



УДК 616-008.87-07.097.931

## Перспективы новых биотехнологий в изучении микробной экологии человека

С. М. Попкова<sup>1</sup>, С. И. Лещук<sup>1</sup>, Ю. П. Джигоев<sup>1</sup>, Е. А. Шмелева<sup>2</sup>, Л. В. Сердюк<sup>1</sup>,  
Т. В. Демина<sup>1</sup>, Г. В. Юринова<sup>3</sup>, Е. Б. Ракова<sup>1</sup>, Е. Г. Ламсков<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт эпидемиологии и микробиологии НЦ МЭ ВСНЦ СО РАМН, Иркутск

<sup>2</sup>МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского, Москва

<sup>3</sup>Иркутский государственный университет, Иркутск

E-mail: [popkov\\_smaf@mail.ru](mailto:popkov_smaf@mail.ru)

**Аннотация.** Рассматриваются современные проблемы микробной экологии человека, связанные с особенностями антропогенного иммунного ответа на антигены симбионтной микрофлоры. Предлагаются оригинальные тест-системы, изготовленные на основе традиционных методов (реакция пассивной гемагглютинации РПГА, метод молекулярной гибридизации нуклеиновых кислот – ММГНК), но с более высокими разрешающими возможностями за счет использования нанокompозитных материалов.

**Ключевые слова:** микробиоценоз, бифидобактерии, коринебактерии, диагностикумы, конъюгаты.

Биотехнологическое направление в Институте эпидемиологии и микробиологии в рамках научных исследований существует уже много лет. Создаваемые продукты биотехнологий применяются для решения тех или других задач исследовательской работы. Основные составляющие биотехнологического направления:

1) конструирование иммунодиагностических систем, используемых при диагностике инфекционных и неинфекционных заболеваний;

2) разработка синтетических адъювантов, используемых для получения гипериммунных сывороток и имеющих перспективу при создании синтетических вакцин;

3) конструирование молекулярно-генетических тест-систем.

Одной из актуальных проблем современности является рост числа и интенсивности влияния на организм человека глобальных и локальных воздействий, приводящих к перенапряжению и истощению компенсаторных резервов физиологических систем человека. Многие исследователи считают, что проблемы микробной экологии человека значительно сложнее и, возможно, важнее, чем проблемы макроэкологии. Напомним, что общее количество клеток микрофлоры человека в 10 раз превышает количество собственных клеток организма и составляет в массе более 3 кг. По сути –

это отдельный экстракорпоральный орган, выполняющий множество функций, или, если еще образнее – 2-й геном человека [4]. Каждый этап развития иммунологии, микробиологии, молекулярной биологии или экологии, связан с открытиями в области осмысления механизмов симбиотических взаимоотношений между макроорганизмом и его микробиотой (микрофлорой). Так, например, на сегодняшний день мы еще далеки от понимания того, как происходит переход от симбионтных взаимоотношений к взаимной агрессии. С разными «фигурантами» микробного сообщества у макроорганизма в процессе эволюции сложились симбиотические отношения разного порядка: от мутуалистических до комменсальных и паразитических. Так, известно, что на микроорганизмы нормальной (непатогенной) микрофлоры иммунная реакция не развивается – к антигенам этих микроорганизмов иммунная система толерантна. С открытием образраспознающих рецепторов, которые узнают общие контуры микроорганизмов и специфически активируют естественный иммунитет [1] появилась возможность понять сущность иммунологических взаимоотношений макроорганизма с микробами-симбионтами, и таким образом дополнить представления об иммунной системе как не только имеющей функцию защиты от чужеродного и изменения своего, но и функцию регуляции

микрофлоры организма. Не исчерпана в этом плане и тема изучения влияния факторов среды на механизм индукции и проявления макроорганизмом феномена толерантности или ее срыва по отношению к индигенной непатогенной микрофлоры.

В связи с вышесказанным и на основании наших исследований нам представляется следующее: *проживание в условиях экологического неблагополучия является фактором риска развития иммунореактивности («агрессии») к индигенной симбионтной микрофлоре.*

Рост числа и интенсивности влияния на организм человека глобальных и локальных воздействий, приводящих к перенапряжению и истощению компенсаторных резервов физиологических систем организма, остается актуальнейшей проблемой современности. При этом одной из реакций организма на любой стресс является бактериемия, основным источником которой выступает кишечник. Очевидно, что при такой ситуации качественный и количественный состав кишечной микрофлоры будет играть существенную роль в стабилизации либо дестабилизации физиологических процессов.

