

УДК: 612.017.11: 612.014.482.4

## Влияние экстракта куриных эмбрионов на состояние микрофлоры кишечника мышей после однократного тотального $\gamma$ -облучения

М.С.Погорелая<sup>1,2</sup>, Г.Ф.Жегунов<sup>1</sup>, О.Н.Щербак<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Харьковская зооветеринарная академия (Харьков, Украина)

<sup>2</sup>ГУ «Институт микробиологии и иммунологии имени И.И.Мечникова НАМН Украины» (Харьков, Украина)

marionimmun@gmail.com

В эксперименте *in vivo* на самках белых лабораторных мышей, которые подвергались действию однократного тотального  $\gamma$ -излучения в дозе 5 Гр, было изучено действие экстракта из эмбрионов кур на состояние микрофлоры кишечника. Установлено, что внутримышечное введение экстракта из эмбрионов кур способствует восстановлению нормального состава пристеночной микрофлоры кишечника мышей в эксперименте.

**Ключевые слова:** *белые мыши, экстракт из эмбрионов кур, микрофлора кишечника, 5 Гр, однократное общее  $\gamma$ -облучение.*

## Вплив екстракту з курячих ембріонів на стан кишкової мікрофлори мишей після їх одноразового тотального $\gamma$ -опромінення

М.С.Погоріла, Г.Ф.Жегунов, О.М.Щербак

В експерименті *in vivo* на самках білих лабораторних мишей після одноразового тотального  $\gamma$ -опромінення досліджено дію серії внутрішньом'язових введень екстракту з ембріонів курей на стан мікрофлори кишківника. Встановлено, що внутрішньом'язове введення екстракту із ембріонів курей сприяє відновленню нормального складу мікрофлори кишківника мишей в експерименті.

**Ключові слова:** *білі миші, екстракт із ембріонів курей, мікрофлора кишківника, 5 Гр, одноразове загальне  $\gamma$ -опромінення.*

## The effect of the extract from chickens embryos on the state of intestinal microflora of mice at total single $\gamma$ -irradiation

M.S.Pogorila, G.F.Zhegunov, O.N.Sherbak

In the experiment *in vivo* using females of white laboratory mice, that were subjected to single total gamma irradiation, there has been investigated the action of a series of intramuscular introductions of the extract from chickens embryos on the state of intestinal microflora. Intramuscular administration of the extract from chickens embryos promotes restoration of the normal state of intestinal microflora of mice in the experiment.

**Key words:** *white mice, extract from chickens embryos, intestinal microflora, 5 Gr, single  $\gamma$ -irradiation.*

### Введение

Человек и окружающая среда представляют собой единую экологическую систему, находящуюся в состоянии биологического равновесия между макроорганизмом и микроорганизмами, строго адаптированными друг к другу (Анохин, Тюрин, 2001; Бондаренко, 2007). Полагают, что микробы-симбионты, формирующие микрoэкологические системы организма, определяют стабильность его нормальной микрофлоры и принимают самое непосредственное участие в формировании гомеостаза организма человека. Поэтому качественное и количественное соотношение популяций микробов в отдельных биотопах является чрезвычайно чувствительным индикатором состояния организма (Поликарпов, 1994).

Состав микрофлоры каждого отдела пищеварительного тракта отличен друг от друга и в норме характеризуется относительным постоянством. Кишечная нормофлора обеспечивает пристеночное пищеварение и препятствует адгезии и проникновению патологических агентов (Edwards, Parett, 2002; Guarino et al., 2009; Klaenhammer, 2000).

Нарушение количественного и качественного состава микроорганизмов в определенном отделе системы приводит к развитию дисбактериоза, который относят к наиболее распространенным синдромам, развивающимся на фоне снижения иммунологической защиты и нарушения нормальной гистологической структуры ткани кишечника (Callaway et al., 2008; Rambaud, 2006).

Значение микрофлоры в реализации специфических и неспецифических реакций иммунного ответа определяется её универсальными иммуномодулирующими свойствами (Бондаренко, Воробьев, 2004; Грачева и др., 2004; Копанев, Алешкин, 2002). Симбионтная микрофлора кишечника, в первую очередь бифидо- и лактобактерии, посредством антигенной стимуляции иммунной системы усиливает образование компонентов системы комплемента, лизоцима, иммуноглобулинов, индуцирует синтез интерферона, стимулирует лимфоидный аппарат кишечника через непосредственное влияние на дифференцировку Т- и В-лимфоцитов в пейеровых бляшках, активизирует фагоцитарную активность (Хавкин, Жихарева, 2006; Шифрин, Андросова, 2003). Так известно, что дисбиотические нарушения приводят к возникновению метаболической иммуносупрессии и могут обусловить развитие иммунодефицита (Хаитов, 2001).

