

Обзорная статья
УДК 579.65
DOI: <https://doi.org/10.18127/j20700997-202401-01>

Условно-патогенная микрофлора кишечника человека и протеом крови хозяина – поиск взаимосвязей

Д.В. Комиссарова¹, Д.Н. Каширина², Л.Х. Пастушкова³, А.Г. Гончарова⁴,
Н.А. Усанова⁵, О.И. Орлов⁶, И.М. Ларина⁷, В.К. Ильин⁸

¹⁻⁸ Государственный научный центр Российской Федерации –
Институт медико-биологических проблем РАН (Москва, Россия)
¹ d.komisarova@yandex.ru, ² daryakudryavtseva@mail.ru, ³ lpastushkova@mail.ru,
⁴ goncharova.anna@gmail.com, ⁵ usanovasp@mail.ru, ⁶ info@imbp.ru,
⁷ irina.larina@gmail.com, ⁸ piton2004@bk.ru

Аннотация

Постановка проблемы. Кишечник млекопитающих — это место, где постоянно сходятся многочисленные внешние и внутренние сигналы. Клетки кишечника, оказывающие влияние на количественный и качественный состав микробиоты, подвержены влиянию протеома крови. Отдельный интерес представляет изучение взаимосвязи уровня белков в крови человека с количеством условно-патогенных микроорганизмов кишечного биотопа в экспериментах, имитирующих отдельные эффекты космического полёта, например, в «сухой» иммерсии, поскольку известно, что факторы космической миссии негативно сказываются на микрофлоре верхних дыхательных путей и кишечника.

Цель работы – выявление взаимосвязи уровней белков в крови человека, изученных с помощью методов протеомики на основе масс-спектрометрии, с количеством условно-патогенных микроорганизмов в эксперименте «3-суточная «сухая» иммерсия».

Результаты. В исследовании принимали участие 6 испытуемых от 25 до 40 лет. Во время эксперимента участницы не принимали антибактериальные препараты и иные средства, способные оказать влияние на микрофлору. В результате проведенных исследований были выявлены комплексы белков, количество которых коррелировало с количеством условно-патогенной кишечной микробиоты и которые можно условно разделить на 4 группы: белки, связанные с функциями иммунной системы; белки, связанные с шаперонином; белки, влияющие на закрепление бактериальных клеток или проникновение в клетку бактериальных токсинов; белки, имеющие высокий коэффициент регрессии при корреляции с некоторыми микроорганизмами, но не имеющие с их числом очевидной функциональной связи.

Практическая значимость. Полученные данные подтверждают гипотезу о наличии взаимосвязи некоторых белков крови и кишечных микроорганизмов кишечника. Исследование взаимосвязи концентрации белков в крови и количества бактерий в кишечнике представляется актуальным как для вопросов поддержания здоровья космонавтов, так и для «земной» медицины, поскольку позволяют не только выявить глубинные взаимосвязи в системе «хозяин-микробиота», но и могут служить диагностическим целям в рамках клинических исследований.

Ключевые слова

Протеомика, кишечная микробиота, «сухая» иммерсия, дисбактериоз

Работа выполнена в рамках тем фундаментальных научных исследований FMFR-2024-0035 и FMFR-2024-0032.

Для цитирования

Комиссарова Д.В., Каширина Д.Н., Пастушкова Л.Х., Гончарова А.Г., Усанова Н.А., Орлов О.И., Ларина И.М., Ильин В.К. Условно-патогенная микрофлора кишечника человека и протеом крови хозяина – поиск взаимосвязей // Технологии живых систем. 2024. Т. 21. № 1. С. 5–19. DOI: <https://doi.org/10.18127/j20700997-202401-01>

A brief version in English is given at the end of the article

Введение

Недавние исследования показали, что кишечная микробиота или «второй геном» вовлечены в целый ряд важных для организма человека процессов: от метаболических и иммунных до когнитивных, а отклонение его состава от нормы приводит к развитию разнообразных патологических состояний: аллергических и аутоиммунных заболеваний, сахарного диабета, ожирения [1].

Микрофлора кишечника человека представлена широким спектром микроорганизмов, среди которых различают постоянную микрофлору, включающую в себя специфичных для данного биотопа представителей, и транзитную, т.е. занесённую извне [2].

Подавляющее большинство бактерий обитает в толстом кишечнике. В проксимальных отделах тонкой кишки также в норме имеется до 10^4 КОЕ/мл микроорганизмов, но сравнительно малое по сравнению с толстым кишечником количество связано с рН среды и бактерицидным действием желчи [3].

Постоянная микрофлора относительно стабильна, но физиологическая роль микроорганизмов, составляющих её, неравнозначна. В постоянной микрофлоре различают облигатную и факультативную составляющие. Облигатная микробиота (или протективные виды бактерий (ПМ)) противодействует заселению биотопа случайными микроорганизмами, т.е. осуществляет формирование колонизационной резистентности, включающей в себя продукцию бактериями ингибиторов, нарушающих метаболизм патогенных и условно-патогенных бактерий, конкурентные взаимоотношения с патогенными бактериями за питательные субстраты и места адгезии, а также участвует в процессах ферментации и иммуностимуляции [2]. Известны иммуномодулирующие свойства бифидо- и лактобактерий, способных воздействовать на различные звенья иммунной системы, регулируя неспецифический и специфический клеточный и гуморальный иммунитет [4,5]. Под влиянием этих бактерий увеличивается активность моноцитов, макрофагов, естественных киллеров, стимулируется фагоцитоз; увеличивается синтез иммуноглобулинов, интерферона, интерлейкинов 10 и 12, фактора некроза опухолей *альфа*, стимулируется Т-клеточный иммунитет. К облигатной микрофлоре кишечника относят лактобациллы, бифидобактерии, типичные кишечные палочки, пептострептококки, эубактерии, а также большинство видов энтерококков.

Остальные виды микроорганизмов принято относить к факультативной микробиоте или условно-патогенным микроорганизмам (УПМ). Последние могут содержаться в норме в небольших количествах (как правило, до 10^4 КОЕ/мл), но увеличение их количества выше этой границы принято связывать с увеличением риска развития дисбактериоза.

В настоящее время нарушение нормального состава микрофлоры кишечника (дисбактериоз) выявляется в 75–90 % случаев острых и хронических гастроэнтерологических заболеваний. При дисбактериозе кишечника происходит снижение защитных сил организма и повышается восприимчивость к инфекционным заболеваниям. Так, например, пневмония при острой респираторной вирусной инфекции у детей с дефицитом бифидобактерий в 3,5 раза чаще является затяжной [6]. Кишечник при этом может заселяться УПМ, что на фоне сниженного иммунитета может привести к развитию эндогенной инфекции (т.е. активация и (реже) проникновение УПМ нормальной микрофлоры из нестерильных полостей во внутреннюю среду организма) и сепсису. При конкуренции с ПМ за утилизацию питательных компонентов УПМ могут выделять большое количество индола, сероводорода, которые, попадая в кровь, увеличивают токсическую нагрузку на печень [7].

К факторам риска развития дисбактериоза принято относить применение антибиотиков, гормонов, иммунодепрессантов, лучевой терапии, хирургические операции (особенно на органах желудочно-кишечного тракта – ЖКТ), а также острые кишечные инфекции, хронические заболевания желудка, печени и кишечника. Кроме того, на кишечный биотоп могут влиять такие факторы, как изменение среды обитания, длительное воздействие экологических факторов, нервно-психический стресс, голодание, нерациональное питание и авитаминоз.

Таким образом, кишечник млекопитающих — это место, где постоянно сходятся многочисленные внешние и внутренние сигналы. Помимо функционирования в качестве органа пищеварения и всасывания, кишечный тракт можно рассматривать как крупнейший периферический иммунный орган, в котором содержится более 70 % всех иммунных клеток организма [8].

Взаимоотношения организма человека и кишечной микробиоты активно изучаются в последние десятилетия, в том числе — благодаря развитию геномо-центричных методов молекулярной биологии (ОМИКов). Метаболическая «мощность», которую может обеспечить совокупный геном микробиоты, превышающий геном человека в тысячи раз, предопределяет сложность исследования связей «микробиота–хозяин».

Двусторонние связи «организм хозяина–микробиота» представляются более-менее понятными в регуляции врожденной и, в меньшей степени — адаптивной иммунной системы. Можно предполагать, что ширина «двусторонней дороги», т.е. области воздействия микробиоты на человека и наоборот — больше, чем сейчас нам известно и понятно. Возможно, связь «организм человека–микробиота кишечника» имеет сложный характер, по большей части отличающийся от прямой регуляции.

В то же время клетки, составляющие в кишечнике клеточный барьер внутриклеточного пространства организма человека с внешней средой, в которой размещена микробиота кишечника, подвержены влиянию протеома крови. Возможно, именно через модуляцию их функций при изменении как внешних условий жизнедеятельности большого организма, так и внутренних пертурбаций, осуществляется связь протеома хозяина и функций микробиоты.

Одним из таких клеточных «посредников» служит макрофаг. Макрофаги принадлежат к системе мононуклеарных фагоцитов, плотно заселенных по всей собственной пластинке кишечника и обнаруживаемых в непосредственной близости от эпителиальных клеток кишечника (IECS) [9]. Эти универсальные иммунные клетки также широко распределены по подслизистому, наружному мышечному и серозному слоям, где они получают сигналы от энтеральных нейронов и различных мезенхимальных клеток. Таким образом, макрофаги играют ключевую роль в генерации сигналов обратной связи для организации функций соседних клеток [10]. Так, показано, что макрофаги гармонизируют гомеостаз эпителиальных и стромальных клеток [11].

