

УДК 636.087.8:579.674:57.083.3

БАКТЕРІАЛЬНА ТРАНСЛОКАЦІЯ ЛАКТОБАЦИЛ-ПРОБІОТИКІВ

В. О. Агєєв

Інститут сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН
вул. Шевченка, 97; м. Чернігів, 14027, Україна; e-mail: iggarsil@mail.ru

Представлено результати вивчення динаміки та особливостей транслокації двох пробіотичних штамів молочнокислих бактерій у кров та паренхіматозні органи тварин. Встановлено залежність прояву бактеріальної транслокації від штаму бактерій та від перорально введеної дози. Культурально-морфологічні та фізіолого-біохімічні властивості всіх виділених з крові та органів культур мікроорганізмів відповідають властивостям вихідних бактеріальних штамів, що були введені тваринам.

Ключові слова: молочнокислі бактерії, бактеріальна транслокація, кров, паренхіматозні органи.

Ефективність пробіотичних препаратів на основі молочнокислих бактерій зумовлена здатністю останніх колонізувати внутрішню поверхню травного тракту та продукувати низку біологічно активних метаболітів (органічні кислоти, передусім молочну, лізоцим тощо), які не лише сприяють захисту організму від збудників інфекцій, але й активують його власні захисні та адаптивні реакції. Наприкінці ХХ ст. з'являється все більше експериментальних даних, що вступають у протиріччя з традиційною думкою щодо механізмів дії пробіотиків на макроорганізм. Авторами з різних країн відмічено випадки ефективності пробіотичних препаратів, що не підлягали поясненню з точки зору загальноприйнятого бачення — не лише для лікування інфекцій травного тракту за колонізації кишковика, але й у лікуванні патологічних процесів, що локалізовані поза ШКТ [1–4].

У зв'язку з цим набуває особливого значення дослідження явища транслокації пробіотичних штамів мікроорганізмів різних таксономічних груп (бацил, кишкової палички, біфідобактерій, лактобактерій тощо), які є основою ветеринарних та медичних препаратів різної функціональної спрямованості (профілактичних, лікувальних, стимулюваль-

них), його динаміки, з'ясування відповідної реакції макроорганізму за показниками морфологічних змін в органах та активністю основних його систем. Це дозволяє суттєво розширити уявлення про складний процес взаємодії пробіотиків з макроорганізмом.

Сьогодні актуальною є розробка нових підходів у стратегії і тактиці створення та застосування біопрепаратів бактеріальної природи, зокрема пробіотиків. А завдяки всебічному дослідженню взаємного впливу макроорганізму та пробіотичних бактерій стає можливим створення пробіотичних препаратів, призначених для профілактики та лікування не лише розладів роботи травної системи, але й багатьох захворювань сільськогосподарських тварин і людини, що локалізуються поза межами шлунково-кишкового тракту [5–7].

Одним з механізмів такої дії пробіотиків є стимуляція ними неспецифічної резистентності макроорганізму у результаті транслокації не лише бактерій верхніх відділів травного тракту (ротоглотки і шлунку) — подібні процеси продовжуються і при подальшому проходженні мікроорганізмів через усі відділи шлунково-кишкового тракту. Крім того, важливий вплив на стимулювання імунної системи, всмоктуючись у кров і лімфу, чи-

нять біологічно активні сполуки, що виробляються клітинами кишкового у відповідь на взаємодію з бактеріями та продукуються безпосередньо мікроорганізмами [8].

Враховуючи викладене вище, метою роботи було з'ясування залежності бактеріальної транслокації від штаму молочнокислих бактерій-пробіотиків.

Матеріали й методи. Для досліджень використовували штами молочнокислих бактерій *Lactobacillus plantarum* L5 (входить до складу препарату БПС-Л) [9] та *L. plantarum* Lc-18 з колекції лабораторії пробіотиків, перспективний для створення на його основі нового бактеріального препарату. Вирощування культур молочнокислих бактерій здійснювали на живильному середовищі де Мана (MRS) [10]. Вирощування тест-культур для визначення антагоністичної активності здійснювали на поверхні м'ясо-пептонного агару (МПА) [11].

