

ВЛИЯНИЕ ТИРАМА НА КОЛИЧЕСТВЕННУЮ ПРЕДСТАВИТЕЛЬНОСТЬ БИФИДО- И ЛАКТОБАКТЕРИЙ И КОРРЕКЦИЯ ДИСБИОЗА

THIRAM INFLUENCE ON THE QUANTITATIVE REPRESENTATION OF BIFIDO- AND LACTOBACTERIA AND CORRECTION OF DYSBIOSIS

V. Korolev
O. Medvedeva
V. Riadnova
E. Korolev
M. Babaeva

Summary: Currently, tiram group pesticides are intensively used in agriculture. When ingested, these drugs can cause changes in the colon microbiota, resulting in the development of dysbiosis.

Keywords: pesticides, antioxidant protection, lipid peroxidation, dysbiosis, tiram, synbiotic, sea buckthorn oil.

Королев Владимир Анатольевич

Доктор биол.наук, профессор, ФГБОУ ВО Курский государственный медицинский университет
medecol1@yandex.ru

Медведева Ольга Анатольевна

Доктор биол.наук, профессор, ФГБОУ ВО Курский государственный медицинский университет
olgafrida@rambler.ru

Ряднова Вера Анатольевна

Ассистент, ФГБОУ ВО Курский государственный медицинский университет
veraan8@yandex.ru

Королев Егор Владимирович

ФГБОУ ВО Курский государственный медицинский университет
medecol1@yandex.ru

Бабаева Мадина Акифовна

ФГБОУ ВО Курский государственный медицинский университет
bmadina.2002@mail.ru

Аннотация. В настоящее время пестициды тирамовой группы интенсивно применяются в сельском хозяйстве. Данные препараты, попадая в организмы, способны вызывать изменения микробиоты толстой кишки, в результате чего развивается дисбиоз.

Ключевые слова: пестициды, антиоксидантная защита, перекисное окисление липидов, дисбиоз, тирам, синбиотик, облепиховое масло.

Актуальность

В агропромышленном производстве пестициды являются важным средством защиты растений и повышения урожайности сельскохозяйственных культур. Для борьбы с болезнями, вредителями и сохранения урожая используют широкий спектр пестицидов [1]. Широкомасштабное использование пестицидов и других стойких органических загрязнителей приводит к загрязнению воды, почвы, воздуха и биоты. Попадая в экосистему ксенобиотики, создают угрозу для человека, препятствуют нормальному функционированию многих систем организма, и особенно системы пищеварения [2, 3].

Желудочно-кишечный тракт человека и других млекопитающих колонизирует обширная и разнообразная группа микробов, среди которых доминирующими являются колонии бифидо- и лактобактерий [4]. Макроорганизм и его микрофлора является единой экологической системой, находящейся в состоянии динамического равновесия [5]. Нарушение такой связи, в результате

действия ксенобиотиков, приводит к изменению количественного и/или качественного состава бактериальной флоры, обусловленному динамическим нарушением микроэкологии кишечника в результате расстройства адаптационных, защитных и компенсаторных механизмов [6].

Процессы свободнорадикального окисления более интенсивно протекают в результате действия различных токсикантов на организм, в результате чего происходит накопление продуктов перекисного окисления липидов и нарушение работы антиоксидантной защиты организма [7].

С целью восстановления прооксидантно-антиоксидантного статуса целесообразно применять препараты антиоксидантной группы совместно с синбиотиками [8].

Цель исследования

Изучить состояние лакто- и бифидобактерий толстого кишечника экспериментальных животных при суб-

хронической интоксикации фунгицидом тирам и коррекции экспериментального дисбиоза синбиотиком Бифилар и облепиховым маслом.