Бифидобактерии – несомненная доминанта кишечного микробиоценоза, к которым в процессе эволюции сформировалась иммунологическая толерантность, что и определило мутуалистический тип симбиоза между макроорганизмом и данным микробом. Проведенные нами исследования в двух городах Иркутской области (более 1 500 человек), показали картину антропогенного иммунного ответа на антигены бифидобактерий, которая выразилась в виде нормального распределения титров естественных антител к бифидобактериям, подчинявшихся *закону Пуассона*. Было установлено, что у более 70 % лиц естественные антитела к бифидобактериям в РПГА не определялись или определялись в небольших концентрациях (13–20 %). Кривые отличались по признакам, не входящим в модальную группу, что может быть связано с «...особенностями среды обитания» [5]. Так, в г. Усолье-Сибирское, с более высоким по сравнению с Иркутском уровнем техногенной нагрузки, кривая имела «лихорадочный» тип, обусловленный повышенным удельным весом лиц с наличием естественных антител против бифидобактерий.

*In vitro* нами было установлено достоверно значимое (в 1,5–2 раза) ингибирование цитоадгезии бифидобактерий сывороткой крови лю-

дей, имеющих естественные антитела против микроорганизмов, что свидетельствует о возможном участии естественных антител в торможении колонизационной активности индигенной микрофлоры на слизистой кишечника. *Данное обстоятельство может быть патогенетической компонентой резкого снижения колонизационной резистентности организма и, тем самым, – развития кишечного дисбактериоза.*

В связи с этим, гипотеза, возникшая пока «на кончике пера», предполагает: *увеличение в популяции доли лиц с высоким содержанием естественных антител против бифидобактерий свидетельствует о повышенном экологическом прессинге на популяцию людей в целом. Для отдельных индивидуумов – это может быть маркером риска развития устойчивого дисбактериоза.*

Исходя из вышесказанного, на примере взаимоотношений с бифидобактериями, нами предложена *концептуальная схема «порочного круга» устойчивых кишечных дисбактериозов*, исходя из которой выстраивается «тактика и стратегия» профилактики и коррекции современных дисбиотических нарушений в популяции человека, основанная на характеристиках степени иммунореактивности организма к индигенной микрофлоре кишечного биоценоза (главным образом к бифидобактериям) и видовой принадлежности аутоштаммов микроорганизма, выделенного от индивида.

Другая изучаемая нами экосистема «макроорганизм – нетоксигенные коринебактерии дифтерии» (НКД) представляет симбиоз, основанный на взаимоотношениях *комменсализма*. С помощью сконструированных нами иммунодиагностикумов для РПГА изучалось содержание естественных противобактериальных антител в крови населения Иркутской области. Экосистемная связь между антигенами симбионтных НКД и иммунным ответом макроорганизма характеризовалась кривой, подчиняющейся *закону нормального (биномиального) распределения*, со средними значениями титров антител в 3–4  $\log_2$ . Полагаем, что такое распределение показателей антропогенного иммунного отклика к НКД является оригинальной особенностью данного симбиоза. На основе данных исследований была сформулирована следующая концепция: *негативное влияние абиотических и биотических (бессистемная вакцинация дифтерийным анатокси-*

ном) факторов среды на здоровье человека приводит к нарушениям иммуногемеостаза (супрессии гуморального и клеточного звеньев иммунной системы) и дисбактериозу ротоглотки, проявляющегося длительным носительством токсигенных коринебактерий дифтерии [6]. Концепция объясняла природу длительного носительства токсигенных коринебактерий дифтерии на фоне супертитров антител против дифтерийного токсина, вырабатываемых организмом в ответ на вакцинацию, и таким образом привела к созданию вакцины Кодивак [6], корректирующую антибактериальный иммунитет, а также – к созданию авторским коллективом оригинального иммунодиагностикума, позволяющего мониторировать иммунитет и давать прогноз носительства.

Отработка данной эритроцитарной иммунодиагностической системы прошла эффективную апробацию в период эпидемии дифтерии 1996–1998 гг. в Иркутской области, а при выполнении инновационного проекта «Внедрение нового иммунодиагностикума для оценки антибактериального иммунитета с целью предупреждения заболеваний (вспышек) дифтерии у населения Иркутской области» был отрегулирован целый ряд технологических моментов по сенсibilизации эритроцитов, синтезу конъюгирующих компонентов тест-систем и т. д. Кроме того, был составлен полный регламент, позволяющий выйти на серийное производство тест-систем. Иммунодиагностикум по определению антител к симбионтам человека – коринебактериям дифтерии – зарегистрирован Патентом РФ и как «Способ оценки общей иммунорезистентности человека» [3]. Уникальность данной тест-системы – использование слабых полимерных кислот (разработанных и любезно предоставленных нам ведущим научным сотрудником ЛИИ СО РАН доктором хим. наук В. В. Анненковым) в качестве конъюгирующих компонентов эритроцитарной диагностической системы [2], позволило значительно усилить основные характеристики тест-систем: чувствительность, специфичность, стабильность при хранении до 2–3-х лет, воспроизводимость результатов. По этой же технологии был сконструирован оригинальный иммунодиагностикум для определения естественных антител к антигенам бифидобактерий, с исполь-

зованием антигенов клеточных стенок микроорганизма [7].

