

ВЛИЯНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОЙ СУБСТАНЦИИ ИЗ *MEDUSOMYCES GISEVII* (ЧАЙНЫЙ ГРИБ) НА ПОКАЗАТЕЛИ ФАГОЦИТАРНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛОВ КРОВИ БЕЛЫХ КРЫС

Ю. М. ДОБРЫНЯ, аспирант, Северо-Кавказский федеральный университет,
Л. Д. ТИМЧЕНКО, доктор ветеринарных наук, профессор, заведующий лабораторией,
Н. И. БОНДАРЕВА, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник,
С. И. ПИСКОВ, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник,
ПНИЛ Экспериментальной иммуноморфологии, иммунопатологии и иммунобиотехнологии
Северо-Кавказского федерального университета
(355009, г. Ставрополь, ул. Пушкина, д. 1; тел.: +7 918 751-79-96, +7 905 417-30-22, +7 906 442-75-17, +7 905 419-14-82; e-mail: dobruniajulia@rambler.ru)

Ключевые слова: дисбактериоз, фагоцитарная активность, нейтрофилы, иммунитет, чайный гриб, *Medusomyces gisevii*, крысы.

На сегодняшний день не вызывает сомнения тот факт, что состояние микрофлоры желудочно-кишечного тракта напрямую влияет на все звенья иммунитета макроорганизма, при этом одним из диагностических критериев его оценки являются показатели неспецифического иммунитета, к числу которых относятся и показатели фагоцитоза. В связи с этим исследование было посвящено изменению фагоцитарной активности нейтрофилов крови (фагоцитарный индекс, фагоцитарное число, процент завершенности фагоцитоза) у крыс в условиях экспериментального антибиотико-ассоциированного дисбактериоза под влиянием биологически активной субстанции из зооглеи природного симбионта *Medusomyces gisevii* (чайный гриб), приготовленной согласно нашей технологии. Животным обеих групп индуцировали дисбактериоз с помощью введения гентамицин сульфата перорально в течение 10-ти дней, при этом крысам группы 2 дополнительно к основному корму применяли субстанцию из зооглеи чайного гриба, а крысам группы 1 скормливание субстанции не производили. Установлено, что угнетение микрофлоры ЖКТ у крыс группы 1 привело к значительному снижению всех показателей фагоцитарной активности, в то время как применение биологически активной субстанции из зооглеи чайного гриба животным группы 2 позволило избежать существенного снижения фагоцитарной активности нейтрофилов, по сравнению с таковыми в группе 1, при прочих равных условиях, и даже повысить фагоцитарный индекс, что свидетельствует о ее иммуномодулирующих свойствах. Этот факт позволяет предположить целесообразность использования субстанции из зооглеи чайного гриба, приготовленную по нашей технологии, во время дисбактериозов у животных.

INFLUENCE OF A BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCE FROM *MEDUSOMYCES GISEVII* (TEA FUNGUS) ON THE PHAGOCYtic ACTIVITY OF BLOOD NEUTROPHILS OF WHITE RATS

Y. M. DOBRYNYA, graduate student, North-Caucasian Federal University,
L. D. TIMCHENKO, doctor of veterinary sciences, professor, head of laboratory,
N. I. BONDAREVA, candidate of biology science, senior researcher,
S. I. PISKOV, candidate of biology science, leading researcher,
Problem Research Laboratory "Experimental immunomorphology, immunopathology,
immunobiotechnology" in the center of collective use of scientific equipment,
North-Caucasian Federal University
(1 Pushkina Str., 355009, Stavropol; tel.: +7 918 751-79-96, +7 905 417-30-22, +7 906 442-75-17, +7 905 419-14-82; e-mail: dobruniajulia@rambler.ru)

Keywords: dysbacteriosis, phagocytic activity, neutrophils, immunity, tea fungus, *Medusomyces gisevii*, rats.

Nowadays there is no doubt that the general condition of the microflora of the gastrointestinal tract directly affects on the immunity of the macroorganism, one of the diagnostic criteria for its evaluation are the indices of nonspecific immunity, including phagocytosis. The study was devoted to the phagocytic activity of blood neutrophils (phagocytic index, phagocytic number, completion rate of phagocytosis) of rats under the conditions of experimental antibiotic-associated dysbacteriosis with the influence of a biologically active substance from zooglea of the natural symbiont *Medusomyces gisevii* (tea fungus) prepared according to our technologies. The animals of both groups were induced with dysbacteriosis by administration of gentamycin sulfate orally for 10 days. Rats of group 2 in addition to the main diet were fed with a substance from the zooglea of the tea fungus, and the rats of group 1 were not fed with the substance. It was found that the inhibition of the microflora of the gastrointestinal tract in the rats of group 1 led to a significant decrease in all indices of phagocytic activity, while the use of a biologically active substance from the zooglea of the tea fungus to animals of group 2 made it possible to avoid a significant decrease in the phagocytic activity of neutrophils, compared with those in group 1, with other equal conditions, and even raise the phagocytic index, which indicates its immunomodulatory properties. This fact makes possible to suggest the expediency of using a substance from the zooglea of *Medusomyces gisevii*, prepared according to our technology, during dysbacteriosis in animals.

