



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 75767

(13) C2

(51) МПК (2006)

A61K 35/66

A61P 5/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД(54) ЗАСТОСУВАННЯ ПРЕПАРАТУ НА ОСНОВІ ШТАМУ *BACILLUS SUBTILIS* ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ТА ПРОФІЛАКТИКИ ГІПОТИРЕОЇДНИХ СТАНІВ

1

(21) 20040604799

(22) 18.06.2004

(24) 15.05.2006

(46) 15.05.2006, Бюл. № 5, 2006 р.

(72) Бойко Надія Володимирівна, Кривцова Марина Валеріївна, Фабрі Золтан Йосипович

(73) Ужгородський національний університет

(56) Грыцив В.Е., Епишин А.В., Т-, В-системы лимфоцитов и неспецифические факторы защиты у больных гипотиреозом. Врачебное дело., 1998. №2., С.52-56.

2

SU 1779692 A1

Бойко Н.В., Протективна ефективність бактеріального біопрепарату Моноспорин-ПК в умовах сучасних агроєкоценозів., Бюлетень інституту сільськогосподарської мікробіології., 2000., №8, С.32-34.

(57) Застосування препарату, що містить клітини штаму *Bacillus subtilis* ДНКІБШМ №090 і продукти їх життєдіяльності, як засобу для лікування та профілактики гіпотиреоїдних станів.

Винахід відноситься до галузі мікробіології, біотехнології, зокрема до застосування біопрепаратів ветеринарного призначення і може бути використаний для терапії гіпотиреоїдного стану, що супроводжується порушеннями імунного та біохімічного статусу організму.

Відомим є застосування імуномодулюючих препаратів для лікування хворих на гіпотиреоз в медицині (спленіну, глюкокортикоїдів). Однак, використання спленіну і глюкокортикоїдів сприяє зменшенню клінічних проявів гіпотиреозу лише при їх комбінованому призначенні з основними засобами, при цьому зменшення симптомів захворювання не завжди проходить паралельно з нормалізацією імунних порушень [1].

Використання спленіну і глюкокортикоїдів у ветеринарії обмежене високою вартістю препаратів.

Біопрепарат Моноспорин-ПК (протиклебсієльний) призначений для профілактики і терапії клебсієльозів, дисбактеріозів, інших інфекційних бактеріальних захворювань шлунково-кишкового тракту (ШКТ) молоддю сільськогосподарських тварин та птиці, в тому числі ентероколітів типу ешерихіозів і сальмонельозів [2]. Проте не розглядалася можливість його використання для корекції біохімічного, імунного та тиреоїдного статусу тварин при гіпотиреозі.

Завданням винаходу є розширення діапазону використання відомого біопрепарату Моноспорин-ПК (протиклебсієльного), а саме пропозиція його застосування для корекції основних біохімічних показників крові, співвідношення імуноглобулі-

нів та рівня тиреоїдних гормонів за умов гіпотиреозу у ветеринарії.

Поставлене завдання досягається тим, що біопрепарат Моноспорин-ПК (протиклебсієльний) на основі штаму *Bacillus subtilis* 090 застосовується для корекції гіпотиреоїдного стану, що супроводжується порушеннями імунного та біохімічного статусу організму тварин у ветеринарії.

Моноспорин-ПК - монокомпонентний бактерійний біопрепарат з пробіотичними і імуномодулюючими властивостями, основу якого становить штам *Bacillus subtilis* 090, що характеризується широким спектром антагоністичної активності [3]. Основною перевагою застосування даного біопрепарату є його комплексна позитивна дія на макроорганізм. Моноспорин-ПК здійснює корегуючий вплив на обмінні процеси в першу чергу на обмін білку, холестерину, покращує показники функціональної активності щитоподібної залози за умов гіпотиреозу, позитивно впливає на імунологічну реактивність організму. Застосування даного біопрепарату є більш економічно вигідним (дешевим) для виробництва.

Переваги і принципову можливість застосування запропонованого біопрепарату для терапії гіпотиреоїдних станів відображено в наведених нижче прикладах.

