

ВПЛИВ ПРОБІОТИКА БПС-44 НА СТАН АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ ОРГАНІЗМУ КОРОПА

**Агеєв В.О.¹, Смольський О.С.², Смольська Т.М.², Дерев'янку
С.В.¹, Божок Л.В.¹**

¹Інститут сільськогосподарської мікробіології УААН
вул. Шевченка, 97, м. Чернігів, 14027, Україна

²Чернігівський державний педагогічний університет імені Т.Г. Шевченка
вул. Гетьмана Полуботка, 53, м. Чернігів, 14013, Україна

Досліджений вплив пробіотичного препарату БПС-44 на стан антиоксидантної системи організму коропа в умовах зимового голодування. Встановлено, що за дії цього пробіотика зменшується рівень продуктів пероксидного окислення ліпідів (ПОЛ) та активуються первинні ферменти антиоксидантного захисту, що свідчить про посилення адаптивно-захисних можливостей організму риб в умовах зимівлі.

*Ключові слова: пробіотики, *Bacillus subtilis*, БПС-44, пероксидне окислення ліпідів, антиоксидантна система, короп, зимівля, адаптація.*

Більшість препаратів, які застосовуються нині у ветеринарній медицині для корекції різних патологічних станів, не завжди відповідають сучасним вимогам, оскільки дуже часто мають або високу токсичність, або потенційно мутагенні властивості, чи дають інші побічні ефекти [1; 2]. У зв'язку з цим актуальним є пошук і створення нових та вивчення існуючих нетоксичних препаратів біологічного походження для використання в тваринництві [3].

У літературі [4-6] є чимало повідомлень про застосування подібних препаратів з лікувальною та профілактичною метою. Такі препарати є переважно поліфункціональними, оскільки, маючи антиоксидантні та антирадикальні властивості, вони, крім того, впливають на регуляцію ферментативної активності, транспорту, передачі сигналів, тобто ті процеси, які протікають на рівні біомембран.

З цією метою можуть застосовуватися не лише окремі речовини природного походження чи їх штучно модифіковані аналоги, але й живі культури мікроорганізмів.

Препарати на основі живих мікробних клітин (пробіотики) широко застосовуються для лікування і профілактики шлунково-кишкових хвороб, ендометритів, маститів та інших захворювань сільськогосподарських тварин і птиці. Лікувальний і профілактичний ефект цих препаратів обумовлений високою антагоністичною активністю виробничих штамів по відношенню до патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів, здатністю активізувати систему макрофагів та спричиняти індукцію інтерферону [7; 8]. В останні роки пробіотики застосовуються також і для збільшення приростів маси тварин і птиці. Їх ефективність у процесі травлення обумовлена високою ферментативною активністю (амілолітичною, целюлозолітичною, протеолітичною), здатністю поповнювати раціон незамінними амінокислотами та вітамінами, які в процесі травлення за участю бактерій синтезуються *de novo* [9].

Крім того, відомо, що після перорального прийому пробіотиків відбувається явище, яке класифікується як безсимптомна транслокація мікроорганізмів: при їхньому контакті зі слизовими оболонками шлунково-кишкового тракту приблизно 0,1% загальної кількості введених мікробних клітин вже у перші хвилини може проникати у кров, а потім – у паренхіматозні органи [10; 11]. Цим може обумовлюватися інтегрований вплив пробіотичних препаратів на макроорганізм.

Відомо, що у риб в умовах зимового голодування активуються процеси пероксидного окислення ліпідів (ПОЛ), що супроводжується окисленням органічних сполук та утворенням токсичних для організму риб пероксидних продуктів. Це зумовлює необхідність підтримання високого рівня активності систем антиоксидантного захисту організму, порушення функціонування яких може призвести до негативних змін структурно-функціональних властивостей біомембран та значного ураження клітин відповідних тканин та органів [12]. Уникнути таких небажаних наслідків можна шляхом своєчасного блокування пускового механізму патології, тобто зниження інтенсивності ПОЛ в організмі за допомогою антиоксидантів, які запобігають утворенню вільних радикалів, здатних пошкоджувати клітину [13]. Однак вплив пробіотиків на організм риб узагалі, як і на стан їхньої антиоксидантної системи зокрема, вивчено недостатньо.

