

УДК: 546.47.+579.852.11+591.85

## ВПЛИВ ПРОБІОТИКУ ІЗ БАКТЕРІЙ РОДУ *BACILLUS* НА ПОКАЗНИКИ МІКРОФЛОРИ КИШЕЧНИКУ ЛАБОРАТОРНИХ ТВАРИН ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ГІПОТИРЕОЗУ

М.В. Кривцова, В.І. Ніколайчук

*Вплив пробіотику із бактерій роду Bacillus на показники мікрофлори кишечника лабораторних тварин за умов експериментального гіпотиреозу. – М.В. Кривцова, В.І. Ніколайчук. – Досліджено стан мікрофлори кишечника лабораторних тварин в умовах експериментального гіпотиреозу. Встановлено, що гіпотиреоїдний стан супроводжується змінами у кишкової мікрофлорі кролів: зниженням кількості анаеробної мікрофлори та підвищенням умовно-патогенних мікроорганізмів. Введення пробіотику на фоні гіпотиреоїдного стану забезпечувало корекцію у складі кишкового мікробіоценозу.*

**Ключові слова:** мікробіоценоз кишечника, пробіотики, *Bacillus subtilis*, гіпотиреоїдний стан.

**Адреса:** Ужгородський національний університет, кафедра генетики, фізіології рослин і мікробіології, біологічний факультет, вул. Волошина, 32, м. Ужгород, 88000, Україна, e-mail: f-k-m-79@rambler.ru

*Effect of Bacillus-based probiotics upon intestinal microflora of laboratory animals in experimental hypothyroid condition. – M.V. Krivtsova, V.I. Nikolaichuk. – The influence of experimental hypothyroid condition upon intestinal microflora of laboratory animals has been studied. It was shown that hypothyroidism caused disorders in rabbits' intestinal microbocenosis: decrease in the quantity of anaerobic microflora and an increase in the level of conditionally pathogenic bacteria. Application of the probiotics under study was accompanied with correction intestinal microflora.*

**Key words:** intestinal microflora, probiotics, *Bacillus subtilis*, hypothyroidism.

**Address:** Uzhhorod National University, Department of Genetics, Plant Physiology and Microbiology, Biological Faculty, 32, Voloshina St., Uzhhorod, 88000, Ukraine; e-mail: f-k-m-79@rambler.ru

В останні десятиріччя спостерігається значний приріст числа хворих з ознаками порушення кількісного складу та функцій нормальної мікрофлори кишечника, що обумовлено негативним впливом антибактеріальної терапії, стресами, нераціональним харчуванням, несприятливим станом довкілля тощо [1, 2]. Дисбактеріози кишечника супроводжують різні за етіологією захворювання і є фактором ускладнення їх перебігу, а також причиною формування нових патологічних зсувів в організмі. Враховуючи широкий спектр функцій, що виконує нормальна мікрофлора травного тракту організму, дисбаланс видового та кількісного складу останнього може спричинити ряд дисфункцій імунної відповіді організму, обміну речовин тощо [3, 12]. Крім безпосередньої участі у кишковому травленні, регуляції морфокінетичної діяльності та газового складу кишечника, мікроорганізми, що відносяться до нормальної мікрофлори травного тракту, виконують важливу роль у регуляції обміну речовин, зокрема метаболізмі протеїнів, вуглеводів, жирів, нуклеїнових кислот, синтезі біологічно активних сполук, регуляції водно-

сольового обміну, вітамінного балансу, рециркуляції жирних кислот, стероїдів та інших молекул. Показано також детоксикаційну активність мікроорганізмів-представників нормофлори кишечника [4]. Доведеним є тісний зв'язок між нормальною мікрофлорою організму та його імунним статусом.

Враховуючи широкий спектр функцій, що виконує нормальна мікрофлора кишечника, корекція кишкового мікробіоценозу за умов різних патологічних станів в організмі є першочерговим завданням.

Відомо, що зсуви гормонального статусу в організмі супроводжуються змінами кишкової мікрофлори. В роботах останніх років [5, 6] показано, що дисфункція щитоподібної залози призводить до зростання ступеня елімінації біфідо-, лактобактерій, бактероїдів, ентерококів та колонізації слизової оболонки кишки умовно патогенними ентеробактеріями.

В той же час зростання числа хворих із зниженою функцією щитоподібної залози, що особливо характерно для населення Закарпаття, обумовлює

актуальність вивчення стану мікрофлори кишечника за умов експериментального гіпотиреозу та дослідження ефективності її корекції пробіотиками із бацил.