Материалы и методы

Для эксперимента использованы крысы линии Wistar с массой тела 200 гр. Экспериментальные животные распределялись на 10 групп по 10 животных в каждой. Первая группа — это интактные животные, ставшие биологическим контролем. Группы 2–5 получали фунгицидный препарат тирам в дозе 1,6 мг (1/50 LD50) длительностью 28 дней, тем самым формировалась субхроническая интоксикация. Чтобы исключить физиологический стресс у животных тирам добавляли в стандартный пищевой рацион. К измельченному корму добавляли тирам и 2 мл дистиллированной воды, формировали гранулы и сушили в естественных условиях лаборатории. На 7, 14, 21, 28 сутки производили забой и осуществляли забор материала, в дальнейшем экспериментальных животных декапитировали под слабым эфирным наркозом. Крысы 6 группы после 28 дней интоксикации получали 21 день дистиллированную воду. Забой производили через 21 день после введения воды. В 7 группе субхроническая интоксикация формировалась так же 28 дней, в дальнейшем животные получали стандартный пищевой рацион в течении 30 дней. Забой производили через 30 суток. После 28 суток интоксикации тирамом самцы крыс 8 группы получали облепиховое масло 30 суток в объеме 0,17 мл из расчета на одно животное. Забой произвели через 30 дней коррекции. 9 группа животных получала тирам 28 дней, в дальнейшем 21 день синбиотик Бифилар в объеме 0,17 мл. Через 21 сутки коррекции произвели забой животных. Субхроническая интоксикация в 10 группе длилась 28 суток. Корректировали состояние животных данной группы облепиховым маслом в дозе 0,78 мг/кг и Бифиларом в дозе 85,68 мг/кг, забой производили через 30 дней применения.

Расчет дозы фунгицида тирам проводили исходя из токсикологических данных: LD50 для крыс составляет 400 мг/кг. В эксперименте использовалась доза 1/50 LD50 и после расчета для 200 граммовых экспериментальных животных она составила 8 мг/кг (1,6 мг) [9].

По методике Л.И. Кафарской и В.М. Коршунова была исследована пристеночная микрофлора толстой кишки (качественная и количественная) [10]. Идентифицировали микроорганизмы при помощи масс-спектрометра Maldi Biotyper Microflex.

Активность ферментов системы АОЗ изучали по содержанию супероксиддисмутазы и каталазы с использованием наборов фирмы CelBiolabs в микропланшетном формате на биохимическом анализаторе Clima RAC (Испания).

Результаты

В контрольной группе количество Bifidobacterium составило $Ig\ 8,95 \pm 1,29$, Lactobacillus — $Ig\ 6,32 \pm 0,66$. В динамике субхронической интоксикации наблюдалось снижение количества изучаемых представителей и достигло своего максимума в группе «Тирам 28 сутки». Так, количество бифидобактерий снижалось до $Ig\ 3,00 \pm 0,27$ (в 2,98 раза ($p < 0,001$)), лактобацилл — до $Ig\ 2,50 \pm 0,25$ (в 2,53 раза ($p < 0,001$)) (таблица 1).

Состояние антиоксидантной защиты организма оценивали при помощи активности супероксиддисмутазы и каталазы в гомогенате ткани толстой кишки и плазме крови. Наиболее выраженное уменьшение данных показателей наблюдается при сроке введения тирама на 28 сутки. Активность каталазы снизилась в 1,94 раза ($p < 0,001$), супероксиддисмутазы — в 2,34 раза ($p < 0,001$) по сравнению с интактной группой животных.

Выявленные нарушения антиоксидантной защиты могут стимулировать процессы липопероксидации, это приводит к накоплению продуктов перекисного окисления липидов. Увеличение концентрации малонового диальдегида и диеновых конъюгатов в 2,57 раза ($p < 0,001$) и 2,37 раза ($p < 0,001$) соответственно наблюдается в группе «Тирам 28 сутки» по сравнению с группой контроля (таблица 2).

Введение тирама в течении 7 суток не привело к статистически значимым изменениям значений определяемых показателей плазмы крови экспериментальных животных.

В группе «Тирам 14 суток» произошло достоверное увеличение малонового диальдегида в 1,75 раза ($p < 0,001$). Активность каталазы сократилась с $11,80 \pm 1,12$ до $8,16 \pm 0,86$, супероксиддисмутазы $13,79 \pm 1,40$ до $9,92 \pm 1,04$.

Применение тирама на 21 сутки оказал существенное влияние на показатели плазмы крови. Произошло увеличение содержания МДА в 1,99 раза и ДК в 1,48 раза по сравнению с группой интактных животных. Сократилось количество каталазы в 1,68 раза и СОД в 1,68 раза (таблица 3).

В группе животных, получавших стандартный пищевой рацион на протяжении 21 дня после проведенной интоксикации тирамом 28 суток, наблюдается увеличение количества лактобацилл и бифидобактерий в 1,40 и 1,71 раза ($p < 0,05$ и $p < 0,001$) соответственно по сравнению с группой «Тирам 28 сутки». При применении препарата Бифилар наблюдается нарастание лактобацилл в 2,39 раза и бифидобактерий в 2 раза по сравнению с группой «Контроль (вода)» (таблица 4).

Таблица 1.

