

СРАВНЕНИЕ АУТОПРОБИОТИЧЕСКИХ КОМПЛЕКСОВ ЛАКТОБАКТЕРИЙ У ГЕНЕТИЧЕСКИ БЛИЗКИХ РОДСТВЕННИКОВ

М. А. Кириленко*,
О. Ю. Кузнецов, доктор биологических наук,
К. М. Литов, кандидат химических наук

ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия» Минздрава России, 153012, Россия, г. Иваново, Шереметевский просп., д. 8

Актуальность. Для коррекции дисбиоза кишечника, кроме традиционных пробиотических препаратов, могут быть использованы аутопробиотические комплексы, полученные от родственников пациента, что требует подробного изучения.

Цель исследования – сравнить комплексы лактобактерий аутопробиотических штаммов генетически близких родственников.

Материал и методы. Выделены аутопробиотические комплексы живых лактобактерий от генетически близких родственников (32 человека). Проведен анализ спектров молекулярной массы фрагментов макромолекул аутопробиотических комплексов с использованием метода времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (time-of-flight mass spectrometry with matrix activated laser desorption/ionization, MALDI ToF).

Результаты и выводы. Совпадение спектров молекулярной массы фрагментов молекул аутопробиотических комплексов, выделенных от генетически близких родственников, наблюдалось у детей в 49,9% случаев, у взрослых – в 30,5%. Сравнительная оценка спектров позволяет исследовать аутопробиотические комплексы без предварительного выделения отдельных штаммов и их видовой идентификации. Метод MALDI ToF показал возможность быстрого и надежного определения степени чистоты комплекса и контроля получаемых индивидуальных аутопробиотических комплексов лактобактерий.

Ключевые слова: аутопробиотический комплекс, лактобактерии, пробиотик, микробиоценоз кишечника.

* Ответственный за переписку (corresponding author): e-mail: smarina23@mail.ru

Микробиоценоз кишечника каждого человека представляет собой чрезвычайно сложную и почти уникальную по составу систему. Для устранения нарушений микробиоценоза и их профилактики в настоящее время широко используются различные пробиотические препараты, в состав которых входят живые лактобактерии и бифидобактерии [3]. Однако несмотря на опубликованные сообщения о положительном эффекте применения этих пробиотических штаммов, результат такой терапии в каждом конкретном случае непредсказуем. Возможно, неудачи применения пробиотических препаратов объясняются низкой биосовместимостью штаммов лактобактерий, входящих в их состав, и штаммов, составляющих микробиоценоз конкретного пациента. Кроме того, следует учитывать тот факт, что пробиотические штаммы, не обладающие достаточно высоким иммунным сродством рецепторов к слизистым оболочкам кишечного тракта, с течением времени будут неизбежно элиминированы из организма человека. Следовательно, необходим индивидуальный подбор пробиотических штаммов для поддержания нормальной микрофлоры кишечника, что довольно трудно быстро осуществить.

В настоящее время уже не подвергается сомнению эффективность использования аутопробиотических штаммов лактобактерий для коррекции нарушений микробиоценоза кишечника [3, 5]. Однако неясно, можно ли использовать с этой целью штаммы, полученные от близких родственников. Неизвестно, насколько комплексы лактобактерий, выделенные у близких родственников, сходны по видовому составу. Главным образом это определяется сложностью и трудоемкостью выделения и идентификации отдельных штаммов традиционными бактериологическими методами. Однако в последние годы появились новые методы выделения аутопробиотических штаммов [2, 4].

Цель исследования – сравнить комплексы аутопробиотических штаммов лактобактерий у генетически близких родственников в разных возрастных группах с применением метода времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (time-of-flight mass spectrometry with matrix activated laser desorption/ionization, MALDI ToF).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование проведено на кафедре микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия» Минздрава России. В исследовании участвовали 2 группы генетически близких родственников (братья, сестры). В 1-ю группу вошли 5 детей в возрасте от 1 до 5 лет, получавших грудное молоко в течение 1-го года жизни, во 2-ю – 18 лиц в возрасте 25–30 лет.

Для выделения аутопробиотического комплекса живых лактобактерий брали у одного и того же индивидуума образец фекалий и слюну. Далее выполняли десятикратную разлитровку изучаемого образца жидкой питательной средой (MRS) с привнесением селективных агентов (слюны). Готовили 2 ряда разведений с соблюдением правил асептики. Первый ряд состоял из пробирок до разведения 10^9 , он был предназначен для оценки общего количественного состава лактобактерий в исходном биоматериале; второй ряд – из пробирок с материалом до разведения 10^6 , он был необходим для выделения лактобактерий. В пробирку второго ряда с биоматериалом в разведении 10^6 вносили стерильный раствор слюны того же человека. После инкубирования при 38°C в течение 48 часов определяли количество лактобактерий, а также наличие патогенных бактерий, делая контрольные высевы [2].