Отдельный интерес представляет изучение взаимосвязи уровня белков в крови человека с количеством различных представителей УПМ кишечного биотопа организма человека в экспериментах, имитирующих отдельные физиологические эффекты космического полёта, поскольку известно, что факторы космической миссии являются причиной формирования стресса и негативно сказываются на микрофлоре верхних дыхательных путей и кишечника [12, 13].

Для изучения влияния отдельных факторов космического полёта на системы организма наиболее удобными являются наземные модельные эксперименты, в частности, «сухая» иммерсия [14]. Участник такого испытания, находясь в иммерсионной ванне, испытывает развитие ряда факторов, характерных для реального космического полёта: гиподинамию, разгрузку опорных зон стопы, перераспределение жидкостных сред тела между секторами, нервное напряжение, изменённый режим питания и гигиены, поскольку испытатель покидает ванну только на 10 мин в сутки для принятия душа и совершения гигиенических процедур. Все перечисленные факторы, наблюдаемые в «сухой» иммерсии и близкие к тем, с которыми сталкивается человек в условиях космического полёта, могут служить причиной нарушения колонизационной резистентности.

Таким образом, исследование взаимосвязи концентрации белков в крови и количества бактерий в кишечнике представляется актуальным как для вопросов поддержания здоровья космонавтов, так и для «земной» медицины, поскольку позволяют не только выявить глубинные взаимосвязи в системе «хозяин–микробиота», но и могут служить диагностическим целям в рамках клинических исследований и своевременного обнаружения проблем, связанных с колонизационной резистентностью кишечного биотопа.

Ц е л ь р а б о т ы – выявление взаимосвязи уровней белков в крови человека, изученных с помощью методов протеомики на основе масс-спектрометрии, с количеством УПМ в эксперименте «3-суточная «сухая» иммерсия».

Материалы и методы

Данный эксперимент одобрен биоэтической комиссией ГНЦ РФ – ИМБП РАН (протокол № 544 от 16 июня 2020 г.).

В исследовании принимали участие 6 испытательниц от 25 до 40 лет. Во время эксперимента участницы не принимали антибактериальные препараты и иные средства, способные оказать влияние на микрофлору. Продолжительность пребывания в иммерсионной ванне составила 3 сут. При начале испытаний женщины-добровольцы были синхронизированы по фазе менструального цикла (фолликулярная фаза), чтобы избежать различия эффектов эстрадиола на исследуемые параметры.

Однократно за 1-2-е сутки до начала эксперимента и однократно на 1-3-и сутки после окончания «сухой» иммерсии отбирались фекальные пробы. Из образцов фекалий готовили ряд десятикратных разведений в стерильном физиологическом растворе от 10^{-1} до 10^{-9} . Затем 100 мкл инокулята высевали в чашки Петри с агаризованными питательными средами: кровяной агар, агар МакКонки, маннитол-солевой агар, среда Сабуро, среда МРС, среда Бактофок, цитратный агар, агар для энтерококков, бифидоагар (производитель всех сред – Himedia, Индия).

Выросшие колонии подсчитывались и идентифицировались. После изучения состава микробиоты кишечника были отобраны четыре бактерии, которые встречались у всех участниц и присутствовали в клинически-значимом количестве свыше 104 КОЕ/мл.

Для оценки изменений микрофлоры ЖКТ использован эубиотический индекс, показывающий отношение количества положительных изменений микрофлоры к количеству отрицательных изменений [15].

Образцы капиллярной крови были взяты у добровольцев за 2 сут до начала эксперимента, в 1-, 2- и 3-и сутки во время эксперимента и через 2 сут после окончания эксперимента. Капиллярную кровь от-

бирали путем прокола концевой фаланги безымянного пальца автоматическим скарификатором. Пробы сушили при температуре окружающей среды (от 19 до 26 °С) в течение 2 ч в защищенном от света месте, а затем помещали в пакеты с застежкой-молнией. Хранили высушенные образцы пятен крови при –20 °С до дальнейших исследований методами протеомики.

Сухие пятна крови вырезали и помещали в экстрагирующий буфер, содержащий 25 мМ бикарбоната аммония, 1 % дезоксихолата натрия и 5 мМ ТСЕР (трис-(2-карбокситил) фосфин гидрохлорид) (Thermo Scientific). После инкубации при температуре 60 °С при 1 000 rpm (термомиксер, Eppendorf) в течение 1 ч приступали к стандартным этапам подготовки к хромато-масс-спектрометрическому анализу [16].

Полученные смеси триптических пептидов анализировали методом жидкостной хромато-масс-спектрометрии на основе системы нано-ВЭЖХ Dionex Ultimate3000 (Thermo Fisher Scientific, США) и масс-спектрометра TimsTOF Pro (Bruker Daltonics, США).

Масс-спектрометрический анализ проводили с использованием метода параллельного накопления при последовательной фрагментации (PASEF). Параметры анализа подробно описаны в [17].

Изменения в кишечной микробиоте оценивались с помощью непараметрического критерия Краскеля-Уоллеса для связанных выборок. Статистическая обработка эубиотического индекса проводилась с помощью парного двухвыборочного t-теста для средних. Изменение количества белков в крови оценивались с помощью дискриминантного анализа для малых выборок. Связь между уровнем белков в крови человека и численностью УПМ кишечника была адекватно описана с помощью регрессионной модели, в которой в качестве зависимой переменной выступало количество условно-патогенной бактерии, в качестве независимой – количество белков [18]. Для обработки результатов использовалась программа STATISTICA 12.0; для визуализации взаимосвязей белков – база данных STRING.

Результаты и их обсуждение

Образцы сухих пятен крови женщин-добровольцев исследовались с помощью хромато-масс-спектрометрии, что позволило идентифицировать 1256 белков с определением их относительных уровней.

Согласно критерию Краскеля-Уоллеса, было выявлено, что количество УПМ после «сухой» иммерсии (СИ) достоверно увеличилось. Эубиотический индекс также достоверно уменьшился, что говорит о преобладании отрицательных изменений в микрофлоре над положительными. Полученные данные свидетельствуют об увеличении риска развития дисбиотических состояний в кишечном биотопе.

Согласно проведённому дискриминантному анализу, после СИ статистически достоверно изменилось количество 55 белков. Регрессионная модель также показала связь между уровнем ряда данных белков в крови человека и численностью УПМ кишечника в течение СИ.

S. aureus. Золотистый стафилококк является одной из основных бактерий условно-патогенной микрофлоры, вызывающей септические поражения различных биотопов человека. *S. aureus* обладает высокой вирулентностью и хорошей способностью к формированию антибиотикорезистентности. Носительство золотистого стафилококка встречается достаточно часто. В количестве до 10⁴ КОЕ/мл *S. aureus* в кишечной флоре обычно не приводит к какой-либо патологии, однако при нарушении иммунитета и баланса протективных (ПМ) и условно-патогенных (УПМ) видов кишечной микробиоты, активно размножается, приводя к возникновению дисбиоза, который может перейти в токсин-ассоциированные состояния, например, гастроэнтерит.

При анализе данных, полученных в 3-суточной «сухой» иммерсии, с помощью регрессионного анализа был выявлен комплекс белков, ассоциированных с *S. aureus*: TCP1, GSTO1, CAST, GPI, HRG, ALB и PON1 (рис. 1 и рис. 2).

По имеющимся литературным данным, дефицит белка GSTO1 (Глутатион S-трансфераза омега-1), вероятно, участвует в клеточном окислительно-восстановительном гомеостазе и антиоксидантной защите, а также ослабляет вклад диеты с высоким содержанием жиров в развитие толерантности клеток к глюкозе и инсулинорезистентности [19]. Цитозольная и мембраносвязанная формы глутатион S-трансферазы кодируются двумя различными семействами супергенов. Эти ферменты участвуют в детоксикации электрофильных соединений, включая канцерогены, терапевтические препараты, токсины окружающей среды и продукты окислительного стресса, путем конъюгации с глутатионом. В настоящее время идентифицировано восемь различных классов растворимых цитоплазматических глутатион S-трансфераз млекопитающих: *альфа*, *каппа*, *мю*, *омега*, *пи*, *сигма*, *тета* и *дзета*. Гены, сопоставленные

с хромосомой 6, являются наиболее обильно экспрессируемыми для глутатион S-трансфераз в печени (гепатоцитах) и почках (проксимальные каналцы). Помимо метаболизма билирубина и отдельных фармакологических препаратов в печени, *альфа*-класс этих ферментов проявляет активность глутатионпероксидазы, тем самым защищая клетки от активных форм кислорода и продуктов перекисного окисления. Мыши с дефицитом GSTO1-1 демонстрируют более тяжелую воспалительную реакцию и повышенный выход бактерий из толстой кишки в лимфатическую систему в модели воспалительного заболевания кишечника, опосредованной декстраном сульфатом натрия. Эти реакции аналогичны реакциям мышей с дефицитом TLR4 и MyD88 в указанных моделях и подтверждают, что GSTO1-1 имеет решающее значение для TLR4-подобного провоспалительного ответа *in vivo* [19]. В то же время диета с высоким потреблением жиров, приводящая к воспалению и резистентности к инсулину, у мышей с дефицитом GSTO1-1 не приводит к таким эффектам, аналогично моделям с дефицитом TLR4 и MyD88 [20]. Этот результат еще раз подтверждает критическую роль, которую играет GSTO1-1 в передаче провоспалительных сигналов.

