УДК 616.34:547.979.8:612.017.1

ВПЛИВ КАРОТИНОВМІСНОЇ БІОМАСИ ДРІЖДЖІВ ТА В-КАРОТИНУ НА СКЛАД МІКРОФЛОРИ ТА ІМУННИЙ СТАТУС ЩУРІВ

М. В. Камінська, Г. І. Нечай, Н. І. Цепко, Г. В. Колісник

Інститут біології тварин УААН

У роботі наведені порівняльні дані про вплив біомаси каротиновмісних дріжджів Phaffia rhodozyta та синтетичного β-каротину на склад мікрофлори порожнини товстої кишки щурів і показники фагоцитозу за стандартних умов утримання та на фоні, змодельованого тетрахлорметаном, оксидативного стресу. Додавання до раціону щурів 0,5 мг біомаси каротиновмісних дріжджів на голову в день покращувало кількісний та якісний склад мікробоценозу кишечника: позитивно змінилось співвідношення окремих штамів кишкової палички та зменшилась кількість кокових форм. За умов оксидативного стресу застосування біомаси дріжджів стабілізувало склад мікрофлори та приводило його до норми. Застосування β-каротину не запобігало порушенням у мікробоценозі кишечника. Показники фагоцитозу за умов змодельованого стресу у щурів контрольної та дослідних груп не зазнали достовірних змін.

Ключові слова: БІОМАСА ДРІЖДЖІВ, КАРОТИН, ІМУНІТЕТ, МІКРОФЛОРА, ЩУРІ.

Дослідження багатьох вчених показали тісний взаємозв'язок мікрофлори шлунково-кишкового тракту та організму тварин. Мікрофлора кишечника суттєво впливає на життєдіяльність макроорганізму: бере участь у процесах травлення, синтезує вітаміни, ферменти, модифікує жовчні кислоти, підтримує метаболічну та імунну рівновагу[1]. Захисні функції нормальної флори визначаються не лише її антагоністичною дією на збудники інфекційних захворювань, але й активною стимуляцією неспецифічних механізмів резистентності макроорганізму. Відомо, що мікрофлора шлунково-кишкового тракту стимулює синтез імуноглобулінів класу А, природних антитіл, активність клітин фагоцитарного ряду, локалізованих у стінках кишечника, їх бактерицидну активність [2]. Тому збереження мікрофлори і запобігання порушень її складу у кишечнику тварин є важливою науковою та практичною проблемою. Для лікувального та профілактичного ефекту при порушенні складу мікрофлори використовують препарати на основі живих мікроорганізмів, зокрема біомаси дріжджів, які нормалізують склад мікробоценозу кишечника та корегують імунний статус організму [3, 4]. Біомаса дріжджів *Phaffia rhodozyta*, яка була використана у попередніх наших дослідженнях як пробіотичний препарат [5], містить каротиноїди, які проявляють різносторонній стимулюючий вплив на функцію імунної системи організму тварин [6]. Проте, дослідження біомаси каротиносинтезуючих дріжджів, як пробіотичного та імуностимулюючого препарату раніше не проводилось. Тому, метою даної роботи було дослідити та порівняти склад мікрофлори кишечника щурів та їх імунний статус при згодовуванні біомаси каротинсинтезуючих дріжджів і хімічно синтезованого β-каротину.

Матеріали і методи

Дослід проводили на самцях щурів лінії Вістар із початковою масою тіла 120–130 г, яких утримували у стандартних умовах віварію. Тварини були поділені на 3 групи (по 8 тварин):

контрольна група; I дослідна — щури, яким згодовували біомасу каротиновмісних дріжджів *P. rhodozyma* 0,5 мг на голову в день; II дослідна — тварини, яким згодовували β-каротин (фірми «Sigma») у дозі 5 мг/100 г маси тіла на добу (кількість еквівалентна вмісту каротиноїдів у біомасі дріжджів, яку споживали щури I дослідної групи). На 12-й день досліду кожну групу тварин було розділено на 2 підгрупи. Тваринам однієї підгрупи з кожної групи вводили тетрахлорметан у дозі 0,2 мл/100 г маси тіла у вигляді 50 % олійного розчину для моделювання оксидативного стресу. Тетрахлорметан вводили внутрішньочеревинно два рази через день. Забій тварин проводили через 48 год. після останнього введення токсиканту під легким ефірним наркозом. Для досліджень відбирали кров, тканини печінки, мозку та серця.