После получения аутопробиотического комплекса лактобактерий в питательной среде MRS использовали метод MALDI ToF для сравнительной оценки молекулярной массы фрагментов макромолекул (M_{DM}) [1]. Результаты получали на масс-спектрометре Shimadzu фирмы Biotech Axima в режиме положительных ионов с использованием в качестве матрицы СНСА (α -циано-4-гидроксикоричной кислоты). Анализ спектров осуществлялся с использованием программного обеспечения MALDI Biotyper 3.0. Учитывали значения, рейтинг которых составлял $\geq 1,7$.

Статистическую обработку данных осуществляли с применением пакета Statistica 13. Для анализа использовали значение t-критерия Стьюдента. Во всех случаях различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В исследовании были получены комплексы аутопробиотических штаммов лактобактерий кишечника генетически близких родственников. С помощью традиционных бактериологических методов было подтверждено, что в каждом случае выделенный комплекс аутопробиотических микроорганизмов представлен только бактериями рода *Lactobacillus* и не содержит представителей других родов.

На рис. 1 и 2 отражены спектры M_{DM} микроорганизмов, полученных от детей и взрослых.

Shimadzu Biotech Axima Confidence 2.9.3.20110624: Mode Reflectron, Power: 60, Blanked, P.Ext. @ 700 (bin 58)
%Int. 239 mV[sum= 48475 mV] Profiles 1-203 Smooth Av 5 -Baseline 20

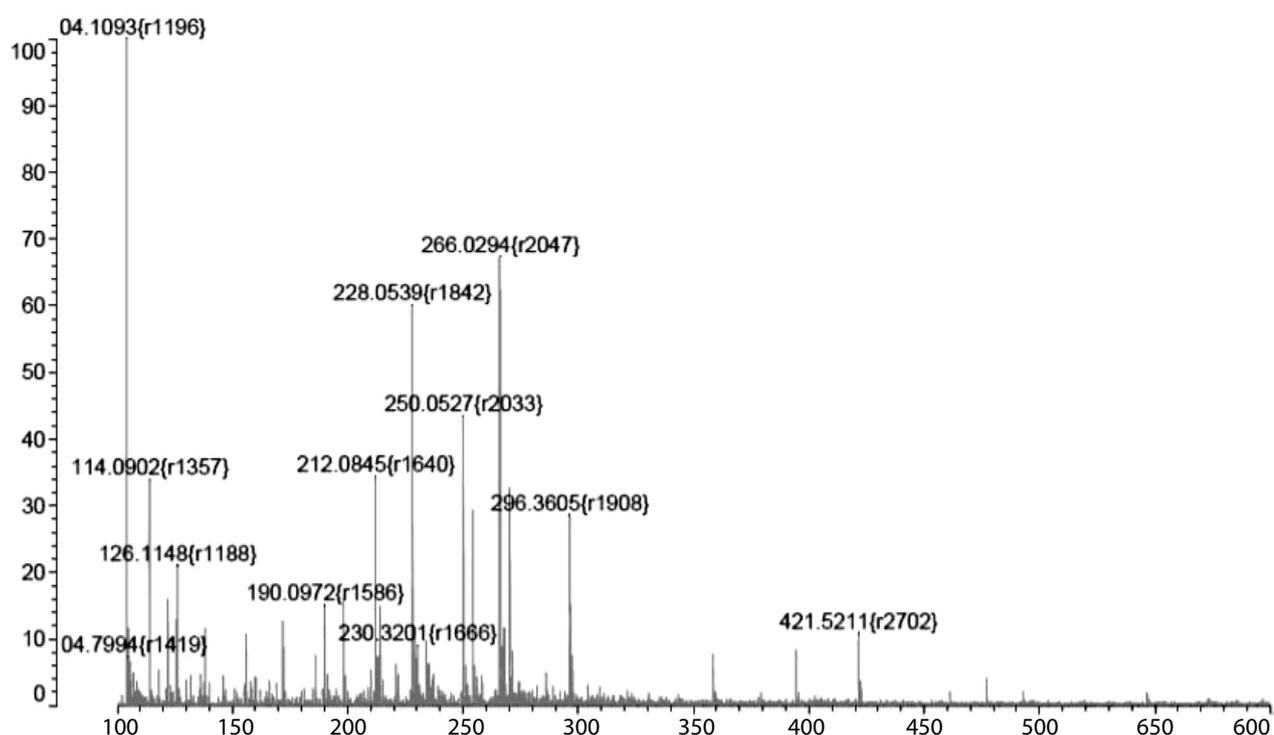


Рис. 1. Масс-спектрометрия аутопробиотического комплекса, выделенного от детей

Shimadzu Biotech Axima Confidence 2.9.3.20110624: Mode Reflectron, Power: 50, Blanked, P.Ext. @ 300 (bin 58)
%Int. 222 mV[sum= 25275 mV] Profiles 1-114 Smooth Av 5 -Baseline 20

