

ВПЛИВ БІОЛОГІЧНО АКТИВНОГО ЗАСОБУ НА ОСНОВІ ПЕПТИДОГЛІКАНУ НА МІКРОФЛОРУ КИШЕЧНИКУ ЛАБОРАТОРНИХ ТВАРИН

В. І. Кушнір, І. М. Кушнір, І. С. Семен

Державний науково-дослідний контрольний інститут ветеринарних препаратів та кормових добавок

Пептидоглікани, що є компонентами мікробної клітини практично усіх мікроорганізмів, відіграють важливу роль у підтримуванні цілісності самих бактерій та проявляють імуностимулюючий вплив на макроорганізм. Встановлено позитивний вплив біологічно активного засобу на основі пептидогліканів у дозах 75 та 100 мг на мікрофлору кишечника лабораторних тварин. Зокрема, на сьому добу після застосування препарату у товстому відділі кишечника білих щурів зменшувалась кількість умовно-патогенної мікрофлори та зростала кількість лакто- та біфідобактерій. Позитивний вплив біологічно активного засобу продовжувався й на 14 добу після закінчення застосування досліджуваного препарату.

Із виникненням антибіотикорезистентності мікроорганізмів гостро постало питання пошуку фізіологічних і безпечних засобів профілактики та лікування інфекцій. З огляду на це, особливої уваги заслуговують пробіотики, які відіграють важливу роль не тільки у запобіганні виникнення мікробної резистентності, але й як стратегічні засоби альтернативної медицини, спрямованої на підтримку та відновлення гомеостазу. Проте, експериментальні дослідження показали, що ефективність лікувальної дії пробіотиків ще недостатньо підтверджена, оскільки діюча субстанція препаратів інактивується під впливом кислотного, жовчного і ферментативного бар'єрів [1].

Будь-які зміни у нормобіоценозі кишечника спричиняють порушення функціонального стану макроорганізму, зокрема, порушення процесів травлення, білкового, вуглеводного та ліпідного обміну, продукування біологічно активних речовин, пригнічення дезінтоксикації екзо- і ендогенних субстратів тощо. Зниження резистентності організму призводить до поширення інфекційних та запальних захворювань, які важко піддаються традиційним методам лікування. У таких випадках виправданим є фармакологічне стимулювання імунної системи ефективними та недорогими імуностимуляторами, які не проявляють побічної дії. З огляду на це, перспективним є використання пептидогліканів (ПГ) [2, 3].

Пептидоглікани — полімери, що складаються з цукрів та амінокислот, які утворюють гомогенний шар навколо плазматичної мембрани бактерій та відіграють структурну роль у бактерійній клітинній стінці, надають їй форму та міцність, а також протидіють осмотичному тиску цитоплазми [4, 5]. Вони є головними універсальними та невід'ємними компонентами клітинної стінки як грампозитивних, так і грамнегативних бактерій [6], при цьому найбільша частка ПГ (50–80 %) припадає на грампозитивні мікроорганізми [7].

Метою роботи було вивчити вплив біологічно активного засобу на основі ПГ молочнокислих та біфідобактерій на мікрофлору товстого відділу кишечника лабораторних тварин та встановити антимікробну дію досліджуваного препарату.

Матеріали і методи. Для проведення досліджень за принципом аналогів було сформовано чотири групи білих щурів, лінії Вістар, масою тіла 160-180 г, яким за допомогою

металевого зонда внутрішньошлунково вводили різні концентрації біологічно активного засобу на основі ПГ. Тваринам першої (контрольної) групи вводили фізіологічний розчин, тваринам другої групи вводили біологічно активний засіб на основі ПГ у дозі 25 мг на тварину, тваринам третьої групи — 50 мг, тваринам четвертої — 75 мг, п'ятої — 100 мг. Біологічно активний засіб вводили упродовж 14 діб. Для визначення впливу ПГ на мікрофлору товстого відділу кишечника проводили мікробіологічне дослідження проб вмістимого на сьому та 14 добу після застосування досліджуваного засобу. Для цього проводили послідовні десятикратні розведення проб, з наступним висіванням матеріалу на живильні середовища. У вмістимому товстого відділу кишечника визначали кількість *E. coli*, *S. aureus*, *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.* та грибів роду *C. albicans*.

