

## Характеристика лактобацилл, выделенных из трупного материала подвздошной кишки

В.М. Червинец<sup>1</sup>, Ю.В. Червинец<sup>1</sup>, Е.А. Беляева<sup>1</sup>, В.К. Дадабаев<sup>1</sup>, А.В. Леонтьева<sup>1</sup>,  
Э.С. Кравчук<sup>1</sup>, А.Ю. Миронов<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Тверской государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, Тверь

<sup>2</sup> ФБУН Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва

## Characteristic of lactobacilli isolated from cadaveric material of ileum

V.M. Chervinets<sup>1</sup>, Yu.V. Chervinets<sup>1</sup>, E.A. Beliaeva<sup>1</sup>, V.K. Dadabaev<sup>1</sup>, A.V. Leonteva<sup>1</sup>,  
E.S. Kravchuk<sup>1</sup>, A.Yu. Mironov<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Tver State Medical University

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

### Аннотация

При изучении 37 образцов трупного материала подвздошной кишки были идентифицированы следующие штаммы лактобацилл: 4 - *L. rhamnosus*, 4 - *L. plantarum*, 3 - *L. fermentum*, 1 - *L. paracasei*. Были изучены ферментативная и адгезивная активности, способность к антагонизму по отношению к условно-патогенным и патогенным микроорганизмам и продуцировать газообразные сигнальные молекулы. Выявлено, что выделенные лактобациллы обладают адаптационным и пробиотическим потенциалом.

### Ключевые слова

Лактобациллы, подвздошная кишка, биологические свойства

### Summary

In the study of 37 samples of cadaveric material of the ileum were found strains of lactobacilli: 4 - *L. rhamnosus*, 4 - *L. plantarum*, 3 - *L. fermentum*, 1 - *L. paracasei*. Enzymatic and adhesive activity, ability to antagonize to opportunistic and pathogenic microorganisms and to produce gaseous signaling molecules were studied. It was revealed that the isolated lactobacilli have adaptive and probiotic potential.

### Keywords

Lactobacillus, ileum, biological properties

### **Введение**

Микрофлора тонкого кишечника представляет собой часть всего баланса микроорганизмов, обитающих в кишечнике человека, в основном в дистальной части подвздошной кишки в количествах около  $10^6$ - $10^8$  КОЕ/мл. Преобладающими микроорганизмами подвздошной кишки являются представители родов *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Bacteroides* [1].

В пристеночном слое клеток тонкого кишечника лактобацилл от  $10^3$  до  $10^4$  КОЕ/мл кишечного сока. Лактобациллы характеризуются важ-

нейшими биологическими свойствами, благодаря которым оказывают положительное влияние: подавляют рост и размножение гнилостных микроорганизмов, обладают антибактериальным действием, предотвращают развитие воспалительного процесса, вызванного патогенными микроорганизмами [2], сбалансированно заселяют слизистую оболочку пищеварительного тракта, активизируют иммунную систему, способствуют продукции ИЛ-1, 2, 4, 6, 8, 10 и  $\gamma$ -интерферон [3], участвуют в расщеплении питательных субстратов, обеспечивают биосинтетическую, детоксикоци-

онную функции нормальной микрофлоры человека, обладают способностью оказывать антагонистическое действие по отношению к патогенам [4, 5]. Имеются данные о биологических свойствах лактобацилл, выделенных из толстого кишечника, включающие биохимические свойства, антагонистическую активность, адгезию [6, 7, 8]. Зарубежные исследования газообразных продуктов, образуемых эндотелиальными клетками различных тканей и/или кишечными бактериями, особенно лактобациллами, выявили участие этих биологически активных и сигнальных молекул в различных фундаментальных физиологических и патофизиологических процессах организма хозяина [9, 10, 11]. Микроорганизмы могут продуцировать различные низкомолекулярные регуляторные молекулы (аутоиндукторы), способные распознавать окружающую среду, обеспечивать обмен информацией между многочисленными микроорганизмами и клетками хозяина и играть ключевую роль в регуляции многих физиологических функций, биохимических и поведенческих реакций, в поддержании здоровья в целом. Актуальным является изучение лактобацилл подвздошной кишки, как наиболее обильно колонизированного отдела тонкого кишечника.

*Цель работы:* анализ биологического потенциала представителей рода *Lactobacillus*, изолированных из кишечника людей, умерших естественной смертью.

