

БИОЛОГИЯ

МРНТИ 34.27.17

*С.М.Шайхин¹, Г.К.Абитаева¹, А.К.Молдагулова¹,
Д.С.Шайхина¹, Э.Е.Бекенова¹,
З.С.Сармурзина¹, К.Д.Закарья¹, А.Б.Абжалелов¹*

¹Республиканская коллекция микроорганизмов,
г. Астана, Казахстан

ВЛИЯНИЕ СТРЕССА НА СВОЙСТВА ЛАКТОБАКТЕРИЙ

Аннотация. Условия пребывания в желудочно-кишечном тракте организма млекопитающих являются крайне опасными для жизни микробов из-за присутствия желчи, кислот, ферментов и других факторов стресса, как осмотический и окислительный, недостаток питания и присутствие антимикробных продуктов. В отношении адаптации к организму хозяина пробиотических микробов обзор литературы показал, что структуры клеточной поверхности, шапероны, специальные регуляторные системы и экспортеры и/или ферменты выявляют способность у определенных штаммов лактобактерий выживать в условиях кислого или желчевого стресса. Пробиотические МКБ взаимодействуют с разными рецепторами иммунных клеток и оказывают модулирующее влияние на функции эпителиальных клеток. Некоторые из этих взаимодействий схожи с таковыми для патогенов и отсутствуют у резидентных и комменсальных микробов. Поскольку у МКБ отсутствуют ткань-разрушающие функции и природные факторы вирулентности, в конечном итоге их взаимодействие с хозяином в целом полезно.

Ключевые слова: лактомолекулярные механизмы, устойчивость микробов к стрессу, адаптация лактобактерий.



Түйіндемe. Сүтқоректілер организмдерінің асқазан-ішек жолында болу шарттары микробтардың өміріне өте қауіпті, өттің, қышқылдың, ферменттердің және басқа да стресс сияқты факторлардың, осмостің және қышқылдың жетіспеушілігі, микробқа қарсы өнімдердің қатысуы болып табылады. Пробиотикалық микробтардың иесін организмге қатысты бейімде-

лу әдебиетке шолуда көрсеткендей, жасуша бетінің құрылымдары, шаперондар, арнайы реттеуші жүйелер мен экспорттаушылар және/немесе ферменттер, белгілі бір штамдарының лактобактериясы қышқыл немесе желчевиялық стресс кезіндегі қабілетін анықтайды. Пробиотикалық СҚБ әр түрлі иммундық жасушалардың рецепторларымен өзара іс-қимыл жасайды және эпителилі жасушалардың функцияларына модульдық әсер көрсетеді. Резиденттық және комменсальдық микробтар жоқ болса, осындай патогендердің кейбіреулері өзара ұқсас. Өйткені СҚБ-да жасуша бұзатын функциялары және табиғи факторлардың вируленттары, сайып келгенде, олардың өзара іс-қимыл иесі, тұтастай алғанда пайдалы.

Түйінді сөздер: молекулярлы механизм, стресске тұрақтылығы, лактобактерия, бейімделу.



Abstract. Conditions of stay in the gastrointestinal tract of the mammalian organism are extremely dangerous for the life of microbes due to the presence of bile, acids, enzymes and other stress factors such as osmotic and oxidative, lack of nutrition, and the presence of antimicrobial products. Concerning the adaptation of probiotic microbes to the host organism, a review of the literature has shown that cell surface structures, chaperones, special regulatory systems and exporters and / or enzymes determine the ability of certain strains of lactobacilli to survive in conditions of acidic or bile stress. Probiotic LABs interact with different receptors of immune cells and have a modulating effect on the functions of epithelial cells. Some of these interactions are similar to those for pathogens and are absent in resident and commensal microbes. Since tissue - destructive functions and natural factors of virulence lack in the LAB, ultimately their interaction with the host is generally beneficial.

Key words: molecular mechanism, stress tolerance, adaptation of lactobacterig.

Введение. Становится все более очевидным, что человеческий организм находится в полной гармонии со сложной экосистемой, которая состоит более чем из 1000 различных видов бактерий, населяющих ротовую полость, верхние дыхательные пути, желудочно-кишечный тракт (ЖКТ), влагалище и кожу. Эти бактерии, известные как микробиота, расселяются в организме сразу после рождения и сохраняются на протяжении всей жизни. Вместе взятые, эти микробы выполняют важную роль в физиологии хозяина, в том числе переваривании и усвоении питательных веществ, защите от патогенов, модуляции иммунного ответа, регуляции накопления жира и стимуляции кишечного

ангиогенеза [1]. Тем не менее понимание того, как различные виды этих бактерий влияют на здоровье человека, остается серьезной проблемой. Как следует из определения, пробиотическая бактерия является "живым микроорганизмом, который при введении достаточных его количеств, полезен для хозяина" [2]. Именно с учетом этого определения в данной области исследуется главным образом воздействие конкретных штаммов, например из функциональных продуктов питания, на здоровье организма-хозяина. Хотя термин "пробиотик" не может быть использован просто как синоним для возможных полезных микробов из состава микрофлоры, все же именно микроорганизмы из человеческой микрофлоры часто являются источниками, из которых выделяют пробиотики на основе таких очевидных и полезных свойств, как выживаемость и выносливость в условиях стресса, присущих организму-хозяину, безопасность и стабильность [3].

В то время как бифидобактерии и другие роды бактерий все чаще применяются в качестве пробиотиков, этот обзор касается лактобактерий, учитывая их длительную историю в традиционном употреблении в пищу продуктов брожения, получаемых от животных (молоко и мясо и т.п.) и от растений (фрукты, овощи и т.п.).

Лактобактерии, или молочнокислые бактерии, получили свое название по основному конечному продукту обмена углеводов, которым является молочная кислота. Род *Lactobacillus* объединяет большую гетерогенную группу грамположительных, не образующих спор анаэробных бактерий с низким содержанием G+C [4]. Таксономически род *Lactobacillus* принадлежит к типу *Firmicutes* класса бацилл и порядка *Lactobacillales*, семьи *Lactobacillaceae*. Они привередливы в питании, требуют богатой среды для роста (углеводы, аминокислоты, пептиды, эфиры жирных кислот, соли, нуклеиновые кислоты и витамины) [5].

Кроме ключевой роли в брожении продуктов питания, молочнокислые бактерии (МКБ) обитают в желудочно-кишечном тракте человека и животных в различных количествах в зависимости от вида и возраста хозяина, или расположения в кишечнике. Однако трудно отличить истинно автохтонные МКБ от аллох-

тонных, т.е. бактерий, временно находящихся в желудочно-кишечном тракте организма-хозяина, например, из ферментированных пищевых продуктов или из ротовой полости, которая служит местообитанием для значительного количества МКБ [6]. Последние, по-видимому, составляют лишь незначительную часть фекальной микрофлоры взрослого человека, т.е. около 0,01-0,6 % от общего числа бактерий [7-10]. *L. gasseri*, *L. reuteri*, *L. crispatus*, *L. salivarius* и *L. ruminis*, являются преобладающими автохтонными видами *Lactobacillus* [6]. *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. johnsonii*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. delbrueckii*, *L. curvatus*, и *L. sakei* также можно найти в желудочно-кишечном тракте человека в меняющихся количествах [6,11]. Хотя и не столь поддающиеся обнаружению, МКБ все же находятся в образцах биопсии из желудка, тонкого кишечника и толстой кишки, но в значительно меньшем количестве [6].

В отличие от желудочно-кишечного тракта наличие МКБ более выражено в женском мочеполовом тракте, где они часто доминируют над здоровой микрофлорой [12,13]. Наиболее часто встречаемыми видами, обитающими во влагалище, являются *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners* и *L. jensenii* [14-17]. Кроме того, в здоровом организме стабильное расселение *Lactobacillus*, по-видимому, является хорошей защитой против урогенитальной инфекции и бактериального вагиноза [18].

Полезные функции лактобактерий в организме-хозяина. Показано, что МКБ в различных условиях оказываются полезными для здоровья. Наилучшим подтверждением являются лечение и профилактика кишечных инфекций и постантибиотических синдромов. В результате нескольких мета-анализов установлена эффективность некоторых МКБ в острой инфекционной диарее и профилактике антибиотик-ассоциированной диареи [19]. Пробиотические молочнокислые бактерии имеют общепризнанный высокий статус безопасности "GRAS" ("generally-regarded-as-safe"). И только в редких случаях имеются сообщения об инфекциях, предположительно вызванных пробиотическими лактобактериями, у пациентов с ослабленным иммунитетом или у пациентов с тяжелыми заболеваниями [20,21].

Основные механизмы действия лактобактерий. Применение пробиотических МКБ следует из главного предположения о том, что механизмы, которые составляют основу лечебных свойств МКБ, относятся к одной из следующих категорий, иногда перекрывающихся [22-24]:

- 1) ингибирование патогенов и восстановление микробного гомеостаза путем микроб-микробных взаимодействий;
- 2) усиление функции эпителиального барьера;
- 3) модуляция иммунного ответа.