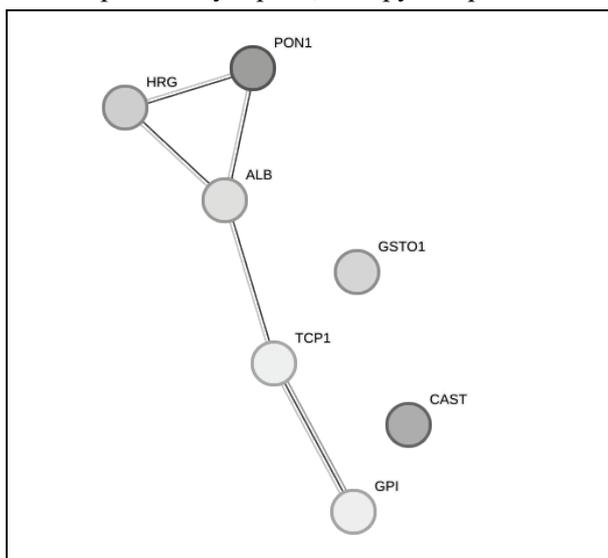


Рис. 1. Взаимосвязь белков, коррелирующих с численностью *S. aureus*

Fig. 1. Relationship of proteins correlated with *S. aureus*

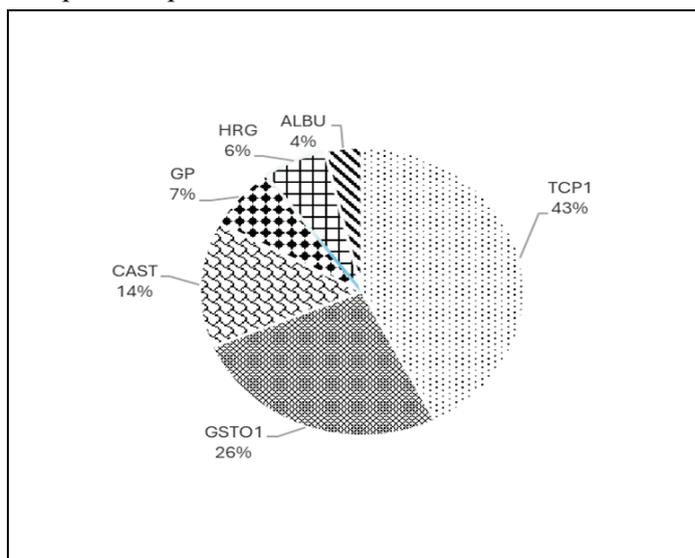


Рис. 2. Вклад белков в изменение количества *S. aureus* (по данным регрессионного анализа)

Fig. 2. Contribution of proteins to changes in the number of *S. aureus* (according to regression analysis)

Имеются также сведения о том, что эндотоксины, выделяемые грамотрицательными бактериями, а также стафилококковый *альфа*-токсин при длительном воздействии могут способствовать повышению инсулинорезистентности и стимулировать адипоциты вырабатывать цитокины [21]. По-видимому, GSTO1-1 вовлечен в провоспалительный ответ организма. В проведенном исследовании белок GSTO1 и количество *S. aureus* коррелировали положительно.

Белок CAST (КальпаSTATIN)¹, согласно литературным данным, ассоциирован с усилением воспалительной реакции кишечника и играет центральную роль в активации макрофагов [22]. В проведенных исследованиях белок CAST положительно коррелирует с количеством золотистого стафилококка, что говорит об усилении иммунного ответа на размножение УПМ.

Одним из свойств белка HRG (Гистидин-богатый гликопротеин²), описанным в литературе, является способность лизировать клетки *Candida spp.* за счёт разрушения клеточной стенки [23]. Аналогичные

¹ Эндогенный кальпаин (кальций-зависимый цистеин протеаза) – ингибитор. Он участвует в протеолизе белка-предшественника амилоида. Система кальпаин/кальпаSTATIN участвует в многочисленных событиях слияния мембран, таких как экзоцитоз нервных пузырьков и агрегация тромбоцитов и эритроцитов. Считается также, что кодируемый белок влияет на уровни экспрессии генов, кодирующих структурные или регуляторные белки.

² Два эффекта белка (ингибирование фибринолиза и снижение ингибирования коагуляции) указывают на потенциальный протромботический эффект. Сообщается также что он может быть вовлечен в апоптоз фагоцитов, иммунных комплексов, клеточную адгезию, миграцию и ангиогенез благодаря своей способности связывать различные лиганды, такие как фосфолипиды, фибриноген, плазминоген, гепарин, *heparansulfate*, тропомиозин и гем, а также как ионы двухвалентных металлов цинка, меди, ртути, кадмия и никеля.

данные были получены при анализе взаимосвязи количества белка HRG и *S. pyogenes* (также одной из важных патогенных бактерий в организме человека) [24]. Мыши с дефицитом HRG были намного более восприимчивы к инфекции *S. pyogenes*, что подчеркивает роль HRG как регулятора воспаления и защитного белка в очаге бактериальной инфекции. Интересно отметить, что в исследовании авторов статьи с *Candida spp.* HRG также коррелировал отрицательно, т.е. с увеличением количества данного белка в крови количество кандиды в кишечнике действительно уменьшалось. В то же время с количеством золотистого стафилококка данный белок имеет положительную корреляцию.

Обращает на себя внимание тесная взаимосвязь пяти белков друг с другом, из которых, согласно коэффициенту регрессии, наиболее сильную корреляцию с количеством золотистого стафилококка имеют белки TCP1, GPI, PON1 и HRG. Однако не ясна природа взаимодействия этих белков и УПМ, поэтому данные корреляции могут быть случайными.

Белок TCP1 является компонентом шаперонина TRiC/CCT, который играет важную роль в протеостазе, участвуя в сворачивании актина и тубулина – важнейших белков, компонентов цитоскелета. Актин, в свою очередь, способен связываться со спектрином, включая этот белок также в цитоскелет. Показано, что во время инфицирования некоторыми патогенными микроорганизмами (например, патогенными штаммами *E.coli*, *S.yphimurium*, *L. monocytogene*) богатым актином мембранным складкам в местах бактериальной инвазии часто сопутствует отсутствие спектриновых цитосклетных белков [25]. Логично предположить, что чем больше актин-спектриновых связей (и, соответственно, участвующего в правильной сборке актина белка TCP1), тем меньшее количество УПМ способно присоединиться к мембранам клеток. В данном исследовании корреляция количества белка TCP1 с количеством золотистого стафилококка отрицательная, что подтверждает высказанную биологическую гипотезу о характере взаимосвязи уровней белка TCP1 и количества золотистого стафилококка.

Белок PON1 – сывороточная параоксоназа и арилэстераза 1, гликопротеин, универсальный фактор антиоксидантной защиты. Он связан как с ALB, так и с HRG, однако его вклад в корреляцию самый слабый среди всех белков. Он предотвращает окисление липопротеинов низкой плотности, в том числе – входящих в состав клеточных мембран. Согласно некоторым исследованиям, PON1 также может быть связан с врождённым иммунитетом и участвует в предотвращении заражения грамотрицательными бактериями [26]. Однако золотистый стафилококк, с которым обнаружена слабая корреляция данного белка, является грамположительным, поэтому такая корреляция может быть случайной.

S. haemolyticus. Кроме золотистого стафилококка было также оценено количество других гемолитических видов стафилококков. Они являются широко распространёнными УПМ, колонизирующими различные биотопы организма человека. Гемолитические стафилококки способны продуцировать эндо- и экзотоксины, негативно влияющие на жизнедеятельность клеток организма человека.

Наиболее сильная корреляция была выявлена между количеством белков DPP3, NSFL1C, VCP, ADD1, YWAHAB и количеством гемолитических стафилококков (рис. 3 и рис. 4). При этом обращает на себя внимание взаимосвязь белков NSFL1C, VCP и YWAHAB. Белки VCP и YWAHAB коэспрессируются, а белок NSFL1C является кофактором VCP, образуя единый комплекс.

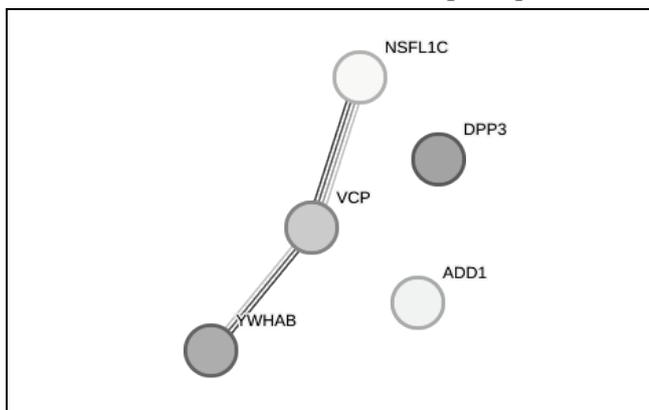


Рис. 3. Взаимосвязь белков, коррелирующих с числом *S. haemolyticus*

Fig. 3. Relationship of proteins correlated with *S. haemolyticus*

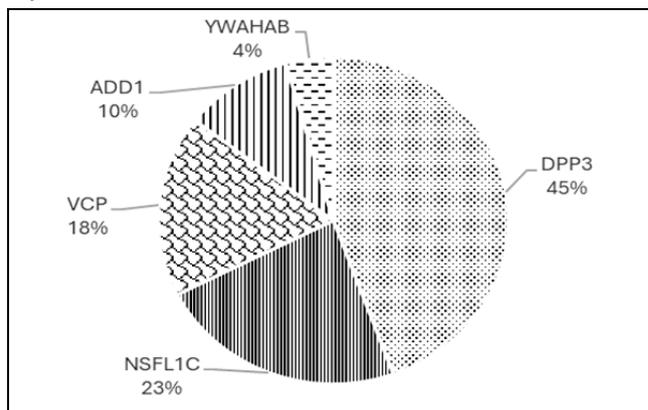


Рис. 4. Вклад белков в изменение количества *S. haemolyticus* (по данным регрессионного анализа)

Fig. 4. Contribution of proteins to changes in the number of *S. haemolyticus* (according to regression analysis)

Белок NSFL1C – N-этилмалеимид-чувствительный фактор (NSF) и валозин-содержащий белок (кофактор p97) – это две АТФазы, которые участвуют в слиянии транспортных пузырьков и мембран-мишеней и слияниях между компартментами мембран.

