

HYPOCHOLESTEROLEMIC AND PROTEOLYTIC ACTIVITY OF LACTIC ACID BACTERIA IN VITRO

Starovoitova S.A., Oryabinska L.B., Gorchakov V. Yu.

ГІПОХОЛЕСТЕРИНЕМІЧНА ТА ПРОТЕОЛІТИЧНА АКТИВНІСТЬ ЛАКТОБАКТЕРІЙ IN VITRO

(РОБОТУ ВИКОНАНО ЗА РАХУНОК ҐРАНТУ ПРЕЗИДЕНТА УКРАЇНИ ДЛЯ ОБДАРОВАНОЇ МОЛОДІ)

П

іперхолестеринемія — це патологічний стан, що характеризується підвищеним накопиченням холестерину в організмі [1].

Нині для терапії хворих з підвищеним рівнем холестерину використовують різні лікувальні засоби, зокрема інгібітори ферментів, що беруть участь у синтезі даного стерину з посередників, та засоби, що підвищують виведення жовчних кислот [2]. Але через наявність небажаних побічних наслідків при лікуванні такими препаратами їх застосування практично може бути обмеженим [3].

Тривалий час головним шляхом перетворення холестерину в організмі хазяїна вважали окислення цієї речовини (як циклічної структури, так і бічних ланцюгів), каталізоване цитохромом P450 клітин хазяїна [4]. Але нині доведено, що разом з цим шляхом обмін холестерину в організмі хазяїна здійснюється також ферментними системами численних мікроорганізмів, тимчасово або постійно присутніх на слизових оболонках та шкірі [1].

Доведено, що резидентна і транзиторна мікрофлора хазяїна активно беруть участь у метаболізмі холестерину, який залежить від кількісного та якісного складу аеробних та анаеробних бактерій, ступеня анаеробіозу, джерела вуглецю, а також концентрації у кишечнику жовчі, антимікробних агентів та інших факторів [5, 6].

Мікроорганізми травного тракту можуть впливати на метаболізм холестерину в організмі також і через вплив на ферментні системи клітин хазяїна, що синтезують ендогенний холестерин [7], а мікроорганізми кишечника здатні до непрямої дії, модифікуючи синтез певних регуляторних сполук, які специфічно регулюють метаболізм холестерину або руйнують ці регуляторні сполуки, тим самим побічно змінюючи

темпи утворення холестерину та жовчних кислот у печінці. Також окремі компоненти мікробної клітини (ендотоксин, мураміддипептиди, зимозан та ін.) стимулюють синтез холестерину в організмі хазяїна [8].

Оскільки джерелом ендогенного холестерину є не лише печінка, а і клітини війок кишечника, бактерії травного тракту суттєво впливають на швидкість оновлення кишкового епітелію, тим самим регулюючи продукування ендогенного холестерину. Відомо, що вміст холестерину у сироватці крові залежить від темпу його абсорбції з кишечника, який пов'язаний з мікроорганізмами кишечника, здатними впливати на швидкість переходу нейтральних стеринів крізь кишечник, концентрацію у кишковому вмісті іонів (насамперед Ca^{2+}), наявність і ступінь спорідненості рецепторів кишечника до мікроорганізмів, що беруть участь у трансформації холестерину. Це доводить, що за наявності деяких бактерій на поверхні активованих Т-лімфоцитів людини зменшується кількість рецепторів, які фіксують транспортні форми холестерину [1, 7].

Ще однією проблемою мікробного метаболізму, пов'язаного з обміном холестерину, є те, що головним попередником холестерину ендогенного походження є ацетат. Його утворення залежить від ферментації анаеробними та мікроаерофільними бактеріями кишечника різних вуглецевих сполук. Навпаки, пропіонат, що утворюється у товстому кишечнику за анаеробної ферментації вуглеводів та жирів, здатний знижувати рівень холестерину у сироватці крові за рахунок пригнічення його синтезу гепатоцитами [9]. Отже, будь-яке втручання, що впливає на склад анаеробних бактерій кишечника, буде змінювати запас ацетату,

