

al. Mikroelementy v meditsine. 2004; 5 (4) : 17-20 (in Russian)

3. Serdiuk A.M., Belitskaia E.N., Paranko N.M. and Shmatkov G.G. Tiazhelye metally vneshnei srede i ikh vliianie na reproduktivnuiu funktsiiu zhenshchin [Heavy Metals of the Environment and their Impact on the Reproductive Function in the Women]. Dnepropetrovsk : Artpress ; 2004 : 148 p. (in Russian)

4. Biletska E.M., Onul N.M. Dovkillia ta zdorovia. 2011; 4 (59) : 15-19 (in Ukrainian).

5. Bakulin I.G., Novozhenov V.G., Ivanova M.A. and Malabaev K.D. Otsenka elementnogo statusa v opredelenii nutritivnoi obespechennosti organizma. Znachenie narushenii elementnogo statusa pri razlichnoi patologii [Assessment of Elemental Status in the Determination of the Nutrient Supply of the Organism. Significance of the Disturbances of Elemental Status at Different Pathology]. Moscow ; 2005. — Available at : [http://portal.vitamax.ua/media/60417/2005\\_opit\\_01\\_bakulin.doc](http://portal.vitamax.ua/media/60417/2005_opit_01_bakulin.doc) (in Russian)

6. Mendiola J., Moreno M.J., Roca M., Vergara-Juarez N., Martinez-Garcia M.J., Garcia-Sanchez A., Elvira-Rendueles et al. Environmental Health. 2011 ; 10 (6).

7. Amidu N., Owiredu W.K.B.A., Bekoe M.A.T. and Quaye L. Journal of Medical and Biomedical Sciences. 2012; 1 (1): 14-20.

8. Fatma Atig, Monia Raffa, Ben-Ali Habib, Abdelhamid Kerkeni, Ali Saad and Mounir Ajina. BMC Urology. 2012; 12: 6.

9. Antomonov M.Yu. Matematicheskaya obrabotka i analiz mediko-biologicheskikh dannyykh [Mathematical Processing and Analysis of Medico-Biological Data]. Kyiv ; 2006 : 558 p. (in Russian)

10. Prokhorova G.V. Sorosovskii obrazovatelnyi zhurnal. 2004; 8 (1) : 51-56. (in Russian)

11. Telisman S., Colak B., Pizent A., Jurasovic J. and Cvitkovic P. Environ. Res. 2007; 105: 256-266.

12. Jockenhoevel F., Bals-Pratsch M., Bertram H.P. and Nieschlag E. Andrologia. 1990; 2 (6); 503-511.

13. Romaniuk A.M., Moskalenko Yu.V., Sauliak S.V., Bonchev S.D. and Moskalenko R.A. Likarska sprava. 2013; 4: 122-127. (in Russian)

14. Ghassan T. Alani, Sermed S. Khonda and Hedef D. El Yaseen. The Iraqi Postgraduate Medical Journal. 2011; 10 (1): 81-88.

15. Meeker J.D., Rossano M.G., Protas B., Diamond M.P., Puscheck E., Daly D. et al. Environ. Health Perspect. 2008; 116: 1473-1479.

Надійшла до редакції 09.02.2015

## SAFETY ASSESSMENT OF PROBIOTIC STRAINS *B. BIFIDUM* AND *E. FAECIUM*

Shentsova M.A., Surmasheva O.V., Nikonova N.O.,  
Sahniuk O.M., Nastoiashcha N.I.

## ОЦІНКА БЕЗПЕЧНОСТІ ПРОБІОТИЧНИХ ШТАМІВ *B. BIFIDUM* ТА *E. FAECIUM*

**М**айже усі існуючі нині пробіотичні штами, які використовуються у виробництві пробіотичних препаратів і дієтичних добавок, мають статус GRAS (Generally regarded as safe) і визнані як безпечні для використання людиною. Даний статус надає міжнародне визнання безпеки пробіотичних штамів і дозволяє необмежене застосування їх у харчовій та фармацевтичній промисловості, а також безпечно використання для дітей з перших днів життя [1-4]. Молочнокислим бактеріям роду *Enterococcus* не було надано статусу GRAS, оскільки представники цього роду нині є одними з основних збудників внутрішньолікарняних інфекцій і здатні викликати тяжкі захворювання [5]. Тому питання щодо безпечного практичного використання ентерококів залишається дискусійним і широко обговорюваним [4].