Нарушения микрофлоры кишечника могут быть следствием воздействия на организм широкого ряда экзо- и эндогенных факторов. Неблагоприятные факторы окружающей среды, инфекционные заболевания, неполноценное питание, прием лекарственных препаратов типа стероидных гормонов и антибиотиков, болезни органов пищеварения становятся причинами нарушений микрофлоры кишечника. В большинстве случаев сдвиги в соотношении групп бактерий, составляющих флору толстой кишки, постепенно проходят самостоятельно и не требуют лечения (Чахава и др., 1982). У ослабленных же больных, особенно с нарушениями иммунитета, самовосстановление экологии кишечника не происходит, и появляются клинические симптомы дисбактериоза. Так, ионизирующее излучение в дозе, оказывающей угнетающее действие на систему иммунитета, способно инициировать патологическое изменение состава микрофлоры кишечника, вызывая дисбактериоз.

В процессе поиска безопасных и эффективных способов коррекции нарушений адаптации и устойчивости организма в условиях агрессивных воздействий внимание ученых привлекли вещества природного происхождения, среди которых далеко не последнее место по широте биологических свойств занимают эмбриональные экстракты. Эффекты, вызываемые применением эмбриональных экстрактов, обусловлены наличием в их составе биологически активных компонентов, таких как незаменимые аминокислоты, жирные кислоты и нуклеиновые соединения в высокой концентрации. В экспериментах на линейных животных показана способность препаратов на основании экстрактов из эмбриональных тканей воздействовать на неспецифические реакции системы иммунитета, влиять на обменные процессы, активировать пролиферацию клеток, участвуя тем самым в процессах регенерации. Отмечены также антистрессовое и антиоксидантное действия. Данные биологические эффекты позволяют говорить о некоей перспективности применения препаратов эмбрионального происхождения при ряде патологических состояний, как острого, так и затяжного характера (Логай и др., 1995; Сотникова и др., 1998).

Целью нашего исследования было изучение влияния экстракта из эмбрионов кур на состояние микрофлоры кишечника в эксперименте *in vivo* на лабораторных мышах, подвергнутых  $\gamma$ -излучению.

#### **Объект и методы исследования**

Объектом исследования были самки белых беспородных мышей, массой  $22 \pm 1,0$  г, возрастом 2 месяца. Животные удерживались на стандартном питании при стандартных регламентированных условиях в виварии Харьковской зооветеринарной академии.

В работе был использован экстракт из эмбрионов кур, который готовится по разработанной методике (Жегунов, Кузнецова, 2009). Введение экстракта подопытным животным осуществлялось внутримышечно, с промежутком в 1 сутки на протяжении 10 дней, в минимальной эффективной дозе – по 0,12 мл (Коваленко та ін., 2001).

Общее однократное облучение животных осуществлялось на установке РУМ-17 в дозе 5 Гр на базе ГУ «Институт медицинской радиологии им. С.П.Григорьева» НАМН Украины.

Выращивание бифидобактерий и лактобактерий, выделяемых из состава кишечной микрофлоры, проводили на плотных питательных средах рекомендованного состава (Поздеев, 2001) в микроаэрофильных условиях в анаэробстате Anaerobic system Mark III-LE 003 (Индия). Выращивание эшерихий проводили на агаре-агаре Эндо. Количество жизнеспособных микроорганизмов в пересчете на 1 г фекалий определяли высевом соответствующих десятикратных разведений суспензий

биоматериала на плотные питательные среды в чашках Петри и подсчетом выросших колоний бактерий по истечении времени инкубирования при температуре 37°C.