У зв'язку з цим метою нашого дослідження було визначення рівня активності основних ферментів антиоксидантного захисту

та вмісту продуктів ПОЛ коропових риб в умовах зимівлі за дії бактеріального препарату БПС-44.

Матеріали і методи. Об'єктом дослідження були дворічки коропа (*Cyprinus carpio L.*) вагою 200–250 г. Дослід проводився у модельних умовах в акваріумах об'ємом 200 літрів на 5 особинах у кожному варіанті. Акліматизація тривала 3 доби, експозиція препарату – 14 діб. Температура води коливалася в межах 6–9°C, вміст розчиненого кисню, який визначали за йодометричним методом Винкгера [14], знаходився в межах фізіологічної норми.

Риби знаходились в умовах зимового голодування та були поділені на два варіанти – контрольний та дослідний. В дослідному варіанті у воду додавався розроблений в Інституті сільськогосподарської мікробіології УААН на основі штаму *Bacillus subtilis 44-p* препарат бацилярний субтиліс БПС-44 в концентрації $1,25 \cdot 10^8$ КУО/л.

Кров для досліджень відбирали із синуса зябрової вени риби з використанням антикоагулянта гепарину з розрахунку 10 од. на 1 мл крові. Кров розділяли на плазму та еритроцити, які суспендували у фізіологічному розчині. Гомогенати печінки, зябер та кишечника готували на 0,025М трис-НСІ-буфері (рН 7,4) з 0,175М КСІ.

Вміст гідропероксидів ліпідів (ГПЛ) визначали за методом [15], що базується на здатності ГПЛ окислювати йони Fe^{2+} до Fe^{3+} , вміст дієнових кон'югатів ненасичених жирних кислот (ДК) – за методом [16], що ґрунтується на реєстрації оптичної густини гептан-ізопропанольного екстракту ліпідів при 233 нм. Визначення вмісту малонового діальдегіду (МДА) проводили за його реакцією з тіобарбітуровою кислотою [17].

Досліджували активність ферментів первинного антиоксидантного захисту – супероксиддисмутази (СОД) та каталази, а також глутатіонзалежної системи знешкодження пероксидних продуктів – глутатіонпероксидази (ГП) та глутатіон-S-трансферази (Г-S-Т). Активність СОД визначали за методом [18], що ґрунтується на визначенні ступеня гальмування реакції відновлення нітросинього тетразолію в присутності феназинметасульфату. Активність каталази встановлювали за величиною зменшення в часі концентрації гідроген пероксиду за методом [19]. Активність ферментів глутатіонового циклу визначали з використанням описаних методів [20].

Вміст у тканинах білкових тіолових груп (SH-груп) вста-

новлювали за Фоломеевым [21]. Фактор антиоксидантного стану (ФАС), що характеризує кількісні зміни антиоксидантного статусу тканини, розраховували за формулою:

$$\text{ФАС} = \frac{\text{СОД} \cdot \text{Каталаза}}{\text{МДА}}$$

Кількість білка визначали за Lowry et al. [22].

Крім того, проводили мікробіологічне дослідження проб внутрішніх органів риб. При цьому визначали концентрацію бактерій виду *Bacillus subtilis* у внутрішніх органах риб контрольної і дослідної груп. Додатково досліджували деякі характеристики виділених мікроорганізмів: морфологію колоній, амілолітичну активність (за допомогою йодної проби), а також проводили мікроскопічне дослідження культур: рухомість визначали в препараті “роздавлена крапля”, розміри клітин, наявність та положення спор – у мазках, пофарбованих за Грамом [23].

Математичну обробку даних здійснювали методами варіаційної статистики з використанням t-критерію Стьюдента [24] за допомогою програми Microsoft Excel XP.

Результати та їх обговорення. Встановлено, що за дії БПС-44 протягом двох тижнів у досліджуваних органах і тканинах риб спостерігається статистично достовірне, порівняно з контролем, зниження рівня МДА в плазмі крові (на 40%) та печінці (на 28%). Незначне зниження концентрації МДА спостерігається також у зябрах та кишечнику (табл. 1). В той же час в усіх органах, крім плазми крові, удвічі збільшується активність СОД. У печінці, кишечнику та еритроцитах також суттєво підвищується активність каталази (на 23, 53 та 93% відповідно). Як наслідок, значення фактора антиоксидантного стану в усіх тканинах збільшується в 3–3,4 раза. Отже, при застосуванні препарату БПС-44 активізується система первинного антиоксидантного захисту тканин.