**ШЕНЦОВА М.О.<sup>1</sup>,  
СУРМАШЕВА О.В.<sup>1</sup>,  
НИКОНОВА Н.О.<sup>1</sup>,  
САХНЮК О.М.<sup>2</sup>,  
НАСТОЯЩА Н.І.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>ДУ "Інститут гігієни та медичної екології ім. О.М. Марзєєва НАМН України",  
<sup>2</sup>ДП "Державний експертний центр МОЗ України", м. Київ

УДК 579.67 : 614.8

**Ключові слова :**  
**пробіотичні препарати,  
*B. bifidum*, *E. faecium*,  
токсичність.**

**Метою роботи** було визначення токсикологічних характеристик стосовно потенційної безпечності для здоров'я досліджуваних про-

ОЦЕНКА БЕЗОПАСНОСТИ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ШТАММОВ  
*B. BIFIDUM* И *E. FAECIUM*

**Шенцова М.А., Сурмашева Е.В., Никонова Н.А., Сахнюк О.Н.,  
Настоящая Н.И.**

**Актуальность** работы заключается в важности стандартизации пробиотических препаратов. Для стандартизации их используют стандартные образцы пробиотических микроорганизмов. Определение безопасности стандартных образцов является обязательным условием.

**Материалы и методы.** Использованы общепринятые методы определения безопасности микроорганизмов. Оценку безопасности пробиотических штаммов проводили в остром и хроническом опытах опеределения токсичности по наличию летального эффекта и изменению показателей, характеризующих функциональное состояние организма и отдельных органов экспериментальных животных — мышей и крыс.

**Результаты исследования.** Во время проведения испытаний штаммов *B. bifidum* и *E. faecium* при однократном их введении в организм животных (внутрибрюшинное, внутрижелудочное и подкожно) не удалось определить основной параметр токсичности — показатель среднесмертельной дозы ЛД<sub>50</sub>.

При многократном введении суспензий пробиотических штаммов *B. bifidum* и *E. faecium* в организм структурно-функциональных изменений в тканях и органах экспериментальных животных не зафиксировано, что свидетельствует о безопасности штаммов. Таким образом, в моделях острого и хронического экспериментов была продемонстрирована безопасность микробных популяций в созданных стандартных образцах *B. bifidum* и *E. faecium*.

**Ключевые слова:** пробиотические препараты, *B. bifidum*, *E. faecium*, токсичность.

© Шенцова М.О., Сурмашева О.В., Никонова Н.О.,  
Сахнюк О.М., Настояща Н.І. СТАТТЯ, 2015.



SAFETY ASSESSMENT OF PROBIOTIC STRAINS  
*B. BIFIDUM* AND *E. FAECIUM*

**Shentsova M.A., Surmasheva O.V.,  
Nikonova N.O., Sahniuk O.M., Nastoiashcha N.I.**

Actuality of the work lies in the significance of the standardization of probiotic preparations. The standard samples of probiotic microorganisms are used for their standardization. Determination of standard samples' safety is a compulsory condition.

**Materials and methods.** We used generally accepted methods of the assessment of the micro-organisms' safety. Assessment of the safety of probiotic strains was conducted in acute and chronic experiments of the toxicity by the presence of lethal effect and change of the indices characterizing the functional state of the organism and separate organs of the experimental animals — mouse and rats.

**Results.** During the testing of the strains *B. bifidum* and *E. faecium* at their single introduction into the organism of the animals (intraperitoneal, intragastric and subcutaneous) we failed to determine a main parameter of toxicity — an indicator of median lethal dose  $LD_{50}$ .

At the multiple introduction of the suspensions of probiotic strains *B. bifidum* and *E. faecium* into the organism the structural and functional changes in tissues and organs of experimental animals were not fixed, it indicates the strains' safety. Thus, a safety of the microbial populations in the created standard samples *B. bifidum* and *E. faecium* was demonstrated in the models of acute and chronic experiments.

**Keywords:** probiotic preparations, *B. bifidum*, *E. faecium*, toxicity.

біотичних штамів *B. bifidum* та *E. faecium* в умовах короткотривалої дії. Для прогнозування потенційної здатності пробіотичних субстанцій накопичуватися в організмі, ризику виникнення негативних шкідливих ефектів та хронічної інтоксикації, отже й можливості чинити загальнотоксичну дію були досліджені кумулятивні властивості зразків пробіотичних штамів *B. bifidum* та *E. faecium*.