Приклад №1

Вплив Моноспорину-ПК на тиреоїдині стан, ряд показників імунного та біохімічного статусу організму за умов експериментального гіпотиреозу, відтвореного на кролях

(13) C2

(11) 75767

(19) UA

Для дослідження впливу Моноспорину-ПК на ряд біохімічних показників метаболізму, імунний статус та функціональний стан щитоподібної залози відтворювали експериментальний гіпотиреоз на кролях шляхом орального введення їм мерказолілу (6мг/кг щодоби протягом трьох тижнів). Тваринам дослідної групи, починаючи із 22 доби експерименту, протягом тижня вводили суспензію живої культури *Bacillus subtilis* 090 на фоні гіпотиреоїдного стану, не припиняючи при цьому періодичне (через день) введення мерказолілу.

Експериментальний гіпотиреоз супроводжувався значним підвищенням рівня IgM (у 10 разів), зниженням титру IgG, тенденцією до зменшення рівня IgA та кількості малих і середніх циркулюючих імунних комплексів (ЦІК). У сироватці крові здорових тварин, що одержували тільки Моноспорин-ПК (контроль біопрепарату), спостерігали достовірне зростання титрів IgM і IgG, тенденцію до збільшення концентрації IgA, а також зменшення кількості малих і середніх ЦІК, що є проявом типової для пробіотиків імуномодуючої дії на організм теплокровних.

В умовах експериментального гіпотиреоїдного

стану виявлено регулюючу дію Моноспорину-ПК на концентрації IgM і IgA у сироватці крові піддослідних тварин (таблиця 1).

Про стан тиреоїдного статусу лабораторних тварин судили за титром гормонів щитоподібної залози. Вміст трийодтироніну ( $T_3$ ) у сироватці крові інтактних тварин становив  $1,08 \pm 0,07$  нмоль/л, а тироксину ( $T_4$ ) -  $134,60 \pm 6,63$  нмоль/л. У стані гіпотиреозу у тварин відмічали різке пригнічення секреції тиреоїдних гормонів: рівень  $T_3$  у сироватці крові знизився на 62,96%,  $T_4$  - на 80,82% ( $p < 0,001$ ). Застосування досліджуваного пробіотику із бацил для корекції гіпотиреоїдного стану обумовило достовірне зростання рівня обох гормонів -  $T_3$  до  $0,66 \pm 0,06$  нмоль/л і  $T_4$  відповідно до  $50,75 \pm 2,09$  нмоль/л ( $p < 0,001$ ) (таблиця 2).

Одержані експериментальні дані свідчать про значний вплив Моноспорину-ПК на функціональний стан щитоподібної залози в умовах гіпотиреозу. Для всіх досліджених груп тварин встановлено наявність значної оберненої кореляції між концентраціями тиреоїдних гормонів і IgM та помірної прямої кореляції між титрами  $T_3$  і IgG.

Таблиця 1

Вплив Моноспорину-ПК на тиреоїдини та імунний статус кролів за умов експериментального гіпотиреозу

| Варіант досліджу              | ЦІК (середні), Од.опт.г. $M \pm m$ | ЦІК (малі), Од.опт.г. $M \pm m$ | IgA, МО/мл $M \pm m$  | IgM, МО/мл $M \pm m$  | IgG, МО/мл $M \pm m$ |
|-------------------------------|------------------------------------|---------------------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|
| Контроль 1 (Інтактні кролі)   | $2,25 \pm 0,25$                    | $6,20 \pm 0,58$                 | $1,44 \pm 0,14$       | $0,06 \pm 0,01$       | $8,57 \pm 0,07$      |
| КМ (Контроль Моноспорину-ПК)  | $0,87 \pm 0,23^*$                  | $3,37 \pm 0,46^*$               | $1,59 \pm 0,09$       | $0,12 \pm 0,02^*$     | $9,59 \pm 0,35^*$    |
| КГ (Контроль Гіпотиреозу)     | $1,38 \pm 0,18^*$                  | $4,75 \pm 0,25^*$               | $1,28 \pm 0,13$       | $0,68 \pm 0,10^*$     | $7,34 \pm 0,37^*$    |
| ГМ (Гіпотиреоз+Моноспорин-ПК) | $2,62 \pm 0,32^{**}$               | $3,60 \pm 0,68^*$               | $1,82 \pm 0,12^{***}$ | $0,14 \pm 0,02^{***}$ | $7,98 \pm 0,30$      |