Положительная рецензия представлена Л. И. Дроздовой, доктором ветеринарных наук, профессором, заведующим кафедрой Уральского государственного аграрного университета.

На сегодняшний день уже доказан факт, что состояние микрофлоры желудочно-кишечного тракта оказывает прямое влияние на иммунитет макроорганизма [4, 6, 10]. Одним из основных критериев оценки его состояния признается фагоцитоз — древнейшее защитное приспособление, на основе которого эволюционно сформировалась вся система иммунной защиты. Этот процесс является главным механизмом естественной резистентности, а также обязательным звеном индукции и формирования специфического иммунного ответа. Расстройство фагоцитарных функций существенным образом ослабляет всю систему защитных механизмов организма [5]. Оценка фагоцитарной активности нейтрофилов крови (основного звена фагоцитарной системы организма) [3] является ценным диагностическим критерием как в лабораторно-клинической практике, так и при исследовании влияния различных агентов на организм.

Цель и методика исследований.

Целью исследования явилось изучение фагоцитарной активности нейтрофилов крови у крыс в условиях антибиотико-ассоциированного дисбактериоза при применении им биологически активной субстанции из *Medusomyces gisevii* с установленным пребиотическим эффектом.

В эксперименте использовалось 40 половозрелых крыс — самцов линии Вистар со средней массой 250 г, одного возраста, которые были произвольно разделены на 2 группы по 20 особей в каждой (группа 1 и группа 2). Животные содержались в виварии в стандартных условиях, при этом поддерживался рекомендуемый режим кормления (НИИ питания РАМН). У всех животных был смоделирован антибиотико-ассоциированный дисбактериоз путем введения им гентамицина сульфата перорально в дозе 10 мг на крысу дважды в сутки в течение 10-ти дней согласно методике Чичерина и соавторов (2005) [8]. При этом на фоне применения антибиотика крысы группы 2 в дополнение к рациону ежедневно получали биологически активную субстанцию из зооглеи *Medusomyces gisevii* (чайный гриб) в количестве 120 мг на крысу в сутки. Крысам контрольной группы скармливание субстанции не производили. Биологически активная субстанция была приготовлена по разработанной нами технологии [9], включающей извлечение зооглеи из культуральной жидкости чайного гриба, промывку под проточной водой, измельчение, последующую лиофилизацию и автоклавирование при температуре 110 °С в течение 15 минут.

Забор крови для исследования фагоцитоза осуществляли из хвостовой вены, перед началом и после окончания эксперимента у животных обеих экспериментальных групп, при этом контрольными считали результаты до воздействия антибиотика. Исследовали функциональную активность нейтрофилов сыворот-

ки крови микроскопически путем подсчета общего числа клеток, участвующих в фагоцитозе (фагоцитарный индекс Гамбургера ФИ, %), и определения среднего числа микроорганизмов, поглощенных одним фагоцитом (ФЧ — фагоцитарное число Райта). В качестве объектов фагоцитоза выступали пекарские дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. Переваривающая функция оценивалась путем определения показателя завершенности фагоцитоза (ПЗФ): отношение числа переваренных микробов к общему числу поглощенных микробов, выраженное в процентах [7]. Статистическую обработку результатов исследования проводили на компьютере с использованием программы Primer of Biostatistics (Version 4.03). Вычисляли среднее арифметическое значение (M), ошибку среднего арифметического (m), представляли результаты в виде $M \pm m$. Различия между группами оценивали с помощью критерия Манн-Уитни, достоверными считались результаты при $p \leq 0,5$.

Результаты исследований.

Применение антибиотика у животных группы 1 спровоцировало значительное снижение количества основной эубиотической микрофлоры, а именно представителей *Bifidobacterium spp*, *Lactobacillus spp* — на 4 порядка и *Escherichia coli* с нормальной ферментативной активностью — на 5 порядков, в то время как количество представителей *Candida spp*, предположительно на фоне общего ослабления иммунитета к 10-му дню эксперимента, возросло на 1,5 порядка. В то же время животные группы 2, получавшие субстанцию из чайного гриба в указанных дозах, показали более высокую устойчивость к действию гентамицин сульфата, что выражается в слабом снижении количества эубиотической флоры к 10-му дню эксперимента: *Bifidobacterium spp*, *Lactobacillus spp*, *Escherichia coli* с нормальной ферментативной активностью снизилось на 2 порядка, а количество *Candida spp* осталось на прежнем уровне [1, 2].

