

3
НОМЕР

БОИЦ

ISSN 2304-9081

ЭЛЕКТРОННЫЙ ЖУРНАЛ

<http://www.elmag.uran.ru>

БЮЛЛЕТЕНЬ

ОРЕНБУРГСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА УРО РАН

Оренбургская область

Букобайские яры

Валиева Ж.А.



2023

УЧРЕДИТЕЛЬ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ

ОРЕНБУРГСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР

УРАЛЬСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

© А.Н. Сизенцов, 2023

УДК. 57.044, 57.047; 579.262

А.Н. Сизенцов

ФИЗИОЛОГО-АДАПТАЦИОННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МИКРОБИОМА КИШЕЧНИКА В УСЛОВИЯХ ОСТРОЙ ИНТОКСИКАЦИИ СВИНЦОМ НА МОДЕЛЯХ *IN VITRO* И *IN VIVO*

Оренбургский государственный университет, Оренбург, Россия

Цель. Оценить физиолого-адаптационные характеристики микробиома кишечника в условиях острой интоксикации свинцов на моделях *in vitro* и *in vivo*, а также степень повышения устойчивости организма с использованием транзиторных пробиотических штаммов.

Материалы и методы. Материалом для исследования в модельном эксперименте *in vitro* послужили изоляты факультативно-анаэробной нормофлоры кишечника крыс и пробиотические штаммы *Bacillus* sp.; в качестве регулирующих рост факторов использовали химически чистые соединения $Pb(NO_3)_2$ и $Pb(CH_3COO)_2$. Оценку степени влияния на тестируемые штаммы микроорганизмов осуществляли с использованием диффузионного метода агаровых лунок в комбинации с методом серийных разведений, нефелометрического и атомно-абсорбционного методов. В модельном эксперименте *in vivo* было сформировано 5 групп-аналогов из крыс линии Wistar (n=20 в каждой). Коррекция уровня свинцовой интоксикации в опытных группах осуществлялась с использованием транзиторных пробиотических штаммов (*B.subtilis* 534, *B.cereus* IP 5832, *B.licheniformis* ВКПМ В 7038). Оценку физиолого-адаптационных характеристик организма проводили на основании исследования группы контроля интоксикации. Физиологическое состояние животных оценивали до экспериментальной интоксикации (фоновое исследование) и после острой интоксикации по гематологическим и биохимическим показателям крови, гистологическому состоянию органов мишеней и содержанию исследуемого металла в биологических образцах.

Результаты. Полученные данные свидетельствуют об относительно высоком уровне резистентности как представителей нормофлоры, так и транзиторных пробиотических штаммов к химическим соединениям свинца (0,032 М/л), при этом следует отметить, что ацетат свинца обладает более выраженным ингибирующим действием на основных представителей микробиоты (0,0156 М/л). Максимальные показатели аккумуляции установлены у *B. subtilis* 534, *E. cloacae* и *E. coli* и составляли 65,3; 65,0 и 64,5%, соответственно. В модельных экспериментах *in vivo* установлено значительное влияние катионов свинца на структуру микробиома. Так, на фоне снижения основных представителей тонкого отдела кишечника *Lactobacillus* sp. на 25,5% и *Enterococcus* sp. на 58,6% отмечается значительное увеличение численности *E. coli* на 365,8% в течение 8 часов с момента интоксикации. Исследование, направленное на оценку использования транзиторных штаммов *Bacillus* sp. свидетельствует о высоком потенциале данного воздействия, так как их применение значительно снижало уровень негативного влияния катионов свинца как на отдельные органы (печень, селезенка), так и на организм в целом по средству снижения уровня Pb в тканях экспериментальных животных на 58,9; 53,3 и 44,4 % при использовании *B.subtilis* 534, *B.licheniformis* ВКПМ В 7038 и *B.cereus* IP 5832 соответственно.

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют о выраженном влиянии свинца на представителей нормофлоры кишечника как в условиях экспериментов *in vitro* так и *in vivo*. На фоне применения транзиторных штаммов *Bacillus* sp. значительно снижается патологическое влияние катионов свинца на организм экспериментальных животных.

Ключевые слова: свинец, острая интоксикация, микробиом кишечника, *Bacillus*.

A.N. Sizentsov

PHYSIOLOGICAL AND ADAPTATION CHARACTERISTICS OF THE INTESTINAL MICROBIOME IN THE CONDITIONS OF ACUTE LEAD INTOXICATION IN *IN VITRO* AND *IN VIVO* MODELS

¹ Orenburg State University, Orenburg, Russia

Aim. To assess the physiological and adaptive characteristics of the intestinal microbiome under conditions of acute lead intoxication using *in vitro* and *in vivo* models, as well as the degree of increase in body resistance using transient probiotic strains.

Materials and methods. Isolates of the facultative anaerobic normoflora of the intestines of rats and probiotic strains of *Bacillus* sp. chemically pure compounds $Pb(NO_3)_2$ and $Pb(CH_3COO)_2$ were used as growth regulating factors. The assessment of the degree of influence on the tested strains of microorganisms was carried out using the diffusion method of agar wells in combination with the method of serial dilutions, nephelometric and atomic absorption methods. In a model experiment *in vivo*, we formed 5 analogous groups of Wistar rats ($n=20$ in each). Correction of the level of lead intoxication in the experimental groups was carried out using transient probiotic strains (*B. subtilis* 534, *B. cereus* IP 5832, *B. licheniformis* VKPM B 7038). The assessment of the physiological and adaptive characteristics of the organism was carried out on the basis of a study of the intoxication control group. The physiological state of the animals was assessed before experimental intoxication (baseline study) and after acute intoxication by means of studying hematological and biochemical blood parameters, histological examination of target organs and determining the content of the studied metal in biological samples.