Примітка:

- \* - зміни вірогідні порівняно із інтактним контролем,
- \*\* - порівняно із експериментальним гіпотиреозом,
- \*\*\* - по відношенню до обох зазначених груп, ( $p < 0,05$ )

Таблиця 2

Вплив Моноспорину-ПК на рівень гормонів щитоподібної залози кролів за умов експериментального гіпотиреозу

| Варіант досліджу              | $T_3$ , нмоль/л, $M \pm m$ | $T_4$ , нмоль/л, $M \pm m$ |
|-------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Контроль 1 (Інтактні кролі)   | $1,08 \pm 0,07$            | $134,60 \pm 6,63$          |
| КГ (Контроль Гіпотиреозу)     | $0,40 \pm 0,06^*$          | $25,82 \pm 1,28^*$         |
| ГМ (Гіпотиреоз+Моноспорин-ПК) | $0,66 \pm 0,06^{**}$       | $50,75 \pm 2,09^{***}$     |

Примітка:

- \* - зміни вірогідні по відношенню до інтактного контролю,
- \*\* - порівняно із експериментальним гіпотиреозом,
- \*\*\* - стосовно обох зазначених груп (КІ і КГ), ( $p < 0,05$ )

Показано також виразний вплив Моноспорину-

ПК на ряд біохімічних показників крові кролів за умов модельного гіпотиреозу. Гіпотиреоїдний стан зумовлював суттєве зниження рівня ЗБ та  $\gamma$ -глобуліну у відповідній групі піддослідних тварин. Моноспорин-ПК в умовах експериментальної патології щитоподібної залози характеризувався здатністю до стимуляції процесів біосинтезу білка та нормалізації рівня  $\gamma$ -глобулінової фракції. Введення пробіотику здоровим тваринам призводило до зменшення рівня холестерину та зростання вмісту альбумінової фракції у сироватці крові (таблиця 3).

Таблиця 3

Вплив Моноспорину-ПК на біохімічні показники крові кролів за умов експериментального гіпотиреозу

| Варіант досліджу             | Сечовина, ммоль/л, $M \pm m$ | Тимолова проба, від.од. | Холестерин, ммоль/л, $M \pm m$ | Загальний білок, г/л $M \pm m$ | Альбумін-глобуліновий коефіцієнт | Білкові фракції     |                    |                  |                 |                  |
|------------------------------|------------------------------|-------------------------|--------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|---------------------|--------------------|------------------|-----------------|------------------|
|                              |                              |                         |                                |                                |                                  | Альбуміни, %        | Глобуліни, %       |                  |                 |                  |
|                              |                              |                         |                                |                                |                                  |                     | $\alpha_1$         | $\alpha_2$       | $\beta$         | $\gamma$         |
| Контроль 1 (Інтактні кролі)  | $5,58 \pm 0,87$              | $0,006 \pm 0,0024$      | $1,76 \pm 0,39$                | $64,20 \pm 2,22$               | $1,18 \pm 0,05$                  | $54,364 \pm 1,04$   | $7,10 \pm 0,36$    | $9,64 \pm 0,71$  | $9,94 \pm 0,47$ | $19,78 \pm 1,0$  |
| КМ (Контроль Моноспорину-ПК) | $5,26 \pm 0,60$              | $0,004 \pm 0,0024$      | $1,074 \pm 0,12^*$             | $68,60 \pm 1,95$               | $1,284 \pm 0,05$                 | $57,644 \pm 1,19^*$ | $5,404 \pm 0,32^*$ | $8,644 \pm 0,67$ | $8,80 \pm 0,87$ | $22,10 \pm 1,54$ |