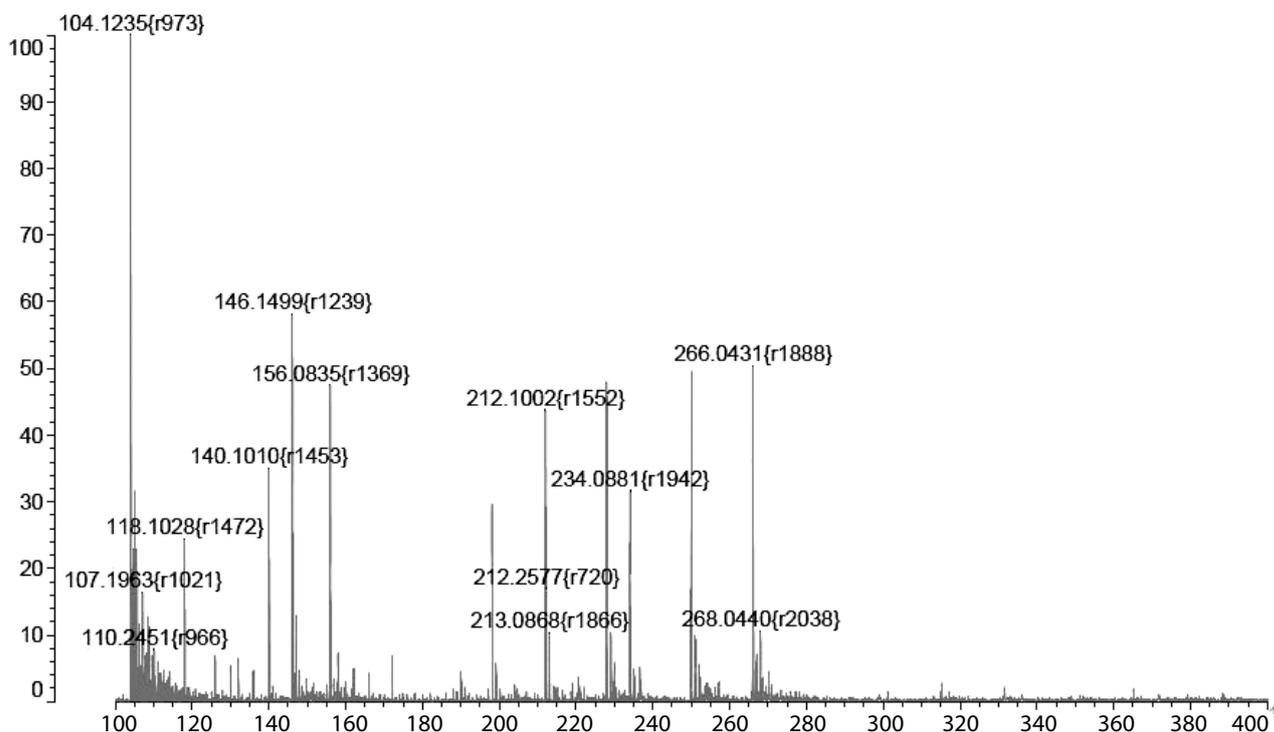


Рис. 2. Масс-спектрометрия аутопробиотического комплекса, выделенного от взрослых

Установлено, что в парах детей – генетически близких родственников наблюдается совпадение спектра $M_{\text{ФМ}}$ для выделенного комплекса лактобактерий на 49,9%, а у взрослых в возрасте 25–30 лет – на 30,5% ($p < 0,05$).

Меньший процент совпадения спектра $M_{\text{ФМ}}$ у родственников в возрасте 25–30 лет можно объяснить тем, что у них произошла частичная смена видового состава из-за изменения рациона питания. Кроме того, это может быть следствием постепенного повышения с возрастом видового разнообразия микроорганизмов нормальной микрофлоры из-за постоянных контактов с новыми видами лактобактерий, потенциально способными к колонизации толстой кишки, что в принципе согласуется с данными других исследователей [6].

