

БИОХИМИЯ

УДК 619.616 - 981.48 - 07:636.4

А. А. Агабабова, О. А. Мовсесян

Изменение условнопатогенной микрофлоры желудочно-кишечного тракта крыс под воздействием низкочастотного лазера

(Представлено академиком К. Г. Карагесяном 11/XII 2010)

Ключевые слова: лазер, микроорганизм, условнопатогенная микрофлора, транслокация

Желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) человека заселяют разнообразные аэробные и анаэробные грамположительные и грамотрицательные микроорганизмы, наибольшее количество которых сосредоточено в толстой кишке. Масса нормальной микрофлоры кишечника взрослого человека составляет более 2.5 кг с численностью 10^{12} – 10^{14} КОЕ на 1 г фекалий. Было обнаружено, что микрофлора кишечника включает 395 филогенетически обособленных групп микроорганизмов, из которых 244 (62%) являются абсолютно новыми [1].

Общий генофонд присутствующей в нашем организме микрофлоры насчитывает 400 тыс. генов, что на порядок больше размера генома человека (около 35 тыс. функционирующих генов) [2]. Столь большой их набор определяет и колоссальную функциональную активность микроорганизмов, участвующих в регуляции многих физиологических и иммунных реакций, обеспечивающих защиту организма от заболеваний включая инфекционные. Инфекционный процесс эндогенного или экзогенного происхождения нередко сопровождает самые различные повреждающие воздействия на макроорганизм, в том числе обширные ожоги, радиационное поражение, политравму, массивную кровопотерю, и осложняет течение патологии [3].

Одной из важных функций симбиотической микрофлоры кишечника является обеспечение колонизационной резистентности и участие в неспецифической стимуляции иммунокомпетентных клеток и тканей. Адьювантоактивные соединения, представленные у гр-бактерий липополисахаридом

(ЛПС), а у грамнегативных мурамилдипептидом, входят в состав клеточной стенки симбиотических микроорганизмов и постоянно высвобождаются в просвете кишечника под воздействием литических агентов [1].

Известно, что значимость эндотоксина при различных патологиях человека не ограничивается лишь его важной ролью при генерализованных заболеваниях, вызванных гр-бактериями. Толстая кишка кишечника человека содержит много аэробных и анаэробных гр-бактерий, причем часть бактериальных клеток постоянно разрушается. Это приводит к выделению в просвет кишки большого количества ЛПС – эндотоксина. Неповрежденная слизистая толстой кишки является достаточно надежным барьером, предотвращающим попадание эндотоксина в кровоток в больших количествах. Во всяком случае, в эксперименте чистый эндотоксин через кишечный эпителий не проникает [2]. В последние годы появились данные, требующие пересмотра этой точки зрения. Практически у всех здоровых лиц эндотоксин можно обнаружить при помощи иммуноферментной реакции в тонких мазках крови на поверхности 3-4% полиморфоядерных лейкоцитов [2]. Следовательно, хоть и в небольших количествах, зато постоянно эндотоксин проникает в кровоток.

В настоящее время очевидно, что транслокация бактерий и эндотоксина из кишечника в кровоток имеет место при очень многих ситуациях: стрессовых воздействиях (иммобилизационный стресс, краш синдром), различных радиационных поражениях (рентгеновские лучи), при патологических процессах (атеросклероз, неспецифический язвенный колит, болезнь Крона, системная красная волчанка, ревматический артрит) и особенно при кишечных дисбактериозах [2].

Во всех этих случаях наблюдается следующий ключевой момент: эшерихии из микробиоценоза кишечника при нарушении иммунобиологических барьеров микроорганизма транслоцируются в мезентериальные лимфоузлы и через портальную венозную систему в кровеносное русло [4].

Цель настоящей работы – оценка качественного и количественного состава микробного сообщества толстой кишки крысы в условиях воздействия лазера. И хотя организм крысы – не вполне адекватная модель человеческого организма, эксперименты вполне могут восполнить определенные пробелы в этой области знаний.