### Материалы и методы

Для микробиологического анализа в работе были использованы образцы слизистой оболочки подвздошной кишки от 37 людей, умерших естественной смертью не более чем через 12 часов после ее подтверждения. Материал забирали стерильным пинцетом (менее 2 см), помещали в стерильную емкость и привозили в учебно-научную бактериологическую лабораторию Тверского ГМУ.

Лактобациллы выращивали на лактоагаре при температуре 37°C при содержании кислорода менее 10% в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. Культуры идентифицировали с помощью биохимических тест-систем API 50 CHL «Bio Mérieux».

Антагонистическую активность лактобацилл к условно-патогенным и патогенным микроорганизмам изучали стандартным методом отсроченного антагонизма по Л.П. Блинковой (2003). В эксперименте участвовали производственные штаммы: дрожженные грибы рода кандиды ATCC 885-653, *Salmonella enterica* Typhimurium 415, *Shigella sonnei* I фазы 941, *Bacillus subtilis* 534,

золотистый стафилококк ATCC 25923, кишечная палочка ATCC 25922, синегнойная палочка ATCC 9027 из коллекций ГУ НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Н. Ф. Гамалеи, ФБУН МНИИЭМ имени Г. Н. Габричевского, ГНИИ стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов имени Л. А. Тарасевича.

Для определения способности микроорганизмов адгезироваться к эпителиальным клеткам полости рта использовали видоизмененную методику В. И. Брилиса. Анализ газовых сигнальных молекул (CH<sub>4</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>, C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>, CO) проводился методом газовой хроматографии на газовом хроматографе Кристал-люкс 5000 М с использованием пламенно-ионизационного детектора и детектора по теплопроводности.

### Результаты и обсуждение

Из 37 образцов трупного материала выделено 3 штамма лактобацилл вида *L. fermentum*, 4 штамма - *L. plantarum*, 4 - *L. rhamnosus*, 1 - *L. paracasei*.

Все штаммы *L. fermentum*, выделенные из подвздошной кишки, ферментировали узкий спектр субстратов: К-глюконат, D-галактозу, D-глюкозу, D-фруктозу, D-маннозу, D-мальтозу, D-лактозу, D-сахарозу, D-раффинозу, D-рибозу.

Штаммы *L. plantarum* в отличие от *L. fermentum* имели более широкую ферментативную активность. Все штаммы *L. plantarum* расщепляли 25 биохимических субстратов (рис. 1).

Все выделенные штаммы *L. rhamnosus*, так же, как и *L. plantarum* обладали разнообразием в ферментации субстратов, за исключением: метил-βD-глюкопиранозид, D-лактозы, D-мелибиозы, D-сахарозы, D-раффинозы (рис. 2).

Лактобациллы подвздошной кишки, выделенные из трупного материала, фенотипически проявили полноценную биохимическую активность, типичную для представителей видов *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. paracasei*, характерных для кишечника живых людей.

**Адгезия на эпителиальных клетках.** Все штаммы лактобацилл проявили среднюю адгезивную способность (1,34±0,27 (M±m)), что свидетельствует об их потенциальной возможности входить в состав биопленок, осуществляя колонизационную резистентность. Способность к адгезии является необходимой особенностью пробиотических штаммов лактобактерий, поскольку она продлевает продолжительность их пребывания в ЖКТ, способствуя подавлению патогенных микроорганизмов и взаимодействуя с клетками организма для защиты и регуляции мукозального иммунитета. По данным литера-

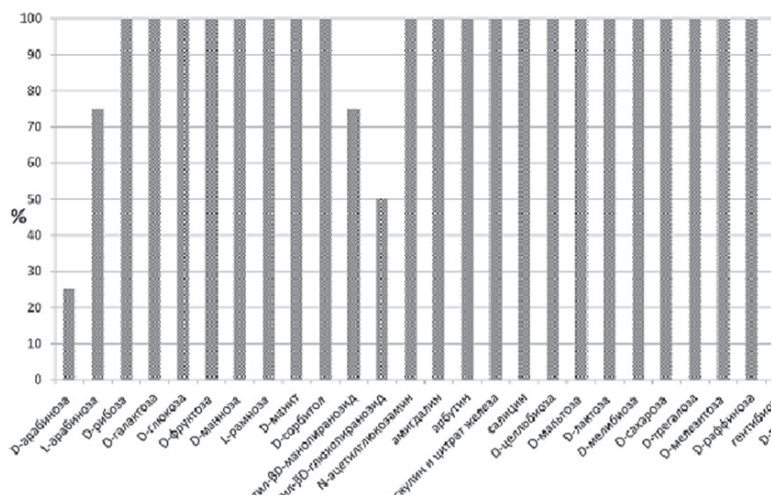


Рис. 1. Биохимическая активность *L. plantarum*, выделенных из трупного материала подвздошной кишки

