288	Резистентные	Пробиотик-подобные популяции, устойчивые к сигналам экзопробиотиков
II, III	2, 9, 14, 15, 21, 30, 51, 53, 54, 239, 296, 683, 856	Чувствительные	Модулируемый/управляемый пробиотическим компартментом пул популяций
III	14, 15, 51, 54, 296,	Резистентные в одних и слабо супрессируемые в других условиях	Близкие к пробиотик-подобным популяции с обратимыми изменениями
III/I	9, 683	Резистентные в одних и слабо индуцируемые в других условиях	Близкие к пробиотик-подобным популяции с обратимыми изменениями
II/III	30, 856	Выраженно модулируемые	Сенсорные/сигнальные, образующие инфосеть
II	2, 21, 53	Супрессируемые выражено и умеренно	Мишени элиминации пробиотиками: ослабленные, неконкурентные, слабо измененные в сторону патологии
III	239	Индуктируемый	Активный участник чувства кворума, вовлекаемый в регуляцию плотности популяции

кишечника)-связывающих белков с малоисследованными свойствами [7, 10]. Участие белковых компонентов пробиотических бактерий в сети коммуникаций типа чувства кворума [quorum sensing] и перекрестного разговора [cross-talking] в обоих направлениях в настоящее время находит новые подтверждения [5, 6, 10, 12, 14]. Анализ секрета лактобацилл выявил набор типов лектиновых и сходных с лектинами ключевых метаболитных белков, в том числе «сброшенных» с клеточной поверхности [5, 7, 10]. Можно ожидать, экспонирование на поверхности лактобацилл, сходных с препаратом ЛЛ муцинсвязывающих белков (характерно для пробиотических хорошо адгезирующих лактобацилл), не будет приводить к существенным взаимодействиям таких популяций с ЛЛ (возможен скрининг кандидатных пробиотических штаммов). Экспонирование гидрофобных липотейхоевых кислот, наоборот, усилит взаимодействие таких популяций лактобацилл с ЛЛ, что может привести к модуляции дальнейшего роста биомассы. В то же время присутствие на поверхности гидрофильных экзополисахаридов может обеспечить другую направленность сорбции ЛЛ и тем самым вызвать другого рода метаболические активности таких популяций. Вместе можно говорить о влиянии ЛЛ на синергидное кофункционирование потенциального консорциума лактобацилл биотопа. В этом смысле систему «Популяции лактобацилл — эндогенные ЛЛ» можно рассматривать как саморегулирующуюся, обеспечивающую здоровый статус биотопа. Учитывая штаммовый состав Ацилакта [2], можно предположить участие ЛЛ в регуляции межвидовых и внутривидовых взаимоотношений лактобацилл в биотопе.

Результаты нашей работы указывают на то, что лектины пробиотической нормофлоры вовлекаются в процессы чувства кворума лактобацилл в условиях совместной инкубации. Результаты свидетельствуют о наличии ауторегуляторных дифференцированно модулирующих рост популяций лактобацилл активностей лектинов пробиотиков. Полученные данные подтверждаются и другими исследователями, показавшими, что изменение локальной концентрации (плотности суспензии) популяций лактобацилл в условиях выживания и стресса регулирует метаболическую сеть и обратимый морфогенез лактобацилл [1].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В целом, полученные результаты расширяют представления о ключевых функциях лектинов пробиотических микроорганизмов в организме человека. Пробиотические лектины, по-видимому, не только осуществляют надзор против экспрессии негативных свойств условно-патогенной микрофлоры (потенциально патогенного компартмента биотопа) и поддерживают защитные системы хозяина, но и участвуют в сигнальном мониторинге поддержки здорового статуса биотопа. Полученные данные указывают на новые перспективные области применения лектинов пробиотиков в