В эксперименте были использованы здоровые крысы-самцы весом до 100 г. Все крысы содержались на стандартном рационе. Перед облучением животные были на голодном рационе с обеспечением питьевой водой. Лазер (SCL) $\lambda = 654$ нм, доза 63.7; 127.4; 254.8; 382.2 мДж/мм². При заборе биоматериала крыс забивали через 5, 10, 20, 30 мин после облучения. Бактериологические исследования проводили согласно методическим указа-

ниям по микробиологической диагностике заболеваний, вызываемых энтеробактериями [5]. Идентификацию высеиваемых микроорганизмов проводили с помощью биохимических тестов. Выделяли микроорганизмы, наиболее типичные для человека: бифидобактерии, лактобактерии, эшерихии, энтерококки, стафилококки, клостридии и кандиды. Количество выделенных микроорганизмов выражали в ед. КоЕ/г массы биологического материала. В результате проведенного исследования было обнаружено, что количество бифидобактерий через 5 мин после облучения было близко к норме, через 10 мин вдвое уменьшалось, а через 20 и 30 мин приравнялось нулю. Количество лактобактерий уже начиная с 5-й мин облучения резко сокращалось. Через 10, 20, 30 мин оно также равнялось нулю. Из облигатной микрофлоры менялось также количество клостридий — через 10, 20, 30 мин оно равнялось нулю. Через 5 мин после воздействия лазера из прочих анаэробов высеивались единичные колонии. Количество *Combylobacter* через 10, 20, 30 мин было равно нулю. Из облигатной микрофлоры резким изменениям подвергалась и кишечная палочка *E. coli*: уже через 5 мин после облучения наблюдались колонии *lact*-форм *E. coli*, количество их через 5 и 10 мин после облучения незначительно уменьшалось, а через 20 и 30 мин равнялось нулю. Кроме того из факультативной микрофлоры выделялись гемолизирующие *E. coli*, которых в норме вообще нет, но через 20 и 30 мин после облучения их колонии также исчезали. Через 5 и 10 мин после облучения выделялись также фекальные стрептококки из облигатных представителей. Из факультативной микрофлоры через 5, 10 мин выделялись колонии *St. epidermitis*, *Ps. aeruginosa* и грибки рода *Candida*, причем грибки в значительно большем количестве, чем в норме. Через 20, 30 мин все микробы факультативной флоры исчезали, кроме грибков, количество которых сравнительно уменьшалось, но не исчезало. Все данные приведены в табл. 1, 2.

Согласно полученным данным у макроорганизма в условиях облучения лазером (различной экспозиции) наблюдается активация процесса транслокации фекальной флоры, как облигатной, так и факультативной.

Вероятно, возможность проникновения микробов за пределы кишечника определяется не столько качественными характеристиками бактерий, сколько дефектами в системе колонизационной резистентности хозяина. Развитие последней сопряжено с ослаблением барьерной функции кишечного микробиоценоза, повышением проницаемости мукозной "выстилки" кишечника и нарушением иммунного статуса микроорганизмов [5]. К счастью, бактериальная транслокация не всегда заканчивается заболеванием, нося в ряде случаев abortивный характер, а ее результат зависит от состояния иммунологической реактивности макроорганизма, присутствия у него дополнительных факторов

