

ВЛИЯНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ГИПОТИРЕОЗА НА МЕТАБОЛИЗМ КОСТНОЙ ТКАНИ И МИНЕРАЛЬНЫЙ ОБМЕН

Феликс Хусаинович Камиллов, Валерий Николаевич Козлов, Тимур Ирекович Ганиев,
Ренат Рамизович Юнусов*

Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа, Россия

Поступила 18.10.2017; принята в печать 31.10.2017.

Реферат

DOI: 10.17750/KMJ2017-971

Цель. Характеристика изменений маркеров костного ремоделирования и показателей минерального обмена при экспериментальном мерказолиловом гипотиреозе у крыс.

Методы. Развитие гипотиреоза у половозрелых самцов белых крыс, вызываемого внутрижелудочным введением в течение 3 нед мерказолила из расчёта 2,5 мл/100 г массы тела животного, контролировали определением содержания в сыворотке крови общих трийодтиронина, тироксина, тиреотропного гормона. По завершении интоксикации в сыворотке крови опытной и контрольной групп крыс изучали содержание Ca, P, Mg, C-концевых телопептидов коллагена типа I, костной щелочной фосфатазы, паратгормона, тестостерона, фолликулостимулирующего и лютеинизирующего гормонов, провоспалительных цитокинов (интерлейкина-1β и фактора некроза опухоли α).

Результаты. Установлено, что мерказолиловый гипотиреоз приводит к снижению содержания в сыворотке крови маркеров метаболизма костной ткани, C-концевых телопептидов (β-Cross Laps), костной щелочной фосфатазы, характеризуя замедление процессов ремоделирования. Снижение содержания в крови содержания Ca и P при этом не выявлено. При экспериментальном гипотиреозе, вызываемом введением мерказолила у самцов крыс, происходят сдвиги в гормональном и цитокиновом балансе. Обнаружены снижение содержания тестостерона, повышение уровней гонадотропинов, паратиреоидного гормона, интерлейкина-1β, интерлейкина-6 и фактора некроза опухоли α.

Вывод. При экспериментальном гипотиреозе, развивающемся при введении мерказолила, нарушение костного и минерального обмена — следствие не только прямого влияния тиреоидных гормонов на костную ткань, но и изменения гормонального и цитокинового статуса.

Ключевые слова: экспериментальный гипотиреоз, метаболизм костной ткани, фосфорно-кальциевый обмен, воспаление.

Ключевые слова: экспериментальный гипотиреоз, метаболизм костной ткани, фосфорно-кальциевый обмен, воспаление.

INFLUENCE OF EXPERIMENTAL HYPOTHYROIDISM ON BONE TISSUE METABOLISM AND MINERAL EXCHANGE

F.Kh. Kamilov, V.N. Kozlov, T.I. Ganiev, R.R. Yunusov

Bashkir State Medical University, Ufa, Russia

Aim. Characteristics of the changes of bone remodeling markers and mineral metabolism parameters in experimental mercazolilum-induced hypothyroidism in rats.

Methods. Development of hypothyroidism in sexually mature male rats caused by 3-week-long intragastric administration of mercazolilum at a dose of 2.5 ml/100 g of animal weight, was monitored by measurement of the total serum triiodothyronine and thyroxine, and thyroid-stimulating hormone. At the end of intoxication, in the serum of experimental and control rat groups the concentration of Ca, P, Mg, C-terminal telopeptides of collagen type I, bone alkaline phosphatase, parathyroid hormone, testosterone, follicle-stimulating and luteinizing hormones, pro-inflammatory cytokines (interleukin-1β and tumor necrosis factor α) was measured.

Results. It was found that mercazolilum-induced hypothyroidism leads to a decrease of serum levels of bone tissue metabolism markers, C-terminal telopeptides (β-Cross Laps), and bone alkaline phosphatase, characterizing slowing of remodeling processes. Decrease of Ca and P concentration in the blood was not observed in such cases. In experimental hypothyroidism caused by mercazolilum administration to male rats, shifts in hormones and cytokine balance occur. Decrease of testosterone, increase of levels of gonadotropins, parathyroid hormone, interleukin-1β, interleukin-6 and tumor necrosis factor α was observed.