Предложены еще несколько важных механизмов, таких, как деградация токсинных рецепторов, конкуренция за питательные вещества, производство ингибирующих веществ, антипролиферативные эффекты и блокирование участков адгезии [22]. Компоненты бактериальных клеток, такие как ДНК или пептидогликан, также могут участвовать в функциональном механизме пробиотиков. Эффективность пробиотика для потенциального применения в качестве профилактического средства или средства для лечения конкретного заболевания определяется его способностью обладать всеми или многими из этих характерных признаков [22]. Свойство МКБ ингибировать патогены – хорошо известно, так как МКБ веками использовались человеком при хранении продуктов от микробного заражения. Последовательно у МКБ исследовались иммуностимулирующие (адъюванты) и иммунорегулирующие свойства, например, болезнь воспаленного кишечника. Поскольку пробиотики применяются при лечении ЖКТ в форме напитков, продуктов питания или таблеток, свойство МКБ укреплять эпителиальный барьер стенки кишечника против патогенов и токсинов – также все больше привлекает внимание исследователей.

Вследствие комплексного проявления этих функций МКБ разные штаммы вызывают разные ответы в организме-хозяине, поэтому результаты, полученные для одного штамма МКБ, не могут распространяться на другие штаммы. При изучении свойств определенного штамма МКБ важно учитывать его штамм-специфические свойства, например, экспрессировать особые поверхностные молекулы или секретировать белки и метаболиты

ты при взаимодействии с клетками организма-хозяина.

Адаптация и пробиотические факторы лактобактерий. Считается, что механизм действия пробиотических МКБ можно изучать в основном на уровне ответных реакций хозяина. Молекулярные же исследования пробиотических штаммов менее изучены. Однако они являются крайне важными ввиду значительных различий между штаммами, с одной стороны, и возникающими противоречиями между результатами исследований *in vitro* и результатами клинических испытаний штаммов МКБ, с другой стороны. Молекулярные исследования пробиотических микробов преследуют важные цели, а именно:

- подбор лучших условий для проявления пробиотических свойств;
- выбор нового штамма с хорошо известными молекулярными критериями.

Существуют 2 главных фактора, вносящих вклад в оптимальную работу пробиотических МКБ. Во-первых, это факторы, которые позволяют бактериям оптимально адаптироваться в новой, временно занятой нише в организме хозяина, т.е. адаптационные факторы. И, во-вторых, факторы, которые прямо отвечают за лечебный эффект, т.е. пробиотические факторы. Эти 2 категории факторов используются для характеристики устойчивых и активных микробов, обладающих лечебной функцией, и называемых пробиотиками [2]. Пробиотические факторы выполняют, как уже сказано выше, 3 основных функции:

- поддержание микробного баланса,
- защита эпителия,
- иммуномодуляция.

"Факторы адаптации" косвенно поддерживают пробиотическое действие, хотя прямо не отвечают за лечебный эффект и порой трудно провести грань между адаптационными и лечебными факторами. Адаптационные факторы включают: устойчивость к условиям стресса, активный метаболизм, адаптированный в условиях организма-хозяина, и адгезию МКБ к слизи и эпителиальной ткани. В этом аспекте много общего между патогенами, такими, как *Salmonella enterica serovar Typhimurium* и эн-

теропатогенами *Escherichia coli*, которые попадают в ЖКТ через продукты питания, и пробиотиками, назначаемыми при лечении. Обе группы микробов пытаются выжить в жестких условиях желудка и желчи, взаимодействуя с хозяином. Для патогенов это взаимодействие проходит по механизмам инвазии и патогенеза. Для пробиотиков это взаимодействие связано с заживлением, усилением симбиотического взаимодействия, от которого и микробы, и хозяин получают пользу. Таким образом, адаптационные и пробиотические факторы МКБ рассматриваются по аналогии с вирулентными факторами патогенов: одни факторы вносят вклад в выживание и адгезию патогена, а другие факторы, такие, как секреция токсина – прямо вызывают болезни [25].

Механизмы активного сопротивления лактобактерий стрессовым условиям в организме хозяина. Пробиотические лактобактерии при попадании в ЖКТ хозяина сталкиваются с различными неблагоприятными для физиологии бактерий условиями среды. Во-первых, они должны выжить в жестких условиях желудка. В организме человека в сутки секретируется 2,5 л желудочного сока, и в голодном состоянии уровень рН составляет 1,5, а при приеме пищи рН повышается до 3 и 5 [26]. О деталях влияния кислотного стресса на физиологию бактерий нет точной и полной картины. Понижение внутриклеточного рН уменьшает разницу по отношению к внеклеточному значению рН, т.е. уменьшает движущую силу протонов, дающую энергию для множества трансмембранных транспортных процессов. Внутриклеточное окисление также инактивирует чувствительные к кислоте ферменты и денатурирует белки и ДНК [27].

Печень в сутки секретирует примерно 1 л желчи в тонкий кишечник [28], что является еще одним вызовом для МКБ в желудочно-кишечном тракте. Желчные кислоты Bile Acids (BA) синтезируются из холестерина и конъюгируют с глицином или таурином. Хотя токсичность желчных кислот для бактерий неясна, молекулы BA, обладая поверхностно-активными, амфипатическими свойствами с потенциальной антимикробной активностью, действуют как детергенты, разрушая биологические мембраны. Кроме того, соли желчи, по-видимому, тоже индуцируют внутри-

клеточное окисление, так что многие механизмы устойчивости к желчи и кислотам схожи [28]. Действительно протонированная форма ВА, по-видимому, проявляет токсичность посредством внутриклеточного подкисления по аналогии с органическими кислотами, как молочная кислота, продуцируемая самими МКБ. Эти кислоты могут пассивно диффундировать в недиссоциированной форме через клеточные мембраны (или через транспортеры) и в цитоплазме быстро диссоциируют на протоны и заряженные производные, для которых клеточная мембрана уже непроницаема [27].

Помимо устойчивости к кислотам и желчи можно ожидать, что взаимодействие с другими микробами и с клетками иммунной системы и различными антимикробными продуктами, которые они секретируют, может дополнительно вызывать серьезную угрозу для пробиотических микроорганизмов. Остается неисследованной тема устойчивости МКБ к окислительному и осмотическому стрессу, которая развивается в некоторых работах для патогенов [29,30]. Интересен часто наблюдаемый феномен перекрестной адаптации, т.е. когда защита от одного стрессового фактора (ВА) также становится защитой против другого стрессового фактора (рН), предполагая некие общие механизмы [27,28,31]. В этой связи неактивно растущие в стационарной фазе клетки, как правило, более устойчивы к различным стрессам, чем клетки в ранней логарифмической фазе.

К настоящему моменту уже известен целый ряд мутантных фенотипов МКБ, выявленных в функциональном анализе устойчивости к стрессу в масштабе генома (таблица). Хотя эксперименты проводились в разных условиях культивирования (типы стресса, штаммы, время экспозиции и фазы роста), можно выделить несколько общих положений. Некоторые факторы имеют скорее неспецифичный вклад в устойчивость к стрессу, такие, например, как поддержание целостности клеточной стенки, защита и репарация макромолекул. Другие факторы специфичны, как, например, специально предназначенные чувствительные к стрессу экспортирующие системы. Более подробно

механизмы устойчивости к стрессу МКБ представлены в некоторых работах [26-28,31].

Поддержание целостности клеточной оболочки. Макромолекулы, из которых состоят клеточные мембраны и стенки МКБ, в разной степени вносят вклад в поддержание целостности клеточной оболочки в условиях стресса. Например, снижение значений pH вызывает изменения в составе жирных кислот клеточной мембраны штамма *L. casei* из ротовой полости [32]. Похожим образом соли желчных кислот вызывают изменения в клеточных мембранах *L. reuteri* CRL1098 [33]. Для некоторых МКБ были определены гены, вовлеченные в эти изменения, например, с использованием ДНК микрочип-анализа была обнаружена 2- и 3-кратная индукция гена с предположительной функцией фосфатидилглицерофосфатазы в *L. reuteri* ATCC 55730 после шока кислотой до pH 2.7 [34]. Кленхамер и коллеги также сообщили, что инактивация гена LBA1272 из штамма *L. acidophilus* NCFM, кодирующего синтазу циклопропановой жирной кислоты, повышает чувствительность к кислоте [35].