В качестве основы оригинальной тест-системы для видовой идентификации бифидобактерий в настоящее время разрабатывается тест-система на основе модификации метода молекулярной гибридизации нуклеиновых кислот (ММГНК).

Таким образом, совершенствование классических методов диагностики (РПГА, ММГНК) с помощью перспективных водорастворимых полимеров, позволяющих значительно усилить основные их характеристики (чувствительность, специфичность, воспроизводимость), дадут возможность более объемно изучать экосистемные взаимоотношения макро- и микроорганизмов, а также использовать их при диагностике инфекционных и неинфекционных заболеваний.

#### Литература

1. Лебедев К. А. Новая иммунология – иммунология образраспознающих рецепторов / К. А. Лебедев, И. Д. Понякина // Изв. РАН. Сер. биол. – 2006. – № 5. – С. 517–529.
2. Пат. 2202801 Российская Федерация. Способ приготовления эритроцитарного антигенного диагностикума с применением бактериальных антигенов бифидобактерий, лактобактерий и полимерных кислот / С. И. Лещук, С. М. Попкова, Е. А. Шмелева. – опубл. 20.04.03.
3. Пат. 2142807 Российская Федерация, 6 А 61 К 35/18, G 01 N 33/53. Способ приготовления эритроцитарного иммунодиагностикума и способ оценки иммунорезистентности организма: / С. И. Лещук, С. М. Попкова, Е. А. Шмелева. – опубл. 20.12.99.
4. Шендеров Б. А. Медицинская микробная экология – некоторые итоги и перспективы исследований / Б. А. Шендеров // Вест. РАМН. – 2005. – № 12. – С. 13–17.
5. Шилов И. А. Экология / И. А. Шилов. – М. : Высш. шк., 2001. – 512 с.
6. Шмелева Е. А. Биологическая функция антигенов клеточной стенки *C. diphtheriae* и научно-производственная разработка иммуномодулирующего препарата Кодивак : дис. ... д-ра биол. наук / Е. А. Шмелева. – М., 1992. – 340 с.
7. Юринова Г. В. Совершенствование технологии приготовления эритроцитарных иммунодиагностикумов для РПГА на основе клеточных фракций бифидобактерий с использованием синтетических полимеров : дис. ... канд. биол. наук / Г. В. Юринова. – Улан-Удэ, 2005. – 142 с.

## Perspectives of new biotechnologies in research of human microbial ecology

S. M. Popkova<sup>1</sup>, S. I. Leshuk<sup>1</sup>, Yu. P. Dzhoiev<sup>1</sup>, E. A. Shmeleva<sup>2</sup>, L. V. Serduk<sup>1</sup>,  
T. V. Demina<sup>1</sup>, G. V. Yurina<sup>3</sup>, E. B. Rakova<sup>1</sup>, E. G. Lamskov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Epidemiology and Microbiology, SC ME ESSC SB RAMS

<sup>2</sup>G. N. Gabrichevsky Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow

<sup>3</sup>Irkutsk State University

**Abstract.** There have been studied the actual problems of human microbial ecology connected with specific features of antropogenic immune response to antigens of symbiolytic microflora. There are offered original test-systems produced on the basis of traditional methods (reaction of passive hemagglutination –RPHA, method of molecular hybridization of nucleic acids – ММННА) but they have higher destructive possibilities due to use of nanocomposite materials.

**Key words:** microbiocenosis, bifidobacteria, diagnosticum, conjugate.

*Попкова Софья Марковна*  
Институт эпидемиологии и микробиологии СО РАМН  
664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 3  
доктор биологических наук  
зав. лабораторией микроэкологии человека  
тел. (395 2) 33–34–45, факс (395 2) 33–34–45  
E-mail: popkov\_smaf@mail.ru

*Popkova Sophya Markovna*  
Research Institute for Epidemiology and Microbiology,  
664000, Irkutsk, 3, K. Marks St.  
D. Sc. in Biology, Head of Laboratory of Human  
Microecology  
phone: (395 2) 33-34-45, fax:(395 2) 33-34-45  
E-mail: popkov\_smaf@mail.ru