Животные были распределены по следующим группам: I группа – интактные животные (n=11); II группа – животные, которым с промежутком в 1 сутки на протяжении 10 дней вводили по 0,12 мл внутримышечно экстракт из куриных эмбрионов (n=11); III группа – животные, которые были подвергнуты однократному общему  $\gamma$ -излучению в дозе 5 Гр (n=11); IV группа – животные, которым по указанной схеме вводили экстракт и на 10 сутки введения облучили указанной дозой (n=11). Исследование микрофлоры проводили с помощью бактериологических методов через 7 суток после однократного облучения. Оценивали общее число аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов, измеряли число кишечных палочек и гемолитических микроорганизмов в колониеобразующих единицах (КОЕ). Данные представлены в виде среднего арифметического с указанием стандартного отклонения в логарифмической шкале. Выведение животных из эксперимента осуществлялось путем декапитации под эфирным наркозом. Работа с животными проводилась согласно Хельсинской декларации, принятой Генеральной ассамблеей Всемирной медицинской ассоциации (1964–2000 гг.), согласно Национальных «Общих этических принципов исследований на животных» (Украина, 2001 г.), согласованных с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в других научных целях» (Страсбург, 18.03.1986). При проведении статистического анализа полученных в эксперименте данных применяли критерий Стьюдента с учетом поправки Бонферрони с помощью компьютерных программ Origin и Microsoft Office Excel 2003 (Лапач, 2004; Чекотовский, 2002). Исследование было одноцентровым, проспективным, двойным слепым.

### Результаты и обсуждение

Согласно результатам, представленным на рис. 1 и 2, введение экстракта необлученным животным (II группа) не привело к статистически достоверным изменениям общего количества, а также не вызвало изменений в соотношении основных видов микроорганизмов кишечника.

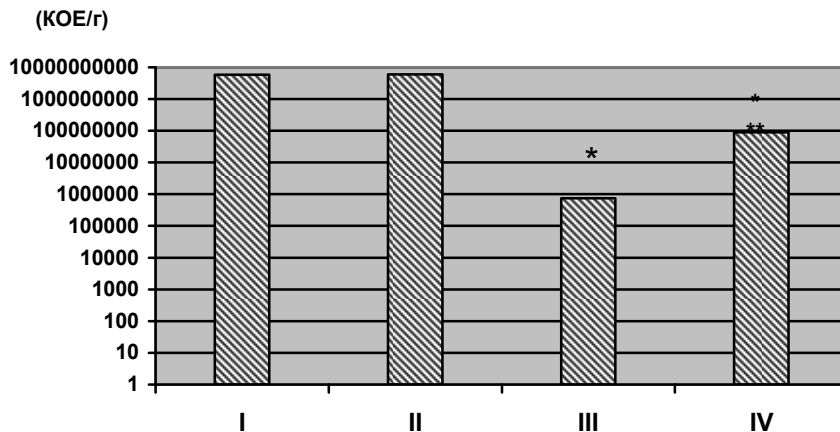
На 7 сутки после воздействия общего однократного  $\gamma$ -излучения в дозе 5 Гр отмечено снижение общего числа микроорганизмов кишечника –  $(7,4 \pm 0,7) \cdot 10^5$  КОЕ/г в III группе в сравнении с интактными животными  $(5,9 \pm 0,3) \cdot 10^9$  КОЕ/г (I группа), ( $p < 0,01$ ). При этом было отмечено существенное снижение количества лактобактерий –  $(1,9 \pm 0,6) \cdot 10^4$  КОЕ/г по сравнению с интактом –  $(2,5 \pm 0,3) \cdot 10^8$  КОЕ/г; а также снижение бифидобактерий –  $(4,6 \pm 0,5) \cdot 10^2$  КОЕ/г по сравнению с интактом –  $(5,5 \pm 0,3) \cdot 10^6$  КОЕ/г. Количество колониеобразующих единиц эшерихий в III группе также было достоверно ниже, чем у интактных животных –  $(3,7 \pm 0,4) \cdot 10^1$  КОЕ/г в сравнении с  $(1,9 \pm 0,3) \cdot 10^4$  КОЕ/г. При наблюдении за общим состоянием облученных мышей было выявлено снижение аппетита и диспептические явления со стороны пищеварительной системы. Таким образом, вследствие воздействия ионизирующего излучения в указанном режиме и дозе наблюдаются проявления дисбиоза кишечника у экспериментальных животных.

Общее количество микроорганизмов кишечника, по данным посева фекальных масс, у облученных животных на фоне применения экстракта из эмбрионов кур на 7 сутки исследования было значительно выше, чем у облученных животных, которым не вводили экстракт.

Так, общее число микроорганизмов в IV группе составило  $(8,9 \pm 0,6) \cdot 10^7$  КОЕ/г в сравнении с облученными и не получавшими экстракт животными –  $(7,4 \pm 0,7) \cdot 10^5$  КОЕ/г, ( $p < 0,01$ ).

