

7. Dominguez-Bello M.G., Costello E.K., Contreras M. et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010 Jun 29;107(26):11971-11975.
8. Falsen E., Pascual C., Sjoden B. et al. Phenotypic and phylogenetic characterization of a novel *Lactobacillus* species from human sources: description of *Lactobacillus iners* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1999, 49:217-221.
9. Haggerty C.L., Hillier S.L., Bass D.C. et al. PID Evaluation and Clinical Health study investigators. Bacterial vaginosis and anaerobic bacteria are associated with endometritis. *Clin. Infect. Dis.* 2004 Oct 1;39(7):990-995.
10. Lauer E., Helming C., Kandler O. Heterogeneity of the species *Lactobacillus acidophilus* (Moro) Hansen and Møcquot as revealed by biochemical characteristics and DNA-DNA hybridization. *Zentbl. Bakteriol. Microbiol. Hyg. Abt.* 1980, 1:150-168.
11. Martin H.L., Richardson B.A., Nyange P.M. et al. Vaginal lactobacilli, microbial flora, and risk of human immunodeficiency virus type 1 and sexually transmitted disease acquisition. *J. Infect. Dis.* 1999, 180(6):1863-1868.
12. Ness R.B., Kip K.E., Hillier S.L. et al. A cluster analysis of bacterial vaginosis-associated microflora and pelvic inflammatory disease. *Am. J. Epidemiol.* 2005 Sep 15;162(6):585-590.
13. Rathod S.D., Krupp K., Klausner J.D. et al. Bacterial vaginosis and risk for *Trichomonas vaginalis* infection: a longitudinal analysis. *Sex. Transm. Dis.* 2011 Sep;38(9):882-886.
14. Tamrakar R., Yamada T., Furuta I., et al. Association between *Lactobacillus* species and bacterial vaginosis-related bacteria, and bacterial vaginosis scores in pregnant Japanese women. *BMC Infect. Dis.* 2007 Nov 7;7:128.
15. Verstraelen H., Verhelst R., Claeys G. et al. Longitudinal analysis of the vaginal microflora in pregnancy suggests that *L. crispatus* promotes the stability of the normal vaginal microflora and that *L. gasseri* and/or *L. iners* are more conducive to the occurrence of abnormal vaginal microflora. *BMC Microbiol.* 2009 Jun 2;9:116.

© А.В.СГИБНЕВ, Е.А.КРЕМЛЕВА, 2018

А.В.Сгибнев¹, Е.А.Кремлева^{1,2}

МОДИФИКАЦИЯ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ И АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ЛИЗОЦИМА МЕТАБОЛИТАМИ ВАГИНАЛЬНЫХ ЛАКТОБАЦИЛЛ

¹Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза, Оренбург; ²Оренбургский государственный медицинский университет

Цель. Оценка влияния метаболитов вагинальных лактобацилл на ферментативную и бактерицидную активность лизоцима. *Материалы и методы.* Изучали изменение ферментативной и бактерицидной активности лизоцима после его обработки бесклеточными супернатантами лактобацилл, содержащих сурфактанты, пероксид водорода или их комбинацию. Ферментативную активность оценивали по скорости лизиса *Micrococcus luteus*, бактерицидность для тест-штаммов *Escherichia coli* и *Lactobacillus acidophilus* — по результатам посева. *Результаты.* Ферментативную активность лизоцима снижали как сурфактанты, так и H₂O₂. Под влиянием сурфактантов бактерицидная активность лизоцима снижалась и в отношении *L. acidophilus*, и *E. coli*. Под влиянием пероксида водорода и его сочетаний с сурфактантами бактерицидная активность лизоцима в отношении *L. acidophilus* снижалась, а в отношении *E. coli* повышалась. Низкие концентрации сурфактантов потенцировали влияние H₂O₂ на антибактериальную активность лизоцима. *Заключение.* Делается вывод о том, что метаболиты нормальной микрофлоры являются инструментом модификации факторов защиты хозяина с целью создания благоприятных условий собственного существования и препятствия интродукции чужеродных видов.