**СТАРОВОЙТОВА С.О.,
ОРЯБІНСЬКА Л.Б.,
ГОРЧАКОВ В.Ю.**

Національний технічний
університет України "КПІ",
м. Київ

УДК 579.864.1:615.331

**ГИПОХОЛЕСТЕРИНЕМИЧЕСКАЯ
И ПРОТЕОЛИТИЧЕСКАЯ
АКТИВНОСТЬ
ЛАКТОБАКТЕРИЙ IN VITRO**

**Старовойтова С.А.,
Орябинская Л.Б.,
Горчаков В.Ю.**

Исследовано способность 14 штаммов молочнокислых бактерий рода Lactobacillus ассимилировать холестерин in vitro. Показано прямую зависимость между способностью лактобактерий ассимилировать холестерин и сохранением ими жизнеспособности в агрессивных условиях желудочно-кишечного тракта, а также продукцией ими внешних протеолитических ферментов.

**HYPOCHOLESTEROLEMIC AND
PROTEOLYTIC ACTIVITY OF
LACTIC ACID BACTERIA IN VITRO**

**Starovoitova S.A.,
Oryabinska L.B.,
Gorchakov V. Yu.**

Fourteen strains of lactic acid bacteria of genus Lactobacillus were assessed for assimilation of a cholesterol in vitro. Direct dependence was shown between ability of lactic acid bacteria to assimilate a cholesterol and saving by them viability in the aggressive conditions of gastro-intestinal tract, and also products by them external photolytic enzymes.

пропіонату та інших легких жирних кислот в організмі хазяїна і, як наслідок, кількість синтезованого клітинами холестерину.

Бактерії кишечника також здатні викликати розкладання та трансформацію, окрім холестерину, також і жовчних кислот та стероїдних гормонів [6]. Це вказує на те, що зміна концентрації однієї з цих сполук індукуватиме утворення або, навпаки, пригнічення синтезу холестерину.

Шляхи, за допомогою яких молочнокислі бактерії вилучають холестерин, на сьогодні не з'ясовані до кінця. Припускають існування цілої низки механізмів, за допомогою яких молочнокислі бактерії знижують рівень холестерину [10-12]. Ці механізми можуть бути причетними до безпосередньої асиміляції холестерину бактеріями, зв'язування холестерину клітинними стінками бактерій, ферментативного руйнування жовчних кислот, а також до фізіологічної дії кінцевих продуктів ферментації жирних кислот з короткими бічними ланцюгами (а саме пропіонату). Нині більш експериментально обґрунтованими механізмами є зв'язування холестерину клітинними стінками бактерій та ферментативне розкладання жовчних кислот [1].

Індигенна мікрофлора кишечника активно бере участь у травній функції макроорганізму, що реалізується через синтез різноманітних ферментів, які здійснюють метаболізм не лише холестерину, а й білків, ліпідів, вуглеводів, нуклеїнових кислот, мінеральних речовин, жовчних кислот та інших компонентів [16].

Метою даного дослідження було з'ясування здатності молочнокислих бактерій роду *Lactobacillus* використовувати холестерин в якості єдиного джерела вуглецю та продукувати зовнішні протеолітичні ферменти.

Матеріали і методи. Об'єктами дослідження були 14 штамів молочнокислих бактерій роду *Lactobacillus*, отримані з музею культур мікроорганізмів кафедри промислової біотехнології факультету біотехнології та біотехніки НТУУ "КПІ": *L. murinus* LE IBM B-7037; *L. rhamnosus* LB3 IBM B-7038; *L. sp.* LB4; *L. acidophilus*⁺ *L. rhamnosus* (Institute Rossell INC, Canada); *L. acidophilus* EP317/402 (Нарі-

не); *L. bulgaricus* LB51; *L. plantarum*; *L. acidophilus* (Institute Rossell INC, Canada); *L. rhamnosus* (Institute Rossell INC, Canada); *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LB86 ВКПМ-В-5788; *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* DSM20074; *L. murinus* DSM20452; *L. plantarum* (Лактобактерин), *L. rhamnosus* V (Del-Immune).

Культивування молочнокислих бактерій провадили при 37°C на середовищі MRS.