Results. The data obtained indicate a high level of resistance of both representatives of the normoflora and transient probiotic strains to chemical compounds of lead (0.032 M/l), while it should be noted that lead acetate has a more pronounced inhibitory effect on the main representatives of the microbiota (0.0156 M/l). The maximum accumulation rates were found in *B. subtilis* 534, *E. cloacae* and *E. coli* and amounted to 65.3%, 65.0% and 64.5%, respectively. In model experiments *in vivo*, a significant effect of lead cations on the structure of the microbiome was established, so against the background of a decrease in the main representatives of the small intestine, *Lactobacillus* sp. by 25.5% and Enterococcus sp. by 58.6% there is a significant increase in the number of *E. coli* by 365.8% within 8 hours from the moment of intoxication. A study aimed at evaluating the use of transient strains of *Bacillus* sp. testifies to the high potential of this area of research, since their use significantly reduces the level of the negative effect of lead cations both on individual organs (liver, spleen) and on the body as a whole by reducing the level of Pb in the tissues of experimental animals by 58.9%, 53.3% and 44.4% when using *B. subtilis* 534, *B. licheniformis* VKPM B 7038 and *B. cereus* IP 5832.

Conclusion. The results obtained indicate a pronounced effect of lead on the representatives of the intestinal normal flora both under the conditions of experiments *in vitro* and *in vivo*. Against the background of the use of transient strains of *Bacillus* sp. the pathological effect of lead cations on the body of experimental animals is significantly reduced.

Key words: lead, acute intoxication, intestinal microbiome, *Bacillus*.

Введение

Микробиом кишечника, часто называемый «суперорганом» или «экстракорпоральным органом», включает до ста триллионов микроорганизмов, а их видовое разнообразие может варьировать от человека к человеку. Они играют решающую роль в разнообразных биологических функциях, связанных с обменом веществ, иммунитетом и неврологическими реакциями. Однако

кишечный микробиом чувствителен к загрязнителям окружающей среды, особенно к тяжелым металлам. Между тяжелыми металлами и микробиомом существует постоянное взаимодействие. Воздействие тяжелых металлов замедляет рост и изменяет структуру типов микроорганизмов, входящих в микробиом кишечника. Между тем, микробиом кишечника участвует в детоксикации тяжелых металлов, изменяя физиологические условия, кишечную проницаемость, продуцируя ферменты для метаболизма тяжелых металлов [1].

Нарушения нормальной микрофлоры хозяина являются известным следствием токсического воздействия поллютантов, и эти нарушения могут привести к негативным последствиям для здоровья человека и животных. Показано, что биотрансформация многих соединений зависит от микробных ферментов, что может привести к различным последствиям для здоровья хозяина в результате изменений в микробиоме. Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что такой метаболизм химических веществ окружающей среды ферментами микробиоты хозяина может влиять на токсичность этого химического вещества для хозяина. Химико-микробные взаимодействия можно разделить на два класса: модуляция токсичности микробиомом и токсическая модуляция микробиома. Первый означает трансформацию химического вещества микробными ферментами или метаболитами с целью модификации химического вещества таким образом, чтобы сделать его более или менее токсичным. Второй – это изменение микробиоты, возникающее в результате химического воздействия. Эти изменения охватывают широкий спектр эффектов и могут варьировать – от регуляции микробных генов до ингибирования определенного фермента или гибели микроорганизмов. Определенные микробиомы могут быть связаны с различными последствиями для здоровья, такими как устойчивость или восприимчивость к воздействию определенных токсичных химических веществ, способность восстанавливаться после химического повреждения, наличие заболеваний, связанных с фенотипов и эффективностью иммунных реакций [2].

Следует отметить, что микробиота кишечника играет жизненно важную роль в поддержании гомеостаза кишечника. Воздействие загрязнителей окружающей среды, таких как тяжелые металлы, может способствовать прогрессированию обширного списка заболеваний, которые в дальнейшем могут привести к нарушениям в кишечнике, ассоциированным с дисбактериозом. Нарушение микробной экологии кишечника также влияет на микробный ме-

таболический профиль, который может изменить состояние видообразования и биодоступность тяжелых металлов, тем самым влияя на механизмы поглощения-абсорбции/детоксикации тяжелых металлов, связанные с их метаболизмом [3]. Таким образом, токсикология должна учитывать токсическое воздействие на микробиом хозяина как неотъемлемую часть холобионта [4].

Появляется все больше эпидемиологических данных о том, что тяжелые металлы (ТМ) могут способствовать прогрессированию различных метаболических заболеваний, и что этиология и прогрессирование этих заболеваний частично обусловлены вызванными ТМ нарушениями микробиоты кишечника. Важно отметить, что микробиота кишечника является первой линией защиты от токсического воздействия ТМ, и между ними существует двусторонняя связь. Таким образом, воздействие ТМ изменяет состав и метаболический профиль кишечной микробиоты на функциональном уровне, а кишечная микробиота, в свою очередь, изменяет поглощение и метаболизм ТМ, действуя как физический барьер для абсорбции ТМ и изменяя рН и окислительный баланс и концентрацию ферментов детоксикации или белков, участвующих в метаболизме ксенобиотиков. Более того, микробиота кишечника может влиять на целостность кишечного барьера что, в свою очередь, также может влиять на абсорбцию металлов [5, 6]. Также очевидно, что характеристика изменений функциональных возможностей микробиоты имеет решающее значение для понимания реакции на воздействие металлов. Эти результаты подтверждают полезность микробиоты в качестве доклинического инструмента для выявления воздействия конкретных тяжелых металлов [7].