Перед вивченням бактеріальної транслокації визначали культурально-морфологічні (морфологія клітин та колоній, особливості росту на живильних середовищах) та фізіолого-біохімічні (активність екзоферментів, здатність зброджувати різні джерела Карбону, антагоністична активність) властивості вихідних пробіотичних культур, які відрізняють їх від інших молочнокислих бактерій — представників нормальної мікрофлори організму тварин [11–14].

Для вивчення динаміки транслокації досліджуваних бактерій у кров тварин було сформовано 5 груп лабораторних кролів по 3 голови у кожній — контрольна та 4 дослідних; контрольні тварини були інтактними (отримували відповідну кількість фізіологічного розчину), тваринам дослідної групи-1 давали культуру бактерій штаму *Lactobacillus plantarum* L5 у дозі $3 \cdot 10^8$ КУО, тваринам дослідної групи-2 — цей самий штам у дозі $3 \cdot 10^9$ КУО, дослідній групі-3 — культуру *L. plantarum* Lc-18 у дозі $3 \cdot 10^8$ КУО, дослідній групі-4 — цю саму культуру у дозі $3 \cdot 10^9$ КУО. Суспензії бактеріальних клітин у фізіологічному розчині вводили тваринам одноразово перорально. Через 3, 10, 30, 60 хв., 24 год., 7 та 14 діб після введення бактерій у кожній тварини відбирали зразки крові.

Для вивчення динаміки транслокації досліджуваних бактерій у паренхіматозні орга-

ни (печінку, селезінку, нирки) лабораторних тварин було сформовано 5 груп білих мишей по 15 голів у кожній — контрольна та 4 дослідних; контрольні тварини були інтактними (отримували відповідну кількість фізіологічного розчину), тваринам дослідної групи-1 давали культуру бактерій штаму *L. plantarum* L5 у дозі $3 \cdot 10^7$ КУО, тваринам дослідної групи-2 — цей самий штам у дозі $3 \cdot 10^8$ КУО, дослідній групі-3 — перспективну культуру *L. plantarum* Lc-18 у дозі $3 \cdot 10^7$ КУО, дослідній групі-4 — цю саму культуру у дозі $3 \cdot 10^8$ КУО. Суспензії бактеріальних клітин у фізіологічному розчині вводили одноразово перорально. Через 30, 60 хв., 24 год., 7 та 14 діб по 3 тварини з кожної групи виводили з дослідів, у них відбирали зразки печінки, селезінки, нирок, а також кров [3; 5].

Кров при відборі змішували з визначеною часткою антикоагулянту, із паренхіматозних органів отримували гомогенати на фізіологічному розчині у співвідношенні 1 : 9 (розведення 10^{-1}). Для визначення наявності та кількості бактерій, що транслокувалися у кров та паренхіматозні органи тварин, робили висіви десятикратних розведень одержаних проб у пробірки з середовищем MRS [10]. Облік здійснювали згідно з таблицями Мак-Креді [15], для зразків крові роблячи перерахунок на додавання антикоагулянту.

Утримання, годівлю, догляд та усі маніпуляції з лабораторними тваринами здійснювали згідно з Європейською конвенцією «Про захист хребетних тварин, які використовуються з експериментальною та науковою метою» (Страсбург, 1986 р.) [16] і «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001 р.) [17]. Експерименти проводили з дотриманням принципів гуманності, викладених у директиві Європейської Спільноти [18].

Математичну обробку всіх отриманих результатів, що мають кількісне вираження, здійснювали методами варіаційної статистики з використанням t-критерію Стьюдента та коефіцієнтів кореляції [19].

Результати та обговорення. Перед початком досліджень бактеріальної транслокації визначено культурально-морфологічні та фізіолого-біохімічні властивості досліджуваних штамів пробіотиків. Встановлено, що