Conclusion. In experimental hypothyroidism developing after mercazolilum administration, disorder of bone and mineral metabolism not only is a consequence of direct influence of thyroid hormones on bone tissue, but is also mediated by changes in hormone and cytokine status.

Keywords: experimental hypothyroidism, bone tissue metabolism, phosphate and calcium homeostasis, inflammation.

В отличие от большинства гормонов, которые способны оказывать регулирующий эффект на определённые клетки, ткани и системы, йодированные гормоны щитовидной железы обладают плейотропным действием и являются пептидами, зна-

чальную функцию которых трудно идентифицировать.

При этом благодаря специфическому монокарбоксилатному транспортёру MCT-8 (от англ. MonoCarboxylate Transporter-8) они проникают внутрь клетки и с помощью ядерных рецепторов принимают непосредственное участие в контроле экспрессии

Содержание тиреотропного и тиреоидных гормонов в сыворотке крови самцов крыс при интоксикации мерказолилом

Гормоны	Контрольная группа, n=10	Опытная группа, n=16	p
Тиреотропин, мкМЕ/л	1,11±0,105	1,95±0,094	0,007
Общий тироксин, нмоль/л	76,6±3,33	60,4±2,43	0,036
Общий трийодтиронин, нмоль/л	3,11±0,19	1,75±0,108	0,005

«мишеневых» генов [1]. Как правило, они влияют на значительный диапазон типов клеток в большинстве органов и тканей, включая костную ткань. Остеобласты и остеокласты экспрессируют обе изоформы рецептора тиреоидных гормонов — TR β и TR α , однако экспрессия TR α в 10 раз выше, чем TR β , это свидетельствует, что TR α служит основным медиатором действия трийодтиронина (T₃) на скелет [2].

Как гипотиреоз, так и гипертиреоз ассоциируются с риском развития остеопороза [3]. Гипотиреоз приводит к снижению скорости ремоделирования кости с увеличением продолжительности времени цикла этого процесса [4]. Дисбаланс циклов ремоделирования при гипотиреозе приводит к снижению костной массы, нарушению микроструктуры с ухудшением качества кости и повышением риска переломов. При гипотиреозе преимущественно страдает губчатая кость, а в кортикальной кости возможна даже избыточная минерализация [5]. Однако это не приводит к снижению риска переломов. Механизмы ухудшения качества кости до конца не изучены. По данным одних авторов [6], тиреоидные гормоны оказывают влияние на доступность и реализацию эффекта половых гормонов (андрогенов и/или эстрогенов), другие авторы [1] связывают их действие с изменением активности в костной ткани дейодиназ D2 (активатора образования T₃) и D3 (инактиватора T₃) в остеобластах, третьи [7] — со стимулированием T₃ в остеобластах эффекта инсулиноподобного фактора роста.

Целью работы была характеристика изменений маркёров костного ремоделирования и показателей минерального обмена при экспериментальном мерказолиловом гипотиреозе у крыс.

Эксперименты проведены на 26 самцах половозрелых имбредных белых крыс с массой тела 200–210 г в строгом соответствии с этическими нормами и рекомендациями по гуманному отношению к лабораторным животным, отражёнными в Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экс-

периментальных и других научных целей, и согласно приказу Министерства здравоохранения Российской Федерации №708н от 23.08.2010 «Об утверждении правил лабораторной практики». Животных содержали в стандартных условиях вивария при естественном освещении, на стандартной диете лабораторных животных (ГОСТ 50258-92).

У крыс опытной группы моделировали гипотиреоз путём ежедневного введения в желудок с помощью металлического зонда мерказолила из расчёта 2,5 мг/100 г массы тела в течение 3 нед [8]. Животных под лёгким эфирным наркозом выводили из эксперимента на 22-е сутки, в сыворотке крови определяли содержание кальция, магния, фосфора колориметрическими методами наборами реагентов HUMAN (Германия), маркёров ремоделирования кости — С-концевых телопептидов коллагена типа I (β -CTX, реагенты «Serum CrossLaps™ ELISA» фирмы Nordic Bioscience Diagnostis a/s), костной щелочной фосфатазы (реагенты «Metra VAF Kit» фирмы Quidel Corporation), уровни тиреотропина, общих T₃ и тироксина, тестостерона, фолликулостимулирующего и лютеинизирующего гормонов, паратгормона (реагенты ЗАО «Вектор-Бест», Россия), интерлейкинов-1 β (ИЛ-1 β) и -6 (ИЛ-6), фактора некроза опухоли α (ФНО α , реагенты ТОО «Цитокиновый контур», Россия) методом иммуноферментного анализа на анализаторе Stat Fox 2100 (США) и полуавтоматическом анализаторе «Униплан» (Россия) согласно протоколам производителей.