З'ясування здатності лактобактерій використовувати холестерин в якості єдиного джерела вуглецю вивчали на піврідкому середовищі такого складу (г): K_2HPO_4 — 2,0; $MgSO_4$ — 0,2; $MnSO_4$ — 0,05; NaCl — 5,0; дріжджовий екстракт — 10,0; вода — 1 л. До середовища додавали різні концентрації холестерину (0,2%, 0,5%, 1,0%, 2,0%), розчиненого в ацетоні та диспергованого за допомогою бус та струшування на качалці при 200 об/хв. Контролем слугувало таке саме середовище з додаванням 1% глюкози та середовище без джерела вуглецевого живлення [17].

Активність позаклітинної лужної протеази визначали у середовищі культивування через 24, 48, 72 та 96 годин вирощування методом Фолпа [18].

Результати та їх обговорення. Дані щодо здатності молочнокислих бактерій використовувати холестерин наведено у табл. 1, з якої видно, що

здатність асимілювати стерин молочнокислими бактеріями є штамозалежним процесом. Лише штами *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LB86, *L. bulgaricus* LB51 та *L. acidophilus* (Canada) здатні були зростати на середовищі з усіма взятими до експерименту концентраціями холестерину.

Висока гіпохолестеринемічна активність лактобактерій може бути опосередкованим показником їхніх онкопротекторних властивостей. Доведено кореляцію рівня холестерину в організмі з частотою появи злоякісних пухлин, особливо травного тракту. Більша частина холестерину, що потрапляє до товстої кишки, перетворюється деякими бактеріями на копростанон та копрастонал. Участь цих метаболітів в індукованні розвитку онкологічних захворювань не встановлено, але їх концентрація у кишечнику завжди значно підвищена в осіб з високим ризиком роз-

Таблиця 1

Зростання лактобактерій у присутності холестерину

| Штам | Контроль | Концентрація холестерину, % | | | |
|---|----------|-----------------------------|-----|-----|-----|
| | | 0,2 | 0,5 | 1,0 | 2,0 |
| <i>L.sp.</i> LB4 | ++++ | - | - | - | - |
| <i>L.rhamnosus</i> LB3 | ++++ | +++ | ++ | - | - |
| <i>L.delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> LB86 | ++++ | +++ | +++ | ++ | + |
| <i>L.bulgaricus</i> LB51 | ++++ | +++ | ++ | ++ | + |
| <i>L.delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> DSM20074 | ++++ | - | - | - | - |
| <i>L.murinus</i> DSM20452 | ++++ | ++ | ++ | - | - |
| <i>L.rhamnosus</i> V(Del-Immune) | ++++ | ++ | ++ | + | - |
| <i>L.acidophilus</i> (Canada) | ++++ | ++ | ++ | + | + |
| <i>L.rhamnosus</i> (Canada) | ++++ | ++ | ++ | + | - |
| <i>L.acidophilus</i> + <i>L.rhamnosus</i> (Canada) | ++++ | ++ | ++ | ++ | - |
| <i>L.plantarum</i> (Лактобактерин) | ++++ | - | - | - | - |
| <i>L.acidophilus</i> EP317/402 | ++++ | + | - | - | - |
| <i>L.murinus</i> LE | ++++ | +++ | ++ | - | - |
| <i>L.plantarum</i> | ++++ | ++ | ++ | - | - |

Примітка: ++++ — гарне зростання культури; +++ — добре зростання культури; ++ — задовільне зростання культури; + — дуже слабе зростання культури; — відсутність росту культури.

виту пухлин. Припускається також, що холестерин сприяє підвищенню екскреції жовчі кишечником та підвищенню внаслідок цього концентрації вторинних жовчних кислот, що мають властивості промоторів раку, та високої токсичності для епітеліальних тканин слизової шлунка [19].

Інші досліджені штами лактобактерій зростали при концентраціях холестерину 0,2%, 0,5%, деякі — при 1,0%. Лише штами *L. sp. LB4*, *L. plantarum* (Лактобактерин) та *L. delbrueckii subsp. delbrueckii* DSM20074 зовсім не росли при згаданих концентраціях холестерину, а штам *L. acidophilus* EP317/402 проявляв дуже слабе зростання при 0,2% холестерину у середовищі.