Кроме того, анализ эффектов кислотного стресса на МКБ позволил идентифицировать гены, участвующие в биосинтезе и упорядочении молекул пептидогликана (PG). В кислых условиях индуцируется ген эстеразы Ig1516 из семейства пенициллин-связывающих белков, как было показано с помощью того же ДНК микрочип-анализа экспрессии генов в *L. reuteri* ATCC 55730 [34]. Мутация гена Ig1516 значительно увеличивала чувствительность к стрессу кислотой. Интересно, что Вайтхэд и др. также идентифицировали ген Ig1516 как индуцируемый, но уже от желчи [36]. Они также подтвердили с помощью мутационного анализа важность этого гена для выживания МКБ в условиях желчного стресса. В дополнение к сказанному, с использованием ДНК микрочипов Пфейлер и др. идентифицировали относительно большое количество генов, по-разному экспрессированных в присутствии желчи. Это были гены, ответственные за биосинтез мембран, пептидогликана, и поверхностных белков (например, сортаза A, *srtA*) у *L. acidophilus* NCFM [37]. В экспериментах по действию соли желчи на *L. plantarum* WCFS1 и скрининг библиотеки клони-

Гены лактобактерий, предположительно вовлеченные в устойчивость к стрессу, и изученные с помощью мутантного анализа

Функциональная категория	Гены или теги локуса	Идентификационный метод	Предполагаемая функция	Организм	Фенотип мутанта	Ссылка на источник
1	2	3	4	5	6	7
51 Клеточная оболочка	lr1516	ДНК-микрочип анализ экспрессии генов	Предполагаемая эстераза, участвующая в биосинтезе и реорганизации пептидогликанов	<i>L. reuteri</i> ATCC 55730	Повышенная чувствительность к кислоте и желчи	34,36
	LBA1272	Специальный подход	Синтаза циклопропановой жирной кислоты	<i>L. acidophilus</i> NCFM	Повышенная чувствительность к кислоте	35
	<i>ditD</i>	Специальный подход	D-аланилирование LTA	<i>L. rhamnosus</i> GG	Повышенная чувствительность к искусственному желудочному соку (pH 2), повышенная чувствительность к дефенсинам	42

Продолжение табл.

1	2	3	4	5	6	7
Клеточная оболочка	<i>dltA</i>	Специальный подход	D-аланилирование LTA	<i>L. reuteri</i> 100-23	Снижение приспособленности к кислоте, повышенная чувствительность к дефенсину	43
	<i>slpA</i>	Специальный подход	Белок S-слоя	<i>L. acidophilus</i> NCFM	Повышенная устойчивость к желчи, снижение сопротивляемости осмотическому стрессу	35
	<i>cdpA</i>	Сравнительная геномика (слабое сходство с белками S-слоя)	Белок деления и разделения клеток	<i>L. acidophilus</i> NCFM	Повышенная устойчивость к желчи, снижение сопротивляемости к осмотическому стрессу	35,39
Защита и восстановление ДНК и белков	<i>dps</i>	Анализ экспрессии с помощью микрочипов	Защита ДНК во время голодания и других стрессов	<i>L. reuteri</i> ATCC 55730	Нет значительного увеличения чувствительности к желчи	36

Продолжение табл.

1	2	3	4	5	6	7
	<i>clpL</i>	Анализ экспрессии с помощью микро-чипов	Clp АТФаза (шаперон)	<i>L. reuteri</i> ATCC 55730	Повышенная чувствительность к кислоте и желчи	36,87
	<i>clpE</i>	Анализ экспрессии с помощью микро-чипов	Clp АТФаза (шаперон)	<i>L. reuteri</i> ATCC 55730	Нет значительного увеличения чувствительности к желчи	36
	<i>clpC</i>	R-IVET	Clp АТФаза (шаперон)	<i>L. plantarum</i> WCFS1	Сниженная способность к выживанию in vivo	55,56
	<i>msrB</i>	IVET	Метионин сульфоксид редуктаза (Msr)	<i>L. reuteri</i> 100-23	Сниженная способность к выживанию in vivo	57,58
	<i>luxS</i>	Специальный подход	Активированный метиловый цикл	<i>L. rhamnosus</i> GG	Сниженная способность к выживанию in vivo	62

Продолжение табл.

1	2	3	4	5	6	7
Двухкомпонентная система регуляции	LBA1524	Сравнительная геномика (in silico)	Гистидиновая протеинкиназа	<i>L. acidophilus</i> NCFM	Повышенная чувствительность к кислоте	66
	LBA1430 ^{a)}	Анализ экспрессии с помощью микрочипов	Гистидиновая протеинкиназа	<i>L. acidophilus</i> NCFM	Повышенная чувствительность к желчи	37
	LBA1431 ^{a)}	Анализ экспрессии с помощью микрочипов	Регулятор ответа	<i>L. acidophilus</i> NCFM	Повышенная чувствительность к желчи	37
	LBA1432 ^{a)}	Анализ экспрессии с помощью микрочипов	Гипотетический белок со сходством с RelA / SpoT	<i>L. acidophilus</i> NCFM	Повышенная чувствительность к желчи	37
	<i>rrp-1</i>	Специальный подход	Регулятор ответа	<i>L. sakei</i> 23K	Повышенная чувствительность к кислоте	86
	<i>rrp-48</i>	Специальный подход	Регулятор ответа	<i>L. sakei</i> 23K	Повышенная чувствительность к кислоте	86

Продолжение табл.

1	2	3	4	5	6	7
Активное удаление стрессоров (факторов, связанных со стрессом)	<i>copA</i>	R-IVET	Медь-переносящая АТФаза	<i>L. plantarum</i> WCFS1	Снижение конкурентоспособности в кишечнике мыши	55, 56
	<i>gadC</i> (LBA0057)	Сравнительная геномика (геном) ^{b)}	Глутамат / аминокислотный антипортёр	<i>L. acidophilus</i> NCFM	Повышенная чувствительность к кислоте	83
	LBA0867	Сравнительная геномика (геном) ^{b)}	Регулятор транскрипции	<i>L. acidophilus</i> NCFM	Повышенная чувствительность к кислоте и желчи	83
	LBA0995	Сравнительная геномика (геном) ^{b)}	Аминокислотная пермеаза	<i>L. acidophilus</i> NCFM	Повышенная чувствительность к кислоте и желчи	83
Активное удаление стрессоров (факторов, связанных со стрессом)	LBA0996	Сравнительная геномика (геном) ^{b)}	Орнитин декарбоксилаза	<i>L. acidophilus</i> NCFM	Повышенная чувствительность к кислоте, но увеличенная устойчивость к желчи	83
	Lr1265	Анализ экспрессии с помощью микрочипов	MDR (белок с множественной лекарственной устойчивостью) (ABC-транспортер)	<i>L. reuteri</i> ATCC 55730	Снижение адаптации к желчи	36

Продолжение табл.

1	2	3	4	5	6	7
	Lr1584	Анализ экспрессии с помощью микрочипов	белок MDR (основной координатор)	<i>L. reuteri</i> ATCC 55730	Снижение адаптации к желчи	36
	LBA1427 ^{a)}	Анализ экспрессии с помощью микрочипов	Предполагаемая оксидоредуктаза, роль в модификации соли желчных кислот?	<i>L. acidophilus</i> NCFM	Повышенная переносимость желчи	37
	LBA1428 ^{a)}	Анализ экспрессии с помощью микрочипов	Гипотетический белок с сходством с редокс-белками, роль в модификации соли желчных кислот?	<i>L. acidophilus</i> NCFM	Повышенная переносимость желчи	37
	LBA1429 ^{a)}	Анализ экспрессии с помощью микрочипов	белок MDR (основной координатор)	<i>L. acidophilus</i> NCFM	Повышенная чувствительность к желчи	37
	<i>bshA</i>	Сравнительная геномика (геном)	Гидролаза соли желчи	<i>L. acidophilus</i> NCFM	Неспособность гидролизовать соли желчных кислот, конъюгированные с хенодезоксиколовой кислотой; отсутствие измененной то-	79

Окончание табл.

1	2	3	4	5	6	7
Активное удаление стрессоров (факторов, связанных со стрессом)	<i>bshB</i>	Сравнительная геномика (геном)	Гидролаза соли желчи	<i>L. acidophilus</i> NCFM	лерантности к желчи Неспособность гидролизовать соли желчных кислот, конъюгированные с таурином; отсутствие измененной толерантности к желчи	79
	LJ0056, LJ1147, LJ1413	Сравнительная геномика (геном)	Гидролаза соли желчи	<i>L. johnsonii</i> NCC533	Тройный мутант проявлял стойкость к кишечнику, сходную с таковой у дикого типа	80
	<i>bsh1</i>	Сравнительная геномика (геном)	Гидролаза соли желчи	<i>L. plantarum</i> WCFS1	Снижение толерантности к гликодезоксихолевой кислоте, но не к тауродаеоксихолевой кислоте	85

а) Гены расположены на опероне в *L. acidophilus* NCFM [37].

б) Геном-информация, основанная на последовательности генома.

рованных промоторов показана индукция нескольких генов, ответственных за функции клеточной стенки, включая гены мурамидаз [38]. Интересно, что мутация в гене *cdpA* у штамма *L. acidophilus* NCFM, предположительно кодирующего фермент модификации клеточной стенки, и тем самым способствующего делению и расхождению дочерних клеток, повышала устойчивость к солям желчи в сравнении с диким типом, но понижала устойчивость к осмотическому стрессу [35,39]. Авторы объяснили такие результаты наличием незрелых структур клеточной стенки в мутантах, где определенные компоненты остались сшитыми, или не разделились. Подобным образом *slpA* мутант *L. acidophilus* NCFM был устойчив к желчи и более чувствителен к осмотическому стрессу [35].