риска, а также от выраженности патогенного потенциала микроорганизмов

Таблица 1

	Контроль	5 мин	10 мин	20 мин	30 мин
Bifidobacteria	$(2.4 \pm 0.4) \times 10^{10}$	$(5.5 \pm 0.3) \times 10^6$	$(8.6 \pm 0.5) \times 10^3$	—	—
Anaerobic cocci	$(4.1 \pm 0.3) \times 10^{10}$	$(2.7 \pm 0.8) \times 10^6$	—	—	—
Other anaerobes	$(1.9 \pm 0.8) \times 10^3$	—	—	—	—
Lactobacilli	$(6.3 \pm 0.8) \times 10$	$(3.7 \pm 0.7) \times 10$	—	—	—
E. coli	$(3.04 \pm 0.2) \times 10^5$	$(1.2 \pm 0.3) \times 10^5$	$(0.9 \pm 0.4) \times 10^3$	—	—
Streptococcus fecalis	$(4.5 \pm 0.6) \times 10^6$	$(2.7 \pm 0.4) \times 10^7$	$(3.9 \pm 0.7) \times 10^5$	$(1.5 \pm 0.3) \times 10^5$	$(4.9 \pm 0.5) \times 10^1$
Clostridium perfringens	10^3	—	—	—	—

Таблица 2

	Контроль	5 мин	10 мин	20 мин	30 мин
Haemolytic E. coli	—	$(2.04 \pm 0.5) \times 10$	$(3.9 \pm 0.8) \times 10^3$	—	—
Staphylococci	—	$(4.4 \pm 0.3) \times 10^5$	$(7.2 \pm 0.8) \times 10^7$	—	—
Clebsiella pneumoniae	—	$(3.1 \pm 0.3) \times 10^3$	$(5.6 \pm 0.6) \times 10^1$	$(8.4 \pm 0.9) \times 10^5$	—
Candida albicans	$(1.8 \pm 0.3) \times 10^3$	$(5.6 \pm 0.8) \times 10^7$	$(2.5 \pm 0.4) \times 10^5$	$(1.9 \pm 0.2) \times 10^7$	$(2.7 \pm 0.2) \times 10^4$

Сущностью этапа колонизации является оккупация выжившими патогенами инфицированных органов и тканей с формированием вторичных очагов вегетирования возбудителей. Причем возбудители либо локализуются на поверхности клеточных мембран, либо проникают внутрь клеток, избегая контакта с эффекторами иммунитета. Фиксации на тканевых структурах бактерий способствуют не только их физико-химические особенности (гидрофобность) и имеющиеся у них адгезины, но и наличие на клетках макроорганизма соответствующих рецепторов [6].

В то же время нормальная микрофлора кишечника принимает участие в обезвреживании мутагенов за счет ферментативного воздействия и продукции антимутагенов. Установлена антимутагенная и противоопухолевая активность клеток или фрагментов клеточных компонентов лактобацилл, бифидобактерий, энтерококков и их метаболитов. Противоопухолевые свойства

пробиотической флоры основаны как на стимуляции его противоопухолевого иммунитета, так и на прямом токсическом воздействии ее клеток и метаболитов на новообразования [7, 8].

Согласно нашим данным у крыс после облучения лазером (при резкой временной зависимости) высевались вначале lact-формы *E. coli* с выраженными изменениями биохимических свойств, а затем, возможно, возникал внекишечный эшерихиоз, т. е. выход *E. coli* из кишечника. Дальнейшая судьба проникших за пределы кишечника эшерихий может быть различна. Лишенные факторов патогенности, непатогенные *E. coli*, вероятно, относительно быстро погибают, столкнувшись с эффекторами иммунитета хозяина (лизоцим, фагоциты, система комплемента), в то время как их патогенные "двойники" сохраняют свою жизнеспособность и способны в конечном итоге вызвать кишечную эшерихиозную этиологию.

Выделенные нами грибки рода *Candida*, которые высевались единичными колониями и при 30-минутном облучении лазером, возможно, усиливают актилизосимную и актикомплементарную активность гемолитической и лактозонегативной кишечной палочки и золотистых стафилококков. В то же время анаэробные бактерии преимущественно подавляют факторы персистенции грибков рода *Candida* [6].