### Матеріали і методи досліджень

Експерименти проводили на 30 статевозрілих клінічно здорових кролях породи “шиншила”, вагою 2,5–3,5 кг. Контроль становили інтактні тварини для визначення нормальних фізіологічних значень досліджуваних показників. У тварин другої групи (група “Контроль експериментального гіпотиреозу”, скорочено КГ) та третьої групи (група “Гіпотиреоз і Моноспорин-ПК”, скорочено ГМ) експериментальний гіпотиреоз відтворювали шляхом орального введення лікарського препарату мерказолілу із розрахунку 6 мг/кг живої ваги 1 раз на добу протягом трьох тижнів. Для визначення терапевтичної ефективності Моноспорину-ПК у групі ГМ, починаючи із 22 доби експерименту, протягом тижня вводили суспензію *Bacillus subtilis 090* на фоні гіпотиреоїдного стану, не припиняючи при цьому періодичне (через день) введення мерказолілу.

Кількісний і якісний склад інтестинальної мікрофлори кролів визначали в динаміці: у тварин групи КГ через 1 та 7 діб після припинення введення мерказолілу; ГМ – через 1 та 7 діб після останнього введення пробіотику.

Вплив гіпотиреозу на кількісний та якісний склад мікрофлори кишечника лабораторних тварин вивчали шляхом підрахунку кількості різних груп мікроорганізмів у 1 г випорожнень кролів. Враховували загальну кількість ешерихій, протею, ентерококів, стафілококів, дріжджоподібних грибів, відсоткове співвідношення лактозопозитивних *E.coli*, лактозонегативних та зі зміненою ферментативною активністю, гемолітичні форми стафілококу та кишкової палички, аеробні спороутворюючі бацили, біфідо- та лактобактерії. [7]. Ідентифікацію мікроорганізмів проводили з врахуванням морфологічних, тинкторіальних, культуральних та біохімічних властивостей бактерій [8]. Для ідентифікації мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* використовували „Системы индикаторные бумажные” виробництва Нижегородського державного підприємства по виробництву бактерійних препаратів (Росія). Кількість мікроорганізмів в 1 г фекалій кролів визначали за кількістю колоній, що виростили на відповідному диференціально-діагностичному поживному середовищі (колоній утворюючих одиниць) з урахуванням об'єму суспензії, що наносили при посіві на поверхню агару і кратністю його розведення. Кількість протею та біфідобактерій виражали у сту-

пені розведення, де реєстрували ріст даних мікроорганізмів. Результати досліджень піддавали статистичному аналізу з використанням t-критерію Стьюдента [9].

### Результати досліджень та їх обговорення

Дослідження мікрофлори кишечника кролів показало, що експериментальний гіпотиреоз супроводжувався змінами у її складі (табл. 1).

Зокрема, виявляли тенденцію до зниження анаеробної облигатної мікрофлори – біфідо- та лактобактерій. Експериментальний гіпотиреоз супроводжувався тенденцією до зниження загальної кількості та лактозопозитивних штамів *E.coli*, причому відсоток лактозонегативних штамів ешерихій становив 7,5 % від загальної кількості. Встановлено лише тенденцію до збільшення кількості дріжджоподібних грибів та бактерій роду *Staphylococcus*. В умовах гіпотиреоїдного стану гемолітичних штамів стафілококу та кишкової палички не виявляли, титр протею не змінювався.

Через 7 діб після припинення введення мерказолілу гіпотиреоїдним тваринам спостерігали зниження біфідо- та лактобактерій.

Введення пробіотику [10] в умовах експериментального гіпотиреозу супроводжувалось нормалізацією у складі мікробіоценозу кишечника. Зокрема, в результаті введення бактеріального препарату спостерігали підвищення кількості лакто- та біфідобактерій, тенденцію до зниження кількості дріжджоподібних грибів, бактерій роду *Staphylococcus*, підвищення лактозопозитивних *E.coli* (табл. 2). Кількість аеробних спороутворюючих бактерій у групі ГМ тимчасово збільшувалась на два порядки, а після припинення введення пробіотику поступово знижувалась.

Отже, гіпотиреоїдний стан, відтворений на лабораторних тваринах, супроводжувався тенденцією до змін у кишкової мікрофлорі: зниженням кількості біфідо- та лактобактерій, *E.coli*, тенденцією до підвищення бактерій роду *Staphylococcus* та дріжджоподібних грибів. Введення пробіотику на фоні гіпотиреоїдного стану забезпечувало ефективну корекцію кишкової мікрофлори: зниження бактерій роду *Staphylococcus*, дріжджоподібних грибів, підвищення біфідо- та лактобактерій.