D-Ala эфиры тейхоевых кислот LTA и WTA, по-видимому, необходимы для функционирования и сохранения целостности клетки в условиях стресса, обусловленного низкими pH и присутствием желчи [40]. Например, с помощью ДНК микрочип-анализа в *L. plantarum* WCFS1 был идентифицирован оперон *dlt*, индуцируемый желчью [41]. В дополнение мутант *dltD* штамма *Lactobacillus rhamnosus* GG был крайне неустойчив к обработке искусственным желудочным соком с pH 2 [42]. Напротив, инактивация гена *dltA* штамма грызунов *Lactobacillus reuteri* 100-23 не влияла на жизнеспособность этого штамма *in vitro* в условиях кислотного стресса. Однако *dltA* мутация сильно влияет на рост штамма и степень колонизации кардиального отдела желудка мыши *in vitro* при низких pH (кислотная адаптация) [43].

Роль экзополисахаридов (EPS) в проявлении устойчивости МКБ к кислотам и желчи менее ясна. ДНК микрочип-анализ позволил обнаружить понижение экспрессии генов биосинтеза EPS под действием желчи. У штамма *Lactobacillus acidophilus* – это гены *epsB*, *epsC* и *epsE* [37] и у штамма *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 – ген *lr0957* [36]. Белки *EpsB*, *EpsC* и *lr0957* гомологичны белкам фосфорегуляторной системы, регулирующей биосинтез EPS и длину цепочек полисахаридов в штамме *Streptococcus pneumoniae* [44,45]. Ген *epsE* кодирует, по-видимому, прайминговую гликозилтрансферазу, катализирующую перенос первого

сахара в биосинтезе полимера EPS [37]. Однако биосинтез EPS в присутствии желчи пока еще детально не исследован [46]. Гомополисахариды (HoPSs) штамма *L. reuteri*, как сообщалось, вносят определенный вклад в устойчивость к стрессу путем поддержания мембран в физиологической жидко-кристаллической фазе при неблагоприятных условиях. Однако, хотя оба мутанта по *inu* (inulose sucrose) и *gftA* (glucosyltransferase) штамма *Lactobacillus reuteri* TMW1.106 показали пониженную сопротивляемость к молочной кислоте. Сопротивляемость этих мутантных штаммов к низким pH не была затронута [47].

Репарация и защита ДНК и белков. Некоторые белки, участвующие в репарации и защите макромолекул, таких, как ДНК и белки, также важны для защиты от действия кислот и желчи. Внутриклеточное подкисление может приводить к потере пуринов и пиримидинов в молекуле ДНК. Например, с помощью Northern-анализа и метода (RT)-PCR, Каппа и др. наблюдали после понижения уровня pH увеличение уровня экспрессии гена *uvrA*, кодирующего субъединицу A в комплексе (excinuclease ATP-binding cassette), участвующего в репарации брешей, вызванных низкими pH, и сделали предположение об участии комплекса в адаптации штамма *Lactobacillus helveticus* CNBL1156 к кислоте [48]. Также было показано, что и желчные кислоты (BA) индуцируют ДНК повреждения и активацию репарационных ферментов [28]. ДНК микрочип-анализ экспрессии генов показал увеличение экспрессии гена, ответственного за защиту ДНК в условиях голода, у штамма *L. reuteri* ATCC 55730 после его экспозиции в BA [36]. Ген белка неспецифического связывания ДНК (nonspecific DNA-binding protein Dps) участвует в адаптации к нескольким типам стресса у *E. coli*, включая окислительный стресс, облучение, отравление металлами, тепловой стресс и pH стресс [49]. Однако повреждением гена Dps в *L. reuteri* ATCC 55730 не были затронуты как жизнеспособность, так и адаптационные свойства организма в присутствии BA [36], по-видимому, вследствие избыточности ферментов с функциями защиты и репарации ДНК.

Важное место в общем клеточном ответе на стресс зани-

мают, по-видимому, шапероны, которые участвуют в решении множества задач, таких, как сворачивание белков, ренатурация, защита денатурированных белков и удаление разрушенных белков. Основные молекулярные шапероны включают DnaK, GroEL и GroES, являющиеся хорошо известными белками теплового шока. Протеомный метод 2D-мерного электрофоретического анализа в исследованиях кислотной адаптации у штамма *L. delbrueckii subsp bulgaricus* позволил идентифицировать 3 активно индуцируемых белка, т.е. GroES, GroEL и DnaK [50]. Похожий подход был использован для демонстрации индукции DnaK, DnaJ, GrpE, GroES и GroEL в *L. acidophilus* как адаптационный ответ на действие кислоты [51]. Похожим методическим подходом было зафиксировано повышение экспрессии GrpE в толерантных к кислоте мутантах *L. sanfranciscensis* [52] и повышение уровня экспрессии GrpE и DnaK в штамме *L. reuteri* после 1 ч инкубации при pH 4 [53].

ДНК микрочип-анализом у *L. acidophilus* NCFM после обработки желчью было обнаружено повышение экспрессии генов groES, groEL, dnaK, htrA и grpE [37]. Эти белки теплового шока вносят особый вклад в длительную устойчивость к кислотному стрессу. Clp АТФ-азы выполняют похожую роль, атакуя неверно свернутые белки, для деградации пептидазой ClpP, в дополнение к реактивации и ремоделированию активностей [54]. В отличие от белков теплового шока, описанных выше, эти шаперонные белки (Clp), вероятно, особенно важны для быстрого ответа МКБ, когда они попадают в неблагоприятные условия в ЖКТ. ДНК микрочип-анализ штамма *L. reuteri* ATCC 55730 в условиях кислотного шока показал, что одним из индуцированных генов был ген шаперона clpL [34]. Интересно, что желчевый шок индуцировал тот же ген шаперона clpL, в то время как сверхэкспрессии генов шаперонов clp не наблюдали при адаптации к желчи [36]. Мутационный анализ также подтвердил важность этих АТФ-аз с активностью шаперонов. Нокаут мутант-гена шаперона clpL в штамме *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 приводил к значительному понижению показателя выживаемости после инкубации при pH 2.7 [34] или инкубации в 0,3 % желчи [36]. Роль этих шаперо-

нов для выживания в ЖКТ в дальнейшем была исследована с помощью технологии *in vivo* экспрессии (recombinase-based IVET [R-IVET]), позволившей идентифицировать ген *clpC* в качестве одного из индуцированных генов штамма *L. plantarum* WCFS1 в ЖКТ мыши [55]. Последующий мутационный анализ показал, что устойчивость WCFS1 *clpC* мутанта в ЖКТ мыши была в десятки и сотни раз ниже в сравнении с контрольным диким типом [56].

Как упоминалось выше, в ЖКТ возможны другие случаи стресса, например такие, как окислительный стресс. Методом IVET в штамме *L. reuteri* 100-23 был идентифицирован ген, кодирующий фермент метионин сульфоксид редуктазу (*Msr*), который специфично индуцируется в ЖКТ мышей [57]. *Msr* восстанавливает биологическую активность белков, утраченную после окисления метиониновых остатков в метионин сульфоксид, таким образом, защищает бактерии против окислительных повреждений, вызванных, например, активными соединениями азота или кислорода. Точную роль *Msr* в выживании штамма *L. reuteri in vivo* еще предстоит определить. Тем не менее у мышей экологическое проявление мутантного по *msrB* штамма *L. reuteri* было подавлено, как показали детальные эксперименты по мутационному анализу [58]. Желчевый стресс также вызывал окислительный стресс [28]. Брон и соавт. наблюдали повышение уровней экспрессии глутатион редуктазы и оперона *metC-cysK* после обработки желчью штамма *L. plantarum* [41]. Глутатион является важным биомаркером окислительного стресса и может играть важную роль в выживании бактерии *in vivo*. В дополнение к своей ключевой роли в поддержании окислительного состояния тиольных групп белка, глутатион также выполняет ключевую функцию в защите бактериальной клетки от действия низких pH, соединений хлора и осмотического стресса [59]. Метаболизм глутатиона и цистеина тесно связан с активированным циклом метилирования и метаболизмом S-аденозилметионина (SAM) [60]. Этот цикл метилирования играет центральную метаболическую роль и участвует в нуклеотидных модификациях в rRNA, синтезе полиаминов и процессах метилирования. Все эти процессы могут вносить определенный вклад в стабильность макромолекул

в условиях стресса [61]. Примечательно, что два исследования МКБ с применением IVET-технологии определили один общий ген, кодирующий предполагаемую витамин В12-независимую метионин-синтазу, принадлежащую этому активированному циклу метилирования [55,57]. Инактивация этого гена с обозначением *met* в штамме *L. Reuteri* не влияла на экологическое поведение, вероятно, из-за избыточности данной функции у *L. reuteri*. Напротив, фермент *LuxS*, катализирующий преобразование S-рибозил-гомоцистеина в гомоцистеин в том же пути, по-видимому, имеет решающее значение для выживания пробиотического штамма *L. rhamnosus* GG в желудочно-кишечном тракте мышей [62]. В конкурентном анализе с диким типом число *luxS* мутантных клеток, которые выжили после прохождения через ЖКТ, постепенно снижалось до уровня ниже 1 % по сравнению с диким типом [62]. Ли и соавторы показали с помощью протеомного анализа, что при желчевом стрессе в клетках *L. reuteri* активируется SAM синтетаза [63]. Авторы также связывают регуляцию этого фермента с центральной метаболической ролью SAM цикла в обеспечении стабильности бактериальных компонентов.