Щодо первинних продуктів ПОЛ, то при дії пробіотики рівень ГПЛ у кишечнику знижується, в інших органах – дещо зростає, проте недостовірно. Це корелює з концентрацією кінцевого продукту ПОЛ – МДА (див. табл. 1). Застосування препарату БПС-44 достовірно не впливає на вміст проміжних продуктів ПОЛ – дієнових кон’югатів ненасичених жирних кислот, що може свідчити про настання певної рівноваги між процесами окислення та відновлення.

Таблиця 1. Основні показники активності антиоксидантної системи при дії препарату БПС-44

Показник	Варіант досліджу	Гомогенати тканин та фракції крові				
		Гомогенат печінки	Гомогенат зябер	Гомогенат кишечника	Плазма крові	Суспензія еритроцитів
Активність СОД, у.о./мг білка	контроль	3,9±0,6	18,5±2,5	8,3±1,9	3,6±0,8	7,7±1,4
	БПС-44	8,0±1,5*	33,3±10,3	15,4±5,1	3,3±1,5	14,1±2,3*
Активність каталази, у.о./мг білка	контроль	75,0±5,9	3,7±0,4	9,5±1,4	–	23,1±2,4
	БПС-44	91,9±9,8	4,6±0,5	14,5±3,5	–	44,6±7,4*
Активність ГП, нмоль NADPH·хв·мг білка	контроль	0,089±0,007	0,117±0,006	0,051±0,006	0,065±0,022	0,045±0,009
	БПС-44	0,049±0,009*	0,100±0,004*	0,055±0,011	0,082±0,015	0,031±0,010
Активність Г-S-T, нмоль NADPH·хв·мг білка	контроль	0,555±0,220	0,376±0,027	0,084±0,034	0,004±0,001	0,025±0,004
	БПС-44	0,557±0,122	0,329±0,023	0,162±0,080	0,003±0,001	0,045±0,017
Концентрація білкових SH-груп, мкмоль/мг білка	контроль	0,077±0,005	0,034±0,004	0,046±0,003	0,012±0,003	0,034±0,006
	БПС-44	0,085±0,004	0,059±0,003*	0,063±0,002*	0,008±0,001*	0,059±0,002*
Концентрація ГПЛ, у.о./мг білка	контроль	0,026±0,039	-0,007±0,021	-0,031±0,037	0,091±0,037	-0,005±0,026
	БПС-44	0,048±0,065	0,045±0,031	-0,089±0,040	0,156±0,051	0,078±0,020*
Концентрація ДК, у.о./мг білка	контроль	0,056±0,009	0,045±0,003	0,080±0,032	0,043±0,023	0,013±0,003
	БПС-44	0,038±0,005	0,038±0,005	0,039±0,003	0,030±0,004	0,009±0,003
Концентрація МДА, у.о./мг білка	контроль	0,866±0,073	0,632±0,047	0,636±0,030	0,615±0,026	0,276±0,024
	БПС-44	0,625±0,038*	0,499±0,062	0,559±0,052	0,372±0,029*	0,292±0,031
Значення ФАС, у.о.	контроль	350,2±73,1	113,2±24,2	121,7±27,4	–	641,9±131,6
	БПС-44	1177,6±249,6*	355,3±162,3	370,2±127,3	–	2165,2±374,9*

* – дані достовірно відрізняються від показників контролю ($p < 0,05$); – – дані відсутні

Що стосується глутатіонової антиоксидантної системи, то глутатіонпероксидаза на вплив БПС-44 реагує в різних органах неоднозначно: у печінці, зябрах та еритроцитах її активність зменшується, в плазмі, навпаки, підвищується, а в кишечнику залишається без змін. Інший фермент цієї системи – глутатіон-S-трансфераза – на дію препарату практично не реагує і лише в кишечнику (де не спрацював попередній фермент) її активність зростає в 1,9 раза. Таким чином, підтверджується взаємодоповнююча роль ферментів глутатіонової системи, які часто є специфічними для окремих органів чи тканин.