Журн. микробиол., 2018, № 4, С. 21—27

Ключевые слова: лактобациллы, лизоцим, пероксид водорода, сурфактанты, факторы врожденного иммунитета

VAGINAL LACTOBACILLI REGULATE THE ACTIVITY OF MURAMIDASE VIA HYDROGEN PEROXIDE AND SURFACTANTS

¹Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg; ²Orenburg State Medical University, Russia

Aim. Evaluation of the effect of metabolites of vaginal lactobacilli on the enzymatic and bactericidal activity of muramidase. *Materials and methods.* We investigated how the enzymatic and bactericidal activity of muramidase changes after treatment with supernatants of lactobacilli containing surfactants, hydrogen peroxide, or a combination thereof. The enzymatic activity was measured by the rate of *Micrococcus luteus* lysis, bactericidal activity for test strains of *Escherichia coli* and *Lactobacillus acidophilus* by results of seeding on agar plates. *Results.* The hydrogen peroxide and surfactants reduced the enzymatic activity of lysozyme. Bactericidal activity of lysozyme against *L. acidophilus* and *E. coli* was decreased under the influence of surfactants. Hydrogen peroxide and its combinations with surfactants decreased bactericidal activity of lysozyme against *L. acidophilus* and increased for *E. coli*. Low concentrations of surfactants potentiated the effect of H₂O₂ on the antibacterial activity of lysozyme. *Conclusion.* It is concluded that the metabolites of the normal microflora is a implement for modification of host defense factors in order to create favorable conditions for its own existence, and prevent introduction of allochthonous species.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 4, P. 21—27

Key words: lactobacilli, lysozyme, hydrogen peroxide, surfactants, innate immunity factors

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что препятствие интродукции чужеродных видов в женском репродуктивном тракте обеспечивается действиями как со стороны организма хозяина, так и его нормальной микрофлоры [12, 14]. Несмотря на то, что многообразные механизмы реализации этого феномена длительное время являются объектом пристального внимания исследователей [12, 14], парадоксальным остается тот факт, что факторы защиты, в концентрациях, не оказывающих заметного антимикробного эффекта *in vitro*, в условиях *in vivo* подавляют патогенов, не угнетая нормофлору [15]. В какой-то мере, это объясняется способностью нормофлоры, в частности вагинальных лактобацилл, повышать активность антимикробных пептидов хозяина за счет продукции пероксида водорода [10]. Однако, помимо пероксида водорода, продукция которого присуща не всем лактобациллам, эти представители вагинальной нормофлоры синтезируют массу других метаболитов [5], также потенциально способных модифицировать активность факторов естественной резистентности хозяина [3, 7]. В число таких метаболитов входят сурфактанты, для которых показана способность изменять конформацию и активность белков [6]. В связи с этим, мы сочли актуальным изучить влияние различных метаболитов вагинальных лактобацилл на активность антимикробных пептидов хозяина, так как, с одной стороны, это может расширить представления о механизмах колонизационной резистентности женского репродуктивного тракта, с другой стороны, иметь прикладное значение.

Это определило цель нашего исследования: оценка влияния сурфактантов, пероксида водорода, а также их комбинаций, продуцируемых лактобациллами, на ферментативную и антибактериальную активность лизоцима в отношении представителей нормальной (*L. acidophilus*) и условно патогенной (*E. coli*) микрофлоры влагалища.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали *Micrococcus luteus* NCTC 2665, *Escherichia coli* ГИСК №240367, *Lactobacillus acidophilus* ИКВС №37 и 20 изолятов лактобацилл из репродуктивного тракта здоровых женщин, идентифицированных с использованием коммерческих наборов API50CH test kit (bioMerieux, La Balme les Grottes, France), согласно рекомендациям производителя.