У попередніх роботах нами було показано, що введення пробіотиків із бацил гіпотиреоїдним тваринам супроводжувалось корекцією тиреоїдного статусу організму – достовірним підвищенням рівня  $T_3$  та  $T_4$ ; тенденцією до зростання концентрації IgG та зниження IgM [11], нормалізацією рівня  $\gamma$ -глобулінової фракції.

Таблиця 1. Мікрофлора кишечника кролів в нормі та за умов експериментального гіпотиреозу. (M±m)

Група мікроорганізмів	Кількість КУО в 1 г випорожнень		
	Контроль (інтактні кролі)	Гіпотиреодний стан (доба після припинення введення мерказолілу)	
		1	7
<i>Escherichia coli</i> загальна кількість	(4,88±0,18)×10 <sup>5</sup>	(3,93±0,10)×10 <sup>5*</sup>	(4,13±0,13)×10 <sup>5*</sup>
лактозопозитивні	(4,54±0,23)×10 <sup>5</sup>	(3,63±0,11)×10 <sup>5*</sup>	(3,84±0,11)×10 <sup>5*</sup>
лактозонегативні	7 %	7,5 %	7 %
гемолітичні	0	0	0
Бактерії роду <i>Staphylococcus</i> гемолітичні	(2,75±0,16)×10 <sup>3</sup>	(3,94±0,20)×10 <sup>3*</sup>	(3,38±0,12)×10 <sup>3***</sup>
Дріжджоподібні гриби	(1,95±0,24)×10 <sup>4</sup>	(3,04±0,09)×10 <sup>4*</sup>	(3,09±0,07)×10 <sup>4*</sup>
Ентерокок	(7,03±0,19)×10 <sup>2</sup>	(6,65±0,10)×10 <sup>2</sup>	(6,81±0,12)×10 <sup>2</sup>
Бактерії роду <i>Proteus</i>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>
Аеробні спороутворюючі бактерії	(9,13±0,30)×10 <sup>4</sup>	(8,33±0,15)×10 <sup>4</sup>	(8,00±0,10)×10 <sup>4*</sup>
Біфідобактерії	10 <sup>8</sup> -10 <sup>10</sup>	10 <sup>8*</sup>	10 <sup>7**</sup>
Лактобактерії	10 <sup>8</sup> -10 <sup>9</sup>	10 <sup>8*</sup>	10 <sup>7**</sup>

Примітка: \* - зміни показників достовірні у порівнянні з інтактними тваринами Контроль; \*\* - стосовно кролів із експериментальним гіпотиреозом.

Таблиця 2. Мікробіоценоз кишечника гіпотиреодних кролів в результаті застосування пробіотику із бацил, (M±m)

Група мікроорганізмів	Кількість КУО в 1 г випорожнень	
	Гіпотиреодний стан +Моноспорин(терапія) (доба після припинення введення пробіотику)	
	1	7
<i>Escherichia coli</i> загальна кількість	(4,75±0,06)×10 <sup>5**</sup>	(4,55±0,06)×10 <sup>5**</sup>
лактозопозитивні	(4,43±0,05)×10 <sup>5**</sup>	(4,24±0,09)×10 <sup>5**</sup>
лактозонегативні	6,8 %	6,9 %
гемолітичні	0	0
Бактерії роду <i>Staphylococcus</i> гемолітичні	(3,0±0,10)×10 <sup>3**</sup>	(2,73±0,09)×10 <sup>3**</sup>
Дріжджоподібні гриби	(2,26±0,06)×10 <sup>4**</sup>	(2,01±0,07)×10 <sup>4**</sup>
Ентерокок	(6,28±0,08)×10 <sup>2*</sup>	(6,55±0,10)×10 <sup>2*</sup>
Бактерії роду <i>Proteus</i>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>
Аеробні спороутворюючі бактерії	(9,09±0,26)×10 <sup>6***</sup>	(1,98±0,07)×10 <sup>5***</sup>
Біфідобактерії	10 <sup>8</sup> -10 <sup>9</sup>	10 <sup>8</sup> -10 <sup>10</sup>
Лактобактерії	10 <sup>8</sup> -10 <sup>9</sup>	10 <sup>8</sup> -10 <sup>9</sup>

Примітка: \* - зміни вірогідні щодо тварин групи Контроль; \*\* - щодо кролів з експериментальним гіпотиреозом, \*\*\* - щодо кролів обох зазначених груп, (p<0,05).