бактерії *Lactobacillus plantarum* L5 є грам-позитивними нерухливими паличками правильної форми, спор не утворюють. У глибині капустяного агару на 24-у годину культивування виростають колонії білого кольору, округлої форми, діаметром до 1 мм, з вираженою зоною розчинення крейди 2–3 мм, через 48–72 годин росту колонії зірчасті, білого кольору, діаметром 2–3 мм, з добре вираженою зоною розчинення крейди в агарі 3–4 мм. У рідких середовищах через 2–3 доби культивування утворюється осад, при збовтуванні якого відбувається помутніння середовища; через 7–10 діб осад ущільнюється. Ферментує арабінозу, глюкозу, мальтозу, цукрозу, маннозу, манніт, галактозу, лактозу, рафінозу, целобіозу, сорбіт. Не ферментує ксилозу, рамнозу, інулін, інозит, гліцерин, галактит. Каталазу не продукує. Гідролізує казеїн. Нітрати не редукує. Уреазною та желатиназною активністю не володіє. Газ із глюкози не утворює. Індол і сірководень не утворює. Викликає зсідання молока, метиленовий синій не відновлює. При рості у молоці з лакмусом відбувається підкислення середовища (середовище набуває рожевого забарвлення). Толерантний до 2 та 4 % NaCl, концентрація NaCl 6 % пригнічує ріст. Виявляє помірний антагонізм до патогенних тест-культур: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei*. Не патогенний для лабораторних тварин.

Бактерії *L. plantarum* Lc-18 є короткими грам-позитивними нерухливими паличками, спор не утворюють, розташовані поодинокі та короткими ланцюжками. У глибині агаризованого середовища з кальцій глюконатом

на 24-у годину культивування виростають колонії білого кольору, округлої форми, діаметром до 2–3 мм, з вираженою зоною просвітлення середовища 5–7 мм, через 48–72 годин росту колонії округлі та неправильної форми, білого кольору, діаметром 3–4 мм, на всій площі чашки Петрі — суцільна зона просвітлення середовища. У рідких середовищах спостерігається інтенсивний ріст з утворенням пухкого осаду та помутнінням середовища; через 5–7 діб середовище просвітлюється, а товщина шару осаду сягає 1/3–1/2 висоти стовпчика середовища, осад лишається пухким і легко збовтується. Ферментує глюкозу, мальтозу, цукрозу, маннозу, манніт, галактозу, лактозу, рафінозу, целобіозу, сорбіт. Не ферментує арабінозу, ксилозу, рамнозу, інулін, інозит, гліцерин, галактит. Каталазу не продукує. Володіє казеїназною та слабкою уреазною активностями. Нітратредуктазу та желатиназу не продукує. Газ із глюкози не утворює. Індол і сірководень не утворює. Викликає зсідання молока, метиленовий синій не відновлює. При рості у молоці з лакмусом відбувається сильне закислення середовища (середовище швидко набуває рожевого забарвлення). Толерантний до 2 та 4 % NaCl, концентрація NaCl 6 % пригнічує ріст. Виявляє сильний антагонізм до патогенних тест-культур: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei*. Не патогенний для лабораторних тварин.

У результаті проведених досліджень виявлено закономірності транслокації молочнокислих бактерій-пробіотиків у кров тварин (табл. 1).

Таблиця 1. Концентрація молочнокислих бактерій, що транслювалися у кров тварин, КУО/см³ ($M \pm m$, $n = 3$)

Час після введення	Групи тварин				
	контрольна	дослідна-1	дослідна-2	дослідна-3	дослідна-4
до введення	0	0	0	0	0
3 хв.	0	0	0	0	31 ± 8
10 хв.	0	0	0	0	64 ± 12
30 хв.	0	0	0	23 ± 4	(3,7 ± 1,0) · 10 ²
60 хв.	0	0	1,1 ± 0,3	(8,9 ± 3,6) · 10 ^{2*}	(1,5 ± 0,3) · 10 ^{4*}
24 год.	0	2,0 ± 0,8	12 ± 4	(1,3 ± 0,4) · 10 ³	(7,8 ± 1,9) · 10 ^{4*}
7 діб	0	0	0,7 ± 0,4	(1,1 ± 0,4) · 10 ³	(5,9 ± 1,6) · 10 ⁴
14 діб	0	0	0	0*	(5,1 ± 1,7) · 10 ^{1*}

Примітка: * — вірогідна різниця порівняно з попередньою часовою відміткою ($p < 0,05$).