Продовження таблиці 3

|                               |           |               |           |               |            |             |             |            |               |              |
|-------------------------------|-----------|---------------|-----------|---------------|------------|-------------|-------------|------------|---------------|--------------|
| КГ (Контроль Гіпотиреозу)     | 5,36±0,76 | 0,004±0,0024  | 1,48±0,25 | 50,58±1,75*   | 1,224±0,07 | 53,52±0,96  | 8,244±0,62  | 8,824±0,80 | 9,84±0,59     | 17,42±0,91*  |
| ГМ (Гіпотиреоз+Моноспорин-ПК) | 4,04±0,46 | 2,60±0,074*** | 1,64±0,05 | 88,60±2,09*** | 1,044±0,05 | 52,304±0,89 | 6,12±0,44** | 8,66±0,77  | 14,86±1,24*** | 21,34±1,42** |

Примітка:

\* - зміни вірогідні по відношенню до інтактного контролю,

\*\* - порівняно із експериментальним гіпотиреозом,

\*\*\* - стосовно обох зазначених груп (КІ і КГ), (p&lt;0,05)

## Приклад №2

Корекція за допомогою Моноспорину-ПК ряду показників біохімічного статусу морських свинок в умовах гіпотиреозу

Корегуючий вплив Моноспорину-ПК на метаболічні порушення і зміни тиреоїдного статусу організму в умовах гіпотиреозу виявлено і в дослідях на морських свинках.

Експериментальний гіпотиреоз у морських свинок відтворювали шляхом перорального введення метізолу у кількості 5мг/1кг ваги через зонд у шлунок 1 раз на добу протягом 21 дня.

У стані гіпотиреозу у тварин відмічали зменшення рівня Т<sub>3</sub> у 2,03 рази, Т<sub>4</sub> - у 5,70, ТТГ - у 1,66. Внаслідок орального застосування Моноспорину-

ПК у гіпотиреоїдних тварин спостерігали нормалізацію рівня ТТГ, підвищення концентрації Т<sub>3</sub> у 1,8 разів та Т<sub>4</sub> у - 4,54, що свідчить про виразний корегуючий вплив біопрепарату на стан їх гіпофізарно-тиреоїдної системи (таблиця 4). Експериментальний гіпотиреоз супроводжувався типовими метаболічними порушеннями: зменшенням рівня ЗБ, тенденцією до зниження вмісту α<sub>1</sub>-, β- і γ-глобулінів у сироватці крові тварин.

Терапевтична ефективність Моноспорину-ПК за умов експериментального гіпотиреозу проявлялась у відновленні рівня загального білка та тенденції до нормалізації β-, γ-глобулінових фракцій, α<sub>1</sub>-, α<sub>2</sub>-глобулінів (таблиця 5).

Таблиця 4

Гормони щитоподібної залози Т<sub>3</sub>, Т<sub>4</sub>, ТТГ у різних варіантах досліді

| Варіанти досліді                     | Т <sub>3</sub> , нмоль/л, М±m | Т <sub>4</sub> , нмоль/л, М±m | ТТГ, мМО/мл М±m |
|--------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-----------------|
| Контроль 1 (Інтактні морські свинки) | 1,83±0,03                     | 131,00±0,5                    | 0,48±0,02       |
| КГ (Контроль Гіпотиреозу)            | 0,90±0,03*                    | 23,00±0,33*                   | 0,29±0,02*      |
| ГМ (Гіпотиреоз+Моноспорин-ПК)        | 1,64±0,07***                  | 104,50±0,33***                | 0,48±0,01**     |

Примітка:

\* - зміни вірогідні порівняно із інтактним контролем,

\*\* - стосовно до групи тварин з експериментальним гіпотиреозом,

\*\*\* - по відношенню до обох зазначених груп (КІ і КГ), (p&lt;0,05)

Показано також сприятливий вплив Моноспорину-ПК на функціональний стан печінки і нирок гіпотиреоїдних тварин. Введення Моноспорину-ПК сприяло зменшенню рівня тимолової проби (таблиця 6) - показник осадження патологічно підвищених концентрацій β-глобулінів, γ-глобулінів і

ліпопротеїнів із сироватки крові буферним розчином (рН=7,55), насиченим тимолом.