Количественный состав бифидо- и лактобактерий толстой кишки крыс при применении тирама, lg КОЕ/г ($M \pm m$)

Микроорганизмы	Контроль (интактные)	Тирам 7 сут.	Тирам 14 сут.	Тирам 21 сут.	Тирам 28 сут.
Lactobacillus spp.	6,32±0,66	3,89±0,41**	3,65±0,48***	3,11±0,44***	2,50±0,25***
Bifidobacterium spp.	8,95±1,29	5,43±0,54*	4,87±0,51**	3,14±0,36***	3,00±0,27***

Примечание: * — $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой, ** — $p < 0,01$ по сравнению с контрольной группой, *** — $p < 0,001$ по сравнению с контрольной группой.

Таблица 2.

Активность ферментов АОЗ и содержание продуктов ПОЛ в гомогенате ткани толстой кишки крыс при введении тирама, мкат/г белка ткани ($M \pm m$)

	Контроль (интактные)	Тирам 7 сут.	Тирам 14 сут.	Тирам 21 сут.	Тирам 28 сут.
МДА	0,95±0,10	1,34±0,13*	1,76±0,18***	2,13±0,22***	2,44±0,25***
ДК	0,30±0,04	0,54±0,06***	0,59±0,07***	0,66±0,07***	0,71±0,08***
КАТ	9,66±0,97	7,17±0,75	6,43±0,70**	5,97±0,61***	4,98±0,52***
СОД	12,85±1,28	8,93±0,89*	7,39±0,80***	6,12±0,61***	5,48±0,61***

Примечание: * — $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой, ** — $p < 0,01$ по сравнению с контрольной группой, *** — $p < 0,001$ по сравнению с контрольной группой.

Таблица 3.

Биохимические показатели плазмы крови крыс при введении тирама, ($M \pm m$)

	Контроль (интактные)	Тирам 7 сут.	Тирам 14 сут.	Тирам 21 сут.	Тирам 28 сут.
МДА	1,02±0,10	1,36±0,14	1,79±0,18***	2,03±0,21***	2,44±0,25***
ДК	0,40±0,05	0,47±0,05	0,53±0,07	0,59±0,07*	0,71±0,08***
КАТ	11,80±1,12	9,32±0,94	8,16±0,86*	7,04±0,70***	5,19±0,67***
СОД	13,79±1,40	10,33±1,03	9,92±1,04*	8,19±0,82***	7,01±0,70***

Примечание: * — $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой, ** — $p < 0,01$ по сравнению с контрольной группой, *** — $p < 0,001$ по сравнению с контрольной группой.

Таблица 4.

Количественный состав лакто- и бифидобактерий при применении синбиотика БиФилар, lg КОЕ/г ($M \pm m$)

Микроорганизмы	Тирам 28 сут.	Контроль (вода)	БиФилар
Lactobacillus spp.	2,50±0,25	3,49±0,37 ^X	8,34±0,88***
Bifidobacterium spp.	3,00±0,27	5,14±0,68 ^{XXX}	10,32±1,45***

Примечание: * — $p < 0,05$ по сравнению с группой «контроль (вода)», ** — $p < 0,01$ по сравнению с группой «контроль (вода)», *** — $p < 0,001$ по сравнению с группой «контроль (вода)»; X — $p < 0,05$ по сравнению с группой «тирам 28 сут.», XX — $p < 0,01$ по сравнению с группой «тирам 28 сут.», XXX — $p < 0,001$ по сравнению с группой «тирам 28 сут.».

Со стороны биохимических показателей ткани толстой кишки крыс при применении БиФилара наблюдается сокращение МДА в 1,72 раза ($p < 0,001$) и ДК в 1,44 раза ($p < 0,05$) по сравнению с группой «Контроль (вода)». Отмечается увеличение активности показателей антиоксидантной защиты, хотя достоверных различий не установлено.

В плазме крови животных, получавших стандартный пищевой рацион после интоксикации тирамом статистической значимости достиг показатель активности каталазы, его активность выросла в 1,42 раза ($p < 0,05$) по сравнению с группой «Тирам 28 сутки». Коррекция синбиотиком БиФилар привела к достоверному снижению МДА и ДК в 1,68 ($p < 0,001$) и 1,35 ($p < 0,001$) раза соответственно по сравнению с группой «Контроль (вода)».

Таблица 5.