Статическую обработку результатов осуществляли с использованием пакета программ Statistica 6,0 (Stat Soft) с расчётом арифметической средней (M), стандартной ошибки средней (m) с оценкой значимости групповых различий по t-критерию Стьюдента.

Результаты определения в сыворотке крови опытной группы животных тиреотропина, T₃ и тироксина свидетельствуют о развитии гипопункции щитовидной железы. После введения мерказолила происходило снижение секреции T₃ и тироксина на фоне повышения содержания тиреотропина (табл. 1).

Таблица 2

Содержание показателей минерального обмена и маркёров метаболизма костной ткани при мерказолиловом гипотиреозе у самцов крыс

Показатели	Контрольная группа, n=10	Опытная группа, n=16	p
Са общий, ммоль/л	2,24±0,087	2,00±0,092	0,063
P, ммоль/л	1,81±0,054	1,70±0,051	0,318
Mg, ммоль/л	0,86±0,063	0,80±0,036	0,473
Костная щелочная фосфатаза, МЕ/л	6,1±0,46	4,7±0,31	0,038
β-СТХ, нг/л	0,87±0,06	0,75±0,03	0,041

Таблица 3

Содержание некоторых гормонов и цитокинов в сыворотке крови у самцов крыс при экспериментальном гипотиреозе

Показатели	Контрольная группа, n=10	Опытная группа, n=16	p
Паратгормон, нг/мл	16,4±0,22	22,1±0,19	0,003
Тестостерон, нмоль/л	23,6±0,88	20,5±0,72	0,048
Фолликулостимулирующий гормон, МЕ/л	2,86±0,116	3,70±0,245	0,024
Лютеинизирующий гормон, МЕ/л	2,26±0,195	2,98±0,161	0,051
ИЛ-1β, пг/мл	12,1±1,07	18,7±0,81	0,036
ИЛ-6, пг/мл	15,2±0,48	18,2±0,39	0,05
ФНОα, пг/мл	15,9±0,79	23,1±0,91	0,026

Примечание: ИЛ — интерлейкин; ФНОα — фактор некроза опухоли α.

Определение содержания в сыворотке крови опытной группы крыс маркёров метаболизма костной ткани свидетельствует о выраженных изменениях (табл. 2). Статически значимо снижается как уровень маркёров костной резорбции β-СТХ, так и маркёра костеобразования — костной щелочной фосфатазы, отражая замедление процессов ремоделирования, что в конечном итоге приводит к снижению костной массы [3, 9].

Установлена статически значимая корреляция между уровнем такого маркёра костеобразования, как остеокальцин, и свободного тироксина, что подтверждает прямое влияние гормонов щитовидной железы на функции остеобластов [10]. Тиреоидные гормоны оказывают действие на остеобласты через сигнальную систему ядерных рецепторов (TR-α₁, TR-α₂, TR-β₁), индуцируя экспрессию лиганда рецептора активатора ядерного фактора κB (RANKL — от англ. Receptor Activator of Nuclear κB factor Ligand) с последующим связыванием и активацией рецептора RANKL на предшественниках остеокластов, приводящими к стимуляции остеокластогенеза [1].

Статистически значимых изменений в сыворотке крови у животных с гипотиреозом содержания кальция, фосфора и магния не отмечено, хотя обнаружена тенденция к снижению их уровней.

При гипотиреозе установлено повышение секреции паратгормона как адапта-

ционная реакция на замедление костного ремоделирования с развитием гипокальциемии, а также увеличение уровня кальцитриола [11]. Тиреоидные гормоны оказывают сложное влияние на обмен фосфора, увеличивая фосфатурию и одновременно повышая его почечную реабсорбцию [9]. Не случайно данные литературы относительно метаболизма фосфора при гипотиреозе противоречивы. Одни авторы сообщают, что тиреотоксикоз сопровождается гиперфосфатемией, другие устанавливали нормальные концентрации фосфора и даже гипофосфатемии [9, 12].