Також слід зазначити, що гіпохолестеринемічна дія пробіотиків залежить не лише від їх здатності впливати на обмін холестерину, але й не меншою мірою — від здатності цих бактерій виживати за специфічних умов ШКТ після внесення до організму [10-13].

Як показали попередні дослідження, за збереженням життєздатності в агресивних умовах ШКТ (рН, шлунковий сік, жовч, хлорид натрію, фенол, ферменти травлення) молочнокислі бактерії можна було поділити на три групи:

□ Порівняно високе збереження життєздатності молочнокислих бактерій в умовах ШКТ: *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* LB86, *L. rhamnosus* LB3, *L. rhamnosus* V (Del-Immune), *L. acidophilus* (Canada), *L. rhamnosus* (Canada);

□ Середній рівень збереження життєздатності молочнокислих бактерій в умовах ШКТ: *L. bulgaricus* LB51, *L. plantarum* (Лактобактерин), *L. delbrueckii subsp. delbrueckii* DSM20074, *L. acidophilus*⁺ *L. rhamnosus* (Canada), *L. murinus* LE, *L. acidophilus* EP317/402;

□ Порівняно низький рівень життєздатності молочнокислих бактерій в умовах ШКТ: *L. murinus* DSM20452, *L. plantarum*, *L. sp. LB4*, *L. plantarum*.

Отже, проаналізувавши збереження життєздатності лактобактерій в агресивних умовах ШКТ та асиміляцію ними холестерину, можна простежити пряму залежність між цими двома параметрами.

Для утилізації білкових компонентів, що входять до складу

поживних середовищ, дуже важливим є рівень продукції протеолітичних ферментів у молочнокислих бактерій, який, як правило, корелює з активністю росту та накопиченням біомаси клітин. Дослідження активності зовнішніх протеаз молочнокислих бактерій показало, що активність ферментів стрімко зростає протягом перших 24 годин культивування, а потім йде на спад. Отримані результати свідчать про те, що зовнішні протеолітичні ферменти краще синтезуються молодими клітинами молочнокислих бактерій. Це може свідчити про те, що під час пристосування клітин до середовища культивування відбувається синтез необхідних на даний момент клітині ферментів, у тому числі і протеолітичних, для здатності асимілювати нові джерела вуглецевого живлення. Як показали дослідження, здатність асимілювати холестерин молочнокислими бактеріями залежить не лише від наявності ферментів, але й від їхньої активності.

За проявом протеолітичної активності досліджені штами можна поділити на три групи:

1. Високоактивні: *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* LB86, *L. murinus* LE, *L. acidophilus* (Canada), *L. rhamnosus* (Canada), *L. acidophilus*⁺ *L. rhamnosus* (Canada), *L. rhamnosus* V (Del-Immune);

2. Середньої активності: *L. bulgaricus* LB51, *L. murinus* DSM20452, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* LB3;

3. Низької активності: *L. sp. LB4*, *L. delbrueckii subsp. delbrueckii* DSM20074, *L. plantarum* (Лактобактерин), *L. acidophilus* EP317/402.

Аналіз протеолітичної активності лактобактерій дозволив припустити, що протеолітичні ферменти, синтезовані молочнокислими бактеріями, можуть використовуватися у травній функції макроорганізмом за недостатньої активності його власних ферментів.

Отримані у ході експерименту дані свідчать про здатність лактобактерій знижувати концентрацію холестерину *in vitro*, що опосередковано може вказувати на їх гіпохолестеринемічну та онкопротекторну дію *in vivo*. Високий рівень накопичення зовнішніх протеолітичних ферментів лактобактерія-