Кількість мікроорганізмів в 1 г вихідного матеріалу (С) розраховували за формулою:

$$C = (N : V) \cdot K,$$

де: N — середня кількість колоній в одній чашці;

V — об'єм суспензії, що вноситься при посіві;

K — кратність розведення.

Ідентифікацію мікроорганізмів проводили загально визначеними методами з використанням визначника бактерій Берджі [8]. У процесі ідентифікації виділених мікроорганізмів, поряд з загально визначеними методами, використовували комерційні тест-системи фірми "Biomerieux".

Результати й обговорення. При вивченні впливу біологічно активного засобу на деякі види товстого відділу кишечника білих щурів (*E. coli*, *Staphylococcus spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.* та грибів роду *Candida*) отримали дані, що наведені у таблиці 1.

На сьому добу (табл. 1) після застосування біологічно активного засобу на основі ПГ проходило зниження загальної кількості умовно-патогенної мікрофлори (*E. coli*, *Staphylococcus spp.* та грибів роду *Candida*). Зокрема, у пробах вмістимого товстого відділу кишечника тварин другої та третьої дослідних груп спостерігали тенденцію до зменшення кількості *E. coli*, відповідно, на 1,4 та 5,4 %, тоді як у тварин четвертої та п'ятої груп було встановлено вірогідне зменшення цього показника, відповідно, на 35,6 та 71,2 % ($p < 0,001$), порівняно до величин контрольної групи. Крім того, встановили, що застосування біологічно активного засобу сприяло зменшенню стафілококів у 2,7 та 9,1 раза ($p < 0,001$) у тварин, яким застосовували препарат у дозі, відповідно, 75 та 100 мг. Також було встановлено зменшення кількості мікроскопічних грибів роду *Candida* у 4,5 раза у тварин четвертої дослідної групи, та вірогідне зниження у 33 раза ($p < 0,001$) у тварин п'ятої групи.

Таблиця 1

Кількість мікроорганізмів на сьому добу, КУО/см³, (M±m, n=5)

Мікроорганізми	Групи тварин				
	I	II	III	IV	V
<i>E. coli</i>	7,3±0,2·10 ⁷	7,2±0,1·10 ⁷	6,9±0,2·10 ⁷	4,7±0,1·10 ^{7***}	2,1±0,1·10 ^{7***}
<i>Staphylococcus spp.</i>	2,2±0,2·10 ⁴	2,1±0,2·10 ⁴	1,9±0,1·10 ^{4***}	8,2±0,2·10 ^{3***}	2,4±0,1·10 ^{3***}
<i>Bifidobacterium spp.</i>	1,2±0,1·10 ⁸	1,3±0,2·10 ⁸	6,8±0,3·10 ^{8***}	8,7±0,1·10 ^{8***}	1,1±0,3·10 ^{9***}
<i>Lactobacillus spp.</i>	1,7±0,1·10 ⁷	2,6±0,3·10 ⁷	2,8±0,2·10 ^{7***}	5,1±0,3·10 ^{7***}	9,9±0,1·10 ^{7***}
Гриби роду <i>Candida</i>	2,8±0,1·10 ⁴	2,7±0,2·10 ⁴	9,7±0,1·10 ^{3***}	6,1±0,2·10 ^{3***}	8,4±0,2·10 ^{2***}

Примітка: *** — $p < 0,001$ до I групи

На протизагу зменшенню кількості умовно патогенної мікрофлори, надзвичайно важливим є позитивний вплив біологічно активного засобу на кількість біфідо- та лактобактерій у вмістимому товстого відділу кишечника тварин дослідних груп. Зокрема, встановили суттєве збільшення у 7,2 та 9,1 раза ($p < 0,001$) кількості *Bifidobacterium spp.* у тварин четвертої та п'ятої дослідних груп. Кількість *Lactobacillus spp.* зростала у вмістимому

кишечника тварин, яким застосовували біологічно активний засіб у дозах 75 та 100 мг, відповідно у 3 та 5,8 раза.