Концентрація білкових тілових груп у зябрах, кишечнику та еритроцитах достовірно підвищується на 35–75%, що також свідчить про позитивний вплив препарату на ферментні системи антиоксидантного захисту клітин, оскільки білкові сульфгідрильні групи можуть виконувати роль антиокислювального буфера.

При аналізі отриманих даних по групах досліджуваних тканин та органів при застосуванні БПС-44 відмічено зниження загального рівня продуктів ПОЛ, активацію ферментів первинного антиоксидантного захисту – СОД та каталази, а також збільшення рівня білкових тілових груп. У той же час відмічено несуттєву роль системи глутатіону в даних процесах, доказом чого є незначні зміни активності відповідних глутатіон-залежних ферментів.

Ці дані, на нашу думку, яскраво свідчать про позитивний вплив пробіотика БПС-44 на загальну динаміку окисно-відновних процесів в організмі коропа.

При мікробіологічному дослідженні проб внутрішніх органів встановлено, що концентрація життєздатних клітин бактерій *Bacillus subtilis* в різних органах і тканинах риб дослідної групи однакова і в 5–20 разів більша, ніж у відповідних органах риб контрольної групи (рис. 1). Виділені з органів риб дослідної групи культури мікроорганізмів є типовими для штаму *B. subtilis* 44-р і характеризуються ознаками, наведеними в табл. 2. Ізоляти, виділені з органів контрольних тварин, теж виявилися типовими представниками виду *B. subtilis*, проте були неоднорідними за морфологічними ознаками колоній, розмірами клітин та амілолітичною активністю, а, отже, вони є представниками резидентної мікрофлори внутрішнього середовища організму риб.

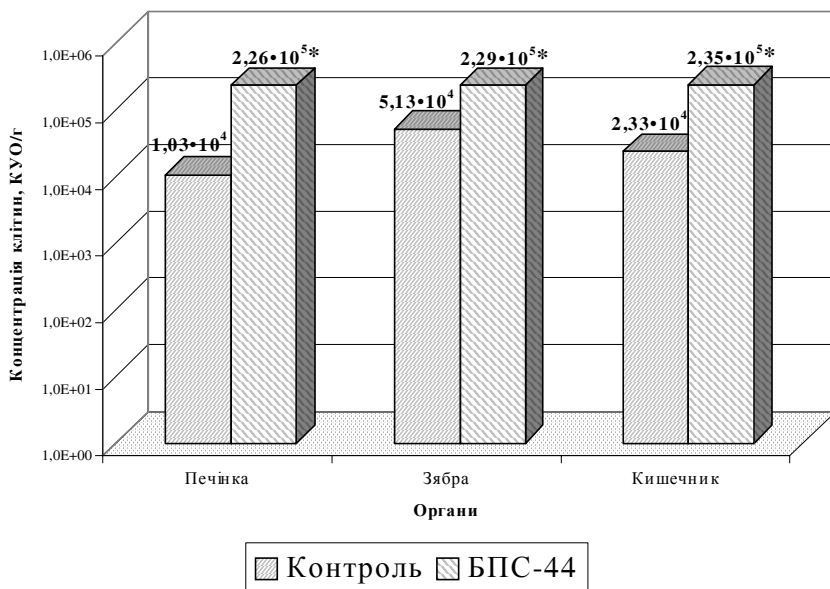


Рис. 1. Вміст бактерій *Bacillus subtilis* в органах і тканинах риб (* – дані достовірно відрізняються від контролю; $p < 0,05$)

Таблиця 2. Характеристики культур мікроорганізмів, виділених з організму риб дослідної групи

Показники	Результати дослідження
Морфологія колоній	на 18–20-й годині росту колонії слизисті, блискучі, гладенькі, підвищені; через 48 годин культивування – складчасті, матові, з піднятим центром і зазубреними краями, безбарвні або білуватого кольору
Амілолітична активність	при додаванні розчину йоду до колоній, вирощених на картопляно-мінеральному середовищі Первозванського, спостерігаються зони просвітлення навколо колоній
Мікроскопія живої культури	у препараті “роздавлена крапля” спостерігаються рухливі поодинокі та розміщені ланцюжками клітини видовженої форми
Мікроскопія мазків	поодинокі та розміщені ланцюжками грампозитивні палички з заокругленими кінцями розміром 0,7–0,8 Ч 2–3 мкм з центрально розташованими спорами

На основі цих даних нами було зроблене припущення, що позитивний вплив пробіотики БПС-44 на організм коропа відбувається внаслідок проникнення клітин препарату у внутрішні органи риб. Причому за умов постійного контакту риб із суспензією пробіотики та зниженого обміну речовин при зимовому голодуванні концентрація клітин пробіотики у їхньому внутрішньому середовищі приблизно дорівнює їх концентрації у зовнішньому середовищі.