*Лещук Светлана Ивановна*  
Институт эпидемиологии и микробиологии СО РАМН  
664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 3  
доктор биологических наук  
ведущий сотрудник лаборатории  
микроэкологии человека  
тел. (395 2) 33–34–45, факс (395 2) 33–34–45

*Leshuk Svetlana Ivanovna*  
Research Institute for Epidemiology and Microbiology,  
664000, Irkutsk, 3, K. Marks St.  
D. Sc. in Biology, leading research scientist,  
Laboratory of Human Microecology  
phone: (395 2) 33-34-45, fax:(395 2) 33-34-45

*Юринова Галина Валерьевна*  
Иркутский государственный университет  
663003, г. Иркутск, ул. Сухэ-Батора, 5  
кандидат биологических наук  
доцент кафедры физико-химической биологии  
тел. (395 2) 24–18–70, факс (395 2) 24–18–55  
E-mail: yurinaova@yandex.ru

*Yurinaova Galina Valeryevna*  
Irkutsk State University  
664003, Irkutsk, 5, Sukhe-Batora St.  
Ph. D. in Biology, ass. prof  
phone: (3952) 24-18-70, fax: (3952) 24-18-55  
E-mail: yurinaova@yandex.ru

*Дзюиев Юрий Павлович*  
Институт эпидемиологии и микробиологии СО РАМН  
664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 3  
кандидат биологических наук  
старший научный сотрудник лаборатории  
молекулярно-генетических методов исследований  
тел. (395 2) 33–34–45, факс (395 2) 33–34–45

*DzhoievYurii Pavlovitch*  
Research Institute for Epidemiology and Microbiology,  
664000, Irkutsk, 3, K. Marks St.  
Ph. D. in Biology, senior research scientist,  
Laboratory of Molecular-Genetical Research Methods  
phone: (395 2) 33-34-45, fax: (395 2) 33-34-45

*Сердюк Людмила Викторовна*  
Институт эпидемиологии и микробиологии СО РАМН  
Адрес: 664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 3  
научный сотрудник лаборатории микроэкологии  
человека  
тел. (395 2) 33–34–45, факс.(395 2) 33–34–45

*Serduk Lyudmila Viktorovna*  
Research Institute for Epidemiology and Microbiology,  
664000, Irkutsk, 3, K. Marks St.  
Ph. D. in Biology, research scientist,  
Laboratory of Human Microecology  
phone: (395 2) 33-34-45, fax: (395 2) 33-34-45

*Демина Татьяна Викторовна*  
 Институт эпидемиологии и микробиологии СО РАМН  
 664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 3  
 кандидат биологических наук  
 старший научный сотрудник лаборатории  
 молекулярно-генетических методов исследований  
 тел. (395 2) 33-34-45, факс. (395 2) 33-34-45

*Demina Tatiana Viktorovna*  
 Research Institute for Epidemiology and Microbiology,  
 664000, Irkutsk, 3, K. Marks St.  
 Ph. D. in Biology, senior research scientist,  
 Laboratory of Molecular-Genetical Research Methods  
 phone: (395 2) 33-34-45, fax: (395 2) 33-34-45

*Шмелева Елена Александровна*  
 Московский научно-исследовательский институт  
 эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского  
 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, 10  
 доктор биологических наук, профессор  
 ведущий научный сотрудник отдела иммуномодуляторов  
 тел. (495) 380-20-19, факс (495) 452-18-05

*Shmeleva Elena Aleksandrovna*  
 Gabricevsky Research Institute for Epidemiology and  
 Microbiology, 125212, Moscow, 10, Admiral Makarov St.  
 D. Sc. in Biology, Prof, leading research scientist  
 отдела иммуномодуляторов  
 phone: (495) 380-20-19, fax: (495) 452-18-05

*Ракова Елена Борисовна*  
 Институт эпидемиологии и микробиологии СО РАМН  
 664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 3  
 научный сотрудник лаборатории микроэкологии  
 человека  
 тел. (395 2) 33-34-45, факс (395 2) 33-34-45

*Rakova Elena Borisovna*  
 Research Institute for Epidemiology and Microbiology,  
 664000, Irkutsk, 3, K. Marks St.  
 research scientist, Laboratory Human Microecology  
 phone: (395 2) 33-34-45, fax: (395 2) 33-34-45

*Ламсков Евгений Григорьевич*  
 Иркутский государственный университет  
 664003, г. Иркутск, ул. Сухэ-Батора, 5  
 студент  
 тел. (395 2) 24-18-70, факс (395 2) 24-18-55

*Lamskov Evgenii Grigorievitch*  
 Irkutsk State University  
 664003, Irkutsk, 5, Sukhe-Batora St.  
 student  
 phone: (3952) 24-18-70, fax: (3952) 24-18-55