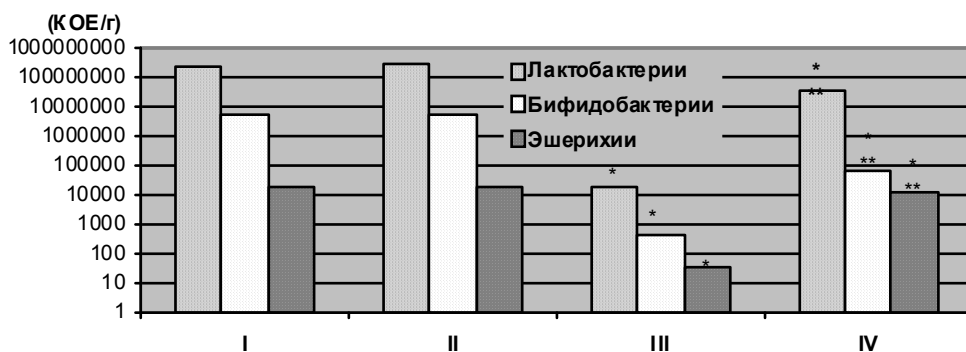
Количество лактобактерий у животных IV группы составило  $(3,9 \pm 0,3) \cdot 10^7$  КОЕ/г по сравнению с  $(1,9 \pm 0,6) \cdot 10^4$  КОЕ/г у животных III группы. Значение численности бифидобактерий у облученных животных, получавших экстракт из эмбрионов, также было достоверно выше, чем у лишь облученных мышей –  $(6,9 \pm 0,6) \cdot 10^5$  КОЕ/г в IV группе в сравнении с  $(4,6 \pm 0,8) \cdot 10^2$  КОЕ/г в III группе ( $p < 0,01$ ). Увеличилось и число колониеобразующих единиц эшерихий –  $(1,2 \pm 0,7) \cdot 10^4$  КОЕ/г в IV группе в сравнении с  $(3,7 \pm 0,8) \cdot 10^1$  КОЕ/г в III группе мышей ( $p < 0,01$ ).

Таким образом, на фоне введения экстракта из эмбрионов кур облученным животным отмечается увеличение численности лакто-, бифидобактерий и эшерихий в кишечнике, то есть явления дисбактериоза, отмеченные у подвергнутых облучению мышей, под воздействием экстракта к 7 суткам эксперимента менее выражены, чем у мышей, которым не вводили экстракт.



**Рис. 1.** Общее число аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов в фекалиях мышей, после воздействия однократного  $\gamma$ -излучения и введения экстракта из куриных эмбрионов

Примечания: I – интактные животные; II – животные, получавшие экстракт из эмбрионов; III –  $\gamma$ -облученные животные; IV – животные, получавшие экстракт из эмбрионов, затем подвергшиеся облучению; \* – достоверность различий относительно интактных животных (I группа),  $p < 0,01$ ; \*\* – достоверность различий относительно групп  $\gamma$ -облученных животных, не получавших экстракт (III группа),  $p < 0,01$ .



**Рис. 2.** Число основных групп микроорганизмов в фекалиях мышей, после воздействия однократного  $\gamma$ -излучения и введения экстракта из куриных эмбрионов

Примечания: I – интактные животные; II – животные, получавшие экстракт из эмбрионов; III –  $\gamma$ -облученные животные; IV – животные, получавшие экстракт из эмбрионов, затем подвергшиеся облучению; \* – достоверность различий относительно интактных животных (I группа),  $p < 0,01$ ; \*\* – достоверность различий относительно групп  $\gamma$ -облученных животных, не получавших экстракт (III группа),  $p < 0,01$ .

Вероятнее всего, выявленный в эксперименте эффект связан с такими свойствами экстракта из куриных эмбрионов, как способность повышать адаптогенность и стимулировать неспецифическую резистентность, что, наряду с другими биологическими эффектами, в конечном счете способствует нормализации состояния микрофлоры кишечника, изменившегося вследствие радиационного влияния на макроорганизм.