ми вказує на можливість застосування пробіотиків при розладах травлення, пов'язаних з недостатністю відповідних ферментів в організмі хазяїна. Таким чином, можна зробити попередній висновок, що пробіотичні препарати на основі лактобактерій можна застосовувати як гіпохолестеринемічні препарати для зниження рівня холестерину та для поповнення відсутніх протеолітичних ферментів для лікування людей з розладами травлення, пов'язаними з недостатньою активністю відповідних ферментів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Мосійчук С.М., Хоменко М.Б., Михайлова Т.С. та ін. Пробиотики: можливість застосування при гіперхолестеринемії // Український медичний часопис. — 2006. — № 2 (52). — С. 10-23.
2. Suckling K.E., Benson G.M., Bond B. et al. Cholesterol lowering and bile acid extraction in the hamster with cholesteramine treatment // *Atherosclerosis*. — 1991. — Vol. 89, № 2-3. — P. 183-190.
3. Erkelens D.W., Baggen M.G., Van Doormaal J.J. et al. Clinical experience with simvastatin compared with cholesteramine // *Drugs*. — 1988. — Vol. 39, suppl. 3. — P. 87-92.
4. Лопухин Ю.М., Арчаков А.И., Владимиров Ю.А., Коган Э.М. Холестериноз (Холестерин и биомембран. Теоретические и клинические аспекты). — М.: Медицина, 1983. — 352 с.
5. Шендеров Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание. Т. II: социально-экологические и клинические последствия дисбаланса микробной экологии человека и животных. — М.: ГРАНТЬ, 2001. — 416 с.
6. Midtvedt T., Lingaas E., Carlstedt-Duke B. et al. Intestinal microbial conversion of cholesterol to coprostanol in man. Influence of antibiotics // *APMIS*. — 1990. — Vol. 98, № 9. — P. 839-844.
7. Homma N. Bifidobacteria as a resistance factor in human being // *Bifidobacteria and Microflora*. — 1988. — № 7. — P. 115-121.
8. Lopes-Virella M.F., Virella G. Immunological and microbiological factors in the pathogenesis of atherosclerosis // *Clin. Immunol. Immunopathol.* — 1985. — Vol. 37, № 3. — P. 377-386.
9. Jenkins D.J. The link between colon fermentation and syste-

mic disease // Am. J. Gastroenterol. — 1989. — Vol. 84, № 11. — P. 1362-1364.

10. Gilliland S.E., Nelson C.R., Maxwell C. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus* // Appl. Environ. Microbiol. — 1985. — Vol. 49, № 2. — P. 377-381.

11. Danielson A.D., Peo E.R. Jr., Shahani K.M. et al. Anticholesteremic property of *Lactobacillus acidophilus* yogurt fed to mature boars // J. Anim. Sci. — 1989. — Vol. 67, № 4. — P. 966-974.

12. Buck L.M., Gilliland N.E. Comparison of freshly isolated strains of *Lactobacillus acidophilus* of human intestinal origin for ability to assimilate cholesterol during the growth // J. Dairy Sci. — 1994. — Vol. 77, № 10. — P. 2925-2933.

13. Nielson J.W., Gilliland S.E. Variation in cholesterol assimilation by individual strains of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* from human intestines // J. Dairy Sci. — 1985. — Vol. 68, suppl. 1. — P. 83.

14. Klaver F.A., van der Meer R. The assumed assimilation of cholesterol by *Lactobacilli* and *Bifidobacterium bifidum* is due to their bile salt-deconjugating activity // Appl. Environ. Microbiol. — 1993. — Vol. 59, № 4. — P. 1120-1124.

15. Noh D.O., Kim S.H., Gilliland S.E. Incorporation of cholesterol into the cellular membrane of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 // J. Dairy Sci. — 1997. — Vol. 80, № 12. — P. 3107-3113.

16. Aocetal S., Matsuyama H. Effect of intestinal microflora of the absorption of soluble calcium in milk // J. Germfree Life Gnotobiol. — 1994. — Vol. 24, № 1. — P. 1123-1128.

17. Коваленко Н.К., Касумова С.А., Мучник Ф.В. Скрининг штаммов молочнокислых бактерий, обладающих гипохолестеринемической активностью, и их практическое использование // Микробиологический журнал. — 2004. — Вип. 66, № 3. — С. 33-42.

18. ГОСТ 20264.2-88 Препараты ферментные. Методы определения протеолитической активности.

19. Шендеров Б.А. Микроэкологические аспекты канцерогенеза // Антибиотики и химиотерапия. — 1990. — Вып. 35, № 3. — С. 165-170.

18 вересня 2007 року свій ювілей відзначив професор кафедри гігієни та екології Донецького державного медичного університету ім. М. Горького Юрій Миколайович Талакін.