Воздействие свинца остается глобальной проблемой общественного здравоохранения. Токсичность свинца хорошо известна для различных систем и органов. В исследованиях проводимых В. Гао с соавторами было установлено, что воздействие свинца изменило траекторию микробиома кишечника и его филогенетическое разнообразие. Метагеномное секвенирование и метаболомное профилирование показали, что многочисленные метаболические пути, включая синтез витамина Е и желчных кислот, азотистый и энергетический метаболизмы, окислительный стресс и механизм защиты (детоксикация), были значительно нарушены под воздействием свинца. Совокупность полученных данных свидетельствует, что воздействие свинца не только изменило разнообразие сообщества микробиома кишечника, но также сильно повлияло на различные метаболические функции [8].

В исследованиях проводимых S.E. George с соавторами по влиянию свинца на микробиом кишечника экспериментальных мышей было установлено, что *E. coli* была видом с самым высоким рейтингом в контрольных микробиомах, тогда как *Lactobacillus* занимает первое место у опытных мышей. Соотношение *Firmicutes* и *Bacteroidetes* в слепой кишке мышей, получавших эталонный почвенный образец свинца (ЭПОС), увеличилось больше, чем при использовании ацетат свинца, что указывает на изменения в метаболизме микробиома кишечника, которые способствуют ожирению. Прогнозируемое среднее содержание функциональных генов, связанных с биосинтезом и деградацией углеводов, липидов и жирных кислот, было выше в микробиоме слепой кишки мышей, получавших ЭПОС (содержание свинца 0,552%). Расширилось понимание взаимосвязи между составом микробиома, предсказанными функциональными генами и концентрацией Pb, особенно в почве [9]. Взаимосвязь между фекальным микробиомом мышей и загрязненными свинцом почвами, а так же выявление общих черт в микробиоме, которые коррелируют с более положительными последствиями для здоровья, может служить биомаркерами, помогающими выбрать более эффективные и представляющие меньший риск подходы к исправлению ситуации [10].

Исходя из выше изложенного, нами была поставлена цель – изучить физиолого-адаптационные характеристики нормофлоры кишечника к острой интоксикации свинцов на моделях *in vitro* и *in vivo*, а также оценить степень повышения устойчивости организма с использованием транзиторных пробиотических штаммов *Bacillus* sp.

Материалы и методы

Для реализации поставленной цели в качестве объектов исследования в модели *in vitro* нами использовались изоляты факультативно-анаэробной нормофлоры кишечника крыс, выделенные с использованием селективных сред и идентифицированные по культуральным, морфологическим, тинкториальным и биохимическим показателям (*E. coli*, *E. cloacae*, *E. faecium*, *L. acidophilus*) и пробиотические штаммы *Bacillus* sp. (*B. subtilis* 534, *B. cereus* IP 5832, *B. licheniformis* ВКПМ В 7038). Оценку уровня биотоксичности свинца на тестируемые штаммы осуществляли с использованием $Pb(NO_3)_2$ и $Pb(CH_3COO)_2$. Критерий выбора данных химических соединений обусловлен высоким уровнем их диссоциации в водных растворах, что позволяет создать высокий уровень катионной нагрузки на субстрат и, как следствие, оценить

уровень толерантности тестируемых в эксперименте штаммов к свинцу.

Определение уровня резистентности бактерий к влиянию солей свинца проводили с использованием диффузионного метода агаровых лунок в комбинации с методом серийных разведений. Использование данного методического подхода позволило оценить не только качественные, но и количественные характеристики воздействия солей металлов (от 1 М/л до 0,0156 М/л) на рост исследуемых микроорганизмов. Стоит отметить, что данная методика позволяет определить степень диффундирования солей химических веществ в субстрат, а также избежать ложноположительных и ложноотрицательных результатов как в отношении взаимодействия химических веществ с субстратом, так и устойчивости спорообразующих микроорганизмов [11].

Для определения времени наступления стационарной фазы роста исследуемых штаммов нами использовался нефелометрический метод исследования, позволяющий оценить не только временной интервал, но и степень влияния на динамические характеристики роста тестируемых микроорганизмов в присутствии субингибирующих (рабочих) концентраций (РК) свинца. Для получения достоверно значимых различий все исследования проводились в десятикратной повторности [12].

Определение уровня сорбционных характеристик свинца из субстрата осуществляли с помощью атомно-абсорбционного метода. Исследуемые образцы готовили по средству периодического культивирования экспериментальных тест-организмов в присутствии рабочих концентраций исследуемых солей свинца до наступления фазы максимального роста. Анализу подвергалась как биомасса клеток, так и надосадочная (супернатант) жидкость для определения общего процента содержания исследуемого элемента в образце.

В экспериментах на модели лабораторных животных (*in vivo*) нами было сформировано 5 групп-аналогов (самцы, идентичного возраста и живой массы тела) по 20 голов в каждой (табл. 1).

Полученные экспериментальные данные были статистически обработаны с целью определения средних значений, среднего квадратичного отклонения и средней ошибки средних значений. Достоверность различий сравниваемых показателей оценивалась на основании определения t- критерия Стьюдента и критерия Уилкоксона. Статистическая обработка данных проводилась с использованием автоматизированных программ «Биостатистика» и Microsoft Office Excel 2007. Регрессионные модели получены с помощью па-

кета программ «STATISTICA 10».