Для получения бесклеточных супернатантов лактобациллы выращивали 72 часа в 500 мл колбах с 200 мл среды MRS (HiMedia) при 37°C и перемешивании (100 об/мин) в атмосфере с 5% CO₂. Бактерии осаждали центрифугированием (10 000 g, 10 мин), двукратно отмывали в 100 мл ФСБ (10 mM K₂HPO₄/K₂HPO₄ и 150 mM NaCl, pH = 7,0, 10 000 g, 10 мин) и готовили взвесь (~10⁷ КОЕ/мл) в стерильной среде (0,8 mM MgSO₄, 0,3 mM MnSO₄, 11,5 mM K₂HPO₄ и 11,5 mM глюкозы, pH=7,0). Взвесь инкубировали 4 часа в аэробных условиях (37 °С, 100 об/мин), бактерии удаляли центрифугированием (10 000 g, 10 мин), полученные супернатанты стерилизовали фильтрованием (0,22 μm, Millipore).

Производство сурфактантов оценивали по наличию эмульгирующей активности (ЭА) супернатантов по описанной ранее методике [13]. Эмульгирующую активность оценивали количественно через 6 часов по формуле: ЭА=(Нэ/Но)×100, где ЭА — эмульгирующая активность, у.е., Нэ — высота эмульсии, мм, Но — общая высота эмульгированного и неэмульгированного толуола, мм.

Определение содержания H₂O₂ в метаболитах лактобацилл проводили по описанному методу [10] с изменениями: для этого в лунки 96-луночного планшета вносили по 50 мкл супернатантов и раствора, содержащего 5мМ тетраметилбензидина (Sigma-Aldrich) и 0,5 U/мл пероксидазы хрена (Sigma-Aldrich) в цитратнофосфатном буфере (pH=4,5). Калибровочные пробы готовили на основе вышеописанной среды. Реакцию останавливали через 5 минут инкубации при 25°C добавлением 50 мкл 5% раствора H₂SO₄ и измеряли оптическую плотность (λ=450 нм).

Для оценки влияния метаболитов лактобацилл на ферментативную и бактерицидную активности яичного лизоцима (M=14,7 кДа, Sigma-Aldrich) супернатанты смешивали с равным объемом раствора лизоцима (200 мкг/мл в 0,1 М ФСБ (pH=6,2)), в контроле использовали метаболиты лактобацилл, предварительно обработанные каталазой (8 U/мл, Sigma-Aldrich), смесью хлороформ:метанол (2:1 об/об), протеазой К (20 мг/мл) и трипсином (20 мг/мл) для удаления из них H₂O₂, сурфактантов или бактериоцинов соответственно. Для исключения влияния молочной и других кислот на лизоцим кислотность всех супернатантов доводили 6 N NaOH до pH=6,2.

Ферментативную активность лизоцима определяли по скорости лизиса *M. luteus* [1]. Активность лизоцима выражали в у.е./мг белка в минуту. За единицу активности фермента принимали уменьшение на 0,01у.е. оптической плотности взвеси *M. luteus*. Концентрацию белка в препаратах лизоцима определяли по Лоури [11].

Для определения минимальной бактерицидной концентрации (МБК) нативного или модифицированного метаболитами лактобацилл лизоцима к взвеси *L. acidophilus* и *E.coli* (~10⁵ КОЕ/мл в 0,1 М ФСБ, pH=6,2) добавляли равный объем раствора лизоцима в различных концентрациях, инкубировали в течении часа при 37°C и высевали *E.coli* на агаризованную среду Эндо, *L. acidophilus* — на MRS. Результаты посева учитывали через сутки культивирования при 37°C в микроаэрофильных условиях. Значения МБК выражали в мкг/мл.