У крові визначали фагоцитарну активність лейкоцитів в тесті з нітросинім тетразолієм [7]. У зразках вмісту кишечника кількісно досліджували видовий склад мікрофлори методом розведень та висіванням мікроорганізмів на селективні середовища [8]. Ідентифікацію їх проводили за морфологічними, культуральними, фізіологічними та біохімічними властивостями. Статистичну обробку результатів, проводили, використовуючи критерій Стьюдента за допомогою програми *Microsoft Excel*.

Результати та обговорення

Метою досліду було порівняння дії біомаси каротиносинтезуючих дріжджів та хімічного ß-каротину на видовий склад мікрофлори вмісту товстої кишки щурів при внесенні цих добавок до раціону за нормальних фізіологічних умов та на фоні змодельованого тетрахлорметаном оксидативного стресу.

При порівнянні впливу добавки біомаси каротиновмісних дріжджів із дією каротину виявлено збільшення загальної кількості кишкової палички у кишечнику щурів дослідних груп у 4,28 та у 1,71 раза відповідно (табл. 1). Однак у групі тварин з добавкою каротину до раціону збільшення відбулось за рахунок штамів з низькою ферментативною активністю, а у групі з добавкою дріжджів — за рахунок штамів з нормальною ферментативною активністю.

Таблиця 1

Порівняльна характеристика складу мікрофлори порожнини товстої кишки щурів при згодовуванні біомаси каротиносинтезуючих дріжджів та β-каротину (*M*±m, N=3)

Мікроорганізми	Контрольна група	I дослідна група	II дослідна група
Заг. кількість кишкової палички, мт/г	$(35\pm2)\times10^6$	$(150\pm9)\times10^6$***	$(60\pm6)\times10^6$*
— з нормальною ферментативною активністю, %	87,0±2,5	93,0±4,1	80,0±4,0
— з слабковираженими ферментативними властивостями, %	12,94±1,20	7,00±0,20 *	20,00±1,30 *
— лактозонегативні ентеробактерії, %	0	0	0
Гемолізуюча кишкова паличка, %	0,06±0,01	0	0
Кокові форми в загальній кількості мікробів, %	14,8±1,2	20,7±2,3	35,7±2,3 **
Біфідобактерії, мт/г	10^7	10^7	10^7
Лактобактерії, мт/г	10^5	10^5	10^5
Протей, мт/г	$(4,0\pm0,2)\times10^4$	$(7,0\pm0,4)\times10^3$***	$(6,0\pm0,3)\times10^3$***
Гриби роду Candida, мт/г	1×10^4	0	1×10^4
Дріжджі	0	$(3,0\pm0,1)\times10^2$	0

Примітка: *, ** та *** — різниця між даним показником і показником у контрольній групі статистично достовірна: (P< 0,025), (P< 0,01) та (P< 0,001) відповідно.

У тварин обох груп у вмістимому товстої кишки не виявлено гемолізуючих штамів та лактозонегативних ентеробактерій. Популяції біфідо- та лактобактерій не зазнавали змін. При введені в раціон каротиновмісних добавок виявлено перерозподіл умовно-патогенної мікрофлори: зросла загальна кількість кокових форм та зменшився вміст протею.

Із вмістимого товстої кишки щурів, що отримували біомасу дріжджів, висівались окремі колонії рожевих дріжджів, ідентифікованих як *Phaffia rhodozyma*.

За умов оксидативного стресу (введення тетрахлорметану) у щурів дослідних груп змінився склад мікрофлори порожнини товстої кишки: зменшилась загальна кількість кишкової палички, зріс вміст слабоферментуючих штамів до 35 % (за норми до 10 %) та збільшилася загальна кількість кокових форм (у 1,4 раза понад норму) (табл. 2).

Таблиця 2

Порівняльна характеристика складу мікрофлори порожнини товстої кишки щурів при згодовуванні біомаси каротиносинтезуючих дріжджів та β-каротину за навантаження тетрахлорметаном (*M*±m, N=3)

Примітка: $^{++}$ та $^{+++}$ — різниця між даним показником і показником у контрольній групі з навантаженням статистично достовірна: (P< 0,01) та (P< 0,001) відповідно.
* та *** — різниця між даним показником і показником у контрольній групі статистично достовірна: (P< 0,025)