Таблица 1. Схема эксперимента *in vivo*

	Исследуемые группы				
	Контроль, интактные животные	Контроль интоксикации	<i>B. subtilis</i> 534**	<i>B. cereus</i> IP 5832**	<i>B. licheniformis</i> ВКПМ В 7038**
	К ₀	К ₁	О ₁	О ₂	О ₃
Основной рацион	+	+	+	+	+
Pb(NO ₃) ₂ *	-	+	+	+	+
Исследуемые показатели					
Морфофизиологические, гематологические и биохимические показатели крови ***	Морфофизиологические (эритроциты, лейкоциты, лейкоцитарный профиль), гематологические (гемоглобин, скорость оседания эритроцитов) и биохимические (общий белок, АлАТ, АсАТ, билирубин, щелочная фосфатаза, сахар, холестерин, мочевины, креатинин) показатели.				
Гистологическое исследование селезенки и печени ****	В качестве органов-мишеней использовались селезенка и печень, так как они в наибольшей степени подвержены воздействию тяжелых металлов (интоксикация)				
Определение содержания исследуемых металлов в тканях экспериментальных животных ****	Уровень поступления и аккумуляции свинца в организме животных осуществлялся с использованием атомно-абсорбционной спектрофотометрии по средству определения его содержания в вожном покрове, мышечной и костной тканях.				
<p><i>Примечание:</i> * – водный раствор Pb(NO₃)₂ вводился насильственно (индивидуально) однократно натошак в дозе 150 мг/кг для создания острой интоксикации</p> <p>** – суспензия микроорганизмов вводилась насильственно (индивидуально) дважды в сутки на протяжении 7 дней натошак в виде суспензии в объеме 0,5 мл в концентрации (1 × 10⁹ КОЕ/мл)</p> <p>*** – отбор исследуемых образцов проводился с интервалом в 7 суток (фоновое исследование, 7, 14 и 21 день эксперимента). Содержание животных и проведение процедур при выполнении исследований осуществляли в соответствии с требованиями инструкций и рекомендаций Российского регламента (Приказ МЗ СССР № 755 от 12.08.1977) и «The Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Academy Press Washington, D.C. 1996)»</p>					

Результаты и обсуждение

В рамках реализации первого блока экспериментов нами было проведено исследование *in vitro*, направленное на оценку уровня толерантности исследуемых штаммов к свинцу, степени его влияния на рост и адаптационные характеристики микроорганизмов (уровень сорбции).

Полученные в ходе эксперимента данные свидетельствуют об относительно высоком уровне устойчивости представителей нормофлоры к свинцу. В частности, установлено, что максимальные показатели резистентности в отношении Pb(NO₃)₂ регистрируются у *E. faecium* и *E. cloacae* в отношении которых концентрация 0,032 М/л не оказывает выраженного токсического влияния, в то время как для *E. coli* и *L. acidophilus* данная концентрация обла-

дает субингибирующим действием.

В отношении ацетата свинца наблюдается близкая картина, однако следует отметить, что внесение данной соли в дозе 0,032 М/л оказывает субингибирующее действие на *E. faecium* и *E. cloacae* и подавляет рост *E. coli* и *L. acidophilus* с диаметром зоны подавления роста в среднем до 10,3 и 9,8 мм, соответственно. В отношении тестируемых штаммов рода *Bacillus* были установлены близкие значения уровня резистентности, проявляющиеся отсутствием негативного влияния на рост в дозе 0,032 М/л как в присутствии нитрата, так и ацетата свинца. В качестве рабочих концентраций для проведения дальнейших исследований были выбраны дозы $Pb(NO_3)_2$ 0,032 М/л для *E. faecium*, *E. cloacae*, *B. subtilis* 534, *B. cereus* IP 5832 и *B. licheniformis* ВКПМ В 7038 и 0,0156 М/л – для *E. coli* и *L. acidophilus*, соответственно.

Системный анализ экспериментальных данных по оценке влияния исследуемых соединений свинца на рост тестируемых микроорганизмов, полученных нефелометрическим методом, свидетельствует о существенном увеличении плотности популяции всех исследуемых микроорганизмов (от 25,8 до 51,2 %) в присутствии избыточных концентраций свинца, обусловленных внесением рабочих концентраций химических соединений данных элементов в субстрат, по отношению к аналогичным показателям интактного образца. Гипотетически, значительное увеличение плотности в экспоненциальную фазу роста обусловлено высокими сорбционными характеристиками катионов на поверхности бактериальных клеток, что в свою очередь повышает уровень их оптической плотности. При этом следует отметить, что присутствие катионов свинца в субстрате сокращает время наступления максимальной фазы роста микроорганизмов в среднем на 6 часов по отношению к контрольному образцу и составляет 24-27 часов для представителей нормофлоры и 21-24 часа для штаммов рода *Bacillus*.

На заключительном этапе исследования нами была проведена оценка сорбционных характеристик свинца исследуемыми микроорганизмами (рис. 1).

Полученные в ходе выполнения эксперимента данные свидетельствуют о высоких сорбционных характеристиках всеми исследуемыми штаммами катионов свинца. При этом следует отметить, что максимальные показатели регистрируются у *B. subtilis* 534, *E. cloacae* и *E. coli* и составляют 65,3; 65,0 и 64,5 %, соответственно. У двух тестируемых штаммов данный показатель составил менее 50 процентов от вносимой в субстрат дозы и составил 48,7% у

штамма *B. licheniformis* ВКПМ В 7038 и 42,3% у изолята *L. acidophilus*.