Результаты исследования параметров фагоцитарной активности нейтрофилов в условиях угнетения кишечной микрофлоры, вызванного дисбактериозом кишечника, представлены в табл. 1. Установлено, что до начала эксперимента показатели фагоцитарного индекса, фагоцитарного числа и процента завершенности фагоцитоза у животных обеих групп были примерно одинаковы. После окончания эксперимента крысы группы 1, содержащиеся на стандартном рационе, демонстрировали угнетение фагоцитарной активности нейтрофилов, что выражалось в снижении фагоцитарного индекса на 28,5 %, фагоцитарного числа — на 2,28 ед. и процента завершенности фагоцитоза — на 27,8 %. Одновременно у животных группы 2, получавших во время действия антибиотика биологически активную субстанцию из зооглеи чайного гриба, фагоцитарное число достоверно не

Таблица 1
 Фагоцитарная активность нейтрофилов крови крыс с экспериментальным антибиотико-ассоциированным дисбактериозом при применении биологически активной субстанции из зооглеи *Medusomyces gisevii* (чайный гриб), $M \pm m$

Table 1

Phagocytic activity of blood neutrophils in rats with experimental antibiotic-associated dysbacteriosis when using a biologically active substance from zooglea of *Medusomyces gisevii* (tea fungus), $M \pm m$

Исследуемый показатель <i>Indicators</i>	Группа 1 Group 1		Группа 2 Group 2	
	До начала эксперимента <i>Before experiment</i>	После окончания эксперимента <i>After experiment</i>	До начала эксперимента <i>Before experiment</i>	После окончания эксперимента <i>After experiment</i>
ФИ, % <i>Phagocytic index, %</i>	56,30 ± 2,6	40,25 ± 1,8* **	55,30 ± 3,6	62,54 ± 2,4* **
ФЧ, ед. <i>Phagocytic number, units</i>	3,9 ± 0,2	1,7 ± 0,2* **	3,87 ± 0,2	3,2 ± 0,3**
ПЗФ, % <i>Percentage of completion of phagocytosis, %</i>	31,2 ± 0,6	22,5 ± 0,5* **	31,4 ± 0,5	27,5 ± 0,2* **

Примечание: * $P < 0,05$ — в сравнении с данной группой до начала эксперимента. ** $P < 0,05$ — в сравнении между группами.

Note: * $P < 0.05$ — in comparison with this group before the beginning of the experiment. ** $P < 0.05$ — in comparison between groups.

изменилось, показатель завершенности фагоцитоза снизился на 12,4 %, что значительно меньше, чем у животных группы 1, в то время как фагоцитарный индекс у них наоборот повысился на 13,1 %.

Выводы. Рекомендации.

Таким образом, антибиотико-ассоциированный дисбактериоз сопровождается достоверными изменениями функциональной активности иммунокомпетентных клеток, что является ожидаемым, так как научно доказано прямое влияние микрофлоры кишечника на все звенья иммунитета организма. Результаты активности нейтрофилов, полученные в группе 1, по нашему мнению, напрямую связаны

со снижением общего количества представителей эубиотической микрофлоры. Применение биологически активной субстанции из зооглеи чайного гриба животным группы 2 позволило избежать существенного снижения фагоцитарной активности нейтрофилов, по сравнению с таковыми в группе 1, при прочих равных условиях, и даже повысить фагоцитарный индекс, что свидетельствует о ее иммуномодулирующих свойствах. Этот факт позволяет предположить целесообразность использования субстанции из зооглеи чайного гриба, приготовленную по нашей технологии, во время дисбактериозов у животных.