Экспериментальные данные представлены в виде средних арифметических трех независимых серий экспериментов (М) и стандартных ошибок средних (m). Для оценки достоверности различий между группами использовался критерии Манна-Уитни и согласия Пирсона (χ^2). Исследование взаимосвязи между признаками осуществляли при помощи коэффициента корреляции Спирмена (r) [2]. Во всех процедурах статистического анализа уровень значимости p принимался равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Обработка лизоцима метаболитами H_2O_2 -продуцирующих лактобацилл приводила к существенному подавлению его ферментативной активности (рис. 1). Степень этого подавления находилась в прямой зависимости от концентрации H_2O_2 ($r=0,83$, $p<0,05$). Одновременно с этим мы наблюдали снижение бактерицидной активности лизоцима в отношении *L. acidophilus* и повышение в отношении *E. coli* (рис. 1). Степень изменения бактерицидной активности лизоцима зависела от концентрации H_2O_2 в супернатантах лактобацилл ($r=0,98$, $p<0,001$ для *E. coli* и $r=-0,93$, $p<0,001$ для *L. acidophilus*). Удаление H_2O_2 из супернатантов лактобацилл отменяло эффект модификации ферментативной и бактерицидной активностей лизоцима.

Обработка лизоцима метаболитами лактобацилл, продуцирующих сурфактанты, приводила к достоверному подавлению его ферментативной активности (рис. 2). Степень этого подавления находилась в прямой зависимости от выраженности ЭА супернатантов ($r=0,87$, $p<0,05$). Бактерицидная активность лизоцима при этом уменьшалась как в отношении *L. acidophilus*, так и в отношении *E. coli* (рис. 2). Изменение бактерицидности лизоцима также зависело от ЭА супернатантов ($r=-0,73$, $p<0,05$ для *E. coli* и $r=-0,92$, $p<0,001$ для *L. acidophilus*). Удаление из культуральной жидкости сурфактантов отменяло описанные эффекты. Но если в отношении *L. acidophilus* заметное снижение бактерицидной активности вызывали супернатанты с ЭА

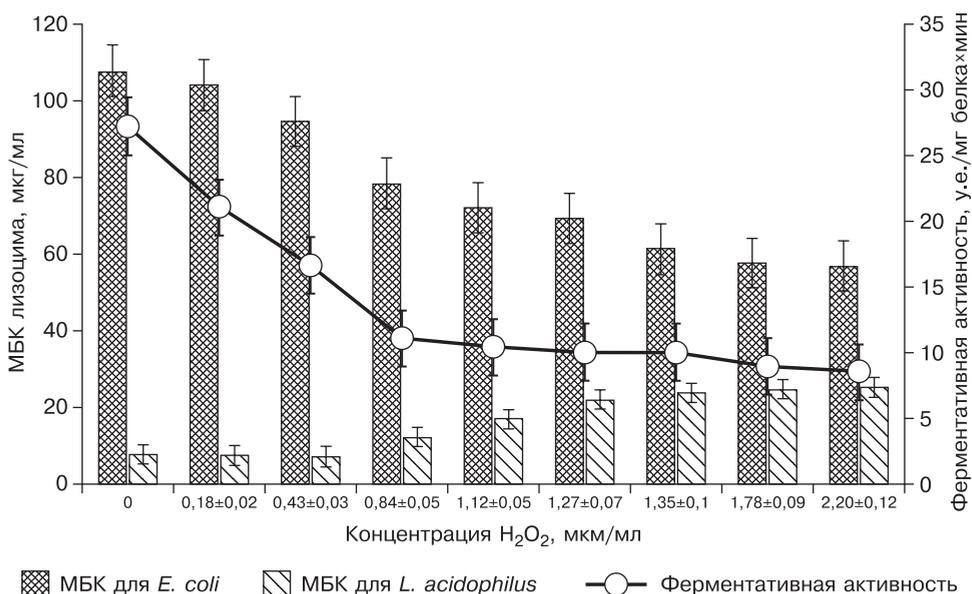


Рис. 1. Изменения ферментативной и бактерицидной активности лизоцима под влиянием метаболитов лактобацилл, продуцирующих перексид водорода.