Отже, зменшення умовно-патогенної та підвищення корисної мікрофлори вказувало на позитивний вплив біологічно активного засобу, який тривав упродовж семи діб після закінчення його застосування. Це, очевидно, пов'язано з тим, що з одного боку ПГ лакто- та біфідобактерій створюють несприятливі умови для колонізації кишечника патогенами, внаслідок зниженням їх адгезивних властивостей, а з другого боку — із коригувальним та стимулювальним впливом ПГ на корисну мікрофлору кишечника лабораторних тварин. З огляду на це, важливим було визначити тривалість позитивної дії біологічно активного засобу на мікрофлору кишечника.

Визначення кількості *E. coli*, *Staphylococcus spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.* та грибів роду *Candida* на 14 добу після застосування біологічно активного засобу наведено у таблиці 2.

Таблиця 2

Кількість мікроорганізмів на 14 добу, КУО/см³, (M±m, n=5)

Мікроорганізми	Групи тварин				
	I	II	III	IV	V
<i>E. coli</i>	7,9±0,2 · 10 ⁷	7,7±0,3 · 10 ⁷	7,3±0,3 · 10 ⁷	6,7±0,3 · 10 ^{7*}	6,2±0,2 · 10 ^{7**}
<i>Staphylococcus spp.</i>	2,9±0,3 · 10 ⁴	2,8±0,3 · 10 ⁴	2,3±0,2 · 10 ⁴	9,7±0,2 · 10 ^{3***}	8,3±0,3 · 10 ^{3***}
<i>Bifidobacterium spp.</i>	2,4±0,2 · 10 ⁸	2,3±0,3 · 10 ⁸	3,5±0,3 · 10 ^{8*}	4,3±0,3 · 10 ^{8*}	9,6±0,2 · 10 ^{8***}
<i>Lactobacillus spp.</i>	1,2±0,2 · 10 ⁷	1,3±0,2 · 10 ⁷	1,6±0,3 · 10 ⁷	4,2±0,2 · 10 ^{7**}	6,8±0,3 · 10 ^{7***}
Гриби роду <i>Candida</i>	3,1±0,2 · 10 ⁴	3,2±0,2 · 10 ⁴	2,9±0,3 · 10 ⁴	8,5±0,3 · 10 ^{3***}	3,4±0,3 · 10 ^{3***}

Примітка:*** — p<0,05; ** — p<0,01; *** — p<0,001 щодо I групи

На 14 добу дослідів (табл. 2) тенденція щодо зниження умовно-патогенної мікрофлори після застосування біологічно активного препарату у дозах 75 та 100 мг ще зберігалася, проте її прояв був не таким вираженим. Зокрема, кількість *E. coli* у вмістимому товстому відділі кишечника зменшувалась у тварин четвертої та п'ятої дослідних груп, відповідно, на — 15,2 (p<0,05) та 21,5 % (p<0,01). Крім цього, відбувалося зменшення кількості стафілококів та грибів роду *Candida* у тварин четвертої групи, відповідно, у 2,9 та 3,6 раза (p<0,001), а у тварин п'ятої групи, відповідно, у 3,5 та 9,1 раза (p<0,001), порівняно до величин контрольної групи.

Необхідно відмітити, що на 14 добу після застосування біологічно активного засобу в дозах 75 та 100 мг позитивний вплив на кількісний склад лакто- та біфідобактерій ще зберігався. Зокрема, у вмістимому кишечнику кількість лактобактерій у тварин четвертої та п'ятої дослідних груп була вищою, відповідно у 3,5 (p<0,01) та 5,6 раза (p<0,001), а біфідобактерій, відповідно, у 2,7 та 9,1 раза (p<0,001), порівняно з тваринами контрольної групи.

ВИСНОВКИ

Застосування ПГ грампозитивних мікроорганізмів, зокрема лакто- та біфідобактерій сприяє зменшенню умовно-патогенної та збільшенню корисної мікрофлори у кишечнику лабораторних тварин, що забезпечує стійкість макроорганізму до несприятливих факторів. Позитивний ефект застосування біологічно активного засобу тривав упродовж чотирнадцяти діб після припинення його застосування.