Белок снижает АТФазную активность VCP и необходим для фрагментации стопок аппарата Гольджи во время митоза и для опосредованной VCP повторной сборки стопок после митоза. В данном исследовании эти белки коррелировали с количеством гемолитических стафилококков по-разному: в то время как VCP имел положительную корреляцию с *S. haemolyticus*, у белка NSFL1C корреляция была отрицательной. Белок YWHAB также имел отрицательную корреляцию с количеством гемолитических стафилококков.

Белок VCP – переходная АТФаза эндоплазматического ретикулума (TER ATPase), также известная как p97. Белок участвует в 53 биологических процессах (Amigo/QuickGO), в том числе является частью процесса деградации белков, связанного с эндоплазматической сетью, который отвечает за поддержания гомеостаза в кишечнике. Также в отдельных исследованиях была показана роль белка VCP в контроле инфекций кишечных паразитов, например токсоплазмы [27]. В данном исследовании была выявлена положительная корреляция этого белка с протективными бифидобактериями. С гемолитическими стафилококками корреляция также положительная и, согласно значению коэффициента регрессии, относительно сильная (коэффициент корреляции равен 0,512).

Белок DPP3 – дипептидилпептидаза 3, цитоплазматический белок, связывает единственный ион цинка своим цинксвязывающим мотивом (HELLGH) и обладает активностью постпролиновой дипептидиламинопептидазы. Протеин обладает способностью последовательно расщеплять дипептиды с N-конца различных биоактивных пептидных субстратов и имеет широкий спектр биологических функций. Так, он участвует во внутриклеточном процессинге белков. Кроме того, была выявлена активность DPP3 в клетках врожденной иммунной системы, например, в полиморфно-ядерных гранулоцитах и нейтрофилах, что свидетельствует о том, что этот белок активно участвует в регуляции иммунной функции организма [28]. В данном исследовании была выявлена сильная отрицательная корреляция количества указанного белка с количеством гемолитических стафилококков, т.е. при снижении количества этого белка в крови количество гемолитических стафилококков увеличивается.

В ряде исследований было показано, что белок ADD1, альфа-аддуцин, (Recommended name: Alpha-adducin, Alternative names: Erythrocyte adducin subunit alpha), активно экспрессирующийся в Т-клетках протеин цитоскелета, является необходимым компонентом для активации CD4+ Т-клеток в ответ на низкие уровни антигенов [29]. В другом исследовании была показана ключевая роль CD4+ Т-клеток в иммунном ответе на *S. aureus* (который также является гемолитическим стафилококком), обитающем на кожных покровах человека. В данном исследовании отмечается, что Т-клеток в коже представлено больше, чем в крови, однако, также подчёркивается важность присутствия CD4+ Т-клеток, как клеток памяти, в тканях барьерных участков [30]. Одним из важнейших барьеров на пути УПМ является и эпителиальная ткань кишечника. Положительная корреляция уровня белка ADD1 с количеством гемолитических стафилококков (т.е. увеличение количества белка ADD1 влекло за собой усиление размножения гемолитических стафилококков) может быть объяснено несколькими причинами: во-первых, усиление иммунного ответа на присутствие УПМ оказалось недостаточным; во-вторых, аутохтонная условно-патогенная флора, возможно, обладает способностью противостоять иммунному ответу хозяина. Таким образом, иммуномодулирующие препараты могут оказаться бесполезными в укреплении иммунитета.

Candida spp. Кандида – род дрожжеподобных грибов. Частота носительства кандиды в кишечнике у здоровых лиц достигает 80 %, однако нормой считается содержание *Candida spp* не более 10^4 КОЕ/мл. Большая часть обитающей в ЖКТ кандиды локализуется в тонком и толстом отделах кишечника. Нормальные биохимические и физиологические процессы в ЖКТ, кислотно-ферментативный барьер, полноценная перистальтика, а также высокое количество протективных микроорганизмов и низкое количество УПМ являются защитными факторами, препятствующими размножению и активной колонизации кандидой ЖКТ. При нарушении колонизационной резистентности, снижении иммунитета и соответствующем увеличении количества кандиды может развиваться воспаление слизистой оболочки кишечника – кандидоз кишечника.

При анализе взаимосвязи белков в крови и количеством кандиды было выявлено, что сильные корреляции с количеством данного микроорганизма имели тесно взаимосвязанные белки PSMD5 и CCT5

(связанный с ними белок PSMC4 имел более низкий коэффициент корреляции), а также белки IGFALS и TPP2. Также взаимосвязь найдена для белков A2M, ITIH3 и HRG, хотя по-отдельности их вклад в общую корреляцию комплекса белков с количеством *Candida spp* ниже, чем вклад первых пяти упомянутых белков (рис. 5 и рис. 6).

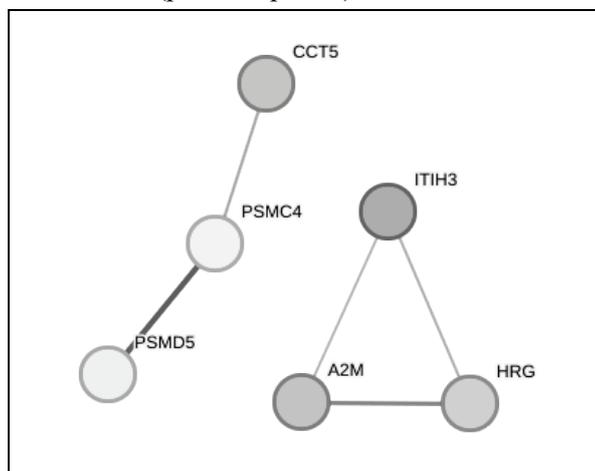


Рис. 5. Взаимосвязь белков, коррелирующих с численностью *Candida spp*

Fig. 5. Relationship of proteins correlated with *Candida spp*

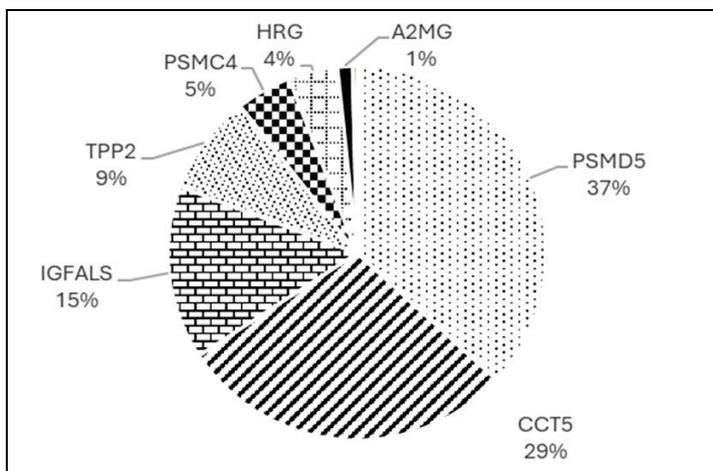


Рис. 6. Вклад белков в изменение количества *Candida spp* (по данным регрессионного анализа)

Fig. 6. Contribution of proteins to changes in the number of *Candida spp* (according to regression analysis)

PSMD5 и PSMC4, являясь частью убиквитин-протеасомной системы (УПС), участвуют в процессе убиквитинирования, т.е. убиквитин-опосредованной деградации белка. В основном, УПС играет важную роль в патогенезе аутоиммунных заболеваний, однако в ряде исследований было показано, что УПС также участвует и в воспалительных реакциях в качестве регулятора пролиферации лейкоцитов [31]. Оба белка положительно коррелируют с количеством кандиды. Подобная картина наблюдалась при изучении взаимосвязи гемолитических стафилококков и белка ADD1, также играющего важную роль в иммунном ответе организма, что снова приводит к выводам о том, что иммуномодуляторы не являются препаратами первого выбора для коррекции микрофлоры кишечника при имитации отдельных факторов космического полёта, так как усиление иммунного ответа не подавляет и даже не замедляет рост УПМ.

IGFALS (связывает инсулиноподобные факторы роста, увеличивая период их полураспада и сосудистую локализацию) и TPP2 (трипептидилпептидаза 2, в значительной степени вовлечен в процессинг главного комплекса гистосовместимости МНС (HLA) класса I) также имеют довольно высокий коэффициент регрессии, хотя и не связаны ни с какими другими белками, коррелирующими с кандидой.

Известно, что IGFALS улучшает биодоступность инсулиноподобных факторов роста и, по-видимому, улучшает состояние слизистой кишечника [32]. Слизистая кишечника представляет собой гликопротеиновую сеть со специфичной для хозяина гликановой структурой, которая, в свою очередь, может «выбирать» отдельные бактерии, которые способны связывать или разрушать определённые муциновые гликаны в качестве источника питательных веществ [33]. Известно, *Candida spp* может проникать глубоко в слизистую кишечника, если нарушена его микроэкология (т.е. количество протективных видов бактерий снижено) [34].

Отдельно необходимо отметить роль оси ГР/IGF-1 в кишечном гомеостазе. Физиологические показатели гормона роста играют важную роль в поддержании функций кишечника, например, уменьшая кишечную проницаемость и бактериальную транслокацию, улучшая абсорбцию макронутриентов и иммунную функцию эпителия [35]. Также было установлено, что введение IGF-1 облегчает дисбактериоз и нормализует микрофлору до уровня нормы [36]. В другом исследовании было выявлено, что уровень IGF-1 коррелирует положительно с *Bacteroidetes* и отрицательно с *Lactobacillus spp* [37].

В данном исследовании была выявлена положительная корреляция белка IGFALS с количеством кандиды, т.е. при увеличении количества белка количество *Candida spp* также увеличивалось. Учитывая имеющиеся в литературе данные, такая взаимосвязь остаётся неясной и требует более тщательного изучения.