Так, за введення кролям *per os* досліджуваного штаму *L. plantarum* L5 у дозах $3 \cdot 10^8$ та $3 \cdot 10^9$ КУО впродовж першої доби майже не спостерігається присутності введених бактерій у крові тварин, лише через добу молочнокислі бактерії вдалося зареєструвати у крові у концентраціях 2–12 КУО/см³ залежно від введеної дози, проте впродовж першого тижня експерименту вони практично зникли з кров'яного руслу.

Щодо культури молочнокислих бактерій *L. plantarum* Lc-18, то за введення більшої з використаних доз невеликі кількості молочнокислих бактерій з'являються у крові вже через 3 хв. після введення бактерій. Через 10 хв. спостереження їх кількість поступово зростає, сягаючи значень у сотні бактеріальних клітин в 1 см³ крові через півгодини після введення. У цей час вперше реєструються поодинокі клітини у крові тварин, що отримали на порядок меншу дозу бактерій.

Упродовж наступних 30 хв. за обох використаних доз концентрація молочнокислих бактерій у крові тварин зростає на 1–2 порядки, впродовж першої доби — ще у 2–5 ра-

зів, лишаючись майже сталою впродовж тижня після перорального введення кролям бактеріальних культур, зменшуючись за цей час лише на 15–24 %.

Через 2 тижні експерименту за меншої з використаних доз молочнокислі бактерії з крові повністю елімінувалися, за більшої — їх концентрація зменшилася до рівня близько 50 КУО/см³, що на 3 порядки менше порівняно з попередньою часовою відміткою.

Щодо транслокації молочнокислих бактерій у паренхіматозні органи (печінку, селезінку, нирки), то виявлені закономірності цілком узгоджуються з отриманими даними щодо їх транслокації у кров лабораторних тварин (табл. 2).

Щодо бактерій *L. plantarum* L5, то за умов даного експерименту не виявлено їх суттєвої здатності до транслокації у паренхіматозні органи тварин; лише через 7 діб після перорального введення виявлено їхні слідові кількості у тканинах селезінки.

Щодо культури *L. plantarum* Lc-18 з колекції лабораторії пробіотиків, перспективною для створення на її основі пробіотичного

Таблиця 2. Концентрація лактобацил, що транслокувалися у паренхіматозні органи мишей, КУО/г ($M \pm m$, $n = 3$)

Час після введення	Групи тварин				
	контрольна	дослідна-1	дослідна-2	дослідна-3	Дослідна-4
Печінка					
30 хв.	0	0	0	0	$(6,4 \pm 2,5) \cdot 10^2$
60 хв.	0	0	0	$(2,4 \pm 1,0) \cdot 10^{2*}$	$(4,2 \pm 1,2) \cdot 10^3$
24 год.	0	0	0	77 ± 21	$(1,7 \pm 0,8) \cdot 10^3$
7 діб	0	0	0	$8,4 \pm 3,9$	$(3,6 \pm 0,8) \cdot 10^{2*}$
14 діб	0	0	0	0	0
Селезінка					
30 хв.	0	0	0	0	0
60 хв.	0	0	0	0	$3,1 \pm 1,3$
24 год.	0	0	0	$1,0 \pm 0,3$	26 ± 11
7 діб	0	0	$1,8 \pm 0,7$	$(2,7 \pm 0,7) \cdot 10^{2*}$	$(6,2 \pm 0,9) \cdot 10^{3*}$
14 діб	0	0	0	0*	$66 \pm 18^*$
Нирки					
30 хв.	0	0	0	0	0
60 хв.	0	0	0	0	0
24 год.	0	0	0	0	$2,4 \pm 1,0$
7 діб	0	0	0	0	$(1,3 \pm 0,6) \cdot 10^{2*}$
14 діб	0	0	0	0	0*

Примітка: * — вірогідна різниця порівняно з попередньою часовою відміткою ($p < 0,05$).

препарату, то у тканинах печінки за введення більшої з використаних доз максимальна концентрація спостерігається через 60 хв., поступово знижується, а повністю з тканин печінки бактерії зникають лише на 2-у тиждень експерименту. За меншої дози спостерігається схожа динаміка, з тією різницею, що перші бактерії у печінці ресструються на 30 хв. пізніше від моменту введення.