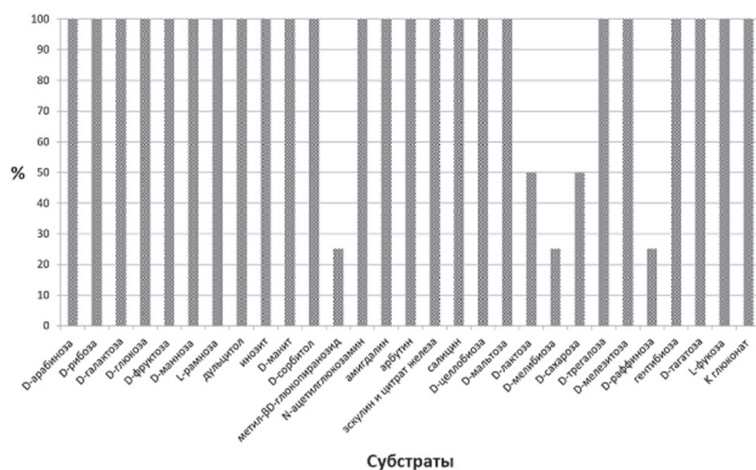


Рис. 2. Биохимическая активность *L. rhamnosus*, выделенных из трупного материала подвздошной кишки

туры антагонистические штаммы лактобацилл полости рта характеризуются высокой адгезивной активностью, а лактобациллы кишечника демонстрируют средние значения [8].

**Антагонистическая активность.** Лактобациллы, принадлежащие к микробиоте желудочно-кишечного тракта, характеризуются не только большим разнообразием, но многие обладают и широкой антибактериальной активностью, которая принимает участие в защитных механизмах желудочно-кишечного тракта. Лактобациллы, выделенные из подвздошной кишки трупов, проявили низкую способность к антагонизму по отношению ко всем тест-культурам (т. е. диаметры зоны задержки роста составляли 10-15 мм).

Способность к продукции газовых сигнальных молекул. Различные штаммы лактобацилл могут образовывать широкий спектр газовых сигнальных молекул:  $\text{CH}_4$ ,  $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{NO}$ ,  $\text{CO}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  и др. [12].

Лактобациллы, выделенные из подвздошной кишки трупов, показали низкую продукцию га-

зовых сигнальных молекул. Штаммы *L. plantarum* 75, *L. plantarum* 46, *L. rhamnosus* 112 выделяют метан и этан. Штамм *L. rhamnosus* 112 выделяет пропан, штамм *L. plantarum* 90 продуцирует  $\text{CO}$  в следовых количествах (табл. 1).

Важная роль газотрансмиттеров ( $\text{CH}_4$ ,  $\text{C}_2\text{H}_6$ ,  $\text{C}_3\text{H}_8$ ,  $\text{CO}$ ) во внутри- и межвидовой микробной коммуникации, а также в диалоге микробиота-хозяин активно изучается. Известна роль этого взаимодействия на здоровье человека, его влияние на психику человека и социальное поведение, а также возможность создания пробиотических препаратов с нейрхимическим эффектом [12]. Выделение  $\text{CO}$  активирует цито- и тканезащитные механизмы [9]. Высказывается предположение, что образование метана является внутриклеточным или межклеточным сигналом гипоксии, которую испытывают клетки. Предполагается, что метан, выделяемый микрофлорой кишечника, принимает участие в регуляции его перистальтики [13, 14].

**Таблица 1. Газовые сигнальные молекулы, выделяемые лактобациллами**

Культуры микроорганизмов	Количество газовых сигнальных молекул, мг/мл			
	CH <sub>4</sub> (метан)	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> (этан)	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> (пропан)	CO (монооксид углерода)
<i>L. rhamnosus</i> 112	0,000349784	0,0001816347	0,0000062117	-
<i>L. plantarum</i> 75	0,000130868	0,0000423603	-	-
<i>L. plantarum</i> 46	0,000024037	0,0000152913	-	-
<i>L. plantarum</i> 90	-	-	-	следовые количества

### Заключение

На примере 4-х видов лактобацилл, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. paracasei*, выделенных подвздошной кишки трупного материала, показано, что, не смотря на время, прошедшее с момента наступления смерти (12 часов), данные штаммы обладали высокой и типичной для вида ферментативной активностью, средней адгезивностью,

способностью проявлять антагонистическую активность по отношению к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам и продуцировать газовые сигнальные молекулы. Лактобациллы подвздошной кишки, проявляя адаптационный и пробиотический потенциал, дают возможность использовать их в качестве трансплантационного материала при пересадке трупной ткани.