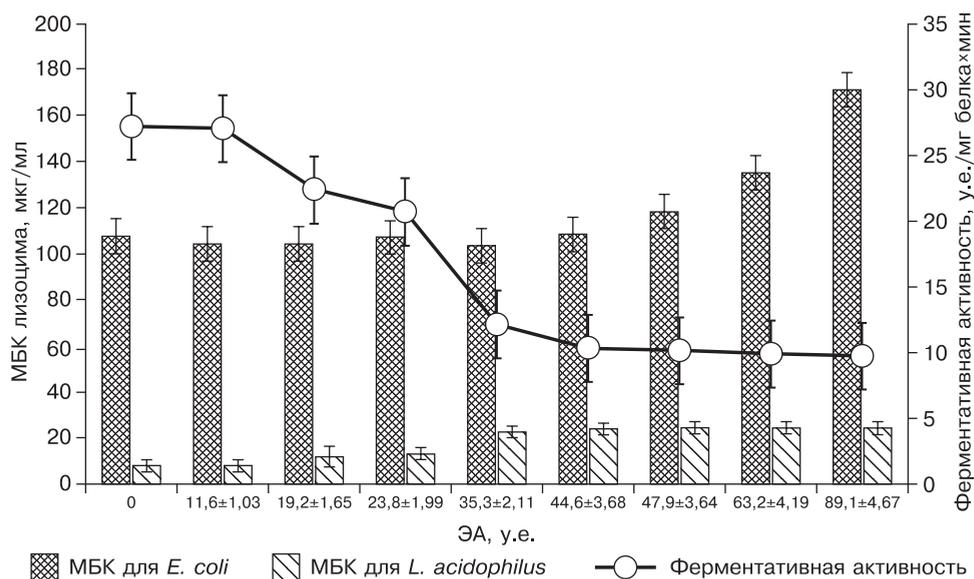


Рис. 2. Изменения ферментативной и бактерицидной активности лизоцима под влиянием метаболитов лактобацилл, продуцирующих сурфактанты.

23,8 у.е. и выше, то в отношении *E. coli* для получения аналогичного эффекта требовался вдвое больший уровень сурфактантов.

Таким образом, результаты влияния сурфактантов и H_2O_2 на ферментативную активность лизоцима были сходны, в то время как антибактериальная активность лизоцима под влиянием этих веществ менялась по-разному.

В связи с этим, нас заинтересовала оценка совместного влияния сурфактантов и H_2O_2 на активность лизоцима (табл.). В отношении *L. acidophilus* подавление бактерицидности лизоцима наблюдалось под влиянием всех изучаемых комбинаций этих веществ. С учетом выше изложенных данных, эти результаты были вполне ожидаемы, так как и по отдельности эти вещества действовали однонаправленно. Интересно, что сочетание низких концентраций пероксида водорода и сурфактантов ($0,55 \pm 0,04$ мМ H_2O_2 и $21,6 \pm 1,8$ у.е. ЭА) снижало бактерицидность лизоцима в той же степени, что и комбинации с их высоким содержанием, а удаление любого из компонентов отменяло этот эффект, что свидетельствует о взаимном потенцировании эффектов этих метаболитов. Несмотря на то, что по отдельности H_2O_2 и сурфактанты

Изменения ферментативной и бактерицидной активности лизоцима под влиянием метаболитов лактобацилл, продуцирующих сурфактанты и пероксид водорода.

Характеристика супернатантов		МБК лизоцима для <i>E. coli</i> , мкг/мл под влиянием:			МБК лизоцима для <i>L. acidophilus</i> , мкг/мл под влиянием:		
Концентрация H_2O_2 , мМ	ЭА, у.е.	нативных супернатантов	супернатантов, после исключения H_2O_2	супернатантов, после исключения сурфактантов	нативных супернатантов	супернатантов, после исключения H_2O_2	супернатантов, после исключения сурфактантов
0	0	107.6±16.5	107.6±16.5	107.6±16.5	7.8±0.978	7.8±0.978	7.8±0.978
0.55±0.04	21.6±1.8	68.7±14.8*	104±11.3	88±4.6*	22.1±1.3*	8.3±0.9	8.5±1.1
1.95±0.05	23.2±2.1	47.3±5.3*	107±9.8	52±3.3*	26.3±1.6*	8.1±1.1	28.3±1.8*
0.42±0.06	76±5.9	98.3±18.7	129±14.6*	97±4.9	23.3±1.9*	22.6±1.6*	8.1±1.3
1.8±0.11	73±6.1	59.3±5.5*	141±10.3*	60±4.3*	31.2±2.1*	20.9±2.1*	24.6±2.0*

Примечание. * Статистически значимые различия с контролем при $p \leq 0.05$.