Максимальна концентрація транслокованих лактобацил у селезінці і нирках на 1–2 порядки нижча за таку у крові тварин ($1,3 \cdot 10^2$ – $6,2 \cdot 10^3$ КУО/г порівняно з $7,8 \cdot 10^4$ КУО/см³) і виявлена значно пізніше (через 7 діб від початку експерименту порівняно з 1 годиною). У селезінці бактерії з'являються пізніше порівняно з тканинами печінки, проте затримуються набагато довше.

За більшої з використаних уведених доз молочнокислих бактерій через 14 діб експерименту їх концентрація у селезінці майже на 30 % вища за таку у крові у цей момент. Створення «запасу» введених бактерій у селезінці може бути одним із механізмів тривалого підтримання їх сталої кількості у циркулюючій крові.

Як нами було показано раніше [20], культурально-морфологічні та фізіолого-біохімічні властивості всіх виділених з крові та органів культур мікроорганізмів відповідали властивостям вихідних бактеріальних штамів, що були введені тваринам.

Отже, встановлено вирішальну залежність прояву бактеріальної транслокації від введеного штаму бактерій. Так, штаму бактерій *Lactobacillus plantarum* L5 характеризується слабкою здатністю до транслокації у кров та паренхіматозні органи макроорганізму, тоді як транслокація іншого досліджуваного мікроорганізму (*L. plantarum* Lc-18) відбувається інтенсивно.

Встановлена залежність динаміки транслокації молочнокислих бактерій від дози: введення бактерій, яка використовується для перевірки нешкідливості пробіотиків ($3 \cdot 10^8$ КУО) супроводжується інтенсивною транслокацією, що починається у перші 10 хв. після введення і концентрація клітин в організмі лишається сталою впродовж досить тривалого часу (до 7 діб); введення меншої дози бактерій ($3 \cdot 10^7$ КУО) зумовлює більш плавний початок бактеріальної транслокації і значно менші концентрації бактерій

у крові та тканинах паренхіматозних органів.

1. Berg R. D. Bacterial translocation from the intestines / Rodney D. Berg // *Experimental animals*. — 1985. — Vol. 34, № 1. — P. 1–16.

2. Никитенко В. И. Транслокация бактерий из желудочно-кишечного тракта — естественный защитный механизм / Никитенко В. И., Копылов В. А., Никитенко М. В. // *Гастроэнтерология Санкт-Петербурга*. — 2004. — № 2–3. — С. 16–18.

3. Современные представления о механизмах лечебно-профилактического действия пробиотиков из бактерий рода *Bacillus* / [В. В. Смирнов, С. Р. Резник, В. А. Вьюницкая и др.] // *Микробиол. журн.* — 1993. — Т. 55, № 4. — С. 92–112.

4. Копылов В. А. Бактериальная транслокация при термической травме [электронный ресурс] / В. А. Копылов, В. В. Захаров // *Esculapus info: электронный медицинский журнал*. — 2002. — № 10. — Esculapus, 2002 ; Режим доступа : <http://esculapus.far.ru/vipusk/10/art/005.htm>.

5. Применение биоспорина в лечении экспериментальной гнойной раны / [Э. В. Горшевикова, Ю. А. Фурманов, А. Т. Слабоспицкая и др.] // *Клиническая хирургия*. — 1992. — № 9/10. — С. 30–32.

6. Дискуссионные вопросы создания и применения бактериальных препаратов для коррекции микрофлоры теплокровных / В. В. Смирнов, С. Р. Резник, И. Б. Сорокулова, В. А. Вьюницкая // *Микробиол. журн.* — 1992. — Т. 54, № 6. — С. 82–94.

7. Tihole F. Fizioloski pomen bakteriemije z jejunalno mikrofloro / Franc Tihole // *Zdravstveni vestnik*. — 1982. — Vol. 51, № 1. — P. 3–5.

8. О некоторых механизмах возникновения бессимптомной бактериемии / В. В. Смирнов, С. Р. Резник, И. Б. Сорокулова, В. А. Вьюницкая // *Микробиол. журн.* — 1988. — Т. 50, № 5. — С. 56–59.

9. Пат. 95689 Україна, МПК С 12 N 1/20, А 61 К 35/66, С 12 R 1/125. Штаму бактерій *Lactobacillus plantarum* для виробництва пробіотичного препарату та бактеріальної закваски / [Дяченко Г. М., Бокун А. О., Дерев'янка С. В. та ін.]. — а 2009 12449, заявл. 02.12.2009 ; опубл. 25.08.2011, бюл. № 16. — 2 с.