Литература

1. Bondareva N. I., Timchenko L. D., Dobrynya Yu. M., Alieva E. V., Rzhepakovskiy I. V., Likhacheva E. S., Sizonenko M. N., Piskov S. I., Kozlova M. A., Areshidze D. A. Influence of biologically active substances from kombucha (*Medusomyces gisevii*) on rat gut microbiota with experimental antibiotic-associated dysbiosis // Indian Journal of Animal Sciences. 2017. Vol. 87. No. 5. P. 624–629.
2. Бондарева Н. И., Тимченко Л. Д., Алиева Е. В., Добрыня Ю. М., Гандрабура Н. И., Писков С. И., Калмыкова Л. И. Микробиоценоз толстого кишечника крыс при пероральном применении зооглеи *Medusomyces gisevii* (чайный гриб) // Медицинский вестник Северного Кавказа. 2017. Т. 12. № 1. С. 87–90.
3. Волкова О. С., Рябоконт Е. Н., Головкин Н. П. Фагоцитарная активность нейтрофилов крыс, содержащихся на кариезогенной диете с добавлением лецитина, растительного масла и препарата кальция // Украинский стоматологический альманах. 2010. № 2. Т. 1. С. 7–10.
4. Генералов Е. А. Физико-химические подходы к анализу природных полисахаридов // Auditorium: электронный научный журнал Курского государственного университета [Электронный ресурс]. URL : <http://auditorium.kursksu.ru>.
5. Горчаков А. М., Кручинский Н. Г., Горчакова Ф. Т., Коростелева И. Н. Метод комплексной оценки фагоцитарной активности нейтрофилов крови. Минск : НИИ экологической и профессиональной патологии, 2003. 15 с.
6. Копанев Ю. А. Взаимосвязь функции местного иммунитета и микробиоценоза кишечника, возможности иммунокоррекции дисбактериоза // Лечащий врач. 2009. № 9. С. 66–69.
7. Медведев А. Н. Способ исследования поглотительной фазы фагоцитоза // Лабораторное дело. 1991. № 2. С. 19–20.

8. Способ моделирования дисбактериоза кишечника у лабораторных животных : пат. 2477894 РФ № 2011149501/14; заявл. 05.12.2011 г.; опубл. 20.03.2013 г. Бюл. № 8.
9. Способ получения биологически активной субстанции с пребиотическим эффектом на основе *Medusomyces gisevii* : пат. 2630457 РФ № 2016128299, 12.07.2016 г.; заявл. 12.07.2016 г.; опубл. 08.09.2017 г. Бюл. № 25.
10. Хавкин А. И. Влияние пребиотиков на иммунную систему // Эффективная фармакотерапия. Педиатрия. 2014. № 4. С. 34–40.

References

1. Bondareva N. I., Timchenko L. D., Dobrynja Ju. M., Alieva E. V., Rzhepakovskij I. V., Lihacheva E. S., Sizonenko M. N., Piskov S. I., Kozlova M. A., Areshidze D. A. Influence of biologically active substances from kombucha (*Medusomyces gisevii*) on rat gut microbiota with experimental antibiotic-associated dysbiosis // Indian Journal of Animal Sciences. 2017. Vol. 87. No. 5. P. 624–629.
2. Bondareva N. I., Timchenko L. D., Alieva E. V., Dobrynja Ju. M., Gandraburova N. I., Piskov S. I., Kalmykova L. I. Microbiocenosis of large intestine of rats with oral application of zooglea *Medusomyces gisevii* (tea fungus) // Medical News of North Caucasus. 2017. Vol. 12. No. 1. P. 87–90.
3. Volkova O. S., Rjabokon E. N., Golovko N. P., Phagocytic activity of neutrophils in rats contained on a cariogenic diet with the addition of lecithin, vegetable oil and a calcium preparation // Ukrainian Dental Almanac. 2010. No. 2. Vol. 1. P. 7–10.
4. Generalov E. A. Physicochemical approaches to the analysis of natural polysaccharides // Auditorium: electronic scientific journal of the Kursk State University [Electronic resource]. URL : <http://auditorium.kursksu.ru>.
5. Gorchakov A. M., Kruchinskij N. G., Gorchakova F. T., Korosteleva I. N. The method of complex evaluation of phagocytic activity of blood neutrophils. Minsk : Research Institute of Environmental and Occupational Pathology, 2003. 15 p.
6. Kopanev J. A. Interrelation of the function of local immunity and intestinal microbiocenosis, the possibility of immunocorrection of dysbacteriosis // The Attending Physician. 2009. No. 9. P. 66–69.
7. Medvedev A. N. A method for studying the absorption phase of phagocytosis // Laboratory Work. 1991. No. 2. P. 19–20.
8. A method for modeling intestinal dysbiosis in laboratory animals : пат. 2477894 Russian Federation No. 2011149501/14; claimed 05.12.2011; publ. 20.03.2013. Bul. No. 8.
9. Method for obtaining a biologically active substance with a prebiotic effect based on *Medusomyces gisevii* : пат. 2630457 Russian Federation No. 2016128299, 12.07.2016; claimed 12.07.2016; publ. 08.09.2017. Bul. No. 25.
10. Havkin A. I. Influence of prebiotics on the immune system // Effective Pharmacotherapy. Pediatrics. 2014. No. 4. P. 34–40.