Мікроорганізми	Контрольна група	Контрольна група з CCl_4	I дослідна з CCl_4	II дослідна з CCl_4
Заг. кількість кишкової палички, мт/г	$(35\pm2)\times10^6$	$(23\pm2)\times10^6$*	$(170\pm8)\times10^{6+++}$	$(30\pm2)\times10^6$
— з норм. ферментативною активністю, %	87,0±2,5	65,0±1,8***	$94{,}0\pm2{,}0^{+++}$	66,7±1,7
— з слабковир. ферментат. властивост., %	12,94±1,20	34,96±2,10***	$6{,}00\pm0{,}90^{+++}$	33,27±1,90
— лактозонегативні ентеробактерії, %	0	0	0	0
Гемолізуюча кишкова паличка, %	0,06±0,01	0,04±0,01	0	0,03±0,01
Кокові форми в заг. кількості мікробів, %	14,8±1,2	48,8±2,3***	$11{,}2\pm0{,}85^{+++}$	$34{,}0\pm2{,}1^{++}$
Біфідобактерії, мт/г	10^7	10^7	10^7	10^7
Лактобактерії, мт/г	10^5	10^5	10^5	10^5
Протей, мт/г	$(4{,}0\pm0{,}2)\times10^4$	0	$(1\pm0)\times10^4$	$(4{,}0\pm0{,}4)\times10^3$
Гриби роду Candida, мт/г	1×10^4	0	2×10^4	0
Дріжджі	0	0	1×10^2	0

та (P< 0,001) відповідно

За цих умов застосування біомаси каротиносинтезуючих дріжджів привело до стабілізації складу мікрофлори кишечника щурів. Відмічено зменшення кількості слабоферментуючих штамів кишкової палички до 6 % та нормування загальної кількості кокових форм, що позитивно впливає на організм в цілому та послаблює негативний вплив тетрахлорметану. Також при застосуванні біомаси каротиносинтезуючих дріжджів відбулася позитивна зміна співвідношення кишкової палички: зросла кількість колоній з нормальною ферментативною активністю та зменшилася кількість лактозонегативних та гемолізуючих штамів.

Використання у раціоні щурів хімічного β-каротину не нормалізувало стан мікрофлори кишечника, розбалансованої дією тетрахлорметану.

Таким чином, застосування у раціонах oehsd біомаси каротиносинтезуючих дріжджів позитивно впливало на мікробоценоз кишечника як за стандартних умов утримання, так і при оксидативному стресі. За умов використання хімічного каротину таких змін не відмічено.

Відомо, що введення біомаси дріжджів та каротиноїдів у раціон тварин впливає на імунний статус їх організму [6]. Нами виявлено тенденцію до зниження фагоцитарної активность лейкоцитів щурів при згодовуванні біомаси дріжджів *P. rhodozyma* та β-каротину (табл.3).

Таблиця 3

Вплив біомаси дріжджів на фагоцитарну активність лейкоцитів щурів (M±m, n =4)

Групи тварин	Фагоцитарна активність,%	Фагоцитарне число	Фагоцитарний індекс
Контрольна група	43,5±3,62	3,76±0,94	8,31±1,41
Контрольна група з CCl_4	36,5±1,44	6,51±0,62	17,69±1,84**
І дослідна група	33,3±4,06	5,90±1,11	14,89±2,18*
І дослідна група з CCl_4	26,0±2,16	3,95±0,95	10,79±1,00
ІІ дослідна група	35,7±2,84	3,03±0,10	8,96±1,07
ІІ дослідна група з CCl_4	40,5±4,56	3,92±0,34	10,43±1,02

Примітка: * та **— різниця між даним показником і показником у контрольній групі статистично достовірна: (P< 0,05) та (P< 0,01) відповідно

У щурів І-ї дослідної групи, на відміну від тварин ІІ-ї дослідної групи, виявлено в 1,79 раза вищий фагоцитарний індекс, ніж у тварин контрольної групи, та тенденцію до зростання фагоцитарного числа.

Моделювання оксидативного стресу не мало чітко виражених негативних наслідків на показники імунної системи у щурів. Так, ми відзначили зростання у 2,13 раза фагоцитарного індексу у щурів контрольної групи з навантаженням на фоні тенденції до зменшення фагоцитарної активності. У щурів дослідних груп, яким вводили тетрахлорметан, достовірних змін у досліджуваних показниках не встановлено.

Очевидно, змодельований нами оксидативний стрес не значно впливав на імунну систему організму щурів, хоча спостерігались зміни у мікробоценозі кишечника.

Висновки

1. Використання у раціоні щурів 0,5 мг на голову в день біомаси каротиносинтезуючих дріжджів позитивно впливає на склад мікрофлори порожнини товстої кишки, підвищує кількість кишкової палички з нормальною ферментативною активністю та зменшує кількість стрепто- та стафілококів.
2. Введення тетрахлорметану щурам спричиняє зміну відносного складу мікрофлори кишечника: зменшення загальної кількості кишкової палички та збільшення на 34 % загальної кількості кокових форм, що приблизно у 2 рази вище норми.
3. Дія тетрахлорметану на мікрофлору кишечника щурів послаблюється при використанні у раціоні біомаси каротиновмісних дріжджів, а склад мікрофлори відповідає нормі. Додавання до раціону ß-каротину не впливає на дію оксидативного стресу на мікрофлору кишечника.
4. Змодельований тетрахлорметаном оксидативний стрес не змінює показники фагоцитозу та не суттєво впливає на іммуний статус організму щурів усіх дослідних груп.