10. de Mann J. C. A medium for the cultivation of lactobacilli / J. C. de Mann, M. Rogosa, M. Elisabeth Sharpe // *Journal of applied bacteriology*. — 1960. — Vol. 23, № 1. — P. 130–135.

11. Методы общей бактериологии / под ред. Ф. Герхардта и др. ; [пер. с англ. Е. Н. Кондратьевой и Л. В. Калакуцкого] : в 3 т. — М. : Мир, 1983–1984. — Т. 3. — 1984. — 264 с.

12. Ашмарин И. И. Практическая медицин-

ская микробиология (руководство) / И. И. Ашмарин. — 2-е изд., испр. и доп. — Ташкент : Медицина, 1966. — 324 с.

13. Методы общей бактериологии / под ред. Ф. Герхардта и др. ; [пер. с англ. Е. Н. Кондратьевой и Л. В. Калакуцкого] : в 3 т. — М. : Мир, 1983–1984. — Т. 1. — 1983. — 536 с.

14. Егоров Н. С. Основы учения об антибиотиках : учеб. для студ. биол. спец. ун-тов / Н. С. Егоров. — 4-е изд., перераб. и доп. — М. : Высш. шк., 1986. — 448 с.

15. Руководство к практическим занятиям по микробиологии : учеб. пособие / под ред. Н. С. Егорова. — 3-е изд., перераб. и доп. — М. : Изд-во МГУ, 1995. — 224 с.

16. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes [электронный ресурс] // European treaty series. — Strasbourg, 1986. — № 123.

— 50 p. — Режим доступа : <http://conventions.coe.int/Treaty/en/Treaties/Word/123.doc>.

17. Резников О. Г. Загальні етичні принципи експериментів на тваринах / О. Г. Резников // Ендокринологія. — 2003. — Т. 8, № 1. — С. 142–145.

18. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. — 86/609/EC. — 20.10.2010 // Official journal of the European Union. — L276/33–79.

19. Лакин Г. Ф. Биометрия / Г. Ф. Лакин : учеб. пособие для биол. спец. вузов. — 4-е изд., перераб. и доп. — М. : Высш. шк., 1990. — 352 с.

20. Агеев В. О. Вплив внутрішнього середовища організму тварин на властивості бактерій-пробіотиків / В. О. Агеев // Сільськогосподарська мікробіологія : міжвід. темат. наук. зб. — Чернівці : Сівер-Друк, 2014. — Вип. 19. — С. 89–94.

БАКТЕРИАЛЬНАЯ ТРАНСЛОКАЦИЯ ЛАКТОБАЦИЛЛ-ПРОБИОТИКОВ

В. А. Агеев

Институт сельскохозяйственной микробиологии и агропромышленного производства НААН, г. Чернигов

Представлены результаты изучения динамики и особенностей транслокации двух пробиотических штаммов молочнокислых бактерий в кровь и паренхиматозные органы животных. Установлена зависимость проявления бактериальной транслокации от штамма бактерий и от перорально введенной дозы. Культурально-морфологические и физиолого-биохимические свойства всех выделенных из крови и органов культур микроорганизмов соответствуют свойствам исходных бактериальных штаммов, введенным животным.

Ключевые слова: молочнокислые бактерии, бактериальная транслокация, кровь, паренхиматозные органы.

BACTERIAL TRANSLOCATION OF PROBIOTIC LACTOBACILLI

V. O. Aheyev

Institute of Agricultural Microbiology and Agroindustrial Manufacture, NAAS, Chernihiv

The paper presents the results of studying of the dynamics and characteristics of the translocation of two probiotic strains of lactic acid bacteria in the blood and parenchymal organs of animals. The dependence of the bacterial translocation from the bacterial strain and from orally entered dose was established. It was shown that cultural-morphological and physiological-biochemical properties of all isolated from blood cultures of microorganisms have corresponded to the initial properties of bacterial strains introduced to the animals.

Key words: lactic acid bacteria, bacterial translocation, blood, parenchymal organs.