разнонаправленно влияли на бактерицидность лизоцима в отношении *E. coli*, под влиянием комбинаций этих веществ бактерицидность лизоцима возрастала (табл.). При этом результаты в контроле, с исключением одного из компонентов, соответствовали ранее выявленным закономерностям. Низкие концентрации сурфактантов даже потенцировали влияние пероксида водорода на бактерицидность лизоцима в отношении *E. coli*, а действие высоких концентраций сурфактантов присутствием H_2O_2 компенсировалось.

ОБСУЖДЕНИЕ

По-видимому, вагинальные лактобациллы имеют в своем арсенале несколько разных механизмов модификации лизоцима, направленных на создание благоприятных условий собственного существования.

Одним из таких механизмов является продукция пероксида водорода. Причиной изменений активности лизоцима под влиянием метаболитов H_2O_2 -продуцирующих лактобацилл, скорее всего, является окислительное повреждение, приводящее к изменению конформации молекулы лизоцима [4]. Это, с одной стороны, влечет за собой снижение его ферментативной активности и, как следствие, уменьшение бактерицидности в отношении грамположительных *L. acidophilus*. С другой стороны, это же приводит к повышению гидрофобности молекулы лизоцима, облегчению его взаимодействия с клеточной стенкой [9] и соответственно усилению бактерицидности в отношении грамотрицательных бактерий. Таким образом, продукция лактобациллами пероксида водорода обеспечивает их выживаемость в условиях давления факторов врожденного иммунитета и, повышая колонизационную резистентность биотопа для аллохтонных микроорганизмов, создает для них же конкурентное преимущество.

Следующим из таких механизмов является продукция сурфактантов. По-видимому, снижение бактерицидность лизоцима в отношении лактобацилл под влиянием сурфактантов также, как и в случае с пероксидом водорода, опосредовано ингибированием ферментативной активности лизоцима за счет изменения его конформации. Данное предположение согласуется с известным фактом снижения активности лизоцима под влиянием ПАВ [6].

Наиболее удачным в экологическом плане является способность вагинальных лактобацилл к одновременной продукции и сурфактантов, и пероксида водорода, хотя бы в малом количестве, так как при этом наблюдается усиление антибактериальной активности в отношении грамотрицательных микроорганизмов и ослабление в отношении лактобацилл. Пока не ясно, связан ли наблюдаемый эффект с тем, что лизоцим, модифицируемый пероксидом водорода, по-иному, чем нативный, взаимодействует с сурфактантами или это является следствием модификации самих сурфактантов.

Основываясь на результатах нашего исследования можно заключить, что модификация лизоцима сурфактантами и пероксидом водорода является примером способности нормофлоры разнонаправленно регулировать активность факторов защиты хозяина с целью создания благоприятных условий собственного существования и препятствия интродукции чужеродных видов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бухарин О.В. Персистенция патогенных бактерий. М., 1999.
2. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М., Практика, 1998.
3. Aldunate M., Srbnovski D., Hearps A.C. et al. Antimicrobial and immune modulatory effects of lactic acid and short chain fatty acids produced by vaginal microbiota associated with eubiosis and bacterial vaginosis. *Frontiers in Physiology*. 2015, 6: A164.