Количественный состав лакто- и бифидобактерий при применении облепихового масла, lg КОЕ/г (M±m)

Выделенные микроорганизмы	Тирам 28 сут.	Контроль (стандартный пищевой рацион)	Облепиховое масло
Lactobacillus spp.	2,50±0,25	4,27±0,45 ^{XXX}	5,26±0,70
Bifidobacterium spp.	3,00±0,27	6,22±0,88 ^{XXX}	6,88±0,86

Примечание: X — $p < 0,05$ по сравнению с группой «тирам 28 сут.», XX — $p < 0,01$ по сравнению с группой «тирам 28 сут.», XXX — $p < 0,001$ по сравнению с группой «тирам 28 сут.».

Таблица 6.

Количественный состав лакто- и бифидобактерий при применении синбиотика Бифилар и облепихового масла, lg КОЕ/г (M±m)

Выделенные микроорганизмы	Контроль (вода)	Контроль (стандартный пищевой рацион)	Бифилар + Облепиховое масло
Lactobacillus spp.	3,49±0,37	4,27±0,45	9,46±1,28 ^{***XXX}
Bifidobacterium spp.	5,14±0,68	6,22±0,88	10,77±1,29 ^{***XX}

Примечание: * — $p < 0,05$ по сравнению с группой «контроль (вода)», ** — $p < 0,01$ по сравнению с группой «контроль (вода)», *** — $p < 0,001$ по сравнению с группой «контроль (вода)»; X — $p < 0,05$ по сравнению с группой «контроль (стандартный пищевой рацион)», XX — $p < 0,01$ по сравнению с группой «контроль (стандартный пищевой рацион)», XXX — $p < 0,001$ по сравнению с группой «контроль (стандартный пищевой рацион)».

Установлено увеличение количества бифидо- и лактобактерий при применении облепихового масла, хотя показатели не достигли статистической значимости в экспериментальной и контрольной группе.

Количество лактобацилл выросло в 1,70 раза ($p < 0,001$) и бифидобактерий в 2,07 раза ($p < 0,001$) в группе «Контроль (стандартный пищевой рацион)» по сравнению с группой «Контроль 28 сутки» (таблица 5).

Применение облепихового масла после интоксикации тиразом в течении 28 дней привело к увеличению показателей АОЗ в ткани толстой кишки, каталазы в 1,42 раза ($p < 0,05$) и СОД в 1,63 раза ($p < 0,001$) по сравнению с группой «Контроль (стандартный пищевой рацион)». Так же наблюдается снижение МДА и ДК в 2,87 раза ($p < 0,001$) и 1,94 раза ($p < 0,001$) соответственно. Липопероксидация уменьшалась в 1,85 раза ($p < 0,001$) МДА и 1,62 раза ($p < 0,01$) ДК по сравнению с группой «Контроль (стандартный пищевой рацион)». Активность каталазы возросла в 1,61 раза ($p < 0,01$), по сравнению с группой «Контроль (стандартный пищевой рацион)», супероксиддисмутазы в 1,46 раза ($p < 0,05$) по сравнению с группой «Тирам 28 сутки».

Сочетанное применение препарата Бифилар и облепихового масла способствовало увеличению численности как Bifidobacterium, так и Lactobacillus. Количество лактобацилл выросло в 2,71 раза ($p < 0,01$) по сравнению с группой «Контроль (вода)» и в 2,22 раза ($p < 0,01$) относительно группы «Контроль (стандартный пищевой рацион)». Удельное содержание бифидобактерий увели-

чилось в 2,10 раза ($p < 0,001$) и 1,73 раза ($p < 0,01$) по сравнению с первым и вторым контролем соответственно (таблица 6).

Сочетанное действие синбиотика Бифилар и облепихового масла привело к достоверному увеличению показателей антиоксидантной защиты, как в плазме крови, так и в ткани толстой кишки экспериментальных животных. Активность каталазы возросла в ткани толстой кишки в 1,52 раза ($p < 0,01$) и 1,72 раза ($p < 0,001$) по сравнению с группами «Контроль (вода)» и «Контроль (стандартный пищевой рацион)» соответственно, так же возросла активность СОД в 2,14 раза ($p < 0,001$) в сравнении с первым контролем и 1,92 раза ($p < 0,001$) со вторым.

Отмечается снижение продуктов перекисного окисления липидов после применения синбиотика и антиоксиданта в комплексе. Концентрация МДА снизилась в 3,35 раза ($p < 0,001$) по сравнению с группой «Контроль (вода)» и в 2,96 раза ($p < 0,001$) с группой «Контроль (стандартный пищевой рацион)». Показатель ДК тоже сократился в 2,32 раза ($p < 0,001$) в сравнении с первым контролем и в 2,14 раза ($p < 0,001$) — со вторым.