Таким образом, полученные нами данные парного сравнения спектров $M_{\text{ФМ}}$ установленных методом MALDI ToF для групп генетически близких родственников – детей и взрослых, – позволяют быстро определить чистоту выделенного аутопробиотического комплекса (отсутствие посторонних бактериальных видов – контаминантов). Подтверждением данного факта является стабильные совпадения спектров $M_{\text{ФМ}}$ аутопробиотического комплекса у родственников различного возраста.

Кроме того, установлено, что метод MALDI ToF может служить экспресс-методом оценки степени чистоты выделяемых аутопробиотических комплексов для заключительной оценки контаминационной безопасности.

ВЫВОДЫ

В ходе исследования были выделены комплексы аутопробиотических штаммов лактобактерий кишечника генетически близких родственников разного возраста. При сравнении комплексов лактобактерий на основе определения $M_{\text{ФМ}}$ установлено, что степень совпадения составов аутопробиотических комплексов у детей-родственников (49,9%) и взрослых (30,5%) различается. Это различие свидетельствует о том, что даже у генетически близких родственников в микробиоценозе кишечника присутствуют разные виды лактобактерий, что требует индивидуального подхода к использованию аутопробиотических комплексов для лечения и профилактики заболеваний желудочно-кишечного тракта. Полученные данные открывают перспективу использования метода MALDI ToF для дальнейшего сравнительного анализа состава аутопробиотических комплексов лактобактерий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Артеменко, К. А. Масс-спектрометрическое *de novo* секвенирование пептидов / К. А. Артеменко, Т. Ю. Самгина, А. Т. Лебедев // Масс-спектрометрия. – 2006. – № 3 (4). – С. 225–254.
2. Способ получения аутопробиотика, содержащего живые бифидобактерии и лактобациллы : пат. 2505304 Рос. Федерация : МПК7 А61К35/74, А23С9/127 / Сафонова М. А., Кузнецов О. Ю., Кузнецова Л. А., Кузнецов А. О., Горелова Е. М. ; заявитель и патентообладатель Кузнецов О. Ю. ; заявл. 22.06.2010 ; опубл. 27.01.2014, Бюл. № 3.
3. Шендеров, Б. А. Гомо- и аутопробиотики в формировании здорового поколения россиян / Б. А. Шендеров // Материалы 1-го Всероссийского конгресса «Питание детей XXI век». – М., 2001. – С. 97.
4. Способ получения аутопробиотика, содержащего живые лактобактерии и бифидобактерии : пат. 213907 Рос. Федерация : А61К35/74, С12Н1/20 / Шендеров Б. А., Манвелова М. А. ; заявитель и патентообладатель Шендеров Б. А. ; заявл. 31.03.1999 ; опубл. 10.10.1999, Бюл. № 28.
5. Chen, C. C. Probiotics and prebiotics: role in clinical disease states / C. C. Chen, W. A. Walker // *Advances in Pediatrics*. – 2005. – Vol. 52. – P. 77–113.
6. Intestinal microbiota in healthy U.S. young children and adults a high throughput microarray analysis / T. Ringel-Kulka, J. Cheng, Y. Ringel [et al.] // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8, No. 5. – P. e64315.

COMPARE AUTOPROBIOTICS COMPLEXES OF LACTIC ACID BACTERIA WITH CLOSE GENETIC RELATIVES

M. A. Kirilenko, O. Yu. Kuznetsov, K. M. Litov

Actuality. Autoprobiotic complexes derived from patient relatives may be used for intestinal dysbiosis correction besides the traditional probiotic preparations; it requires thorough investigation.

Objective is to compare lactobacteria complexes of autoprobiotic strains of genetically near relatives.

Material and methods. Alive lactobacteria autoprobiotic complexes were derived from genetically near relatives (32 persons). The analysis of molecular mass spectrum in macromolecules fragments of autoprobiotic complexes by technique of time-of-flight mass spectrometry with matrix activated laser desorption-ionization, MALDI ToF).

Results and conclusions. the coincidence of molecular mass spectrum in macromolecules fragments of autoprobiotic complexes from genetically near relatives was observed in 49.9% cases in children and in 30.5% cases in adults. Spectrum comparative evaluation allowed to investigate autoprobiotic complexes without preliminary derivation of separate strains and their type identification. MALDI ToF technique demonstrated the possibility of quick and reliable determination of complex purity degree and derived individual lactobacteria autoprobiotic complexes monitoring.

Key words: complex autoprobiotics, *Lactobacillus*, prebiotic, microbiocenosis of intestines.