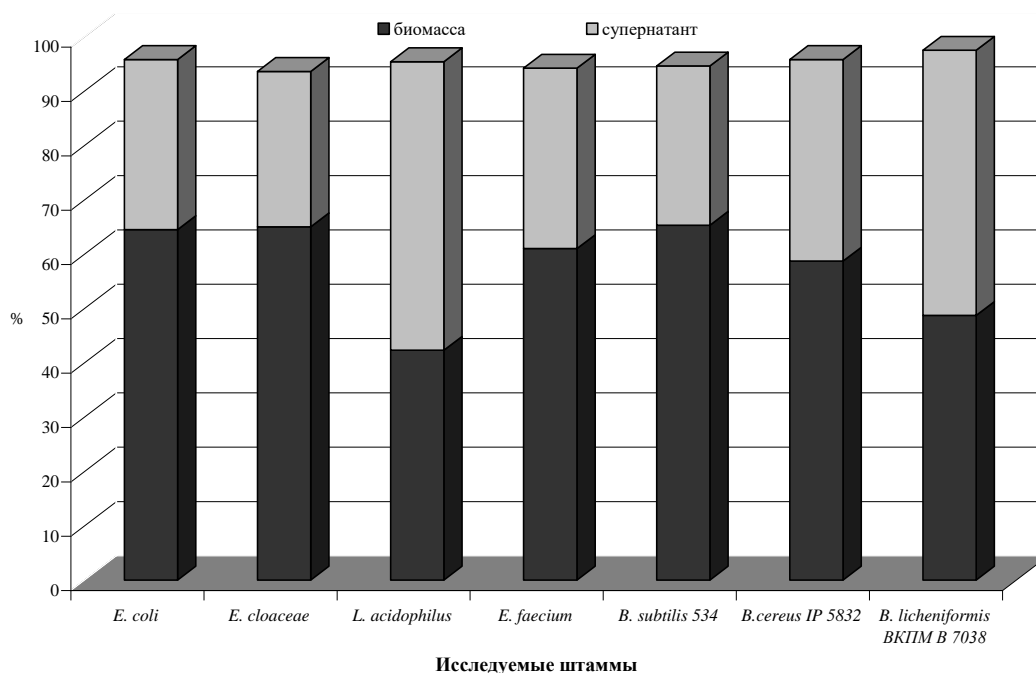


Рис. 1. Оценка биосорбционных характеристик свинца у исследуемыми штаммами на модели *in vitro*.

Второй блок экспериментов был направлен на исследование развития острой интоксикации на модели лабораторных крыс. Для этого животным однократно натошак индивидуально вводили водный раствор нитрата свинца (Pb) в дозе 150 мг/кг с последующей оценкой динамических изменений разнообразия микрофлоры кишечника в течение первых восьми часов после интоксикации по средству отбора и высева содержимого тонкого и толстого отделов кишечника с использованием селективных сред (рис. 2).

Представленные данные свидетельствуют о значительном влиянии свинцовой интоксикации на отдельных представителей кишечной микрофлоры. В частности, следует отметить достоверно значимое увеличение ($p < 0,01$) численности *E. coli* на протяжении всего исследования на фоне значительного снижения численности *Enterococcus* sp. Гипотетически, данный эффект может быть обусловлен либо нарушением межклеточной коммуникации между отдельными представителями нормофлоры кишечника, либо негативным воздействием на прямого конкурента *E. coli*. Нельзя исключить, что данное явление обусловлено значительным снижением концентрации свинца в толстом отделе кишечника за счет биосорбции катионов представителями микробиома тонкого отдела кишечника, а также частичным всасываем свинца.

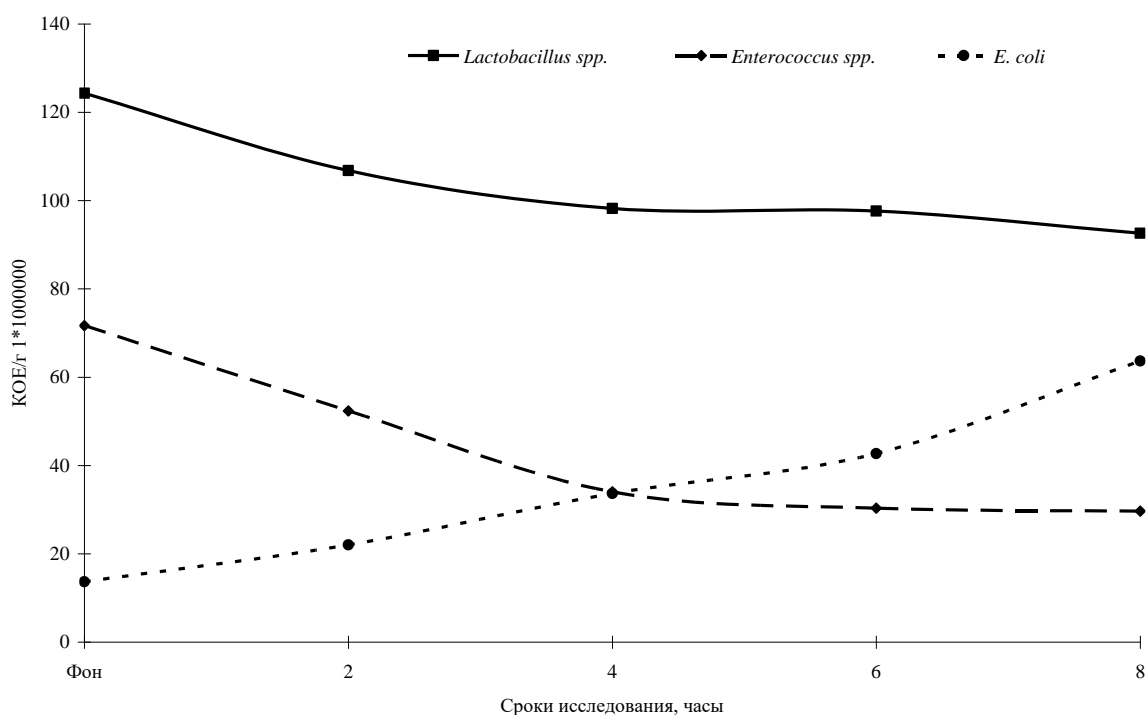


Рис. 2. Динамика численности *E. coli*, *Lactobacillus* sp. и *Enterococcus* sp. в кишечнике экспериментальных животных в условиях острой интоксикации свинцом.