Влияние на метаболизм костной ткани и минеральный обмен тиреоидные гормоны, вероятно, осуществляют и косвенным путём, оказывая действие на другие системные гормоны и тканевые регуляторные факторы. Помимо установленного контррегуляторного феномена между тиреоидными гормонами и паратгормоном, показано, что T₃ и кальцитриол синергично действуют на остеокластогенез [13]. Есть указания на изменение под влиянием T₃ уровней гормона роста, инсулиноподобного фактора роста, ИЛ-6, простагландина E₂, половых гормонов [13, 14].

Изучение уровня некоторых гормонов и цитокинов в сыворотке крови крыс с мерказолиловым гипотиреозом также свидетельствует о влиянии тиреоидных гормонов на гормональный статус организма (табл. 3). У

крыс опытной группы статически значимо увеличены все исследуемые показатели (паратгормон, фолликулостимулирующий и лютеинизирующий гормоны, ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ФНО α), кроме основного полового гормона в мужском организме — тестостерона. Повышение уровня гонадотропных гормонов гипофиза на фоне некоторого снижения концентрации тестостерона свидетельствует о том, что у крыс опытной группы при гипотиреозе сохраняется центральная регуляция синтеза и секреции андрогенов и физиологических реципрокных отношений между компонентами гормональной оси гипоталамус-гипофиз-гонады.

Обращает внимание, что при интоксикации мерказолилом у животных с гипотиреозом увеличивается в сыворотке крови содержание провоспалительных цитокинов: ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ФНО α . Провоспалительные цитокины в костной ткани индуцируют образование матриксных металлопротеиназ, тормозят синтез их ингибиторов, повышают продукцию RANKL, тормозят миграцию остеобластов, вызывают апоптоз остеоцитов и активируют остеокластогенез и функции остеокластов [9, 15, 16].

Связано ли повышение секреции провоспалительных цитокинов с развитием гипофункции щитовидной железы под действием мерказолила или с непосредственным влиянием токсиканта на клетки-продуценты изученных цитокинов — требует дальнейших исследований. Тем не менее, результаты проведённых исследований показывают, что при развитии гипотиреоза нарушение костного ремоделирования и минерального обмена — следствие не только непосредственного влияния тиреоидных гормонов на остеобласты и остеокласты. Они могут быть связаны и с другими механизмами их действия.

ВЫВОДЫ

1. Ежедневное внутривнутреннее введение мерказолила в дозе 2,5 мг/100 г массы тела животных в течение 21 сут приводит к развитию изменений, характерных для гипотиреоза: происходит снижение содержания в сыворотке крови тиреоидных гормонов (трийодтиронина и тироксина) при повышении концентрации тиреотропина.

2. Экспериментальный гипотиреоз характеризуется нарушением течения процессов костного метаболизма, что находит своё отражение в снижении содержания

в сыворотке крови как маркера резорбции кости С-концевых телопептидов коллагена типа I, так и маркера костеобразования — костной щелочной фосфатазы. Показатели минерального обмена — уровни Ca, P и Mg — в сыворотке крови при мерказолиловом гипотиреозе не меняются.

3. Экспериментальный мерказолиловый гипотиреоз у самцов крыс сопровождается снижением секреции тестостерона, увеличением содержания гонадотропинов, паратиреоидного гормона, провоспалительных цитокинов (интерлейкинов-1 β и -6, фактора некроза опухоли α), что свидетельствует о сложном механизме развития нарушений костного и минерального обмена.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов по представленной статье.