Механізм такого впливу пробіотичного препарату на окисно-відновний статус макроорганізму може обумовлюватися продукуванням клітинами *Bacillus subtilis* штаму 44-р біологічно активних речовин, насамперед – природних антиоксидантів.

Таким чином, встановлено, що препарат БПС-44 позитивно впливає на організм коропа, активуючи системи антиоксидантного захисту організму та знижуючи рівень продуктів ПОЛ в тканинах. Цей ефект обумовлений здатністю пробіотичного штаму приживатися в організмі коропа за рахунок транслокації клітин через кров'яне русло. Тому БПС-44 можна рекомендувати для застосування у рибному господарстві як адаптогенний препарат в умовах зимівлі.

1. Висоцький І.Ю. Вплив деяких лікарських засобів на стан ПОЛ за умов гострого токсичного ураження печінки шурів // Ліки. – 2003. – № 1-2. – С. 86-90.

2. Свінціцький А.С., Загородний М.І., Юрченко Н.М. Вплив диклофенаку натрію, кверцетину та їх комбінацій на ліпопероксидацію при експериментальному остеоартрозі // Ліки. – 2003. – № 1-2. – С. 100-103.

3. Гаділія О.П., Андрійчук Т.Р., Меркулов С.П та ін. Вплив препаратів “Аммівіт” та “Церулоплазмін” на вміст продуктів пероксидного окислення ліпідів та показники антиоксидантної системи за дії радіації // Укр. біохім. журн. – 2002. – Т. 74, № 1. – С. 97-100.

4. Даценко З.М., Крищенко О.М., Нечитайло Н.О. Вплив “морських” фосфоліпідів з ω -3 жирними кислотами на склад жирних кислот мікросомальних мембран печінки шурів за окислювального стресу // Укр. біохім. журн. – 2001. – Т. 73, № 1. – С. 60-64.

5. Левицький А.П., Макаренко О.А., Новосад Е.М и др. Антиоксидантное и противовоспалительное действие “Виталонга” при гиперлипидемии у крыс // Укр. біохім. журн. – 2002. – Т. 74, № 1. 100

– С. 121-124.

6. Попичев М.И., Толкачёва Н.В., Кулакова С.Н и др. Влияние биопрепарата “Полиен” на показатели жирнокислотного состава крови у спортсменов-волейболистов // Укр. биохим. журн. – 1999. – Т. 71, № 1. – С. 98-102.

7. Сорокулова И.Б. Влияние пробиотиков из бацилл на функциональную активность макрофагов // Антибиотики и химиотерапия. – 1998. – № 2. – С. 20-23.

8. Тимошок Н.О. Антибактеріальна ефективність індукторів інтерферону різного походження: Автореф. дис... канд. біол. наук: 03.00.07. – К., 2002. – 21 с.

9. Тараканов Б.В. Механизмы действия пробиотиков на микрофлору пищеварительного тракта и организм животного // Ветеринария. – 2000. – № 1. – С. 47-54.

10. Смирнов В.В., Резник С.Р., Сорокулова И.Б., Вьюницкая В.А. О некоторых механизмах возникновения бессимптомной бактериемии // Микробиол. журн. – 1988. – Т. 50, № 6. – С. 56-59.

11. Смирнов В.В., Резник Р.С. Дискусійні проблеми транслокації екзогенної мікрофлори // XII Укр. респ. з'їзд мікробіологів, епідеміологів і паразитологів. – К., 1991. – С. 13.

12. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. – М.: Наука, 1972. – 257 с.

13. Потрохов А.С., Зиньковский О.Г. Новый антистрессовый препарат глициланид и методика его применения в рыбководстве // Гидробиол. журн. – 2000. – Т. 36, № 2. – С. 41-46.