Моноспорин-ПК характеризувався здатністю до зниження рівня середньо-молекулярних пептидів, що доводить відсутність будь-якої інтоксикації в результаті його застосування.

Таблиця 5

Вплив Моноспорину-ПК на рівень загального білку та білкові фракції сироватки крові морських свинок в умовах експериментального гіпотиреозу

| Варіанти досліді                     | Загальний білок, г/л М±m | Білкові фракції  |                    |                    |            |             |
|--------------------------------------|--------------------------|------------------|--------------------|--------------------|------------|-------------|
|                                      |                          | Альбуміни, % М±m | Глобуліни, %       |                    |            |             |
|                                      |                          |                  | α <sub>1</sub> М±m | α <sub>2</sub> М±m | β М±m      | γ М±m       |
| Контроль 1 (Інтактні морські свинки) | 52,60±2,85               | 49,00±1,22       | 12,20±1,25         | 18,30±1,85         | 10,20±2,25 | 10,30±1,25  |
| КІЧ (Контроль Моноспорину-ПК)        | 62,52±1,15*              | 47,84±1,35       | 6,84±0,85*         | 10,54±0,95*        | 10,84±1,20 | 23,84±2,30* |
| КГ (Контроль Гіпотиреозу)            | 43,00±1,25*              | 49,50±1,25       | 10,90±0,45         | 21,70±0,85         | 9,00±1,30  | 8,90±1,30   |
| ГМ (Гіпотиреоз+Моноспорин-ПК)        | 52,80±1,85**             | 44,10±1,85**     | 12,10±1,20         | 19,10±1,40         | 11,70±1,10 | 11,70±1,50  |

Примітка:

\* - зміни вірогідні порівняно із інтактним контролем,

\*\* - по відношенню до групи тварин із експериментальним, гіпотиреозом, (p&lt;0,05)

Таблиця 6

Вплив Моноспорину-ПК на біохімічні показники  
крові морських свинок в нормі та за умов експериментального гіпотиреозу

| Варіанти досліджу                    | Сечовина, ммоль/л, М±m | Тимолова проба, від.од. | Холестерин, ммоль/л, М±m | СМП від.од.    | CRP-реакція |
|--------------------------------------|------------------------|-------------------------|--------------------------|----------------|-------------|
| Контроль 1 (Інтактні морські свинки) | 9,07±1,65              | 0,04±0,003              | 2,64±0,14                | 0,157±0,01     | -           |
| КМ (Контроль Моноспорину-ПК)         | 8,38±0,30              | 0,09±0,01*              | 3,12±0,10                | 0,074±0,09*    | -           |
| КГ (Контроль Гіпотиреозу)            | 7,35±0,24*             | 0,84±0,04*              | 3,00±0,03                | 0,150±0,07     | -           |
| ГМ (Гіпотиреоз+Моноспирин-ПК)        | 8,20±0,69              | 0,11±0,02***            | 2,66±0,15                | 0,022±0,003*** | -           |

Примітка:

\* - зміни вірогідні порівняно із інтактним контролем,

\*\* - стосовно групи тварин із експериментальним гіпотиреозом,

\*\*\* - стосовно до обох зазначених груп (К1 і КГ), (p<0,05)

Негативна CRP-реакція у всіх досліджених пробах свідчила про відсутність запально-деструктивних і некротичних процесів організму піддослідних тварин.

Приклад №3. Вплив Моноспорину-ПК на показники тиреоїдного статусу сільськогосподарських тварин та птиці в умовах обмеженого виробничого експерименту

При дослідженні функціонального стану щитоподібної залози новонароджених телят, поросят і курчат за допомогою імуноферментного аналізу (ІФА) встановлено, що при патологічних процесах (бактеріальна діарея, диспепсія) спостерігаються неоднозначні зміни вмісту тироксину (Т<sub>4</sub>). трийодтироніну (Т<sub>3</sub>) і тиреотропіну (ТТГ) в крові дослідних