ЛИТЕРАТУРА

1. Nicholls J.J., Brassil N.J., Williams G.R., Bassert J.H. The skeletal consequences of thyrotoxicosis. *J. Endocrinol.* 2012; 213: 209–211. DOI: 10.1530/JOE-12-0059.
2. Freitas F.R., Moristoc A.S., Jorgetti V. et al. Spared bone mass in rat treated with thyroid hormone receptor TR β — selective compound GC-1. *Am. J. Physiol. Endocrinol.* 2003; 285: E1135–E1145. DOI: 10.1152/ajpendo.00506.2002.
3. Ночевная Л.Б., Павленко О.А., Калинина О.Ю., Столяров В.А. Состояние костной ткани у больных с впервые выявленным гипотиреозом. *Сибирский мед. ж.* 2011; 26 (4): 189–193. [Nochevnaya L.B., Pavlenko O.A., Kalinina O.Yu., Stolyarov V.A. The state of bone tissue in patients with new-onset hypothyroidism. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal.* 2011; 26 (4): 189–193. (In Russ.)]
4. Bassett J.H., Boyde A., Howell P.G. et al. Optimal bone strength and mineralization requires the type 2 iodothyronine deiodinase in osteoblast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010; 107 (6): 7604–7609.
5. Gouveia C.H., Jorgetti V., Bianco A.C. Effect of thyroid hormone administration and estrogen deficiency on bone mass of female rats. *J. Bone Miner. Res.* 1997; 12: 2098–2107. DOI: 10.1359/jbmr.1997.12.12.2098.
6. Krassas G.E., Poppe K., Glinioer D. Thyroid function and human reproductive health. *Endocrine Reviews.* 2010; 31 (6): 702–735. DOI: 10.1210/er.2009-0041.
7. Varga F., Rumpler M., Kiaushofer K. Thyroid hormone increase insulin-like growth factor mRNA levels in the clonal osteoblastic cell line MC3T3 — E1. *FEBS Lett.* 1994; 345: 67–70. DOI: 10.1016/0014-5793(94)00442-0.
8. Козлов В.Н. Тиреоидная трансформация при моделировании эндемического эффекта у белых крыс в эксперименте. *Сибирский мед. ж.* 2006; (5): 27–30. [Kozlov V.N. Thyroid transformation at modeling endemic effect of white rats under experiment. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal.* 2006; (5): 27–30. (In Russ.)]
9. Cardoso L.F., Maciel L.M., de Paula F.J.A. The multiple effects of thyroid disorders on bone and mineral metabolism. *Arg. Bras. Endocrinol. Metab.* 2014; 58 (5): 452–462. DOI: 10.1590/0004-2730000003311.
10. Schwarz A.N., Sellmeyer D.E., Strotmeyer E.S. et

al. Diabetes and bone loss at the hip in older black and white adults. *J. Bone Miner. Res.* 2005; 20 (4): 596–603. DOI: 10.1359/JBMR.041219.

11. Казимирко В.К., Коваленко В.Н., Мальцев В.Н. *Остеопороз: патогенез, клиника, профилактика и лечение*. 2-е изд. Киев: Морсион. 2006; 159 с. [Kazimirko V.K., Kovalenko V.N., Mal'tsev V.N. *Osteoporoz: patogenez, klinika, profilaktika i lechenie*. 2-e izd. (Osteoporosis: pathogenesis, clinic, prevention and treatment. 2nd ed.) Kiev: Morion. 2006; 159 p. (In Russ.)]

12. Pantazi H., Papapetrou P.D. Changes in parameters of bone and mineral metabolism during therapy for hyperthyroidism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2000; 85 (3): 1099–1106. DOI: 10.1210/jcem.85.3.6457.

13. Gruber R., Cherwenka K., Wolf F. et al. Expression

of vitamin D receptor, of estrogen and thyroid hormone receptor alpha- and beta-isoform, and androgen receptor in cultures of native mouse bone marrow and of stromal/osteoblastic cells. *Bone*. 1999; 24: 465–473. DOI: 10.1016/S8756-3282(99)00017-4.

14. Bassett J.H., Williams G.R. The skeletal phenotypes of TR alpha and TR beta mutant mice. *J. Mol. Endocrinol.* 2009; 42: 269–282. DOI: 10.1677/JME-08-0142.

15. Wei S., Kitaura H., Zhou P. et al. IL-1 mediates TNF-induced osteoclastogenesis. *J. Clin. Invest.* 2005; 115: 282–290. DOI: 10.1172/JCI200523394.

16. Zhdo B., Gimes S., Li S. et al. TNF — induced osteoclastogenesis and inflammatory bone resorption are inhibited by transcription factor RBP-J. *J. Exp. Med.* 2012; 209 (2): 319–334. DOI: 10.1084/jem.20111566.