Двухкомпонентная и другие регуляторные системы.

Механизмы специального обнаружения факторов стресса и регуляции экспрессии генов в ответ на эти стимулы также важны для выживания бактерий в неблагоприятных условиях. Хотя эти механизмы не полностью охарактеризованы для МКБ, они часто включают двухкомпонентные регуляторные системы (TCS). Они позволяют бактерии воспринимать и отвечать на изменения в ее окружении после получения внешнего сигнала через трансмембранные воспринимающие домены гистидиновой протеинкиназы (НРК). Как только фермент получает внешний сигнал, он активируется путем автофосфорилирования по специальному гистидиновому аминокислотному остатку. Фосфорильная группа затем передается на домен регулятора ответа (RR-response regulator), который, в свою очередь, индуцирует транскрипционный ответ через свой ДНК-связывающий домен [64]. Различные исследования указывают на роль TCS в ответах МКБ на

стресс. Повреждение генов *grp-1* и *grp-48*, кодирующих регуляторы ответа в *L. sakei* 23K, привело к повышению чувствительности к низким pH [65]. Клэнхэммер и соавторы идентифицировали TCS регуляторную систему (LBA1524-LBA1525) у *L. acidophilus* NCFM, которая похожа на систему LisRK устойчивости к кислоте у бактерии *Listeria monocytogenes* [66]. Инсерционная инактивация НРК приводит к понижению выживаемости клеток в логарифмической фазе роста после стрессового понижения pH до 3,5. Кроме того, с помощью ДНК микрочип-анализа были идентифицированы примерно 80 генов *L. acidophilus* NCFM, для которых мутация в НРК повлияла на их экспрессию [66]. Наиболее разительные изменения в экспрессии генов в НРК мутантах наблюдались для генов, предположительно кодирующих компоненты системы протеолитических ферментов, включая 2 системы транспорта олигопептидов (Opp). Одной из главных функций систем Opp для бактериальных клеток является интернализация пептидов для последующего использования их в качестве источников углерода и азота. Эти транспортные системы также участвуют в рециклировании пептидов клеточной стенки, которые, по-видимому, являются первыми мишенями физиологического и химического стресса, но эта роль еще не полностью исследована для грамположительных бактерий [67,68]. Похожим образом в штамме *L. reuteri* упомянутым выше ДНК микрочип-анализом идентифицирован ген, кодирующий белок RR (Ir1804), как ген индукции после кислотного шока [34]. Этот ген Ir1804 является частью оперона, гомологичного оперону уусFG *Bacillus subtilis*, где белок RR регулирует гены, участвующие в метаболизме клеточной стенки, например, гены компонентов биосинтеза тейхоевых кислот [69]. Дальнейший анализ сигнальных путей в этой системе TCS на примере *Streptococcus pneumoniae* показал, что нефосфорилированная форма YucF участвует в регуляции биосинтеза жирных кислот [70].

Характеризуя ответ на желчевый стресс у штамма *L. acidophilus* NCFM с помощью ДНК микрочип-анализа, Пфейлер и соавт. также идентифицировали среди множества других генов 7-kb, 8-генный оперон, кодирующий систему TCS, транс-

портер, оксидоредуктазу, и 4 гипотетических белка [37]. Каждая мутация в транспортере, в белках НРК, RR и гипотетическом белке, который имеет сходство с белком RelA (SpoT) (см. ниже) приводила к ослаблению толерантности к желчи. Мутации в других генах 7-kb оперона, кодирующих другие гипотетические белки и возможную оксидоредуктазу, приводили к значительному усилению толерантности к желчи, что показывает важность данного оперона как для толерантности, так и для чувствительности к желчи. Эти данные позволяют предположить, что система TCS может играть комплексную роль по отношению к действию желчи, но детали регуляторной сети необходимо еще определить [37].

Другие общепринятые темы для важных регуляторов стрессовых ответов в МКБ не так легко обозначить. Например, relA участвует, как известно, в синтезе и гидролизе сигнальной молекулы (p)ppGpp, которая участвует в механизме толерантности по отношению к различным типам стресса [71]. В штамме *L. lactis* инактивация гена guaA, кодирующего GMP синтетазу, и гена relA, участвующего в гуанин-нуклеотидном метаболизме, приводит к увеличению толерантности к кислоте [72]. В *L. reuteri* ATCC 55730, ДНК микрочип-анализом было показано, что уровень экспрессии relA был снижен после кислотного шока [34]. Однако необходим дальнейший функциональный анализ, чтобы охарактеризовать роль этой системы в МКБ.

Активное удаление факторов, связанных с кислотным и желчевым стрессом. В бактериях также существует множество прямых и весьма конкретных стратегий активного удаления различных стрессовых факторов.

(i) *АТФ-азы.* Мультисубъединичная FoF1 АТФ-аза, облегчающая вытеснение протонов из цитоплазмы под действием протон-движущей силы, является одним из основных протонных насосов, используемых грамположительными бактериями. Дифференциальный дисплей-анализ (DD-PCR) показал, что воздействие низких значений pH для *L. acidophilus* приводит к увеличению уровня mRNA, кодирующей pH-индуцибельную, протон-переносящую FoF1 АТФ-азу [73], но об адресном мутантном анализе еще не сообщалось в литературе. Коркоран и соавторы

использовали спонтанные, устойчивые к неомицину мутанты пробиотического штамма *L. rhamnosus* GG со сниженной FoF1 ATP-азной активностью, чтобы подчеркнуть важность присутствия сбрасываемых сахаров и синтеза ATP по гликолитическому пути для вытеснения протонов, осуществляемого FoF1 ATP-азой [52,74]. Ли и др. также наблюдали с помощью 2D электрофоретического анализа значительную сверхэкспрессию некоторых гликолитических белков в ответ на кислотный стресс. В их числе глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа, фосфоглицерат мутаза и пируваткиназа, что указывает на важность синтеза богатых энергией интермедиатов (ATP и NADH) при низком уровне pH [53]. Кроме того, гены, кодирующие FoF1 ATPазу, также активировались в штамме *L. plantarum* под действием желчи [41] в соответствии с тем фактом, что присутствие желчи приводит к умеренному подкислению цитоплазмы, как упоминалось выше.

В последнее время было высказано предположение о роли транспортных ATP-аз, переносящих тяжелые металлы и поддерживающих гомеостаз меди, в кислотной толерантности *L. bulgaricus* ATCC 11842 [75]. Точная функция этих переносчиков не известна, но примечательно, что Клиребэзэм и коллеги также выявили ген *copA*, кодирующий предполагаемую транспортную ATP-азу меди (*Ip_3055*), которая индуцировалась в желудке мыши [55,76]. Эксперименты, связанные с конкуренцией между диким типом и мутантом по гену *copA*, показали, что относительное содержание *copA* мутанта уменьшилось в сотни и тысячи раз после прохождения через ЖКТ мыши [56]. Дэноу и коллеги также выявили желудочно-специфическую экспрессию медь-транспортирующей ATP-азы в *L. johnsonii* NCC533 [77-81], указывая на то, что она должна иметь некоторую важную, но еще не полностью понятную роль в МКБ *in vivo*.

(ii) Реакции декарбоксилирования аминокислоты и антипорта. В реакциях декарбоксилирования аминокислоты и антипорта, аминокислота транспортируется в клетку, где происходит ее декарбоксилирование. Протон расходуется в этой реакции, и продукт экспортируется из клетки с помощью антипортера. Конечным результатом является увеличение внутриклеточного pH.

Примером такой системы служит глутамат декарбоксилаза (GAD), которая была биохимически охарактеризована для штамма *L. brevis* [82]. Высказано предположение, что АТФ может синтезироваться за счет преобразования глутамата в γ -аминобутират (GABA) в МКБ, тем самым, связывая GAD систему с синтезом АТФ [83]. Инсерционная инактивация в штамме *L. acidophilus* NCFM показала важность для кислотной толерантности таких ферментов, как орнитин декарбоксилаза, соседняя пермеаза аминокислот, антипортер для пары "глутамат - γ -аминобутират" и транскрипционный регулятор со слабым сходством с регулятором GAD системы, принимающей участие в кислотной толерантности штамма *L. lactis* [84-87]. Кроме того, это исследование подтвердило, что клетки в стационарной фазе роста, как правило, более толерантны к низким рН, чем клетки в логарифмической фазе роста, как обсуждалось выше.