### Литература

- Ouweland A.C., Vaughan E. E. Gastrointestinal Microbiology. CRC Press. 2006; 25-50.
- Besselink M.G.H., van Santvoort H.C., Boermeester M.A. et al. Probiotic prophylaxis in acute pancreatitis: prudence required. Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol. 2009; 6(3): E3-6.
- <https://doi.org/10.1038/ncpgasthep1368>
- Medzhitov, R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. Nature. 2007; 449: 819-826.
- <https://doi.org/10.1038/nature06246>
- Червинец В.М., Червинец Ю.В., Беляева Е.А. и соавт. Сравнительная характеристика лактобацилл, выделенных из фекалий здоровых людей, проживающих в Российской Федерации и Казахстане. Современные проблемы науки и образования. 2016; 6: 570.
- Червинец В.М., Червинец Ю.В., Михайлова Е.С. и соавт. Микробиоценоз кишечника и иммунный статус у детей младшего школьного возраста. Клиническая лабораторная диагностика. 2013; 1: 49-51.
- Червинец Ю.В., Ботина С.Г., Глазова А.А. и соавт. Генетическая паспортизация и изучение способности к формированию биоплёнок лактобациллами, выделенными из полости рта здоровых людей. Клиническая лабораторная диагностика. 2011; 2: 44-46.
- Ботина С.Г., Ивашкина Н.Ю., Маев И.В. Молекулярно-генетические характеристики и пробиотический потенциал бактерий рода *Lactobacillus*. Молекулярная медицина. 2011; 2: 53-56.
- Червинец Ю.В., Червинец В.М. Пробиотический и адаптационный потенциал лактобацилл, перспективных для

конструирования эффективных пробиотических препаратов. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2016; 2 (126): 108.

- Althaus M, Clauss WG. Gasotransmitters: novel regulators of ion channels and transporters. Front Physiol. 2013; 4: 27.
- <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00027>
- Farrugia G, Szurszewski JH. Carbon monoxide, hydrogen sulfide, and nitric oxide as signaling molecules in the gastrointestinal tract. Gastroenterology 2014;147(2): 303-313.
- <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.04.041>
- Takahashi N., Kozai D., Mori Y. TRP channels: sensors and transducers of gasotransmitter signals. Front. Physiol. 2012; 3: 324.
- <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00324>
- Шендеров Б.А. Роль эндогенных и микробных газовых молекул в физиологии, патофизиологии сердечно-сосудистой системы. Вестник восстановительной медицины. 2015; 5: 58-65.
- Sahakian, A.B., Jee, S.R., Pimentel, M. Methane and the gastrointestinal tract. Dig Dis Sci. 2010; 55(8): 2135-2143.
- <https://doi.org/10.1007/s10620-009-1012-0>
- Tuboly E., Szabó A., Garab D. et al. Methane biogenesis during sodium azide-induced chemical hypoxia in rats. American Journal of Physiology - Cell Physiology. 2013; 304(2): 207-214.
- <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00300.2012>

### Сведения об авторах

Червинец Вячеслав Михайлович – д.м.н., профессор заведующий кафедрой микробиологии и вирусологии с курсом иммунологии, e-mail: chervinets@mail.ru  
 Червинец Юлия Вячеславовна – д.м.н., профессор кафедры микробиологии и вирусологии с курсом иммунологии, e-mail: julia\_chervinets@mail.ru  
 Беляева Екатерина Андреевна – к.б.н., доцент кафедры микробиологии и вирусологии с курсом иммунологии, e-mail: eabelyaeva1@mail.ru  
 Дадабаев Владимир Кадырович – к.м.н., доцент, доцент кафедры судебной медицины с курсом правоведения, e-mail: vkdadabaiev@ya.ru  
 Леонтьева Аурелия Валерьевна – студентка 5 курса стоматологического факультета, e-mail: aurika171900@mail.ru  
 Кравчук Элина Сергеевна – ассистент кафедры микробиологии и вирусологии с курсом иммунологии, e-mail: ellada\_92@mail.ru

Поступила 12.02.2019 г.