УДК 613.2.038: 612.353: 616.5-078

© 2017 Линецкая О.И. и соавторы

ВЛИЯНИЕ ВЫСОКОБЕЛКОВОГО РАЦИОНА ПИТАНИЯ НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ СПОСОБНОСТЬ ПЕЧЕНИ КРЫС И ВОЗМОЖНОСТИ КОРРЕКЦИИ НАРУШЕНИЙ

Ольга Игоревна Линецкая*, Елена Александровна Нургалева, Эсфирь Исааковна Эткина, Алла Аркадьевна Фазылова, Зинфира Раисовна Гарипова

Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа, Россия

Поступила 10.10.2017; принята в печать 31.10.2017.

Реферат

DOI: 10.17750/KMJ2017-975

Цель. Изучить изменения биохимических параметров сыворотки крови, качественного и количественного состава микробиоты толстой кишки, кала крыс препубертатного возраста с высокобелковым типом питания и последующей коррекцией пробиотическим препаратом «Нормобакт».

Методы. Для создания модели использовали крыс линии Вистар, получавших высокобелковую пищу (35% общего рациона) в течение 7 нед (первая группа). Второй группе подопытных животных проводили коррекцию препаратом «Нормобакт» длительностью 2 нед. Контрольная группа находилась на сбалансированном типе питания. Биохимические параметры сыворотки крови оценивали с использованием автоматического биохимического анализатора СА-400 (Япония) с жидкими стабильными диагностическими наборами (Diasys, Германия). Для бактериологического исследования проводили забор фекалий, ткани толстой кишки лабораторных животных.

Результаты. У животных на фоне высокобелковой диеты биохимические параметры сыворотки крови характеризовались высокими показателями аспаратаминотрансферазы, аланинаминотрансферазы, общего белка, триглицеридов в сравнении с контролем, а содержание холестерина и Апо-А1-протеина, напротив, снижалось. В микрофлоре толстой кишки и кала уровень условно-патогенной микрофлоры оставался неизменным, показатели *Bifidobacterium spp.* и *Lactobacillus spp.* были достоверно ниже соответствующих значений контрольной группы. Коррекция препаратом «Нормобакт» приводила к достоверному снижению показателей аспаратаминотрансферазы, общего белка и глюкозы в сыворотке крови. Кроме этого, в микробиоте толстой кишки и кала уровень условно-патогенной микрофлоры снижался до нуля, однако достоверно повышалось содержание *Lactobacillus spp.* и *Bifidobacterium spp.* в сравнении с группой крыс без коррекции биотиком.

Вывод. Высокобелковая диета оказывает негативное воздействие на функциональную способность печени, вызывая повышение активности аминотрансфераз, изменение показателей холестеринового и белкового обмена, сопровождается изменениями микробиоты кишечника и кала; использование препарата «Нормобакт» способствует нормализации показателей; на фоне увеличения содержания *Lactobacillus spp.* и *Bifidobacterium spp.* деградируют количественные показатели условно-патогенной микрофлоры

Ключевые слова: высокобелковое питание, биохимический профиль сыворотки крови, микробиота кишечника и кала, пробиотики, функции печени.

INFLUENCE OF HIGH-PROTEIN DIET ON THE FUNCTIONAL ABILITY OF THE LIVER IN RATS AND CORRECTION POSSIBILITIES

O.I. Linetskaya, E.A. Nurgaleeva, E.I. Etkina, A.A. Fazylova, Z.R. Garipova

Bashkir State Medical University, Ufa, Russia

Aim. To study the changes of biochemical parameters of blood serum, the qualitative and quantitative composition of the large intestinal microbiota, the feces of prepubertal rats with a high-protein type of nutrition and following correction with the probiotic «Normobakt».

Methods. To create a model, Wistar rats were used, who received a high-protein diet (35% of the total diet) for 7 weeks (group 1). The second group of laboratory animals received «Normobakt» preparation for 2 weeks. The control group was on a balanced diet. Biochemical parameters of blood serum were evaluated using an automatic biochemical analyzer CA-400 (Japan) with liquid stable diagnostic kits (Diasys, Germany). For bacteriological study, samples of feces and large intestine tissues of the laboratory animals were obtained.