(iii) *ADI путь*. Дополнительный механизм, придающий толерантность к кислоте и желчи, заключается в синтезе щелочных соединений, в частности, аммиака, через аргинин-деиминазный путь, который катализирует превращение аргинина в орнитин, аммиак и CO_2 . Это также приводит к синтезу АТФ, обеспечивая экспорт протонов благодаря работе фермента FoF1 АТФ-аза [77]. Система состоит из 3-х основных ферментов: аргинин-деиминазы (ADI), орнитин транскарбамилазы и карбамат-киназы, кодируется *arcA*, *arcB* и *arcC* соответственно. Кроме того, *ArcD*, аргинин-орнитин транспортер присутствует во многих организмах и осуществляет обмен этих 2-х молекул без каких-либо затрат энергии. Уайтхед и др. обнаружили гены ADI пути, которые индуцируются в процессе адаптации к желчи в *L. reuteri* ATCC 55730 [35], еще раз подтверждая, что действие желчи может привести к умеренному подкислению цитоплазмы.

(iv) *Транспорт и гидролиз желчи*. Некоторые бактерии используют системы транспорта, относящиеся к семейству транспортеров множественной лекарственной устойчивости (MDR), для экспорта желчи [28]. Роль гена транспортера MDR штамма *L. acidophilus* NCFM в ряду генов, локализованных в опероне TCS, важна для проявления толерантности к желчи [37], как упомина-

ется выше, в параграфе о TCS системе. В своих экспериментах по скринингу генов, откликающихся на присутствие желчи в штамме *L. plantarum* WCFS1, Брон и соавт. определили 3 возможных белка-экспортера, в число которых вошел и ген предполагаемого транспортера MDR (Ip_3160) [38]. ДНК микрочип-анализом штамма *L. reuteri* ATCC 55730 также идентифицировали 2 предполагаемых гена MDR: Ir1265 и Ir1584, заявленных в качестве индуцибельных желчью генов [36]. Мутационный анализ показал, что инактивация этих 2-х генов не уменьшила выживаемость бактерий после воздействия желчи. Тем не менее мутанты не могли расти в присутствии желчи, предполагая, что эти транспортеры MDR играют важную роль при адаптации к желчи [36].

Некоторые бактерии, как известно, могут ферментативно модифицировать соли кислот желчи [28]. Гидролазы солей кислот желчи (BSH), как правило, внутриклеточные ферменты, которые катализируют гидролиз амидной связи между стероидной составляющей и боковой цепью аминокислоты в желчных кислотах. Активность BSH обнаруживается в основном в организмах, изолированных из ЖКТ млекопитающих (видов *Bifidobacterium*, *L. acidophilus*, *L. gasseri*, *L. johnsonii* и некоторых штаммов *L. plantarum*). В то же время организмы, изолированные из среды без желчных кислот, например, кисломолочных продуктов и овощей (*L. lactis*, *L. delbrueckii*, *L. helveticus*, и *Streptococcus thermophilus*), не обладают активностью BSH [28]. Тем не менее роль BSH в способности выживания этих лактобацилл в ЖКТ остается эфемерной. Недавно сообщалось, что bsh-1 мутант штамма *L. plantarum* WCFS1 теряет толерантность к глицин-конъюгированным солям желчных кислот [78]. Однако инактивация 2-х генов, bshA и bshB, кодирующих ферменты BSH с различными каталитическими активностями в штамме *L. acidophilus* NCFM, не влияла на толерантность к желчи [79]. Более того, тройной нокаут-мутант для всех 3-х BSH белков штамма *L. johnsonii* NCC533 сохранялся в ЖКТ мыши, как и дикий тип [81].

Таким образом, чем ближе мы подходим к пониманию молекулярных механизмов устойчивости к стрессу, тем больше сход-

ства можно найти между пробиотическими и патогенными бактериями. Не удивительно, что эффективные штаммы пробиотических МКБ напоминают патогены по многим признакам, таким, как выживаемость и адгезивность. Вполне вероятно, что для эффективной конкуренции с патогенами МКБ должны использовать те же питательные вещества и сайты адгезии на клетках хозяина.

Выводы. Представлены актуальные результаты исследования молекулярных механизмов устойчивости к стрессу у молочнокислых бактерий (МКБ), проводимого в передовых научно-исследовательских лабораториях зарубежья. В отношении адаптации лактобактерий к хозяину обзор литературы показал, что структуры клеточной поверхности, шапероны, специальные регуляторные системы и экспортеры, или ферменты определяют способность у определенных штаммов МКБ выживать в условиях кислого или желчевого стресса. Пристальное внимание исследователей к данной теме обусловлено практическими проблемами способа применения потенциальных пробиотических штаммов МКБ. Следовательно, результаты исследования происходящих в микробиоте последствий после преднамеренного введения пробиотических бактерий могут существенно прояснить понимание процессов, связанных с взаимодействиями полезных микробов с хозяином, имеющих фундаментальные, медицинские и коммерческие аспекты.

Список литературы

1 Backhed, F., Ley R. E., Sonnenburg J. L., Peterson D. A., Gordon J.I. Host-bacterial mutualism in the human intestine // *Science*. – 2005.307. 1915-1920.

2 Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B. Sanders, M. E. (2014). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 11(August

2014), 9. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>

3 *Tuomola, E., R. Crittenden, M. Playne, E. Isolauri, S. Salminen.* 2001. Quality assurance criteria for probiotic bacteria // *Am. J. Clin. Nutr.* 73: 393S-398S.

4 *Sun Z, Harris HMB, McCann A, et al.* Expanding the biotechnology potential of lactobacilli through comparative genomics of 213 strains and associated genera // *Nat. Commun.* 2015; 6(October):8322. Doi: 10.1038/ncomms9322.

5 *Kandler, O., N. Weiss.* 1986. Regular, nonsporing gram-positive rods, p. 1208-1234. In P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt (ed.). *Bergey's manual of systematic bacteriology.* Williams & Wilkins, Baltimore, MD.

6 *Walter, J.* 2005. The microecology of lactobacilli in the gastrointestinal tract, p. 51-82. In G. W. Tannock (ed.), *Probiotics & prebiotics: scientific aspects* // Caister Academic Press, Norfolk, United Kingdom.

7 *Dal Bello, F., J. Walter, W. P. Hammes, C. Hertel.* 2003. Increased complexity of the species composition of lactic acid bacteria in human feces revealed by alternative incubation condition // *Microb. Ecol.* 45:455-463.

8 *Kimura, K., A. L. McCartney, M. A. McConnell, G. W. Tannock.* 1997. Analysis of fecal populations of bifidobacteria and lactobacilli and investigation of the immunological responses of their human hosts to the predominant strains // *Appl. Environ. Microbiol.* 63:3394-3398.

9 *Sghir, A., G. Gramet, A. Suau, V. Rochet, P. Pochart, J. Dore.* 2000. Quantification of bacterial groups within human fecal flora by oligonucleotide probe hybridization // *Appl. Environ. Microbiol.* 66:2263-2266.

10 *Tannock, G. W., K. Munro, H. J. M. Harmsen, G. W. Welling, J. Smart, P. K. Gopal.* 2000. Analysis of the fecal microflora of human subjects consuming a probiotic product containing *Lactobacillus rhamnosus* DR20 // *Appl. Environ. Microbiol.* 66:2578-2588.

11 *Heilig, H. G. H. J., E. G. Zoetendal, E. E. Vaughan, P. Marteau, A.D.L. Akkermans, W. M. de Vos.* 2002. Molecular diversity of *Lactobacillus* spp. and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal // *DNA.*

Environ. Microbiol. 68:114-123.

12 Petrova MI, Lievens E, Malik S, Imholz N, Lebeer S. Lactobacillus species as biomarkers and agents that can promote various aspects of vaginal health // Front. Physiol. 2015;6(MAR): 1-19. doi:10.3389/fphys.2015.00081..

13 Zhou, X., C. J. Brown, Z. Abdo, C. C. Davis, M. A. Hansmann, P. Joyce, J. A. Foster, and L.J. Forney. 2007. Differences in the composition of vaginal microbial communities found in healthy Caucasian and black women // ISME J. 1:121-133.

14 Anukam, K. C., E. O. Osazuwa, I. Ahonkhai, G. Reid. 2006. Assessment of Lactobacillus species colonizing the vagina of apparently healthy Nigerian women, using PCR-DGGE and 16S rRNA gene sequencing // World J. Microbiol. Biotechnol. 22:1055-1060.

15 Burton, J.P., P.A. Cadieux, G. Reid. 2003. Improved understanding of the bacterial vaginal microbiota of women before and after probiotic instillation // Appl. Environ. Microbiol. 69:97-101.

16 Burton, J. P., and G. Reid. 2002. Evaluation of the bacterial vaginal flora of 20 postmenopausal women by direct (Nugent score) and molecular (polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis) techniques // J. Infect. Dis. 186:1770-1780.

17 Vasquez, A., T. Jakobsson, S. Ahrne, U. Forsum, G. Molin. 2002. Vaginal Lactobacillus flora of healthy Swedish women // J. Clin. Microbiol. 40:2746-2749.

18 Falagas, M.E., G.I. Betsi, S. Athanasiou. 2007. Probiotics for the treatment of women with bacterial vaginosis // Clin. Microbiol. Infect. 13: 657-664.

19 Johnston BC, Goldenberg JZ, Vandvik PO, Sun X, Guyatt GH. Probiotics for the prevention of pediatric antibiotic-associated diarrhea (Review) // Cochrane Database Syst Rev. 2011;(11):1-49. doi:10.1002/14651858.