Корреляция количества белка TPP2 с количеством кандиды отрицательная. Имеются литературные данные о том, что молекулы главного комплекса гистосовместимости координируют адаптивные иммун-

ные реакции позвоночных, тем самым влияя на восприимчивость к инфекционным заболеваниям [38]. Иммуитет кишечника обеспечивается взаимодействием ряда клеток иммунной системы между собой, что провоцирует выработку высокоаффинного иммуноглобулина А (IgA), который контролирует численность микроорганизмов, маркируя клетки, которые будут впоследствии уничтожены иммунной системой, а также агрегируя и удаляя микробные клетки посредством влияния на перистальтику кишечника. Таким образом, отрицательная корреляция белка TPP2 с количеством *Candida spp*, вероятно, объясняется влиянием местного иммунитета на контроль и поддержание колонизационной резистентности кишечного биотопа.

Белок А2М (α 2-макроглобулин) способен связывать цинк и медь в плазме, а также ингибирует тромбин. В некоторых исследованиях было отмечено, что при инвазивном заражении кандидой и при попадании её в кровотоки наиболее распространёнными выявленными белками на поверхности гиф *Candida spp* были именно те белки, которые участвовали в процессах свёртывания крови, в том числе и белок А2М [39]. Тем не менее, необходимо отметить, что кандида, являясь полиморфным условно-патогенным грибом, в кишечнике человека существует практически всегда в виде дрожжевых клеток, а не гифов, поэтому причины обнаруженной корреляции между белком А2М и количеством кандиды в кишечнике всё ещё остаются неясными.

Белок ИТНЗ (тяжелая цепь 3 ингибитора интер-альфа-трипсина, обладает активностью ингибитора пептидазы серинового типа) имеет довольно слабую отрицательную корреляцию с количеством кандиды в кишечной флоре. Одной из функций данного белка является способность стабилизировать внеклеточный матрикс с помощью связывания гиалуроновой кислоты, которая, в свою очередь, будучи способной вырабатываться в различных клетках кишечника, играет важную роль в модуляции иммунных реакций [40]. Отрицательная корреляция данного белка с кандидой скорее всего свидетельствует о том, что при увеличении количества этого белка количество связанной внеклеточной гиалуроновой кислоты увеличивается, усиливая таким образом иммунный ответ клеток и, как следствие, снижая количество кандиды.

Как было указано выше, одним из свойств белка HRG, описанным в литературе, является способность лизировать клетки *Candida spp* и некоторых других бактерий [23]. При анализе коэффициента регрессии очевидно, что количество HGR отрицательно коррелирует с количеством *Candida spp*, т.е. с увеличением количества этого белка в крови количество кандиды в кишечнике уменьшается, что подтверждает имеющиеся в литературе данные.

Enterobacter spp. Энтеробактер – род грамотрицательных палочкообразных неспорообразующих бактерий, являющихся факультативными анаэробами. В норме количество *Enterobacter spp* в кишечнике не должно превышать 10^4 КОЕ/мл. Избыточный рост энтеробактера является одним из признаков дисбактериоза.

Белки, с которыми выявлена корреляция количества энтеробактер, представлены на рис. 7 и рис. 8.

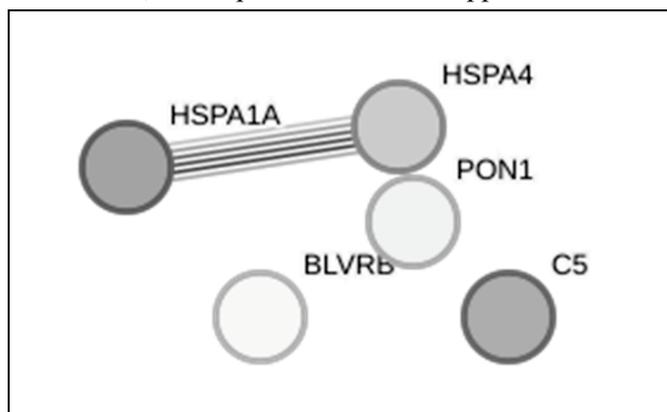


Рис. 7. Взаимосвязь белков, коррелирующих с *Enterobacter spp*
Fig. 7. Relationship of proteins correlated with *Enterobacter spp*

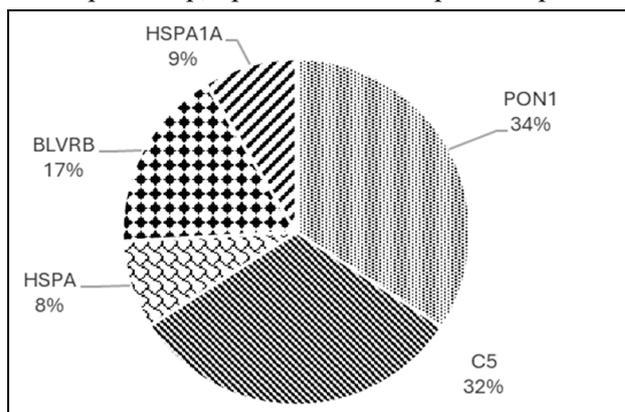


Рис. 8. Вклад белков с изменением количества *Enterobacter spp* (по данным регрессионного анализа)
Fig. 8. Contribution of proteins to changes in the number of *Enterobacter spp* (according to regression analysis)

Наиболее сильная корреляция была выявлена между количеством белка PON1 и количеством *Enterobacter spp*. Необходимо отметить, что этот белок также слабо коррелировал с количеством золоти-

стого стафилококка, и корреляция, как и в случае с энтеробактер, была отрицательной. Как было упомянуто выше, некоторые исследователи полагают, что белок PON1 может быть связан с врождённым иммунитетом и участвует в предотвращении заражения грамотрицательными бактериями [26]. В отличие от золотистого стафилококка, который является грамположительным, *Enterobacter spp* как раз являются грамотрицательными, что подтверждает выявленную взаимосвязь между количеством данного белка и дисбиотическими состояниями, вызванными грамотрицательными бактериями.

Белок C5 является частью врождённой иммунной системы организма. Он расщепляется на два компонента, один из которых увеличивает проницаемость кровеносных сосудов и привлекает воспалительные клетки, а второй связывается с компонентами комплемента, образуя мембраноатакующий комплекс, который атакует патоген. В проведённых авторами исследованиях количество белка C5 положительно коррелирует с количеством *Enterobacter spp*.

Оба белка HSPA1A (белок 1 теплового шока 70 кДа) и HSPA4 (член семейства белков теплового шока Hsp110), количество которых коррелировало с количеством энтеробактер, являются шаперонами, участниками клеточного протеостаза и белками, имеющими внеклеточные функции. Они реагируют на стресс и участвуют в различных патофизиологических процессах. У пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника было отмечено увеличение количества указанных белков в крови [41]. Примечательно, что в данном исследовании белок HSPA1A положительно коррелировал с количеством *Enterobacter spp*, в то время как для белка HSPA4 корреляция была отрицательной.

Анализ обогащения GO показал, что HSPA4 и взаимодействующие с ним гены участвуют не только в основном биологическом процессе ответа на температурный стимул, но также участвуют в прогрессировании инвазии, таких процессах, как аутофагия, регуляция убиквитинирования белка, связывание кадгерина, связывание молекулы клеточной адгезии и связывание белкового комплекса МНС класса II. Убиквитинирование играет решающую роль в обеспечении клеточного гомеостаза и жизнедеятельности, а aberrантная регуляция убиквитинирования может индуцировать различные типы рака [42]. Снижение уровня кадгерина и связывания молекул клеточной адгезии коррелирует с инвазивными состояниями [43]. МНС-II экспрессируется антигенпредставляющими клетками [44], представляя экзогенно полученные пептидные антигены CD4+ Т-клеткам. HSPA4 усиливает способность эндотелиальных клеток сосудов к ангиогенезу [45]. Отмечают, что HSPA4 обладает функцией репрессии в отношении экспрессии провоспалительных цитокинов [45]. Учитывая функции данного белка, его отрицательная корреляция с энтеробактер пока остаётся не до конца понятной.

Также была отмечена небольшая корреляция количества белка BLVRB (биливердин редуктазы В, катализирующей заключительную стадию метаболизма гема) с количеством *Enterobacter spp*, однако, учитывая функции этого белка в клетке, природу данной связи предстоит установить.

Таким образом, был выявлен ряд белков, количество которых достоверно коррелировало с количеством ряда условно-патогенных бактерий. Характер возможного взаимодействия белков с бактериями, а также то, положительная или отрицательная корреляция наблюдалась, вероятнее всего, зависит как от свойств белка, так и от родовой характеристики бактерий.