**Матеріали і методи.** Токсиколого-гігієнічна оцінка лабораторних зразків пробіотичних штамів *B. bifidum* та *E. faecium*, які були виділені з молочнокислих продуктів, здійснювалася шляхом визначення та аналізу параметрів гострої токсичності за внутрішньошлункового, внутрішньовенного та підшкірного введення їх до організму лабораторних тварин, хронічної токсичності — за внутрішньошлункового введення. Усі дослідження супроводжувалися контролями — групи інтактних тварин з аналогічними параметрами фізичного стану [2, 6, 7].

Токсикологічні властивості пробіотичних штамів визначали в експериментах гострої та хронічної токсичності за наявністю летального ефекту і змінами показників, що характеризують функціональний стан організму тварин.

У дослідах використовували клінічно здорових безпорідних білих мишей з масою тіла ( $18,0 \pm 2,0$ ) г (80 голів), безпорідних білих щурів з масою тіла ( $180,0 \pm 20,0$ ) г (30 голів), які утримувалися на стандартному раціоні у стабільних умовах за ГОСТ 42 1-88. Про відсутність ознак токсичності у пробіотичних штамів судили за станом інте-

гральних показників, що відображають рівень метаболічних процесів: масою тіла тварин, ваговими коефіцієнтами та відсутністю патоморфологічних змін в органах тварин.

Гістологічні дослідження виконувалися стандартними методами з фарбуванням препаратів гематоксилін-еозином.

Статистичну обробку отриманих даних було проведено на ПК Intel® Pentium Dual-Core inside, цифровий матеріал у кожній окремій вибірці був перевірений та підтверджений на нормальне розподілення величин. Для чисельних даних розраховували середнє арифметичне, дисперсію та стандартне квадратичне відхилення. Інтервал надійності отримували з вірогідністю 95%.

**Результати дослідження.** При детальному аналізі результатів вивчення гострої токсичності було виявлено, що однократне введення досліджуваних штамів *B. bifidum* та *E. faecium* у дозі  $1 \times 10^{11}$  КУО/мл мишам і щурам у максимально допустимій дозі різними способами не впливало на загальний стан піддослідних тварин. Симптомів гострого отруєння не спостерігалось, летальність була відсутня. Пробіотичні культури добре переносилися тваринами: вони були активними, рухливими, з нормальною координацією рухів, стандартною реакцією на зовнішні подразники, звичайною частотою дихальних рухів, нормальною консистенцією фекальних мас, кратністю сечовипускання та забарвлення сечі, гарним апетитом і нормальним зовнішнім виглядом та не відрізнялися від контрольних.

Під час спостереження за зміною маси тіла тварин у динаміці принципів відмінностей у тварин дослідних та контрольних груп не було виявлено. Було зафіксовано збільшення маси тіла усіх експериментальних груп.

Так, маса тіла обох груп мишей, яким вводили підшкірно суспензії пробіотичних штамів *B. bifidum* та *E. faecium*, зросла порівняно з початковим її значенням відповідно з ( $17,55 \pm 0,09$ ) г і ( $17,29 \pm 0,11$ ) г на ( $24,60 \pm 1,03$ )% і ( $26,82 \pm 1,15$ )%. Спостерігалось також і збільшення маси тіла у контрольній групі на ( $25,76 \pm 0,99$ )%. Індекс приросту маси тіла дослідних тварин складав 0,96 для групи мишей, якій вводили штам *B. bifidum*, і 1,03 для мишей, які отримували пробіотичний штам *E. faecium*.

Лабораторні щури, яким підшкірно вводили пробіотичні штами, також помітно збільшили масу тіла: зафіксовано підвищення показника середньої маси зі ( $184,71 \pm 1,97$ ) г на ( $15,94 \pm 2,01$ )% для групи тварин, яка отримувала штам *B. bifidum*, і зі ( $177,38 \pm 1,97$ ) на ( $15,06 \pm 1,66$ )% для групи, що отримувала *E. faecium*. Щури контрольної групи збільшили масу тіла у середньому на ( $13,87 \pm 1,45$ )%, а індекс приросту маси тіла дорівнював 1,21 для групи, якій вводили штам *B. bifidum*, і 1,10 — для групи, що отримувала штам *E. faecium*.

Схожі результати було зафіксовано для тварин, які отримували пробіотичні штами внутрішньошлунковим способом. Так, група мишей, якій вводили штам *B. bifidum*, збільшила



масу тіла у середньому на  $(25,34 \pm 1,39)\%$ . На  $(26,68 \pm 0,75)\%$  зросла маса тіла мишей, які отримували штам *E. Faecium*, у контрольній групі — на  $(26,99 \pm 0,69)\%$ . Індекс приросту маси мишей, які отримували пробіотичний штам *B. bifidum*, склав 0,94, а *E. faecium* — 0,99.