20 Kochan P, Chmielarczyk A, Szymaniak L, et al. Lactobacillus rhamnosus administration causes sepsis in a cardiosurgical patient- is the time right to revise probiotic safety guidelines? // Clin. Microbiol. Infect. 2011;17(10):1589-92. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03614.x.

21 Liang, M.T. 2008. Safety of probiotics: translocation and infection. Nutr. Rev. 66:192-202.

22 *Bajaj BK, Claes IJJ, Lebeer S.* Functional mechanisms of probiotics // *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci.* 2015;4(4):321-327. doi:10.15414/jmbfs.2015.4.4.321-327..

23 *Knights D, Silverberg MS, Weersma RK, et al.* Complex host genetics influence the microbiome in inflammatory bowel disease. *Genome Med.* 2014;6(12):107. doi:10.1186/s13073-014-0107-1..

24 *Bron PA, Kleerebezem M, Brummer R-J, et al.* Can probiotics modulate human disease by impacting intestinal barrier function? // *Br. J. Nutr.* 2017:1-15. doi:10.1017/S0007114516004037..

25 *Neves B.M.* Pathogen Strategies to Evade Innate Immune Response?: A Signaling Point of View. 2012;(May 2017). doi:10.5772/37771.

26 *Wu C, Huang J, Zhou R.* Progress in engineering acid stress resistance of lactic acid bacteria // *ApplMicrobiol Biotechnol* 2014;98:1055-1063. doi:10.1007/s00253-013-5435-3..

27 *van de Guchte, M., P. Serror, C. Chervaux, T. Smokvina, S. D. Ehrlich, E. Maguin.* 2002. Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 82:187-216.

28 *Begley, M., C.G. M.Gahan, C.Hill.* 2005. The interaction between bacteria and bile // *FEMS Microbiol. Rev.* 29:625-651.

29 *Weng Y, Chen F, Liu Y, Zhao Q, Chen R, Pan X.* *Pseudomonas aeruginosa* Enolase Influences Bacterial Tolerance to Oxidative Stresses and Virulence. 2016; (December). doi:10.3389/fmicb.2016.01999.

30 *Rychlik, I., and P.A. Barrow.* 2005. *Salmonella* stress management and its relevance to behaviour during intestinal colonisation and infection. *FEMS // Microbiol. Rev.* 29:1021-1040.

31 *Aditya Upadrasta, Catherine Stanton, Colin Hill GFF, Paul and RR.* Improving the Stress Tolerance of Probiotic Cultures: Recent Trends and Future Directions. In: *Effie Tsakalidou, Konstantinos Papadimitriou, ed. Stress Responses of Lactic Acid Bacteria.* 1st ed. Springer US; 2011:P.395-438. doi:10.1007/978-0-387-92771-8_17.

32 *Fozo, E. M., J. K. Kajfasz, and R. G. Quivey.* 2004. Low pH-induced membrane fatty acid alterations in oral bacteria. *FEMS // Microbiol. Lett.* 238:291-295.

33 *Taranto, M.P., M.L.F. Murga, G. Lorca, G.F. de Valdez.* 2003.

Bile salts and cholesterol induce changes in the lipid cell membrane of *Lactobacillus reuteri* // *J. Appl. Microbiol.* 95:86-91.

34 *Wall, T., M. Bath, R. A. Britton, H. Jonsson, J. Versalovic, and S. Roos.* 2007. The early response to acid shock in *Lactobacillus reuteri* involves the ClpL chaperone and a putative cell wall-altering esterase // *Appl. Environ. Microbiol.* 73:3924-3935.

35 *Klaenhammer, T. R., R. Barrangou, B. L. Buck, M. A. Azcarate-Peril, and E. Altermann.* 2005. Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS // Microbiol. Rev.* 29:393-409.

36 *Whitehead, K., J. Versalovic, S. Roos, and R. A. Britton.* 2008. Genomic and genetic characterization of the bile stress response of probiotic *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 // *Appl. Environ. Microbiol.* 74:1812-1819.

37 *Pfeiler, E.A., M.A. Azcarate-Peril, and T.R. Klaenhammer.* 2007. Characterization of a novel bile-inducible operon encoding a two-component regulatory system in *Lactobacillus acidophilus* // *J. Bacteriol.* 189: 4624-4634.

38 *Bron, P. A., M. Marco, S. M. Hoffer, E. Van Mullekom, W. M. de Vos, and M. Kleerebezem.* 2004. Genetic characterization of the bile salt response in *Lactobacillus plantarum* and analysis of responsive promoters in vitro and in situ in the gastrointestinal tract // *J. Bacteriol.* 186:7829-7835.

39 *Altermann, E., B. L. Buck, R. Cano, T. R. Klaenhammer.* 2004. Identification and phenotypic characterization of the cell division protein CdpA. *Gene* 342:189-197.

40 *Neuhaus, F. C., and J. Baddiley.* 2003. A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67:686-723.

41 *Bron, P.A., D. Molenaar, W.M. Vos, and M. Kleerebezem.* 2006. DNA micro-array-based identification of bile-responsive genes in *Lactobacillus plantarum* // *J. Appl. Microbiol.* 100:728-738.

42 *Perea Ve'lez, M., T. L. A. Verhoeven, C. Draing, S. Von Aulock, M. Pfitzenmaier, A. Geyer, I. Lambrichts, C. Grangette, B. Pot, J. Vanderleyden, and S.C.J. De Keersmaecker.* 2007. Functional analysis of D-alanylation of lipoteichoic acid in the probiotic strain

Lactobacillus rhamnosus GG // *Appl. Environ. Microbiol.* 73:3595-3604.

43 *Walter, J., D. M. Loach, M. Alqumber, C. Rockel, C. Hermann, M. Pfitzenmaier, and G. W. Tannock.* 2007. D-Alanyl ester depletion of teichoic acids in *Lactobacillus reuteri* 100-23 results in impaired colonization of the mouse gastrointestinal tract. *Environ // Microbiol.* 9:1750-1760.

44 *Bender, M. H., R. T. Cartee, and J. Yother.* 2003. Positive correlation between tyrosine phosphorylation of CpsD and capsular polysaccharide production in *Streptococcus pneumoniae* // *J. Bacteriol.* 185:6057-6066.

45 *Morona, J. K., D. C. Miller, R. Morona, and J.C. Paton.* 2004. The effect that mutations in the conserved capsular polysaccharide biosynthesis genes *cpsA*, *cpsB*, and *cpsD* have on virulence of *Streptococcus pneumoniae* // *J. Infect. Dis.* 189:1905-1913.

46 *Caggianiello G, Kleerebezem M, Spano G.* Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: from health-promoting benefits to stress tolerance mechanisms // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2016;100:3877-3886. doi: 10.1007/s00253-016-7471-2..

47 *Schwab, C., J. Walter, G. W. Tannock, R. F. Vogel, and M.G.Ganzle.* 2007. Sucrose utilization and impact of sucrose on glycosyltransferase expression in *Lactobacillus reuteri* // *Syst. Appl. Microbiol.* 30:433-443.

48 *Cappa, F., D. Cattivelli, and P. S. Cocconcelli.* 2005. The *uvrA* gene is involved in oxidative and acid stress responses in *Lactobacillus helveticus* CNBL1156 // *Res. Microbiol.* 156:1039-1047.

49 *Martinez, A., and R. Kolter.* 1997. Protection of DNA during oxidative stress by the nonspecific DNA-binding protein Dps // *J. Bacteriol.* 179:5188-5194.

50 *Lim, E. M., S. D. Ehrlich, and E. Maguin.* 2000. Identification of stress inducible proteins in *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* // *Electrophoresis* 21: 2557-2561.

51 *Lorca, G.L., G.F. de Valdez, and A. Ljungh.* 2002. Characterization of the protein synthesis dependent adaptive acid tolerance response in *Lactobacillus acidophilus* // *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 4:525-532.

52 De Angelis, M., L. Bini, V. Pallini, P. S. Cocconcelli, and M. Gobetti. 2001. The acid-stress response in *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1 // *Microbiology* 147:1863-1873.

53 Lee, K., H. G. Lee, K. Pi, and Y. J. Choi. 2008. Effect of low pH on protein expression by the probiotic bacterium *Lactobacillus reuteri*. *Proteomics* 8: 1624-1630.

54 Frees, D., K. Savijoki, P. Varmanen, and H. Ingmer. 2007. Clp ATPases and ClpP proteolytic complexes regulate vital biological processes in low GC, gram-positive bacteria // *Mol. Microbiol.* 63:1285-1295.

55 Bron, P.A., C. Grangette, A. Mercenier, W.M. de Vos, and M. Kleerebezem. 2004. Identification of *Lactobacillus plantarum* genes that are induced in the gastrointestinal tract of mice // *J. Bacteriol.* 186:5721-5729.

56 Bron, P. A., M. Meijer, R. S. Bongers, W. M. de Vos, and M. Kleerebezem. 2007. Dynamics of competitive population abundance of *Lactobacillus plantarum* *ivi* gene mutants in faecal samples after passage through the gastrointestinal tract of mice // *J. Appl. Microbiol.* 103:1424-1434.