Для оценки адаптационного потенциала организма к острой интоксикации и эффективности применения транзиторных пробиотических штаммов было проведено исследование в соответствии со схемой эксперимента, представленной в таблице 1.

Полученные в ходе выполнения эксперимента данные биохимического анализа сыворотки крови свидетельствуют о выраженном гепатотоксическом действии свинца, на что указывает значительное увеличение значений (выше референтных) аланинаминотрансферазы, аспартатаминотрансферазы и щелочной фосфатазы, что подтверждалось результатами гистологических исследований (табл. 2).

Таблица 2. Динамические характеристики размера ядер печени экспериментальных животных (в мкм)

	Фоновое значение	7 сутки	14 сутки	21 сутки
Интактная группа	25,7±1,4	25,7±1,1	29,9±1,1	25,7±1,1
Контроль интоксикации		35,7±1,6*	34,8±1,7	34,1±1,2*

Примечание: *p < 0,5.

В качестве основной характеристики патологического состояния печеночных клеток выбран размер ядер (табл. 2). В результате исследования выявлены патологические изменения, характеризующиеся достоверно значимым увеличением размера ядер гепатоцитов в группе контроля интоксикации свинцом на 7 и 21 дни исследований ($p < 0,5$).

Селезенка участвует в клеточном и гуморальном иммунитете, контроле за циркулирующими форменными элементами, в ней разрушаются эндотоксины. Основные анатомические элементы селезенки – капсула и трабекулы, образующие слабо демаркированные области в органе. Между трабекулами содержится белая пульпа (селезеночные узлы) и красная пульпа (селезеночные синусы). Данные гистологически различимые области селезенки являются функциональными элементами иммунной системы, а их соотношение характеризует нормальное или патологическое состояние органа. Увеличение состояния в сторону красной пульпы, свидетельствует о развитии патологического процесса (табл. 3).

Таблица 3. Динамика состояния селезенки экспериментальных животных (соотношение красной пульпы к белой по 3-бальной шкале)

Исследуемые показатели	Сроки проведения исследования, сутки			
	Фоновое значение	7 сутки	14 сутки	21 сутки
Интактная группа				
Красная пульпа	27,7 ± 0,9	30,5 ± 0,2	31,8 ± 0,7	31,6 ± 0,4
Белая пульпа	72,3 ± 0,7	69,5 ± 0,4	68,2 ± 0,3	68,4 ± 0,5
Контроль интоксикации				
Красная пульпа	27,7 ± 0,9	56,3 ± 0,2****	55,1 ± 0,2**	40,3 ± 0,5**
Белая пульпа	72,3 ± 0,7	43,7 ± 0,8****	43,7 ± 0,8**	59,7 ± 0,3**
Примечание: * $p < 0,5$; ** $p < 0,01$				
* - по отношению к интактной группе				
* - по отношению к предыдущим показателям исследуемой группы				

Представленные в таблице 3 данные свидетельствуют о выраженном патологическом влиянии катионов свинца на селезенку животных группы контроля интоксикации, характеризующемся значительным увеличением красной пульпы с максимальными ее значениями на 7 сутки с момента создания экспериментальной острой свинцовой интоксикации ($p < 0,01$).

Следует отметить, что на фоне применения транзиторных пробиотических штаммов негативное влияние свинца на организм лабораторных животных значительно снижается, что проявляется стабилизацией биохимических показателей на уровне референтных значений к 21 дню эксперимента. Гисто-

логические исследования также свидетельствуют о положительной динамике, в частности, в группах с применением *B. subtilis* 534 и *B. licheniformis* ВКПМ В 7038 выраженных, достоверно значимых изменений в селезенке животных к 21 дню эксперимента выявлено не было. Полученные данные коррелируют с результатами исследования динамики содержания свинца в биологических образцах, полученных от экспериментальных животных (рис. 3).