До загальноновизнаних механізмів, за допомогою яких пробіотики можуть попереджувати і лікувати цілий ряд захворювань, відносять, насамперед, їх здатність стимулювати імунну відповідь, продукцію антибіотичних речовин та бактеріоцинів, короткотривалу безсимптомну "бактеріємію" (поява вже через 2 хв. після перорального введення у крові з наступною швидкою елімінацією) [12-14]. Антагоністична активність штамів бацил, що входять до складу біопрепаратів, досягається за рахунок їх здатності до продукції ферментів, лізоциму, активізації продукції ендogenous інтерферону тощо. Позитивним також є синтез бакте-

ріями роду *Bacillus*, що становлять основу пробіотиків, пектинолітичних, протеолітичних та інших ферментів, антиалергічна дія, здатність до ферментативного розщеплення харчових та мікробних алергенів на неактивні субодиниці. На особливу увагу заслуговує той факт, що бактерії роду *Bacillus* здатні до зв'язування та інкорпорації радіоактивного цезію та стронцію. Така властивість обумовлює перспективність їх використання у якості засобів, що сприяють виведенню ВМ із організму теплокровних [13].

Таким чином, отримані результати свідчать про зміни у складі кишкового мікробіоценозу ла-

бораторних тварин в умовах експериментального гіпотиреозу та доцільність використання пробіотиків із бацил для корекції виявлених порушень.

1. Федоровская Е. А., Немировская Л. И. Взаимосвязь микробных экосистем и иммунитета человека // Микробиологический журнал. – 1999. – Т.61, № 5. – С. 85-95.
2. Веселов А.Я. Современные представления о нормальной микрофлоре пищеварительного тракта взрослого человека и изменениях ее в норме и при некоторых заболеваниях органов пищеварения (обзор литературы) // Лабораторное дело. – 1988. – № 4. – С. 3-11.
3. Полосухина В.А., Ужегова Е.Б., Бабаджанова С.С. Эффективность коррекции дисбактериоза у больных бронхиальной астмой // Терапевтический архив. – 1989. – Т. 61, №3. – С. 110-113.
4. Шендеров Б. А., Маквелова М. А., Степанчук Ю. Б., Скиба Н. Э Пробиотики и функциональное питание // Антибиотики и химиотерапия. – 1997.– № 7, Т. 42. – С. 30-34.
5. Маковійчук А.А., Мещишен І.Ф., Пешковська Н.В. Вплив лінексу та біоспорину на про- та антиоксидантний стан крові та шлунково-кишкового тракту щурів за умов гіпертиреозу// Ендокринологія. – 2004. – Т. 9, № 1. – С. 65-69.
6. Маковійчук А.А. Видовий склад та популяційний рівень мікрофлори порожнини товстої кишки у хворих на дифузний токсичний зоб // Бук. Мед. Вісник. – 2002. – Т.6, № 3. – С. 61-66
7. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования / Под. ред. М.О. Биргера. М.: Медицина, 1982. – 464 с.
8. Краткий определитель бактерий Берги /Под. ред. Дж. Хоулта. – М.: Мир, 1980. – 495 с.
9. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1973. – 342 с.
10. Бойко Н.В., Кривцова М.В., Фабрі З.Й. Застосування препарату на основі штаму *Bacillus subtilis* для лікування та профілактики гіпотиреоїдних станів. – Патент на винахід № 75767. – Бюл. № 15. – 2006. – 10 с.
11. Бойко Н.В., Кривцова М.В., Фабрі З.Й. Застосування біопрепарату із бацил для корекції імунної відповіді та функціональних порушень тиреоїдного статусу організму за умов експериментального гіпотиреозу // Ендокринологія – 2004. – Т. 9, № 2. – С. 243-247.
12. Смирнов В.В., Резник С.Р., Вьюницкая В.А., Сорокулова И.Б., Литвин В.П. Влияние комплексного пробиотика споролакта на микробиоценоз кишечника теплокровных // Микробиологический журнал.– 1995.– Т 57, № 4. – С. 42-49.
13. Смирнов В.В., Резник С.Р., Вьюницкая В.А., Сорокулова И.Б., Самгородская Н.В., Тофан А.В. Современные представления о механизмах лечебно-профилактического действия пробиотиков из бактерий рода *Bacillus* // Микробиологический журнал – 1993. – Т. 55, № 4. – С. 92 – 112.
14. Смирнов В.В., Резник С.Р., Сорокулова І.Б. Високоєфективний біологічний препарат Біоспорин // Лікарська справа. – 1994. – № 5-6. – С. 133 – 138.
15. Смирнов В.В., Сорокулова И.Б., Пинчук И. В. Бактерии рода *Bacillus* – перспективный источник биологически активных веществ // Микробиологический журнал. – 2001. – Т.63, №1. – С. 72-76.

Отримано: 20 січня 2007 р.

Прийнято до друку: 1 лютого 2007 р.