### Выводы

Однократное внешнее тотальное  $\gamma$ -облучение мышей в дозе 5 Гр приводит к патологическим изменениям в составе симбионтной микрофлоры кишечника с формированием дисбиотического состояния. В ходе изучения биологических эффектов применения экстракта из эмбрионов кур у мышей, которые были подвергнуты облучению, было отмечено увеличение суммарного количества и отдельных основных групп микроорганизмов фекальной микрофлоры кишечника. Выявленный эффект можно интерпретировать как положительное влияние эмбрионального экстракта на резистентность организма при воздействии высоких доз ионизирующего излучения. Результаты свидетельствуют о перспективности дальнейших исследований биологического и фармакологического действия экстрактов из эмбрионов кур с целью создания на их основе лекарственных и профилактических средств с радиозащитными свойствами.

### Список литературы

- Анохин В.А., Тюрин Ю.А. Роль основных представителей анаэробной кишечной микрофлоры в норме и патологии // Казан. мед. журн. – 2001. – Т.82, №2. – С. 149–151. /Anokhin V.A., Tyurin Yu.A. Rol' osnovnykh predstaviteley anaerobnoy kischechnoy mikroflory v norme i patologii // Kazan. med. zhurn. – 2001. – Т.82, №2. – С. 149–151./
- Бондаренко В.М. Роль транслокации кишечной бактериальной аутофлоры и ее токсических биомолекул в патологии человека // Экспер. и клинич. гастроэнтерология. – 2007. – №5. – С. 86–93. /Bondarenko V.M. Rol' translokatsii kischechnoy bakterial'noy autoflory i yeye toksicheskikh biomolekul v patologii cheloveka // Eksp. i klinich. gastroenterologiya. – 2007. – №5. – С. 86–93./
- Бондаренко В.М., Воробьев А.А. Дисбиозы и препараты с пробиотической функцией // Журн. микробиологии. – 2004. – №1. – С. 84–92. /Bondarenko V.M., Vorob'yev A.A. Disbiozy i preparaty s probioticheskoy funktsiyey // Zhurn. mikrobiologii. – 2004. – №1. – С. 84–92./
- Грачева Н.М., Грачева Н.М., Бондаренко В.М. Пробиотические препараты в терапии и профилактике дисбактериоза кишечника // Инфекционные болезни. – 2004. – Т.2, №2. – С. 53–58. /Gracheva N.M., Gracheva N.M., Bondarenko V.M. Probioticheskiye preparaty v terapii i profilaktike disbakterioza kischechnika // Infektsionnyye bolezni. – 2004. – Т.2, №2. – С. 53–58./
- Жегунов Г.Ф., Кузнецова В.Г. Изучение иммуностимулирующей активности экстрактов из эмбрионов кур // Проблемы зооинженерии та ветеринарної медицини. – 2009. – Вип.19, част.2, Т.2. – С. 116–119. /Zhegunov G.F., Kuznetsova V.G. Izuchenye immunostimuliruyushchey aktivnosti ekstraktov iz embrionov kur // Problemy zoonzhenerii ta veterinarnoi medytyny. – 2009. – Vyp.19, chast.2, T.2. – С. 116–119./
- Коваленко В.М., Стефанов О.В., Максимов Ю.М., Трахтенберг І.М. Експериментальне вивчення токсичної дії потенційних лікарських засобів // Доклінічні дослідження лікарських засобів: Метод. реком. /За ред. О.В.Стефанова. – К.:ВД «Авіцена», 2001. – С. 74–97. /Kovalenko V.M., Stefanov O.V., Maksimov Yu.M., Trakhtenberg I.M. Eksperymental'ne vyvchennya toksychnoi dii potentsiynykh likars'kykh zasobiv // Doklinichni doslidzhennya likars'kykh zasobiv: Metod. rekom. /Za red. O.V.Stefanova. – К.:VD «Avitsena», 2001. – С. 74–97./
- Копанев Ю.А., Алешкин В.А. Дисбактериоз кишечника и дисбиотические реакции у детей // Педиатрия. – 2002. – №6. – С. 100–103. /Kopanev Yu.A., Aleshkin V.A. Disbakterioz kischechnika i disbioticheskiye reaktsii u detey // Pediatriya. – 2002. – №6. – С. 100–103./
- Лапач С.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. – Киев: Моріон, 2004. – 408с. /Lapach S.N. Statisticheskiye metody v mediko-biologicheskikh issledovaniyakh s ispol'zovaniyem Excel. – Kiev: Morion, 2004. – 408s./
- Логай І.М., Соловьева В.П., Сотникова Е.П. Тканевая терапия по В.П.Филатову, основные направления и перспективы // Здоровье. – 1995. – №2. – С. 7–10. /Logay I.M., Solov'yeva V.P., Sotnikova Ye.P. Tkanevaya terapiya po V.P.Filatovu, osnovnyye napravleniya i perspektivy // Zdorov'ye. – 1995. – №2. – С. 7–10./
- Поздеев О.К. Медицинская микробиология /Под ред В.И.Покровского. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2001. – 778с. /Pozdeyev O.K. Meditsinskaya mikrobiologiya /Pod red V.I.Pokrovskogo. – М.: GEOTAR-MED, 2001. – 778s./
- Поликарпов Н.А. Солнечная активность и продукция потенциально патогенными микроорганизмами факторов агрессии // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1994. – №6. – С. 19–20. /Polikarpov N.A. Solnechnaya aktivnost' i produktsiya potentsial'no patogennymi mikroorganizmami faktorov agressii // Zhurn. mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii. – 1994. – №6. – С. 19–20./
- Сотникова Е.П., Соловьева В.П., Лотош Т.Д. Экспериментальная оценка уровня биологической активности и безопасности адаптогенов // Актуальные проблемы клинической фармакологии. – Винница, 1998. – С. 256–257. /Sotnikova Ye.P., Solov'yeva V.P., Lotosh T.D. Eksperimental'naya otsenka urovnya biologicheskoy aktivnosti i bezopasnosti adaptogenov // Aktual'nyye problemy klinicheskoy farmakologii. – Vinnitsa, 1998. – С. 256–257./