Негативные последствия циркуляции потенциально патогенных бактерий по замкнутой траектории кишечник — порт. венозная система — печень — желчь — кишечник связаны с тем, что поддерживаются и углубляются дисбиотические нарушения в кишечном микробиоценозе, повышается вероятность многократной транслокации кишечной флоры, увеличивается опасность развития патологического процесса в печени, желчевыводящих путях и других органах, кроме того происходит своеобразная преадаптация патогенов к их паразитированию в тканях микроорганизма, поскольку при движении бактерий по указанному маршруту выживают преимущественно клоны, устойчивые к эффекторам иммунитета [7].

Институт биохимии им. Г.Х.Бунятына НАН РА

А. А. Агабабова, О. А. Мовсесян

Изменение условнопатогенной микрофлоры желудочно-кишечного тракта крыс под воздействием низкочастотного лазера

В условиях облучения лазером у макроорганизма выявлена активация процесса транслокации фекальной флоры, как облигатной, так и факультативной. Вероятно,

возможность проникновения микробов за пределы кишечника определяется не столько качественными характеристиками бактерий, сколько дефектами в системе колонизационной резистентности хозяина. Развитие последних сопряжено с ослаблением барьерной функции кишечного микробиоценоза, повышением проницаемости мукозной "выстилки" кишечника и нарушением иммунного статуса микроорганизмов.

Ա. Ա. Ագաբաբովա, Ն. Ա. Մովսեսյան

Առնչվելի աղեստամոքսային տրակտի պայմանական ախտաճին միկրոֆլորայի փոփոխությունը ցածր հաճախականության լազերի ազդեցության ներքո

Միկրոօրգանիզմների մոտ լազերային ճառագայթումից հետո հայտնաբերվել է ինչպես պարուսդիր, այնպես էլ ֆակուլտատիվ կղանքի ֆլորայի տրանսլոկացման ընթացքի ակտիվացում: Հնարավոր է, որ մանուկների թափանցելիությունն աղիների սահմաններից դուրս պայմանավորված լինի ոչ այնքան բակտերիաների որակական բնութագրերով, որքան փիրոզ զաղութագմանը դիմադրողականության համակարգի թերություններով: Վերջիններիս զարգացումը կապված է աղիքային միկրոբիոցենոզի արգելապարի ֆունկցիայի նվազեցման, աղիների մուկոզային "պարման" թափանցելիության և միկրոօրգանիզմների իմունային կարգավիճակի հետ:

A. A. Agababova, N. A. Movsesyan

Change of Gut Microflora of Healthy Rats under the Low Energy Laser Irradiation

In the conditions of laser irradiation the activation of the process of translocation of the fecal flora, both obligate and facultative, is found out. The possibility of penetration of microbes out of intestine is defined more by defects in host system of resistance, than by not good characteristics of bacteria. The development of defects is interfaced to weakening of barrier function of an intestinal microbiocenosis, rising of permeability of an intestine and disturbance of the immune status of microorganisms.

Литература

1. Бондаренко В.М., Савицкая И.Е. - ЖМЭИ. 2008. N 3. С. 53-58.
2. Бондаренко В.М., Лихидег В.Г. - ЖМЭИ. 2008. N 5: С. 23-29.
3. Бондаренко В.М., Рябиченко Е.В. - ЖМЭИ. 2005. N 4. С. 76-81.
4. Гриценко В.А., Брудастов Ю.А. - ЖМЭИ. 2000. N 1. С. 37-41
5. Методические указания по микробиологической диагностике заболеваний.

вызванных энергодобактериями. Под. ред. М.А.Покровского. М. 1984.

6. Бондаренко В.М., Рыбальченко О.В. - ЖМЭИ. 2009. N 4. С. 96-99.

7. Николаева Т.Н., Бондаренко В.М. - Экспер. клин. гастероэнтерол. 2004. N 4. С. 54-59

8. Воробьев А.А., Несвижский Ю.В., Корнеев - ЖМЭИ. 2005. N 6. С. 3-7

9. Wollowski J., Pool-Zobel B.L. - Am. J. Clin. Nutr. 2001. V. 73. P. 451-455.