Изменения биохимических показателей плазмы крови сопровождались снижением показателей ПОЛ. В 2,07 раза ($p < 0,001$) и в 1,96 раза ($p < 0,001$) снизилась концентрация МДА по сравнению с первым и вторым контролем соответственно. Содержание ДК ниже обеих контрольных групп в 1,71 раза ($p < 0,001$) и 1,66 раза ($p < 0,01$) соответственно.

В результате коррекции препаратом Бифилар и облепиховым маслом возросла активность ферментов АОЗ. Активность каталазы выросла в 1,55 раза ($p < 0,01$) по сравнению с первым контролем, со вторым в 1,67 раза ($p < 0,001$). Активность супероксиддисмутазы превысила в 1,52 раза ($p < 0,01$) и 1,39 раза ($p < 0,05$) значения группы «Контроль (вода)» и «Контроль (стандартный пищевой рацион)» соответственно.

Выводы

В результате субхронической интоксикации фунгицидным препаратом тирам возникает дисбаланс в структуре микробиоценоза толстого кишечника экспериментальных животных, который проявляется в уменьшении

количественной представительности лакто- и бифидобактерий. Одновременно с этим, в ткани толстой кишки, и в плазме крови крыс отмечено усиление процессов липопероксидации и угнетение функционирования системы антиоксидантной защиты организма. При применении синбиотика Бифилар наблюдается увеличение количества лакто- и бифидобактерий и восстанавливаются показатели антиоксидантной защиты. Облепиховое масло, как антиоксидант незначительно восстанавливает показатели микробиоты, но повышает адаптационный потенциал организма. Одновременное использование синбиотика и антиоксиданта у экспериментальных животных приводит к увеличению количественного состава доминирующей микробиоты, возрастанию показателей АОЗ и снижению концентрации продуктов ПОЛ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hassaan M.A., Nemr A. El. Pesticides pollution: Classifications, human health impact, extraction and treatment techniques. The Egyptian Journal of Aquatic Research. 2020; Vol. 46(3): 207–220 p.
2. Королёв В.А., Иванов В.П., Шорманов В.К., Ким А.В., Юшин В.В., Кирищева Н.Е., Никитина Е.С. Относительный экологический риск формирования детской патологии в условиях интенсивного применения фунгицида ТМТД // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье», 2012, № 1. С. 25–28.
3. Warra A.A., Prasad M.N.V. African perspective of chemical usage in agriculture and horticulture—their impact on human health and environment. Agrochemicals Detection, Treatment and Remediation Pesticides and Chemical Fertilizers. 2020, chapter 16. 401–436 p.
4. Frank, D.N. Gastrointestinal microbiology enters the metagenomics era / D.N. Frank, N.R. Pace // Current opinion in gastroenterology. — 2008. — Vol. 24, Iss. 1. — P. 4–10.
5. Хавкин А.И. Нарушения микроэкологии кишечника и энтеросорбция // Вопросы современной педиатрии. — 2009; 8: 2: — С. 94–98.
6. Пайков В.Л. Современные представления о кишечном дисбактериозе: сборник лекций и научных работ «Практические вопросы детской гастроэнтерологии Санкт-Петербурга». — СПб., 1999. — С. 133–138.
7. Чанчаева, Е.А. Современное представление об антиоксидантной системе организма человека / Е.А. Чанчаева, Р.И. Айзман, А.Д. Герасев // Экология человека. 2013. №7. С. 50–58.
8. Тринеева, О.В. Исследование фитохимического состава плодов облепихи крушиновидной (*Hipporhaes rhamnoides* L.) различных сортов / О.В. Тринеева, М.А. Рудая, А.И. Сливкин, Е.Ф. Сафонова // Химия растительного сырья. — 2019. — №1. — С. 139–146.
9. Хабриев Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ // М.: Медицина. 2005. 832 с.
10. Особенности микробиоценоза пристеночного муцина желудочно-кишечного тракта крыс / А.А. Воробьев [и др.] // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 2005. — № 6. — С. 3–7.

© Королёв Владимир Анатольевич (medecol1@yandex.ru); Медведева Ольга Анатольевна (olgafrida@rambler.ru); Ряднова Вера Анатольевна (veraan8@yandex.ru); Королёв Егор Владимирович (medecol1@yandex.ru); Бабаева Мадина Акифовна (bmadina.2002@mail.ru)
Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»