Дослідні щури, які отримували пробіотичні штами, збільшили масу тіла на  $(15,50 \pm 1,35)\%$  (штам *B. bifidum*) і  $(16,18 \pm 1,55)\%$  (штам *E. faecium*), у контрольній групі — на  $(15,46 \pm 0,91)\%$ . Індекс приросту маси тіла щурів дослідних груп був майже однаковим і складав 1,04 і 1,06 відповідно.

Для лабораторних тварин за внутрішньочеревного введення було отримано такі результати. Приріст маси тіла мишей, що отримували штам *B. bifidum*, склав  $(23,91 \pm 1,36)\%$ , *E. faecium* —  $(28,54 \pm 0,63)\%$ , а для контрольної групи тварин —  $(25,15 \pm 0,84)\%$ . Тобто індекс збільшення маси тіла мишей дорівнював 0,97 для штаму *B. bifidum* і 1,13 — для штаму *E. faecium*.

Середній приріст маси тіла щурів за внутрішньочеревного введення штамів *B. bifidum* та *E. faecium* дорівнював  $(16,73 \pm 1,20)\%$  і  $(17,77 \pm 1,52)\%$  відповідно. Тварини контрольної групи збільшили вагу у середньому на  $(17,95 \pm 0,93)\%$ . Індекс приросту маси тіла склав 0,97 для групи щурів, яка внутрішньочеревно отримувала штам *B. bifidum*, і 0,99 — для групи з *E. faecium*.

Таким чином, найбільший приріст показників маси тіла було зафіксовано для групи щурів, яким вводили підшкірно штам *B. bifidum*. Найменш результативним способом введення пробіотичних штамів з негативним значенням індексу приросту маси тіла виявився внутрішньочеревний спосіб.

Отже, усі три способи введення суспензії пробіотичних мікроорганізмів з метою вивчення параметрів гострої токсичності виявилися безпечними і не спричиняли будь-якого шкідливого впливу на загальний стан піддослідних тварин. Не було зафіксовано жодних клінічних ознак проявів інтоксикації, інтегральні показники залишалися у нормі, функціональні порушення або морфо-

логічні зміни були відсутні. Тому виділені пробіотичні штами *B. bifidum* та *E. faecium* можна віднести до VI класу токсичності і вважати відносно нешкідливими за класифікацією Сидорова К.К. [6].

Під час проведення випробувань гострої токсичності не вдалося визначити основний параметр токсичності — показник середньосмертельної дози  $LD_{50}$  за внутрішньочеревного, внутрішньошлункового та внутрішньовенного способів введення суспензій пробіотичних штамів лабораторним мишам і щурам. Дослідження впливу більш високої кількості мікроорганізмів пробіотичних штамів було обмежене можливістю введення великих об'ємів зразків експериментальним тваринам. Розрахунковий індекс кумуляції визначити також не вдалося. Таким чином, пробіотичні штами можна вважати малотоксичними.

Результати вивчення хронічної токсичності пробіотичних штамів *B. bifidum* та *E. faecium* базувалися на патолого-анатомічних і гістологічних дослідженнях органів мишей. Отримані дані з взаємозалежності

між дозою та ефектом дії пробіотичних субстанцій за одnorазового введення було використано нами для визначення дози для досліджень токсичності під час повторних введення.