Заключение

В результате проведённых исследований были выявлены комплексы белков, количество которых коррелировало с количеством УПМ кишечной микробиоты. Все белки, уровень которых в крови хозяина коррелирует с числом разных УПМ, можно условно разделить на четыре группы в зависимости от функций и характера взаимодействия этих белков с различными микроорганизмами:

белки, связанные с функциями иммунной системы – PON1 (слабая отрицательная корреляция с количеством *S. aureus*, сильная отрицательная корреляция с *Enterobacter spp*); DPP3 (отрицательная корреляция с *S. haemolyticus*), ITIH3 (отрицательная корреляция с *Candida spp*), C5 (*Enterobacter spp*), CAST (положительная корреляция с *S. aureus*), TPP2 (отрицательная корреляция с *Candida spp*); ADD1 (положительная корреляция с *S. haemolyticus*), PSMD5, PSMC4 (для обоих – положительная корреляция с *Candida spp*);

белки, связанные с шаперонином TRiC/CCT – TCP1 (отрицательная корреляция с *S. aureus*); HSPA1A (положительная корреляция с *Enterobacter spp*), HSPA4 (отрицательная корреляция с *Enterobacter spp*);

белки, непосредственно связанные с определёнными бактериями, а также влияющие на закрепление бактериальных клеток или проникновение в клетку бактериальных токсинов – HRG (положительная

корреляция с *S. aureus*, отрицательная корреляция с *Candida spp*), A2M (положительная корреляция с *Candida spp*), GSTO1 (положительная корреляция с *S. aureus*), IGFALS (положительная корреляция с *Candida spp*), NSFL1C (отрицательная корреляция с *S. haemoliticus*), VCP (положительная корреляция с *S. haemoliticus*);

белки, имеющие высокий коэффициент регрессии при корреляции с некоторыми микроорганизмами, но не имеющие с их числом очевидной функциональной связи – YWANAB (отрицательная корреляция с *S. haemoliticus*), ADD1 (положительная корреляция с *S. haemoliticus*), PSMD5, PSMC4 (для обоих – положительная корреляция с *Candida spp*), TCP1 (отрицательная корреляция с *S. aureus*), CCT5 (отрицательная корреляция с *Candida spp*), GPI (отрицательная корреляция с *S. aureus*), NSFL1C (отрицательная корреляция с *S. haemoliticus*), VCP (положительная корреляция с *S. haemoliticus*).

Список источников

1. Fang X., Miao R., Wei J., Wu H., Tian J. Advances in multi-omics study of biomarkers of glycolipid metabolism disorder // Comput. Struct. Biotechnol. J. 2022. V. 20. P. 5935–5951.
2. Ильин В.К., Воложин А.И., Виха Г.В. Колонизационная резистентность организма в изменённых условиях обитания. М.: Наука. 2005. 280 с.
3. Плотникова Е.Ю., Краснова М.В., Баранова Е.Н., Борщ М.В. Непрошенные гости: избыточный бактериальный рост в тонкой кишке. Что делать? // Consilium medicum. Гастроэнтерология. 2013. № 1. С. 36–42.
4. Wells J.M. Immunomodulatory mechanisms of lactobacilli // Microb. Cell. 2011. V. 10(1). P. 17.
5. Hiramatsu Y., Hosono A., Takahashi K. et al. Bifidobacterium components have immunomodulatory characteristics dependent on the method of preparation // Cytotechnology. 2007. V. 55. P.79–87.
6. Дракина С.А., Перевощикова Н.К., Муратова Р.Н., Нурмехамитова Н.В. Пробиотики как средство профилактики ОРВИ у детей раннего возраста // МиД. 2019. Т. 77. № 2. С. 40–46.
7. Звягинцева Т.Д., Чернобай А.И., Гривнёва С.В. Кишечный микробиом и неалкогольная жировая болезнь печени: патогенетические взаимосвязи и коррекция пробиотиками // Гастроэнтерология, гепатология, колопроктология. 2016. Т. 39. № 1. С. 44–45.
8. Pabst R., Russell M.W., Brandtzaeg P. Tissue distribution of lymphocytes and plasma cells and the role of the gut // Trends Immunol. 2008. V. 29. P. 206–208.
9. Williams M., Thierry G.R., Bonnardel J., Bajenoff M. Establishment and maintenance of the macrophage niche // Immunity. 2020. V. 52. P. 434–451.
10. Heinsbroek S.E., Gordon S. The role of macrophages in inflammatory bowel diseases // Expert Rev. Mol. Med. 2009. V. 11. P. 14.
11. Qian Cao, Randall Tyler Mertens, Sivanathan K.N., Cai X., Xiao P. Macrophage orchestration of epithelial and stromal cell homeostasis in the intestine // J. Leukoc. Biol. 2022. V. 112(2). P. 313–331.
12. Turroni S., Magnani M., Lesnik P., Vidal H., Heer M. Gut Microbiome and Space Travelers' Health: State of the Art and Possible Pro/Prebiotic Strategies for Long-Term Space Missions // Frontiers in physiology. 2020. V. 11.
13. Ильин В.К., Комиссарова Д.В., Садчиков Е.Р., Гольдман И.Л., Колупаев А.К., Садчиков П.Е., Лукичёва Н.А., Жиганшина А.А., Усанова Н.А., Морозова Ю.А. Влияние приёма лактоферрина на кишечную микрофлору крыс при имитации микрогравитации // Биомедицинская радиоэлектроника. 2023. Т. 26. № 1. С. 82–88. DOI: 10.18127/j15604136-202301-09
14. Пастушкова Л.Х., Гончаров И.Н., Каширина Д.Н., Гончарова А.Г., Ларина И.М. Связь ряда достоверно изменяющихся белков крови с ангиогенезом после 21-суточной сухой иммерсии // Технологии живых систем. 2021. Т. 18. № 1. С. 51–57. DOI: 10.18127/j20700997-202101-05
15. Ильин В.К., Усанова Н.А., Комиссарова Д.В., Шеф К.А., Агуреев А.Н. Каспранский Р.Р., Каспранский Р.Р., Морозова Ю.А., Сахарова А.В., Носовский А.М. Сочетанное использование напитков брожения на основе сахаромидет и пробиотических и аутопробиотических препаратов для обеспечения нормализации микрофлоры человека в изоляционном эксперименте («SIRIUS-18/19») // Авиакосмическая экология и медицина. 2020. Т. 54. № 3. С. 49–53.
16. Пастушкова Л.Х., Гончарова А.Г., Каширина Д.Н., Ларина И.М., Ильин Е.А. Влияние гипобарической гипоксии на протеом плазмы крови здорового человека во время зимовки на Антарктической станции «Восток» // Биомедицинская радиоэлектроника. 2023. Т. 26. № 4. С. 5–14. DOI: 10.18127/j15604136-202304-01
17. Kashirina D., Brzhozovskiy A., Sun W., Pastushkova L., Popova O., Rusanov V., Nikolaev E., Larina I., Kononikhin A. Proteomic characterization of dry blood spots of healthy women during simulation the microgravity effects using dry immersion // Front. Physiol. 2022. V. 12. P. 7.
18. Кулаичев А.П. Методы и средства комплексного статистического анализа данных: Учеб. пособие. 5-е изд., перераб. и доп. М.: ИНФРА-М. 2017. 484 с.
19. Menon D., Innes A., Oakley A.J. GSTO1-1 plays a pro-inflammatory role in models of inflammation, colitis and obesity // Sci. Rep. 2017. V. 7. P. 15.
20. Everard A., Geurts L., Caesar R., et al. Intestinal epithelial MyD88 is a sensor switching host metabolism towards obesity according to nutritional status // Nat. Commun. 2015. V. 5. P. 12.
21. Vu B.G., Gourronc F.A., Bernlohr D.A., Schlievert P.M., Klingelhutz A.J. Staphylococcal superantigens stimulate immortalized human adipocytes to produce chemokines // PLOS ONE. 2013. V. 8(10).
22. Zhi Huang, Rose A., Hoffmann F., Hashimoto A., Bertino P., Denk T., Takano J., Iwata N., Saido T., Hoffmann P. Calpastatin prevents NF- κ B-mediated hyperactivation of macrophages and attenuates colitis // J. Immunol. 2013. V. 191(7). P. 3778–3788.
23. Rydengård V., Shannon O., Lundqvist K., Kasprzyk L., Chalupka A. Histidine-rich glycoprotein protects from systemic candida infection // PLOS Pathogens. 2008. V. 4(8).
24. Shannon O., Rydengård V., Schmidchen A., Mörgelin M., Per Alm M., Sørensen O., Björck L. Histidine-rich glycoprotein promotes bacterial entrapment in clots and decreases mortality in a mouse model of sepsis // Blood. 2010. V. 116 (13). P. 2365–2372.