4. Chao C.C., Ma Y.S., Stadtman E.R. Modification of protein surface hydrophobicity and methionine oxidation by oxidative systems. Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1997, 94: 2969-2974.
5. Dover S.E., Aroutcheva A.A., Faro S., Chikindas M.L. Natural antimicrobials and their role in vaginal health: a short review. International J. Probiotics & Prebiotics. 2008, 3 (4): 219-230.
6. Ivanov R.A., Soboleva O.A., Smirnov S.A. et al. Effect of surfactants of different types on the bacteriolytic activity of lysozyme. Rus. J. Bioorg. Chem. 2015, 41 (3): 260-265.
7. Kaewsrichan J., Peeyananjarassri K., Kongprasertkit J. Selection and identification of anaerobic lactobacilli producing inhibitory compounds against vaginal pathogens. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2006, 48 (1): 75-83.
8. Nakata K., Tsuchido T., Matsumura Y. Antimicrobial cationic surfactant, cetyltrimethylammonium bromide, induces superoxide stress in Escherichia coli cells. J. Applied Microbiology. 2011, 110 (2): 568-579.
9. Nash J.A., Ballard T.N., Weaver T.E., Akinbi H.T. The peptidoglycan-degrading property of lysozyme is not required for bactericidal activity in vivo. J. Immunol. 2006, 177 (1): 519-526.
10. Sgibnev A.V., Kremleva E.A. Vaginal protection by H₂O₂-producing lactobacilli. Jundishapur J. Microbiology. 2015, 8 (10): A e22913.
11. Simonian M. H., Smith J. A. Spectrophotometric and colorimetric determination of protein concentration. Curr. Protoc. Mol. Biol. 2006, 76. 10.1A:10.1.1-10.1A.9.
12. Valore E.V., Park C.H., Igrati S.L., Ganz T. Antimicrobial components of vaginal fluid. Am. J. Obstet. Gynecol. 2002, 187 (3): 561-568.
13. Willumsen P.A., Karlson U. Screening of bacteria, isolated from PAH-contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers. Biodegradation. 1997, 7 (5): 415-423.
14. Wilson M. Microbial Inhabitants of Humans: Their Ecology and Role in Health and Disease. Cambridge University Press. 2005.
15. Yarbrough V.L., Winkle S., Herbst-Kralovetz M.M. Antimicrobial peptides in the female reproductive tract: A critical component of the mucosal immune barrier with physiological and clinical implications. Human Reproduction Update. 2015, 21 (3): 353-377.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

А.В.Шевченко, О.А.Медведева, А.Ю.Мухина, В.А.Королев, П.В.Калуцкий

СОСТАВ НОРМОБИОЦЕНОЗА ТОЛСТОГО КИШЕЧНИКА И ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНЫЙ БАЛАНС ПЛАЗМЫ КРОВИ, КОЛОНОЦИТОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ДИСБИОЗЕ И ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПРОБИОТИКА РИОФЛОРА ИММУНО НЕО

Курский государственный медицинский университет

Цель. Изучение изменений состава микробиоценоза толстого кишечника животных и молекулярно-биохимических показателей плазмы крови и колоноцитов в условиях экспериментального лекарственного дисбиоза, возможности их коррекции с использованием пробиотика. *Материалы и методы.* Животным формировали лекарственный дисбиоз внутрибрюшинным введением гентамицина, после с целью коррекции вводили пробиотик. Количественное и качественное исследование мукозной микрофлоры толстой кишки мышей проводили бактериологическим методом. О состоянии системы перекисного окисления липидов судили по содержанию ацилгидроперекисей и малонового диальдегида, системы антиоксидантной защиты — по активности ферментов (каталаза и супероксиддисмутазы). *Результаты.* В результате проведенного исследования зарегистрировано изменение состава кишечной микрофлоры, снижение ферментативной активности системы антиоксидантной защиты в плазме крови и колоноцитах, увеличение содержания продуктов перекисного окисления липидов в плазме крови и колоноцитах. Отмечен корригирующий эффект пробиотика РиоФлора Иммуно Нео в отношении восстановления нормобиоценоза кишечника и молекулярно-биохимических показателей колоноцитов животных. *Заключение.* Использование пробиотика привело к восстановлению микробного равновесия в микробиоценозе кишечника, а также оказало