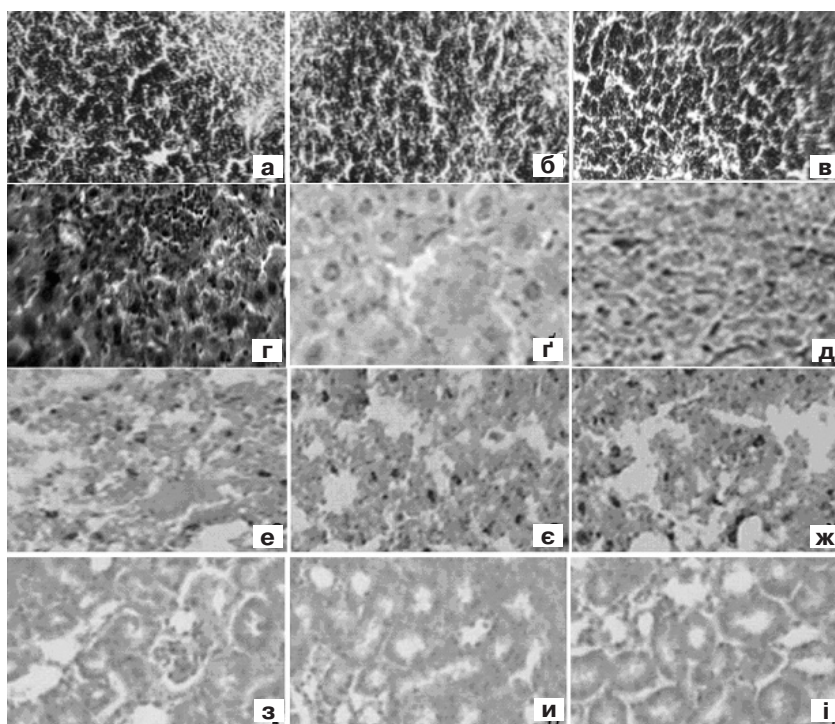
Було виявлено, що в умовах 3-місячного багаторазового внутрішньошлункового введення суспензій штамів пробіотичних бактерій загибелі піддослідних тварин не відбувається. До кінця строку спостережень усі тварини залишались у нормальному фізіологічному стані і без ознак захворювань. Так, загальний стан, зовнішній вигляд, поведінкові реакції, харчова активність мишей не змінювалися. Маса тіла білих мишей протягом експериментів зростала і до кінця досліджень збільшилася у середньому на  $(80,59 \pm 3,31)\%$  у контрольній групі та на  $(81,83 \pm 8,03)\%$  і  $(81,65 \pm 4,47)\%$  — у дослідних групах тварин, які отримували штами *B. bifidum* та *E. faecium* відповідно.

Доведено, що при повторних внутрішньошлункових введеннях протягом 90 діб у максимальних терапевтичних дозах пробіотичні субстанції не спричиняли негативного впли-

Рисунок

#### Мікроскопічні картини зрізів органів мишей:

**а** — тимус (контрольна група); **б** — тимус (група *B. bifidum*); **в** — тимус (група *E. faecium*); **г** — печінка (контрольна група); **г'** — печінка (група *B. bifidum*); **д** — печінка (група *E. faecium*); **з** — нирки (контрольна група); **и** — нирки (група *B. bifidum*); **і** — нирки (група *E. faecium*); **з'** — легені (контрольна група); **и'** — легені (група *B. bifidum*); **і'** — легені (група *E. faecium*)



ву на основні системи та органи мишей. Фізіологічні і гістоморфологічні показники дослідних тварин не відрізнялися від таких в інтактних мишей та не виходили за межі фізіологічної норми. Величини та індекси абсолютних мас внутрішніх органів мишей за багаторазового введення досліджуваних пробіотичних зразків у тварин дослідних та контрольної груп були рівнозначними. Анатомічна картина органів усіх дослідних тварин, яким вводили *B. bifidum* та *E. faecium*, була тотожною.

Виявлено, що в усіх тварин дослідної та контрольної груп не зафіксовано будь-яких патологічних змін у жодному з органів (рис.).

Дослідження найважливіших органів — головних антитоксичних бар'єрів на шляху потрапляння бактеріальних агентів до організму лабораторних тварин — дозволило підтвердити відсутність синдрому вираженої загальної інтоксикації. Відсутність клінічних проявів токсинемії, токсичної дистрофії та некротичних змін паренхіматозних органів вказують на відсутність токсичної пошкоджуючої дії пробіотичних штамів на клітини макроорганізму. Так, при детальному аналізі мікропрепаратів органів тварин обох дослідних груп не виявлено змін в їхній структурі порівняно з такою у контрольної групи. У паренхіматозних органах дистрофічні і некротичні новоутворення виявлені не були. Зміни морфології життєво важливих внутрішніх органів тварин дослідних груп за внутрішньошлункового введення мишам стандартизованої суспензії пробіотичних штамів не були виявлені. У так званих "шочових" органах — нирках та легенях — змін також не було виявлено. Таким чином, отримані дослідні дані свідчать про слабо виражені кумулятивні властивості експериментальних лабораторних зразків пробіотичних штамів *B. bifidum* та *E. faecium*.

Після надходження до організму піддослідних тварин протягом 3-х місяців приріст маси тіла був таким, як і у тварин контрольної групи.

Таким чином, на моделях гострої і хронічної токсичності було продемонстровано без-

пеку мікробних популяцій у створених лабораторних зразках пробіотичних штамів *B. bifidum* та *E. faecium*.