25. Ruetz T., Cornick S., Guttman J.A. The spectrin cytoskeleton is crucial for adherent and invasive bacterial pathogenesis // PLOS ONE. 2011. V 6(5). P. e19940.
26. Mackness M., Mackness B. Human paraoxonase-1 (PON1): Gene structure and expression, promiscuous activities and multiple physiological roles // Gene. 2015. V. 567(1). P. 12–21.
27. Clough B., Fisch D., Mize T., Encheva V., Snijders A., Frickel E-M. p97/VCP targets Toxoplasma gondii vacuoles for parasite restriction in interferon-stimulated human cells // BioRxiv. 2023. P. 45566. DOI: <https://doi.org/10.1101/2023.06.20.545566>
28. Grdiša M., Vitale L. Types and localization of aminopeptidases in different human blood cells // Int. J. Biochem. 1991. V. 23(3). P. 339–345.
29. Thauland T.J., Khan H.A., Butte M.J. The actin-capping protein alpha-adducin is required for T-cell costimulation // Front. Immunol. 2019. V. 10. P. 2706.
30. Hendriks A., Mnich M.E., Clemente B., Cruz A.R., Tavarini S., Bagnoli F., Soldaini E. Staphylococcus aureus-specific tissue-resident memory CD4+ T cells are abundant in healthy human skin // Front. Immunol. 2021. V. 12. P. 642711.
31. Ben-Neriah Y. Regulatory functions of ubiquitination in the immune system // Nat. Immunol. 2002. V. 3. P. 20–26.
32. Fon Huang K., Chung Dai H., Herndon David N. Insulin-like Growth factor 1 (igf-1) reduces gut atrophy and bacterial translocation after severe burn injury // Archives of Surgery. 1993. V. 128(1). P. 47–53.
33. Schroeder B. Fight them or feed them: how the intestinal mucus layer manages the gut microbiota // Gastroenterology Report. 2019. V. 7(1). P. 3–12.
34. Omar K.H. Domi B., Darmani H. Syzygium aromaticum extracts debilitate Candida albicans by radically inhibiting its morphological plasticity and biofilm formation // Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants. 2023. V. 29(4). P. 392–404.
35. Jensen E., Young J., Mathes S., List E., Carroll R., Kuhn J., Onusko M., Kopchick J., Murphy E., Berryman D. Crosstalk between the growth hormone/insulin-like growth factor-1 axis and the gut microbiome: A new frontier for microbial endocrinology // Growth Hormone & IGF Research. 2020. V. 53–54. P. 101333.
36. Chen J., Toyomasu Y., Hayashi Y. Altered gut microbiota in female mice with persistent low body weights following removal of post-weaning chronic dietary restriction // Genome Med. 2016. V. 8(1). P. 103.
37. Zheng Yu., Song Y., Han Q., Liu W., Xu J., Yu Z., Zhang R, Li N. Intestinal epithelial cell-specific IGF1 promotes the expansion of intestinal stem cells during epithelial regeneration and functions on the intestinal immune homeostasis // American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism. 2018. V. 315(4). P. 638–649.
38. Kubinak J., Stephens W., Soto R. MHC variation sculpts individualized microbial communities that control susceptibility to enteric infection // Nat. Commun. 2015. V. 6. P. 8642.
39. Marín E., Parra-Giraldo C.M., Hernández-Haro C., Hernáez M.L., Nombela C., Monteoliva L., Gil C. Candida albicans Shaving to Profile Human Serum Proteins on Hyphal Surface // Front. Microbiol. 2015. V. 6. P. 1343.
40. Bosi A., Banfi D., Bistoletti M., Moretto P., Moro E., Crema F., Maggi F., Karousou E., Viola M., Passi A. Hyaluronan: A Neuro-immune Modulator in the Microbiota-Gut Axis // Cells. 2022. V. 11(1). P. 126.
41. Hoter A., Naim H.Y. The Functions and therapeutic potential of heat shock proteins in inflammatory bowel disease – an update // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20(21). P. 5331.
42. Deng X., Gao F., Flagg T., Anderson J., May W.S. Bcl2's flexible loop domain regulates p53 binding and survival // Mol. Cell Biol. 2006. V. 26(12). P. 4421–4434.
43. Ito N., Kii I., Shimizu N. Direct reprogramming of fibroblasts into skeletal muscle progenitor cells by transcription factors enriched in undifferentiated subpopulation of satellite cells // Sci. Rep. 2018. V. 7(1). P. 8097.
44. Kambayashi T., Laufer T.M. Atypical MHC class II-expressing antigen-presenting cells: can anything replace a dendritic cell? // Nat. Rev. Immunol. 2014. V. 14(11). P. 719–730.
45. Li S.C., Lan K.-C., Hung H.-N., Huang W.-T., Lai Y.-J., Cheng H.-H., Tsai C.-C., Huang K.-L., You H.-L., Hsu T.-Y. HSPA4 is a biomarker of placenta accreta and enhances the angiogenesis ability of vessel endothelial cells // Int. J. Mol. Sci. 2022. V. 23. P. 5682.

Информация об авторах

Дарья Валерьевна Комиссарова – к.б.н., ст. науч. сотрудник, зам. зав. отделом

SPIN-код: 2800-9048

Дарья Николаевна Каширина – к.б.н., ст. науч. сотрудник

SPIN-код: 3727-7213

Людмила Ханифовна Пастушкова – д.б.н., вед. науч. сотрудник

SPIN-код: 2548-6677

Анна Георгиевна Гончарова – д.м.н., вед. науч. сотрудник

SPIN-код: 1483-4641

Нонна Альбертовна Усанова – ст. науч. сотрудник

SPIN-код: не представлен

Олег Игоревич Орлов – д.м.н., профессор, академик РАН, директор

SPIN-код: 8253-7817

Ирина Михайловна Ларина – д.м.н., зав. лабораторией протеомики

SPIN-код: 5119-2921

Вячеслав Константинович Ильин – д.м.н., профессор, член-корр. РАН, зав. отделом

SPIN-код: не представлен

Статья поступила в редакцию 15.11.2023

Одобрена после рецензирования 26.11.2023

Принята к публикации 23.01.2024

Opportunistic microflora of the human intestine and the host blood proteome – search for connection

D.V. Komissarova¹, D.N. Kashirina², L.Kh. Pastushkova³, A.G. Goncharova⁴,
N.A. Usanova⁵, O.I. Orlov⁶, I.M. Larina⁷, V.K. Ilyin⁸

¹⁻⁸ State Scientific Center of the Russian Federation –

Institute of Biomedical Problems of the Russian Academy of Sciences (Moscow, Russia)

¹ d.komissarova@yandex.ru, ² daryakudryavtseva@mail.ru, ³ lpastushkova@mail.ru,

⁴ goncharova.anna@gmail.com, ⁵ usanovasp@mail.ru, ⁶ info@imbp.ru,

⁷ irina.larina@gmail.com, ⁸ piton2004@bk.ru

Abstract

The mammalian gut is a place where numerous external and internal signals constantly converge. Intestinal cells that influence the quantitative and qualitative composition of the microbiota are influenced by the blood proteome. Of particular interest is the study of the relationship between the level of proteins in human blood and the number of opportunistic microorganisms of the intestinal biotope in experiments simulating certain effects of space flight, for example, in “dry” immersion, since it is known that space mission factors negatively affect the microflora of the upper respiratory tract and intestines.

The purpose of this study was to identify the relationship between the levels of proteins in human blood, studied using proteomics methods based on mass spectrometry, with the number of opportunistic microorganisms in a 3-day “dry” immersion experiment.

6 female volunteers from 25 to 40 years old took part in the study. During the experiment, the participants did not take antibacterial drugs or other drugs that could affect the microflora. As a result of the studies, protein complexes were identified, the number of which correlated with the amount of opportunistic intestinal microbiota and which can be divided into 4 groups: proteins associated with the functions of the immune system, proteins associated with chaperonin, proteins affecting the attachment of bacterial cells or penetration of bacterial toxins into the cell, proteins that have a high regression coefficient when correlated with some microorganisms, but do not have an obvious functional connection with their number.

The data obtained confirm the hypothesis that there is a relationship between some blood proteins and intestinal microorganisms.

The study of the relationship between the concentration of proteins in the blood and the number of bacteria in the intestines seems relevant both for maintaining the health of cosmonauts and for “terrestrial” medicine, since it allows not only to identify deep relationships in the “host-microbiota” system, but can also serve diagnostic purposes in within the framework of clinical trials.

Keywords

Blood proteome, opportunistic microflora, intestines, dry immersion

For citation

Komissarova D.V., Kashirina D.N., Pastushkova L.Kh., Goncharova A.G., Usanova N.A., Orlov O.I., Larina I.M., Ilyin V.K. Opportunistic microflora of the human intestine and the host blood proteome – search for connection. Technologies of Living Systems. 2024. V. 21. № 1. P. 5–19. DOI: <https://doi.org/10.18127/j20700997-202401-01> (In Russian)

References

1. Fang X., Miao R., Wei J., Wu H., Tian J. Advances in multi-omics study of biomarkers of glycolipid metabolism disorder. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 2022. V. 20. P. 5935–5951.
2. Ilin V.K., Volozhin A.I., Vikha G.V. *Kolonizatsionnaya rezistentnost organizma v izmenennykh usloviyakh obitaniya.* M.: Nauka. 2005. 280 s. (in Russian).
3. Plotnikova E.Yu., Krasnova M.V., Baranova E.N., Borshch M.V. Neproshennyye gosti: izbytochnyy bakterialnyy rost v tonkoy kishke. Chto delat? *Consilium medicum. Gastroenterologiya.* 2013. № 1. S. 36–42. (in Russian).
4. Wells J.M. Immunomodulatory mechanisms of lactobacilli. *Microb. Cell.* 2011. V. 10(1). P. 17.
5. Hiramatsu Y., Hosono A., Takahashi K. et al. Bifidobacterium components have immunomodulatory characteristics dependent on the method of preparation. *Cytotechnology.* 2007. V. 55. P.79–87.
6. Drakina S.A., Perevoshchikova N.K., Muratova R.N., Nurmekhamitova N.V. Probiotiki kak sredstvo profilaktiki ORVI u detey rannego vozrasta. *MiD.* 2019. T. 77. № 2. S. 40–46. (in Russian).
7. Zvyagintseva T.D., Chernobay A.I., Gridneva S.V. Kishechnyy mikrobiom i nealkogolnaya zhirovaya bolezn pecheni: patogeneticheskiye vzaimosvyazi i korrektsiya probiotikami. *Gastroenterologiya. gepatologiya. koloproktologiya.* 2016. T. 39. № 1. S. 44–45. (in Russian).
8. Pabst R., Russell M.W., Brandtzaeg P. Tissue distribution of lymphocytes and plasma cells and the role of the gut. *Trends Immunol.* 2008. V. 29. P. 206–208.
9. Guillems M., Thierry G.R., Bonnardel J., Bajenoff M. Establishment and maintenance of the macrophage niche. *Immunity.* 2020. V. 52. P. 434–451.
10. Heinsbroek S.E., Gordon S. The role of macrophages in inflammatory bowel diseases. *Expert Rev. Mol. Med.* 2009. V. 11. P. 14.
11. Qian Cao, Randall Tyler Mertens, Sivanathan K.N., Cai X., Xiao P. Macrophage orchestration of epithelial and stromal cell homeostasis in the intestine. *J. Leukoc. Biol.* 2022. V. 112(2). P. 313–331.
12. Turrone S., Magnani M., Lesnik P., Vidal H., Heer M. Gut Microbiome and Space Travelers' Health: State of the Art and Possible Pro/Prebiotic Strategies for Long-Term Space Missions. *Frontiers in physiology.* 2020. V. 11.