индустриальной (скрининг и отбор про- и синбиотических консорциумов) и медицинской (использование лектинов как вспомогательных ингредиентов лекарств) биотехнологии и микробиологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Адаптация молочнокислых бактерий к неблагоприятным для роста условиям / Н.А. Голод [и др.] // Микробиология. — 2011. — Т. 78. — С. 317–335.
2. Ботина С.Г. Молекулярно-биологические подходы к отбору бактериальных культур при создании заквасок для биотехнологии : автореферат дис. ... д.б.н. — М., 2011. — 46 с.
3. Лектин-гликоконъюгатные системы в организме человека / М.В. Лахтин [и др.] // Иммунопатология, аллергология, инфектология. — 2012. — № 1. — С. 27–36.
4. Роль лектинов пробиотических микроорганизмов в жизнеобеспечении макроорганизма / М.В. Лахтин [и др.] // Вестник РАМН. — 2010. — № 2. — С. 3–8.
5. Шендеров Б.А. Молекулярный язык пробиотических микроорганизмов // Пищевые ингредиенты. Сырье и добавки. — 2009. — № 1. — С. 47–48.
6. Alcantara C., Revilla-Guarinos A., Zuniga M. Influence of two-component signal transduction systems of *Lactobacillus casei* BL23 on tolerance to stress conditions // Appl. Environ. Microbiol. — 2011. — Vol. 77. — P. 1516–1519.
7. LAB-Secretome: a genome-scale comparative analysis of the predicted extracellular and surface-associated proteins of lactic acid bacteria / M. Zhou [et al.] // BMC Genomics. — 2010. — Vol. 11. — P. 651; www.biomedcentral.com/1471-2164/11/651
8. Lactobacillus and bifidobacterial lectins as possible signal molecules regulating intra- and interpopulation bacteria-bacteria and host-bacteria relationships. Part I. Methods of bacterial lectin isolation, physicochemical characterization and some biological activity investigation / V.M. Lakhtin [et al.] // Microb. Ecol. Health. Dis. — 2006. — Vol. 18, N 1. — P. 55–60.
9. Lakhtin V., Lakhtin M., Aleshkin V. Lectins of living organisms. The overview // Anaerobe. — 2011. — Vol. 17, N 6. — P. 452–455. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2011.06.004.
10. Lebeer S., Van Der Leyden J., De Keersmaecker S.C.J. Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action // Microbiol. Mol. Biol. Rev. — 2008. — Vol. 72. — P. 728–764.
11. Lectins of beneficial microbes: system organization, functioning and functional superfamily / M. Lakhtin [et al.] // Beneficial Microbes. — 2011. — Vol. 2, N 2. — P. 155–165. DOI: 10.3920/BM2010.0014.
12. Microbiota/host crosstalk biomarkers: regulatory response of human intestinal dendritic cells exposed to *Lactobacillus* extracellular encrypted peptide / D. Bernardo [et al.] // PLoS ONE. — 2012. — Vol. 7 (5): e36262. DOI:10.1371/journal.pone.0036262
13. Probiotic lactobacillus and bifidobacterial lectins against *Candida albicans* and *Staphylococcus*

aureus clinical strains: new class of pathogen biofilm destructors / M. Lakhtin [et al.] // Probiotics & Antimicrobial Proteins. — 2010. — Vol. 2, N 3. — P. 186 — 196. DOI: 10.1007/s12602-010-9046-3.

14. QS-системы у бактерий и перспективы создания новых метаболитных пробиотических препаратов / Л.Н. Петров [и др.] // Вестник РАМН. — 2006. — № 1. — С. 38 — 45.

Сведения об авторах

Лактин Михаил Владимирович – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора (Россия, 125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10, тел. (495) 708-02-62, e-mail: info@gabrich.com)

Байракова Александра Львовна – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора (Россия, 125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10, тел. (495) 708-02-62, e-mail: info@gabrich.com)

Лактин Владимир Михайлович – доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора (Россия, 125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10, тел. (495) 708-02-62, e-mail: info@gabrich.com)

Алешкин Андрей Владимирович – доктор медицинских наук, заведующий лабораторией клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора (Россия, 125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10, тел. (495) 708-02-62, e-mail: info@gabrich.com)

Афанасьев Станислав Степанович – заслуженный деятель науки РФ, профессор, доктор медицинских наук, заместитель директора ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора (Россия, 125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10, тел. (495) 708-02-62, e-mail: info@gabrich.com)

Алешкин Владимир Андрианович – заслуженный деятель науки РФ, профессор, доктор биологических наук, директор ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора (Россия, 125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10, тел. (495) 708-02-62, e-mail: info@gabrich.com)