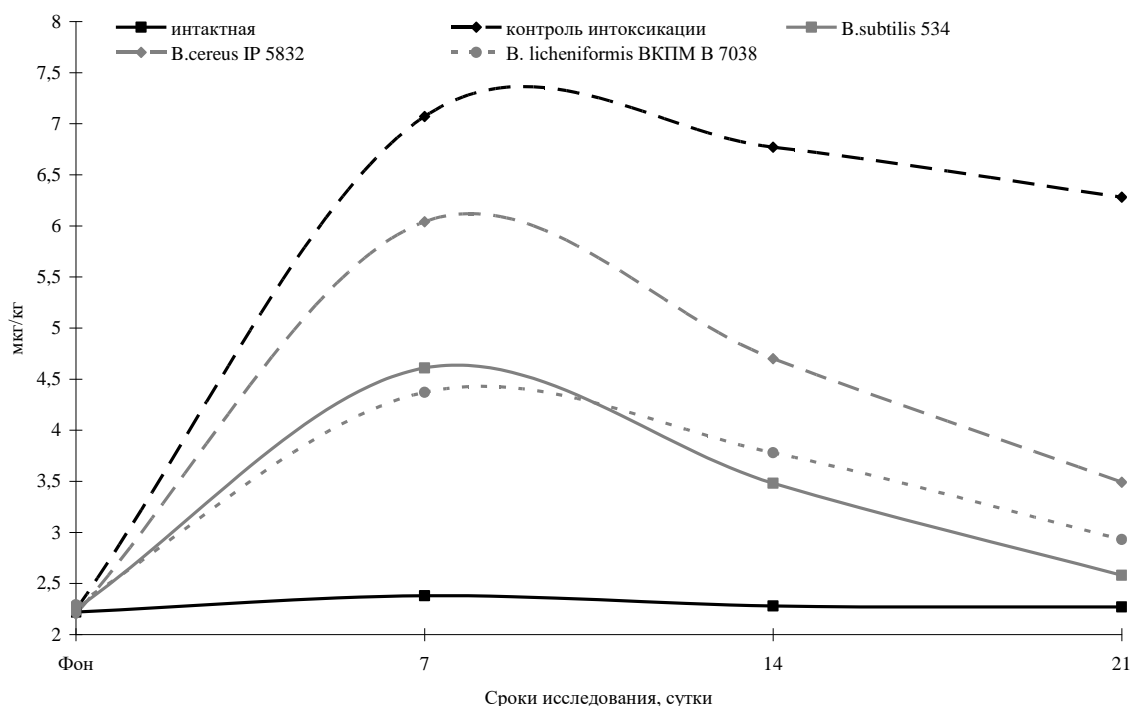


Рис. 3. Динамика концентрации свинца в тканях экспериментальных животных.

Полученные данные свидетельствуют о значительном увеличении свинца в тканях экспериментальных животных с максимальным уровнем аккумуляции на 7 день эксперимента. При этом следует отметить, что минимальные значения накопления регистрируются в группах, где применялся *B. subtilis* 534 и *B. licheniformis* ВКПМ В 7038, с последующим снижением данного показателя к 21 дню до значений близких к интактным.

Заключение

Полученные данные свидетельствуют об относительно высоком уровне резистентности как представителей нормофлоры, так и транзиторных пробиотических штаммов к химическим соединениям свинца, причем ацетат свинца обладает более выраженным ингибирующим действием на основных представителей микробиоты. Практически все тестируемые штаммы бактерий обладали высокими сорбционными характеристиками (более 50%), за ис-

ключением лактобацилл *L. acidophilus*, для которых данный показатель составил 42,3%, и *B. licheniformis* ВКПМ В 7038 с уровнем аккумуляции до 48,7% катионов свинца из субстрата.

В модельных экспериментах *in vivo* установлено значительное влияние катионов свинца на структуру микробиома. Так, на фоне снижения основных представителей тонкого отдела кишечника *Lactobacillus* sp. на 25,5% и *Enterococcus* sp. на 58,6% отмечается значительное увеличение численности *E. coli* на 365,8% в течение 8 часов с момента интоксикации.

Исследование, направленное на оценку детоксицирующего эффекта использования транзиторных штаммов *Bacillus* sp., свидетельствует о высоком потенциале данного воздействия, так как их применение значительно уменьшает уровень негативного влияния катионов свинца как на отдельные органы (печень, селезенка), так и на организм в целом, снижая содержание Pb в тканях экспериментальных животных на 58,9; 53,3 и 44,4% при использовании *B. subtilis* 534, *B. licheniformis* ВКПМ В 7038 и *B. cereus* IP 5832 соответственно.

ЛИТЕРАТУРА

1. Arun KB, Madhavan A, Sindhu R, Emmanuel S, Binod P, Pugazhendhi A, Sirohi R, Reshmy R, Awasthi MK, Gnansounou E, Pandey A. Probiotics and gut microbiome - Prospects and challenges in remediating heavy metal toxicity. *J Hazard Mater.* 2021. 15; 420:126676. doi: 10.1016/j.jhazmat.2021.126676.
2. Koontz JM, Dancy BCR, Horton CL, Stallings JD, DiVito VT, Lewis JA. The Role of the Human Microbiome in Chemical Toxicity. *Int J Toxicol.* 2019. 38(4): 251-264. doi: 10.1177/1091581819849833.
3. Bist P, Choudhary S. Impact of Heavy Metal Toxicity on the Gut Microbiota and Its Relationship with Metabolites and Future Probiotics Strategy: a Review. *Biol Trace Elem Res.* 2022. 200(12): 5328-5350. doi: 10.1007/s12011-021-03092-4.
4. Assefa S, Köhler G. Intestinal Microbiome and Metal Toxicity. *Curr Opin Toxicol.* 2020. 19: 21-27. doi: 10.1016/j.cotox.2019.09.009.
5. Duan H, Yu L, Tian F, Zhai Q, Fan L, Chen W. Gut microbiota: A target for heavy metal toxicity and a probiotic protective strategy. *Sci Total Environ.* 2020. 10; 742: 140429. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.140429.
6. Tsiaoussis J, Antoniou MN, Koliarakis I, Mesnage R, Vardavas CI, Izotov BN, Psaroulaki A, Tsatsakis A. Effects of single and combined toxic exposures on the gut microbiome: Current knowledge and future directions. *Toxicol Lett.* 2019. 15: 312:72-97. doi: 10.1016/j.toxlet.2019.04.014.
7. Richardson JB, Dancy BCR, Horton CL, Lee YS, Madejczyk MS, Xu ZZ, Ackermann G, Humphrey G, Palacios G, Knight R, Lewis JA. Exposure to toxic metals triggers unique responses from the rat gut microbiota. *Sci Rep.* 2018. 8(1): 6578. doi: 10.1038/s41598-018-24931-w.
8. Gao B, Chi L, Mahbub R, Bian X, Tu P, Ru H, Lu K. Multi-Omics Reveals that Lead Exposure Disturbs Gut Microbiome Development, Key Metabolites, and Metabolic Pathways. *Chem Res Toxicol.* 2017. 30(4): 996-1005. doi: 10.1021/acs.chemrestox.6b00401.
9. George SE, Devereux R, James J, Wan Y, Diamond GL, Bradham KD, Thomas DJ. Dietary lead modulates the mouse intestinal microbiome: Subacute exposure to lead acetate and lead