14. Лурье Ю.Ю. Аналитическая химия промышленных сточных вод. – М.: Химия, 1984. – С. 177-182.

15. Романова Л.А., Стальная И.Д. Метод определения гидроперекисей липидов с помощью тиоцианата аммония // Современные методы в биохимии / Под ред. В.Н. Ореховича. – М.: Медицина, 1977. – С. 64-66.

16. Стальная И.Д. Метод определения диеновой конъюгации ненасыщенных ВЖК // Современные методы в биохимии / Под ред. В.Н. Ореховича. – М.: Медицина, 1977. – С. 63-64.

17. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью ТБК // Современные методы в биохимии / Под ред. В.Н. Ореховича. – М.: Медицина, 1977. – С. 66-68.

18. Дубинина Е.Е., Сальникова Л.А., Ефимова Л.Ф. Актив-

ность и изоферментный спектр супероксиддисмутазы эритроцитов и плазмы крови человека // Лаб. дело. – 1983. – № 10. – С. 30-33.

19. Biochemica Information. II. – West Germani: Boehringer Mannheim GmbH, 1975. – P. 45-47.

20. Гришко В.Н., Сыщиков Д.В. Пероксидное окисление липидов и функционирование некоторых антиокислительных ферментных систем у кукурузы и овса при остром поражении фтористым водородом // Укр. биохим. журн. – 1999. – Т. 71, № 3. – С. 51-57.

21. Фоломеев В.Ф. Фотокolorиметрический ультрамикрометод количественного определения сульфгидрильных групп белков и небелковых соединений крови // Лаб. дело. – 1981. – № 1. – С. 33-35.

22. Lowry O.H., Rosebroug N.I., Farr A.L., Randall R.I. Protein measurement with the Folin phenol reagent // Journal of Biological Chemistry. – 1951. – Vol. 193, № 1. – P. 265-275.

23. Смирнов В.В., Резник С.Р., Василевская И.А. Спорообразующие аэробные бактерии – продуценты биологически активных веществ. – К.: Наук. думка, 1982. – С. 92-104.

24. Лакин Г.В. Биометрия: Учеб. пособие для биол. спец. вузов. – 4-е изд., перераб. и доп. – М.: Высш. шк., 1990. – 352 с.

ВЛИЯНИЕ ПРОБИОТИКА БПС-44 НА СОСТОЯНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ ОРГАНИЗМА КАРПА

**Агеев В.А.¹, Смольский А.С.², Смольская Т.М.²,
Деревянко С.В.¹, Божок Л.В.¹**

¹Институт сельскохозяйственной микробиологии УААН, г. Чернигов

²Черниговский государственный педагогический университет имени
Т.Г. Шевченко, г. Чернигов

Изучено влияние пробиотического препарата БПС-44 на состояние антиоксидантной системы организма карпа в условиях зимнего голодания. Установлено, что под воздействием этого пробиотика снижается уровень продуктов пероксидного окисления липидов (ПОЛ) и активируются первичные ферменты антиоксидантной защиты, что свидетельствует об усилении адаптивно-защитных возможностей организма рыб в условиях зимовки.

Ключевые слова: пробиотики, Bacillus subtilis, БПС-44, пероксидное окисление липидов, антиоксидантная система, карп, зимовка, адаптация.

THE INFLUENCE OF PROBIOTIC BPS-44 ON THE STATE OF THE ANTIOXIDATION SYSTEM OF CARPS' ORGANISM

**Aheyev V.O.¹, Smolskiy O.S.², Smolska T.M.², Derevjanko S.V.¹,
Bozhok L.V.¹**

¹Institute of Agricultural Microbiology, UAAS, Chernihiv

²Chernihiv State Pedagogical University named after T.G. Shevchenko, Chernihiv

It is studied the influence of probiotic preparation BPS-44 on the state of the antioxidation system of carp's organism in the conditions of winter starvation. It is set out that the level of products of lipids' peroxidation diminishes and the primary enzymes of antioxidation defence activate under influence of this probiotic. This fact testifies to strengthening of adaptive-protective possibilities of fishes' organism in the conditions of wintering.

Key words: probiotics, Bacillus subtilis, BPS-44, lipids' peroxidation, antioxidation system, carp, wintering, adaptation.