13. Ilin V.K., Komissarova D.V., Sadchikova E.R., Goldman I.L., Kolupayev A.K., Sadchikov P.E., Lukicheva N.A., Zhiganshina A.A., Usanova N.A., Morozova Yu.A. Vliyaniye priyema laktoferrina na kishchnuyu mikrofloru kryz pri imitatsii mikrogravitatsii. *Biomeditsinskaya radioelektronika*. 2023. T. 26. № 1. S. 82–88. DOI: 10.18127/j15604136-202301-09 (in Russian).
14. Pastushkova L.Kh., Goncharov I.N., Kashirina D.N., Goncharova A.G., Larina I.M. Svyaz ryada dostoverno izmenyayushchikhsya belkov krovi s angiogenezom posle 21-sutochnoy sukhoj immersii. *Tekhnologii zhivyykh sistem*. 2021. T. 18. № 1. S. 51–57. DOI: 10.18127/j20700997-202101-05 (in Russian).
15. Ilin V.K., Usanova N.A., Komissarova D.V., Shef K.A., Agureyev A.N. Kaspranskiy R.R., Kaspranskiy R.R., Morozova Yu.A., Sakharova A.V., Nosovskiy A.M. Sochetannoye ispolzovaniye napitkov brozheniya na osnove sakharomitset i probioticheskikh i autoprobioticheskikh preparatov dlya obespecheniya normalizatsii mikroflory cheloveka v izolyatsionnom eksperimente («SIRIUS-18/19»). *Aviakosmicheskaya ekologiya i meditsina*. 2020. T. 54. № 3. S. 49–53. (in Russian).
16. Pastushkova L.Kh., Goncharova A.G., Kashirina D.N., Larina I.M., Ilin E.A. Vliyaniye gipobaricheskoy gipoksii na proteom plazmy krovi zdorovogo cheloveka vo vremya zimovki na Antarkticheskoy stantsii «Vostok». *Biomeditsinskaya radioelektronika*. 2023. T. 26. № 4. S. 5–14. DOI: 10.18127/j15604136-202304-01 (in Russian).
17. Kashirina D., Brzhozovskiy A., Sun W., Pastushkova L., Popova O., Rusanov V., Nikolaev E., Larina I., Kononikhin A. Proteomic characterization of dry blood spots of healthy women during simulation the microgravity effects using dry immersion. *Front. Physiol.* 2022. V. 12. P. 7.
18. Kulaichev A.P. *Metody i sredstva kompleksnogo statisticheskogo analiza dannykh: Ucheb. posobiye. 5-e izd., pererab. i dop. M.: INFRA-M. 2017. 484 s. (in Russian).*
19. Menon D., Innes A., Oakley A.J. GSTO1-1 plays a pro-inflammatory role in models of inflammation, colitis and obesity. *Sci. Rep.* 2017. V. 7. P. 15.
20. Everard A., Geurts L., Caesar R., et al. Intestinal epithelial MyD88 is a sensor switching host metabolism towards obesity according to nutritional status. *Nat. Commun.* 2015. V. 5. P. 12.
21. Vu B.G., Gourronc F.A., Bernlohr D.A., Schlievert P.M., Klingelutz A.J. Staphylococcal superantigens stimulate immortalized human adipocytes to produce chemokines. *PLOS ONE*. 2013. V. 8(10).
22. Zhi Huang, Rose A., Hoffmann F., Hashimoto A., Bertino P., Denk T., Takano J., Iwata N., Saido T., Hoffmann P. Calpastatin prevents NF- κ B-mediated hyperactivation of macrophages and attenuates colitis. *J. Immunol.* 2013. V. 191(7). P. 3778–3788.
23. Rydengård V., Shannon O., Lundqvist K., Kacprzyk L., Chalupka A. Histidine-rich glycoprotein protects from systemic candida infection. *PLOS Pathogens*. 2008. V. 4(8).
24. Shannon O., Rydengård V., Schmidtchen A., Mörgelin M., Per Alm M., Sørensen O., Björck L. Histidine-rich glycoprotein promotes bacterial entrapment in clots and decreases mortality in a mouse model of sepsis. *Blood*. 2010. V. 116 (13). P. 2365–2372.
25. Ruetz T., Cornick S., Guttman J.A. The spectrin cytoskeleton is crucial for adherent and invasive bacterial pathogenesis. *PLOS ONE*. 2011. V. 6(5). P. e19940.
26. Mackness M., Mackness B. Human paraoxonase-1 (PON1): Gene structure and expression, promiscuous activities and multiple physiological roles. *Gene*. 2015. V. 567(1). P. 12–21.
27. Clough B., Fisch D., Mize T., Encheva V., Snijders A., Fricke E-M. p97/VCP targets *Toxoplasma gondii* vacuoles for parasite restriction in interferon-stimulated human cells. *BioRxiv*. 2023. P. 45566. DOI: <https://doi.org/10.1101/2023.06.20.545566>
28. Grdiša M., Vitale L. Types and localization of aminopeptidases in different human blood cells. *Int. J. Biochem.* 1991. V. 23(3). P. 339–345.
29. Thauland T.J., Khan H.A., Butte M.J. The actin-capping protein alpha-adducin is required for T-cell costimulation. *Front. Immunol.* 2019. V. 10. P. 2706.
30. Hendriks A., Mnich M.E., Clemente B., Cruz A.R., Tavarini S., Bagnoli F., Soldaini E. *Staphylococcus aureus*-specific tissue-resident memory CD4+ T cells are abundant in healthy human skin. *Front. Immunol.* 2021. V. 12. P. 642711.
31. Ben-Neriah Y. Regulatory functions of ubiquitination in the immune system. *Nat. Immunol.* 2002. V. 3. P. 20–26.
32. Fon Huang K., Chung Dai H., Herndon David N. Insulin-like Growth factor 1 (igf-1) reduces gut atrophy and bacterial translocation after severe burn injury. *Archives of Surgery*. 1993. V. 128(1). P. 47–53.
33. Schroeder B. Fight them or feed them: how the intestinal mucus layer manages the gut microbiota. *Gastroenterology Report*. 2019. V. 7(1). P. 3–12.
34. Omar K.H. Domi B., Darmani H. *Syzygium aromaticum* extracts debilitate *Candida albicans* by radically inhibiting its morphological plasticity and biofilm formation. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*. 2023. V. 29(4). P. 392–404.
35. Jensen E., Young J., Mathes S, List E., Carroll R., Kuhn J., Onusko M., Kopchick J., Murphy E, Berryman D. Crosstalk between the growth hormone/insulin-like growth factor-1 axis and the gut microbiome: A new frontier for microbial endocrinology. *Growth Hormone & IGF Research*. 2020. V. 53–54. P. 101333.
36. Chen J., Toyomasu Y., Hayashi Y. Altered gut microbiota in female mice with persistent low body weights following removal of post-weaning chronic dietary restriction. *Genome Med.* 2016. V. 8(1). P. 103.
37. Zheng Yu., Song Y., Han Q., Liu W., Xu J., Yu Z., Zhang R, Li N. Intestinal epithelial cell-specific IGF1 promotes the expansion of intestinal stem cells during epithelial regeneration and functions on the intestinal immune homeostasis. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2018. V. 315(4). P. 638–649.
38. Kubinak J., Stephens W., Soto R. MHC variation sculpts individualized microbial communities that control susceptibility to enteric infection. *Nat. Commun.* 2015. V. 6. P. 8642.
39. Marín E., Parra-Giraldo C.M., Hernández-Haro C., Hernández M.L., Nombela C., Monteoliva L., Gil C. *Candida albicans* Shaving to Profile Human Serum Proteins on Hyphal Surface. *Front. Microbiol.* 2015. V. 6. P. 1343.
40. Bosi A., Banfi D., Bistoletti M., Moretto P., Moro E., Crema F., Maggi F., Karousou E., Viola M., Passi A. Hyaluronan: A Neuroimmune Modulator in the Microbiota-Gut Axis. *Cells*. 2022. V. 11(1). P. 126.
41. Hoter A., Naim H.Y. The Functions and therapeutic potential of heat shock proteins in inflammatory bowel disease – an update. *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20(21). P. 5331.
42. Deng X., Gao F., Flagg T., Anderson J., May W.S. Bcl2's flexible loop domain regulates p53 binding and survival. *Mol. Cell Biol.* 2006. V. 26(12). P. 4421–4434.
43. Ito N., Kii I., Shimizu N. Direct reprogramming of fibroblasts into skeletal muscle progenitor cells by transcription factors enriched in undifferentiated subpopulation of satellite cells. *Sci. Rep.* 2018. V. 7(1). P. 8097.

44. Kambayashi T., Laufer T.M. Atypical MHC class II-expressing antigen-presenting cells: can anything replace a dendritic cell?. *Nat. Rev. Immunol.* 2014. V. 14(11). P. 719–730.
45. Li S.C., Lan K.-C., Hung H.-N., Huang W.-T., Lai Y.-J., Cheng H.-H., Tsai C.-C., Huang K.-L., You H.-L., Hsu T.-Y. HSPA4 is a biomarker of placenta accreta and enhances the angiogenesis ability of vessel endothelial cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. P. 5682.

Information about the authors

Daria V. Komissarova – Ph.D. (Biol.), Senior Research Scientist, Deputy Head of Department

Daria N. Kashirina – Ph.D. (Biol.), Senior Research Scientist

Lyudmila H. Pastushkova – Dr.Sc. (Biol.), Leading Research Scientist

Anna G. Goncharova – Dr.Sc. (Med.), Leading Research Scientist

Nonna A. Usanova – Senior Research Scientist

Oleg I. Orlov – Dr.Sc. (Med.), Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Director

Irina M. Larina – Dr.Sc. (Med.), Head of the Proteomics Laboratory

Vyacheslav K. Ilyin – Dr.Sc. (Med.), Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Head of Department

The article was submitted 15.11.2023

Approved after reviewing 26.11.2023

Accepted for publication 23.01.2024