M. V. Kaminska, G. I. Nechay, N. I. Cepko, H. V. Kolisnyk

INFLUENCE OF CAROTENECONTAINING YEAST BIOMASS AND B-CAROTENE ON THE MICROFLORAS COMPOSITION AND IMMUNE STATUS OF RATS

S u m m a r y

The data about the influence of carotene containing yeasts Phaffia rhodozyma biomass and synthetic b-carotene on rats colons cavities microfloras composition and phagocytosis indexes at the standard conditions and at the oxidative stress, which was modelled by tetrachlormetan are presented in this article. The adding to the rats ration 0,5 mg carotene containing yeasts biomass on a head per a day improved quantitative and qualitive composition of intestines microcenosis: the E.

coli' strains ration was changed positive and the coccus forms amount was diminished. The yeasts biomasses application stabilized microfloras composition and brought it over to the norm at the oxidative stress. The b-carotene application did not prevent violation at intestines microcenosis. The phagocytosis indexes did not change the control and experimental groups of rats at the modelled stress.

М. В. Каминская, Г. И. Нечай, Н. И. Цепко, Г. В. Колиснык

ВЛИЯНИЕ КАРОТИНОСОДЕРЖАЩЕЙ БИОМАССЫ ДРОЖЖЕЙ И В-КАРОТИНА НА СОСТАВ МИКРОФЛОРЫ И ИММУННЫЙ СТАТУС КРЫС

А н н о т а ц и я

В работе приведены сравнительные данные о влиянии биомассы каротиносодержащих дрожжей Phaffia rhodozyma и синтетического β-каротина на состав микрофлоры просвета толстой кишки крыс и показатели фагоцитоза при стандартных условиях содержания и на фоне смоделированного тетрахлорметаном оксидативного стресса. Добавление к рациону крыс 0,5 мг биомассы каротиносодержащих дрожжей на голову в день улучшало количественный и качественный состав микробоценоза кишечника: положительно изменилось соотношение отдельных штаммов кишечной палочки и снизилось количество кокковых форм. При оксидативном стрессе использование биомассы дрожжей стабилизировало состав микрофлоры. Использование β-каротина не предотвращало нарушений микробоценоза кишечника. Показатели фагоцитоза при смоделированном стрессе у крыс контрольной и опытных групп не изменялись.

1. *Насонова Т. А.* Современные представления о значении нормальной микрофлоры тела в норме и патологии [Текст] / Насонова Т. А., Мальцев В. Н. // Успехи современной биологии. — 1983. — Т. 96, вып. 1 (4). — С. 139–150.

2. *Хавкин А. И.* Микробиоценоз кишечника и иммунитет. / Хавкин А. И. — www/rmj/t11/n3/122.htm.

3. *Смирнов В. В.* Пробиотики на основе живых культур микроорганизмов [Текст] / Смирнов В. В., Коваленко Н. К., Подгорский В. С. // Мікробіол. журн. — 2002. — Т. 64, № 4. — С.62–79.

4. *Антипов В. А.* Использование пробиотиков в животноводстве [Текст] / Антипов В. А. // Ветеринария. — 1999. — № 4. — С.55–58.

5. *Камінська М. В.* Зміни у видовому складі мікробоценозу кишечника щурів при згодовуванні біомаси дріжджів *Sacharomyces cerevisiae* та *Phaffia rhodozyma* [Текст] / Камінська М. В. // Ж. «Біологія тварин». — 2007. — Т.9, №1–2. — С. 199–202.

6. *Куртяк Б. М., Янович В. Г.* Жиророзчинні вітаміни у ветеринарній медицині і тваринництві. / Куртяк Б. М., Янович В. Г. — Львів : Тріада плюс, 2004. — 426 с. — 500 пр. — ISBN–966–7596–39–7.

7. Довідник : Фізіолого-біохімічні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині. — Львів, 2004. — 399с.

8. *Красноголовець В. Н.* Дисбактериоз кишечника [Текст] : моног. / В. Н. Красноголовец ; под ред. М. Х. Левитана. — Москва : Медицина, 1989. — 208 с. — 5000 экз. — ISBN 5–225–00337–0.