- Хавкин А.И., Жихарева Н.С. Терапия антибиотик-ассоциированного дисбактериоза // Рус. мед. журн. – 2006. – Т.14, №19. – С. 3–7. /Khavkin A.I., Zhikhareva N.S. Terapiya antibiotik-assotsirovannogo disbakterioza // Rus. med. zhurn. – 2006. – T.14, №19. – S. 3–7./
- Хайтов Р.М. Физиология иммунной системы. – М.: ВИНТИ, 2001. – С.220. /Khaitov P.M. Fiziologiya immunnoy sistemy. – M.: VINITI, 2001. – S.220./
- Чахава О.В., Горская Е.М., Рубан С.З. Микробиологические и иммунологические основы гнотобиологии. – М.: Медицина, 1982. – 160с. /Chakhava O.V., Gorskaya Ye.M., Ruban S.Z. Mikrobiologicheskiye i immunologicheskiye osnovy gnotobiologii. – M.: Meditsina, 1982. – 160s./
- Чекотовский Э.В. Графический анализ статистических данных в Microsoft Excel 2000. – М.: Издательский дом «Вильямс», 2002. – 464с. /Chekotovskiy Ye.V. Graficheskiy analiz statisticheskikh dannykh v Microsoft Exsel 2000. – M.: Izdatel'skiy dom «Vil'yams», 2002. – 464s./
- Шифрин О.С., Андросова Л.Н. Антибиотико-ассоциированная диарея: новые возможности лечения и профилактики // Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2003. – №5. – С. 82–86. /Shifrin O.S., Androsova L.N. Antibiotiko-assotsirovannaya diareya: novye vozmozhnosti lecheniya i profilaktiki // Ros. zhurn. gastrojenterologii, gepatologii, koloproktologii. – 2003. – №5. – S. 82–86./
- Callaway T.R., Edrington T.S., Anderson R.C., Harvey R.B. Probiotics, prebiotics and competitive exclusion for prophylaxis against bacterial disease // Anim. Health Res. Rev. – 2008. – Vol.9 (2). – P. 217–225.
- Edwards C.A., Parett A.M. Intestinal flora during the first months of life: new perspectives // Brit. J. Nutr. 2002. – Vol.88, №3 (suppl.). – P. S11–S18.
- Guarino A., Vecchio A.L., Canani R.B. Probiotics as prevention and treatment for diarrhea // Curr. Opin. Gastroenterol. – 2009. – Vol.25 (1). – P. 18–23.
- Klaenhammer T.R. Probiotic bacteria: today and tomorrow // J.Nutr. – 2000. – №130. – P. 415–416.
- Ramnaud J.C. Gut microflora. Digestive physiology and pathology. – Paris: John Libbey Eurotext, 2006. – 250p.

**Представлено: І.Д.Андрєєва / Presented by: I.D.Andreeva**

**Рецензент: Л.В.Шеремет / Reviewer: L.V.Sheremet**

*Подано до редакції / Received: 21.02.2013*