- contaminated soil. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2023. 1. 249: 114430. doi: 10.1016/j.ecoenv.2022.114430.
10. George SE, James J, Devereux R, Wan Y, Diamond GL, Bradham KD, Scheckel KG, Thomas DJ. Ingestion of remediated lead-contaminated soils affects the fecal microbiome of mice. *Sci Total Environ.* 2022. 1: 837:155797. doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.155797.
 11. Сизенцов А.Н., Климова Т.А., Кван О.В., Быков А.В., Межуева Л.В., Сербова В.А., Сизенцов Я.А. Устройство для вырезания лунок в агаровом геле. Патент на изобретение № 2697770. 11.06.2019.
 12. Сизенцов А.Н., Бибарцева Е.В., Синеок Д.М. Сравнительная оценка уровня толерантности почвенных изолятов *Bacillus subtilis* в отношении химических соединений меди. *Аграрная наука.* 2022. 10: 86-90. DOI: 10.32634/0869-8155-2022-363-10-86-90.

Поступила 7.09.2023 г.

(Контактная информация: **Сизенцов Алексей Николаевич** – кандидат биологических наук, доцент кафедры биохимии и микробиологии ФГБОУ ВО ОГУ; адрес: 460018 г. Оренбург, пр. Победы, 13; тел.: 8 (905)8803604; E-mail: asizen@mail.ru)

REFERENCES

1. Arun KB, Madhavan A, Sindhu R, Emmanuel S, Binod P, Pugazhendhi A, Sirohi R, Reshmy R, Awasthi MK, Gnansounou E, Pandey A. Probiotics and gut microbiome - Prospects and challenges in remediating heavy metal toxicity. *J Hazard Mater.* 2021. 15; 420:126676. doi: 10.1016/j.jhazmat.2021.126676.
2. Koontz JM, Dancy BCR, Horton CL, Stallings JD, DiVito VT, Lewis JA. The Role of the Human Microbiome in Chemical Toxicity. *Int J Toxicol.* 2019. 38(4): 251-264. doi: 10.1177/1091581819849833.
3. Bist P, Choudhary S. Impact of Heavy Metal Toxicity on the Gut Microbiota and Its Relationship with Metabolites and Future Probiotics Strategy: a Review. *Biol Trace Elem Res.* 2022. 200(12): 5328-5350. doi: 10.1007/s12011-021-03092-4.
4. Assefa S, Köhler G. Intestinal Microbiome and Metal Toxicity. *Curr Opin Toxicol.* 2020. 19: 21-27. doi: 10.1016/j.cotox.2019.09.009.
5. Duan H, Yu L, Tian F, Zhai Q, Fan L, Chen W. Gut microbiota: A target for heavy metal toxicity and a probiotic protective strategy. *Sci Total Environ.* 2020. 10; 742: 140429. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.140429.
6. Tsiaoussis J, Antoniou MN, Koliarakis I, Mesnage R, Vardavas CI, Izotov BN, Psaroulaki A, Tsatsakis A. Effects of single and combined toxic exposures on the gut microbiome: Current knowledge and future directions. *Toxicol Lett.* 2019. 15: 312:72-97. doi: 10.1016/j.toxlet.2019.04.014.
7. Richardson JB, Dancy BCR, Horton CL, Lee YS, Madejczyk MS, Xu ZZ, Ackermann G, Humphrey G, Palacios G, Knight R, Lewis JA. Exposure to toxic metals triggers unique responses from the rat gut microbiota. *Sci Rep.* 2018. 8(1): 6578. doi: 10.1038/s41598-018-24931-w.
8. Gao B, Chi L, Mahbub R, Bian X, Tu P, Ru H, Lu K. Multi-Omics Reveals that Lead Exposure Disturbs Gut Microbiome Development, Key Metabolites, and Metabolic Pathways. *Chem Res Toxicol.* 2017. 30(4): 996-1005. doi: 10.1021/acs.chemrestox.6b00401.
9. George SE, Devereux R, James J, Wan Y, Diamond GL, Bradham KD, Thomas DJ. Dietary lead modulates the mouse intestinal microbiome: Subacute exposure to lead acetate and lead contaminated soil. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2023. 1. 249: 114430. doi: 10.1016/j.ecoenv.2022.114430.
10. George SE, James J, Devereux R, Wan Y, Diamond GL, Bradham KD, Scheckel KG, Thomas DJ. Ingestion of remediated lead-contaminated soils affects the fecal microbiome of mice. *Sci Total Environ.* 2022. 1: 837:155797. doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.155797

11. Sizetsov A. N., Klimova T. A., Kvan O. V., Bykov A. V., Mezhueva L. V., Serbova V. A., Sizetsov Ya. A. Ustrojstvo dlya vyrezaniya lunok v agarovom gele.. Patent for invention No. 2697770. 06.11.2019.
12. Sizetsov A.N., Bibartseva E.V., Sineok D.M. Sravnitel'naya ocenka urovnya tolerantnosti pochvennyh izolyatov *Bacillus subtilis* v otnoshenii himicheskikh soedinenij medi. Agrarian science. 2022. 10: 86-90. DOI: 10.32634/0869-8155-2022-363-10-86-90

Образец ссылки на статью:

Сизенцов А.Н. Физиолого-адаптационные характеристики микробиома кишечника в условиях острой интоксикации свинцом на моделях *in vitro* и *in vivo*. Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. 2023. 3: 15 с. [Электр. ресурс] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2023-3/Articles/SAN-2023-3.pdf>). DOI: 10.24411/2304-9081-2023-13003