1961 року Талакін Ю.М. закінчив санітарно-гігієнічний фа-

НАШІ ЮВІЛЯРИ ЮРІЮ МИКОЛАЙОВИЧУ ТАЛАКІНУ — 70 РОКІВ

культет Донецького державного медичного інституту за спеціальністю "санітарна справа". У цьому закладі він пройшов усі щаблі наукового зростання: з 1961 року — аспірант, 1964 р. — асистент, 1969 р. — доцент. 1980 року після захисту дисертації на здобуття вченого ступеня доктора наук став професором, ще за два роки очолив кафедру гігієни та екології. Від 1992 р. Юрій Миколайович — професор кафедри гігієни та екології.

Талакін Ю.М. зробив вагомий особистий вклад у гігієну та екологію як науку, предмет викладання і галузь діяльності. Він є автором понад 300 друкованих праць, 2 монографій, 12 навчально-методичних посібників і наукових рекомендацій, 3 санітарних правил, 10 винаходів. Юрій Миколайович підготував 3 докторів і 7 кандидатів медичних наук. Виконані ним дослідження збагатили гігієнічну науку з проблеми токсичної дії малої інтенсивності, зокрема визначили дію на організм людини важких металів: свинцю, ртуті, марганцю.

У центрі його наукових інтересів — експериментальний аналіз потенційної небезпечності дії на організм факторів виробничого середовища і довкілля та їх гігієнічне нормування, аналіз токсичної дії ксенобіотиків, профілактика хімічної патології і препатології професійного генезису. Ним сформульовано нові

положення про взаємозв'язок загального і специфічного у реакції-відповіді організму на дію екзогенних хімічних чинників.

За ініціативою Талакіна Ю.М. було організовано науково-дос-

НАШІ ЮВІЛЯРИ

лідну токсикологічну лабораторію Медичного університету, науковим керівником якої він був. Проведені у ній оригінальні експерименти та дослідження з токсикології та гігієнічного нормування органічних і неорганічних хімічних сполук, у тому числі з використанням методів культури клітин, дозволили обґрунтувати комплекс оздоровчих заходів з профілактики їхньої несприятливої дії, розроблено і використовуються у практиці охорони здоров'я понад 70 нормативів у повітрі робочої зони і 20 — для атмосферного повітря.

Талакін Ю.М. вів і продовжує вести велику навчально-методичну, наукову і громадську роботу: з 1969 по 1971 рр. працював деканом лікувального факультету, очолюючи паралельно профспілковий комітет інституту, з 1975 по 1988 рік він — декан медико-профілактичного факультету, з 1971 по 1984 рік неодноразово виконував обов'язки проректора з навчальної роботи, протягом 1978-1991 рр. — член Центральної навчально-методичної комісії з гігієни та епідеміології Міністерства охорони здоров'я СРСР. Протягом 40 років він успішно читає лекції студентам усіх факультетів університету.



Талакін Ю.М. має заслужений авторитет у наукових колах країни. Чверть століття він є головою Донецького обласного наукового товариства гігієністів і токсикологів, членом правління наукових товариств гігієністів і токсикологів України, членом редакційної ради журналів "Современные проблемы токсикологии", "Вестник гигиены и эпидемиологии". Його праця відзначено нагородами: медаллю "За доблестный труд" (1970), знаком "Отличник здравоохранения" (1974), медаллю "Ветеран труда" (1990), знаком "За отличные успехи в работе" Міністерства вищої і середньої освіти СРСР (1982).

У 2002 році Юрій Миколайович у складі авторського колективу фахівців Києва, Львова, Донецька та Дніпропетровська отримав Державну премію України у галузі науки і техніки за роботу "Важкі метали як небезпечні для людини забруднювачі довкілля України: медико-екологічні дослідження, обґрунтування та досвід впровадження профілактичних заходів".

Свій ювілей Юрій Миколайович зустрів у колі друзів, які зичать йому здоров'я, творчої наснаги, нових звершень, плідної роботи, благополуччя у родині.

Правління Українського та Донецького обласного наукових товариств гігієністів і токсикологів,

Донецький державний медуніверситет, редакція журналу "Довкілля та здоров'я".