#### Висновки

На моделях гострої і хронічної токсичності було продемонстровано безпеку мікробних популяцій у створених лабораторних зразках пробіотичних штамів *B. bifidum* та *E. faecium*.

Однократне внутрішньошлункове, підшкірне і внутрішньочеревне введення пробіотичних штамів *B. bifidum* та *E. faecium* у максимально можливих дозах ( $10^{11}$  КУО/мл) не викликало токсичного впливу на організм експериментальних тварин, що дозволяє зробити висновки про безпеку виділених мікроорганізмів.

Багатократне внутрішньошлункове введення суспензій досліджуваних зразків пробіотичних штамів *B. bifidum* та *E. faecium* у максимально допустимих дозах не викликало токсичного впливу на організм тварин, що дозволяє зробити висновки про нешкідливість пробіотичних штамів.

Результати патологоанатомічних і гістологічних досліджень різних органів білих мишей, а також відсутність факту загибелі тварин та змін у мікроскопічній структурі досліджених органів свідчать про нешкідливість пробіотичних штамів.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Recommendations for the preparation, characterization and establishment of international and other biological reference standards. WHO Technical Report Series 932, annex 2 / WHO Expert Committee on Biological Standardization. — Geneva, 2004. — P. 73-131, 137.
2. Державна Фармакопея України. — Перше видання. Доповнення 4. — Харків, 2011. — 538 с.
3. Нетребко О.К. Пробиотики и пребиотики в питании грудных детей / О.К. Нетребко // Педиатрия. — 2007. — Т. 86, № 1. — С. 80-87.
4. Глушанова Н.А. Биологические свойства лактобацилл / Н.А. Глушанова // Бюллетень сибирской медицины. — 2003. — № 4. — С. 50-58.
5. Бондаренко В.М. Симбиотические энтерококки и проблема энтерококковой оппортунистической инфекции / В.М. Бондаренко, А.Н. Суворов // Москва, 2007. — 30 с.
6. Сидоров К.К. О классификации токсичности ядов при парентеральных способах введе-

ния / К.К. Сидоров // Токсикология новых промышленных химических веществ. — М., 1973. — Вып. 13. — С. 47-60.

7. Медико-биологические исследования производственных штаммов микроорганизмов и токсиколого-гигиеническая оценка микробных препаратов, определение их безопасности и обоснование гигиенических нормативов и регламентов : метод. указания. — Приказ № 521 МОЗ Украины 26.10.2004.

#### REFERENCES

1. WHO Expert Committee on Biological Standardization. Recommendations for the Preparation, Characterization and Establishment of International and other Biological Reference Standards. WHO Technical Report Series 932, annex 2. Geneva ; 2004 : 73-131, 137.
2. Derzhavna Farmakopeia Ukrainy. Pershe vydannia. Dopovnennia 4 [National Pharmacopoeia of Ukraine. First Edition. Supplement 4]. Kharkiv ; 2011 : 538 p. (in Ukrainian).
3. Netrebko O.K. Peditriia. 2007; 86 (1) : 80-87.
4. Glushanova N.A. Biulleten sibirskoi meditsiny. 2003; 4 : 50-58 (in Russian).
5. Bondarenko V.M., Suvorov A.N. Simbioticheskie enterokokki i problema enterokokkovoii oportunisticheskoi infektsii [Symbiotic Enterococcus and Problem of Enterococcus Opportunistic Infection]. Moscow ; 2007 : 30 p. (in Russian)
6. Sidorov K.K. O klassifikatsii toksichnosti yadov pri parenteralnykh sposobakh vedeniia [On Classification of Poisons' Toxicity at Parenteral Ways of Introductions]. In : Toksikologiya novykh promyshlennykh khimicheskikh veshchestv [Toxicology of New Industrial Chemical Substances]. Moscow ; 1973 ; Iss. 13 : 47-60 (in Russian).
7. Mediko-biologicheskie issledovaniia proizvodstvennykh shtammov mikroorganizmov i toksikologo-gigienicheskaia otsenka mikrobnnykh preparatov, opredelenie ikh bezopasnosti i obosnovanie gigienicheskikh normativov i reglamentov : metodicheskie ukazaniia. Uverzhdeny MOZ Ukrainy Prikaz № 521 26.10.2004 [Medico-Biological Investigations of the Industrial Strains of Microorganisms and Toxicological-Hygienic Assessment of the Microbial Preparations, Determination of their Safety and Substantiation of the Hygienic Standards and Regulations : Methodical Instructions] (in Russian).

Надійшла до редакції 08.02.2015