тварин. В залежності від важкості перебігу захворювання виявлено як підвищення вмісту Т<sub>3</sub> і Т<sub>4</sub> з тенденцією до зниження кількості ТТГ, так і пониження вмісту Т<sub>3</sub> і Т<sub>4</sub> та збільшення кількості ТТГ. Обидві тенденції є негативними, оскільки ведуть до пониження синтезу білку, переважання процесів катаболізму над анаболізмом, що і є однією із причин втрати ваги хворими тваринами. Виявлено, що такими ж інформативними біохімічними показниками загального стану організму та функціональної активності щитовидної залози є вміст загального йоду (ЗЙ), зв'язаного з білками йоду (ЗБЙ) та бутанол-екстрагованого йоду (БЕЙ) в крові сільськогосподарських тварин і птиці.

Таблиця 7

Кількість ЗЙ, ЗБЙ та БЕЙ (нмоль/л) в крові  
сільськогосподарських тварин та птиці в різних варіантах досліджу

| Варіант досліджу і вид тварин                             | ЗИ         | ЗБЙ        | БЕЙ        |
|---|------------|------------|------------|
| Контроль  |            |            |            |
| телята  | 358,0±22,0 | 311,0±27,5 | 268,0±24,1 |
| поросята  | 260,0±13,3 | 221,0±16,5 | 193,0±16,5 |
| курчата   | 147,0±5,1  | 116,0±4,9  | 101,0±3,5  |
| В перші терміни виникнення захворювання                   |            |            |            |
| телята  | 400,0±16,5 | 345,0±20,0 | 293,0±4,5  |
| поросята  | 296,0±18,4 | 253,0±18,0 | 226,0±12,9 |
| курчата   | 189,0±12,0 | 167,0±16,4 | 148,0±22,0 |
| В умовах важкого перебігу - період розпаду хвороби        |            |            |            |
| телята  | 267,0±11,4 | 238,0±14,4 | 195,0±4,6  |
| поросята  | 180,0±12,8 | 160,0±12,2 | 121,0±2,1  |
| курчата   | 85,0±12,0  | 61,0±2,6   | 50,0±6,2   |
| Застосування біопрепарату "Моноспирин - ПК" профілактично |            |            |            |
| телята  | 368,0±16,0 | 331,0±20,0 | 280,0±8,2  |
| поросята  | 270,0±13,2 | 234,0±11,8 | 200,0±20,0 |
| курчата   | 151,0±8,2  | 125,0±10,0 | 110,0±6,4  |

Профілактичне застосування "Моноспорину-ПК" створює умови для адекватної мобілізації щитоподібної залози (таблиця 7), що відповідно відображається на покращанні показників її функціональної активності.

Джерела інформації:

1. Грыцив В.Е., Епишин А.В. Т-, В-системы лимфоцитов и неспецифические факторы защиты у больных гипотиреозом // Врачебное дело.- 1988. - №2. - С.52-56.

2. Бойко Н.В. Протективна ефективність бактеріального біопрепарату Моноспорину-ПК в умовах сучасних агроєкоєнозів //Бюлетень Інституту сільськогосподарської мікробіології.- 2000. -№8. - С.32-34.

3. Boiko, N.V. Bacillus subtilis strain 090 as a basis of new probiotic "Monosporine-PK" //International Probiotic Conference. Proceeding, Slovakia, Kosice. October 11-14, 2000. P.33.

## Перелік основних термінів

|                |  |
|----------------|--|
| B.subtilis 090 | Bacillus subtilis 090                        |
| пробіотики     | біопрепарати на основі живих мікроорганізмів |
| T3             | трийодтиронін                                |
| T4             | тироксин                                     |
| ТТГ            | тиреотропний гормон                          |
| ЗЙ             | загальний йод                                |
| ЗБЙ            | зв'язаний з білками йод                      |
| БЕЙ            | бутанол-екстрагований йод                    |
| Ig A           | імуноглобулін А                              |
| Ig M           | імуноглобулін М                              |
| Ig G           | імуноглобулін G                              |
| ЦІК            | циркулюючі імунні комплекси                  |
| ІФА            | імуноферментний аналіз                       |