Перспективи подальших досліджень. Подальші дослідження будуть направлені на вивчення гострої та хронічної токсичності біологічно активного засобу на основі ПГ.

INFLUENCE OF BIOLOGICALLY ACTIVE MEANS ON THE BASIS OF PEPTIDOGLYCAN ON LABORATORY ANIMALS BOWELS MICROFLORA

V. I. Kushnir, I. M. Kushnir, I. S. Semen

State Scientific-Research Control Institute of Veterinary Medical Products and Fodder Additives

S U M M A R Y

Peptidoglycans, that are the components of microbial cell practically of all microorganisms, play an important role in maintenance of bacteria integrity and show immune-stimulant influence on a macro-organism. Positive influence of biologically active means is set on the basis of peptidoglycans in doses 75 and 100 mgs on a laboratory animals bowels micro-flora. In particular, on the seventh day after application of preparation in a thick department of the bowels of white rats the amount of conditionally-pathogenic micro-flora diminished and the amount of lacto- and bifidobacteria grew. Positive influence of biologically active means proceeded on a **fourteenth day** after completion of application of the investigated preparation.

ВЛИЯНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОГО СРЕДСТВА НА ОСНОВАНИИ ПЕПТИДОГЛИКАНА НА МИКРОФЛОРУ КИШЕЧНИКА ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

В. И. Кушнир, И. М. Кушнир, И. С. Семен

Государственный научно-исследовательский институт ветеринарных препаратов и кормовых добавок

А Н Н О Т А Ц И Я

Пептидогликаны — компоненты микробной клетки практически всех микроорганизмов, которые выполняют важную роль в поддержании целостности бактерий и проявляют иммуностимулирующее влияние на макроорганизм. Установлено положительное влияние биологически активного средства на основании ПГ в дозах 75 и 100 мг на микрофлору кишечника лабораторных животных. В частности, на седьмые сутки после применения препарата в толстом отделе кишечника белых крыс уменьшалось количество условно-патогенной микрофлоры и увеличивалось количество лакто- и бифидобактерий. Положительное влияние биологически активного средства продолжалось еще на 14 сутки после окончания применения исследуемого препарата.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. *Копча В. С.* Антибіотикорезистентність пробіотиків: роздуми і факти / В. С. Копча // Здоров'я України.— 2009. — № 4. — С. 46–47.
2. *Werner G. H.* Immunostimulating agents: what next? A review of their present and potential medical applications / G. H. Werner, P. Jolles // Eur. J. Biochem. — 1996. — Vol. 242. — P. 1–19.
3. *Колесникова Н В.* Регуляция мурамилдипептидами синтеза иммуноглобулина Е в эксперименте и клинике / Н В. Колесникова, Е. А. Коков, Т. М. Андропова и др. // Росс. аллергол. Журн. — 2008. — № 5. — С. 48–54.

4. Dziarski R. Recognition of bacterial peptidoglycan by the innate immune system / R. Dziarski // *Cell Mol Life Sci.* — 2003. — Sep. — № 60 (9). — P. 1793–1804.
5. Kim. H. J. Lipoteichoic acid and muramyl dipeptide synergistically induce maturation of human dendritic cells and concurrent expression of proinflammatory cytokines / H. J. Kim, Jae Seung Yang, Sang Su Woo et al. // *J. Leukoc. Biol.* — 2007. — Vol. 81. — P. 983–989.
6. Boneca I. G. The role of peptidoglycan in pathogenesis / I. G. Boneca // *Curr. Opin. Microbiol.* — 2005. — Vol. 8. — № 1. — P. 46–53.
7. Позур В. К. Імунобіологічна активність бактеріальних пептидогліканів / В. К. Позур // К.: Фітосоціоцентр. — 2002. — 236 с.
8. Определитель бактерий Берджи / под редакцией Д. Гоулта, Н. Крига, П. Снита и др. / М. Мир, 1997. — Т. 1, 2. — 799 с.