57 Walter, J., N. C. K. Heng, W. P. Hammes, D. M. Loach, G. W. Tannock, and C. Hertel. 2003. Identification of *Lactobacillus reuteri* genes specifically induced in the mouse gastrointestinal tract // *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 2044-2051.

58 57=268 Walter, J., P. Chagnaud, G. W. Tannock, D. M. Loach, F. Dal Bello, H. F. Jenkinson, W. P. Hammes, and C. Hertel. 2005. A high-molecular-mass surface protein (Lsp) and methionine sulfoxide reductase B (MsrB) contribute to the ecological performance of *Lactobacillus reuteri* in the murine gut // *Appl. Environ. Microbiol.* 71:979-986.

59 Kullisaar T, Songisepp E, Aunapuu M, et al. Complete glutathione system in probiotic *Lactobacillus fermentum* ME-3 // *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* 2010;46(5):527-531. doi:10.1134/S0003683810050030..

60 Montgomery K, Charlesworth JC, LeBard R, Visscher PT, Burns BP. Quorum sensing in extreme environments. *Life (Basel, Switzerland)* 2013;3(1):131-48. doi:10.3390/life3010131..

61 *Loenen, W.A.M.* 2006. S-Adenosylmethionine: jack of all trades and master of everything? // *Biochem. Soc. Trans.* 34:330-333.

62 *Lebeer, S., I.J.J. Claes, T.L.A. Verhoeven, C. Shen, I. Lambrichts, J.L. Ceuppens, J. Vanderley den, and S.C.J. De Keersmaecker.* 2008. Impact of luxS and suppressor mutations on the gastrointestinal transit of *Lactobacillus rhamnosus* GG // *Appl. Environ. Microbiol.* 74:4711-4718.

63 *Lee, K., H. G. Lee, and Y. J. Choi.* 2008. Proteomic analysis of the effect of bile salts on the intestinal and probiotic bacterium *Lactobacillus reuteri* // *J. Biotechnol.* 137:14-19.

64 *E.J. Capra and M.T. Laub.* The Evolution of Two-Component Signal Transduction Systems. *Annu Rev Microbiol.* 2012;66:325-347. doi:10.1146/annurev-micro-092611-150039.

65 *Morel-Deville, F., F. Fauvel, and P. Morel.* 1998. Two-component signal transducing systems involved in stress responses and vancomycin susceptibility in *Lactobacillus sakei* // *Microbiology* 144:2873-2883.

66 *Azcarate-Peril, M.A., O. McAuliffe, E. Altermann, S. Lick, W. M. Russell, and T. R. Klaenhammer.* 2005. Microarray analysis of a two-component regulatory system involved in acid resistance and proteolytic activity in *Lactobacillus acidophilus* // *Appl. Environ. Microbiol.* 71:5794-5804.

67 *Lazazzera, B.A.* 2001. The intracellular function of extracellular signaling peptides // *Peptides* 22:1519-1527.

68 *Do H, Kumaraswami M.* 2016. Structural Mechanisms of Peptide Recognition and Allosteric Modulation of Gene Regulation by the RRNPP Family of Quorum-Sensing Regulators // *J Mol Biol.* 428(14):2793-804. doi: 10.1016/j.jmb.2016.05.026. Epub 2016 Jun 7.

69 *Howell, A., S. Dubrac, K. K. Andersen, D. Noone, J. Fert, T. Msadek, and K. Devine.* 2003. Genes controlled by the essential YycG/YycF two-component system of *Bacillus subtilis* revealed through a novel hybrid regulator approach // *Mol. Microbiol.* 49:1639-1655.

70 *Maria L. Mohedano, Mónica Amblar, Alicia de la Fuente JMW. and, López P.* The response regulator YycF inhibits expression of the fatty acid biosynthesis repressor FabT in *Streptococcus*

pneumonia // *Front. Microbiol.* 2016;7(January):1-14. doi:10.3389/fmicb.2016.01326.

71 *Srivatsan, A., J.D. Wang.* 2008. Control of bacterial transcription, translation and replication by (p)ppGpp. *Curr. Opin. Microbiol.* 11:100-105.

72 *Rallu, F., A. Gruss, S. D. Ehrlich and E. Maguin.* 2000. Acid- and multistress-resistant mutants of *Lactococcus lactis*: identification of intracellular stress signals // *Mol. Microbiol.* 35:517-528.

73 *Kullen, M.J. and T.R. Klaenhammer.* 1999. Identification of the pH inducible, proton-translocating F1FO-ATPase (atpBEFHAGDC) operon of *Lactobacillus acidophilus* by differential display: gene structure, cloning and characterization // *Mol. Microbiol.* 33:1152-1161.

74 *Corcoran, B. M., C. Stanton, G. F. Fitzgerald, and R.P. Ross.* 2005. Survival of probiotic lactobacilli in acidic environments is enhanced in the presence of metabolizable sugars // *Appl. Environ. Microbiol.* 71:3060-3067.

75 *Penaud, S., A. Fernandez, S. Boudebouze, S. D. Ehrlich, E. Maguin, and M. van de Guchte.* 2006. Induction of heavy-metal-transporting CPX-type ATPases during acid adaptation in *Lactobacillus bulgaricus* // *Appl. Environ. Microbiol.* 72:7445-7454.

76 *Marco, M.L., R.S. Bongers, W.M. de Vos, and M. Kleerebezem.* 2007. Spatial and temporal expression of *Lactobacillus plantarum* genes in the gastrointestinal tracts of mice // *Appl. Environ. Microbiol.* 73:124-132.

77 *Cunin, R., N. Glansdorff, A. Pierard, and V. Stalon.* 1986. Biosynthesis and metabolism of arginine in bacteria // *Microbiol. Rev.* 50:314-352.

78 *Lambert, J., R. Bongers, W. de Vos, and M. Kleerebezem.* 2008. Functional analysis of four bile salt hydrolase and penicillin acylase family members in *Lactobacillus plantarum* WCFS1 // *Appl. Environ. Microbiol.* 74:4719-4726.

79 *McAuliffe, O., R.J. Cano and T. R. Klaenhammer.* 2005. Genetic analysis of two bile salt hydrolase activities in *Lactobacillus acidophilus* NCFM // *Appl. Environ. Microbiol.* 71:4925-4929.

80 *Denou, E., B. Berger, C. Barretto, J. M. Panoff, F. Arigoni, and H. Brussow.* 2007. Gene expression of commensal *Lactobacillus*

johnsonii strain NCC533 during in vitro growth and in the murine gut // J. Bacteriol. 189:8109-8119.

81 Denou, E., R. D. Pridmore, B. Berger, J. M. Panoff, F. Arigoni, and H. Brussow. 2008. Identification of genes associated with the long gut persistence phenotype of the probiotic *Lactobacillus johnsonii* strain NCC533 using a combination of genomics and transcriptome analysis // J. Bacteriol. 190:3161-3168.

82 Ueno, Y., K. Hayakawa, S. Takahashi, and K. Oda. 1997. Purification and characterization of glutamate decarboxylase from *Lactobacillus brevis* IFO 12005 // Biosci. Biotechnol. Biochem. 61:1168-1171.

83 Higuchi, T., H. Hayashi and K. Abe. 1997. Exchange of glutamate and aminobutyrate in a *Lactobacillus* strain // J. Bacteriol. 179:3362-3364.

84 Azcarate-Peril, M. A., E. Altermann, R. L. Hoover-Fitzula, R. J. Cano, and T.R. Klaenhammer. 2004. Identification and inactivation of genetic loci involved with *Lactobacillus acidophilus* acid tolerance. Appl. Environ // Microbiol. 70:5315-5322.

85 Lambert, J. M., R. S. Bongers, and M. Kjeerebezem. 2007. Cre-lox-based system for multiple gene deletions and selectable-marker removal in *Lactobacillus plantarum* // Appl. Environ. Microbiol. 73:1126-1135.

86 Morel-Deville, F., F. Fauvel, and P. Morel. 1998. Two-component signal transducing systems involved in stress responses and vancomycin susceptibility in *Lactobacillus sakei* // Microbiology 144:2873-2883.

87 Antikainen, J., V. Kupannen, K. Lahteenmaki, and T.K. Korhonen. 2007. pH-dependent association of enolase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Lactobacillus crispatus* with the cell wall and lipoteichoic acids // J. Bacteriol. 189:4539-4543.

Шайхин Серик Мурзахметович, доктор биологических наук, заведующий лабораторией генетики и биохимии микроорганизмов

Абитаева Гуляим Кауркеновна, научный сотрудник, email: g.abitayeva@rcm.kz

Молдагулова Асель Кожухановна, младший научный сотрудник

Шайхина Диана Сериковна, младший научный сотрудник

Бекенова Эленора Ербубековна, младший научный сотрудник

Сармурзина Зинигуль Сериковна, кандидат биологических наук,
заведующая лабораторией микробиологии

Закарья Кунсулу Дальтоновна, доктор биологических наук, заместитель
генерального директора

Абжалелов Ахан Бекманович, доктор биологических наук,
генеральный директор