

УДК 616.341-008.87-019

Л. І. Сидорчук

Буковинський державний медичний
університет, м. Чернівці

АВТОХТОННА ОБЛІГАТНА, ФАКУЛЬТАТИВНА АНАЕРОБНА ТА АЕРОБНА МІКРОБІОТА ПОРОЖНИНИ ДИСТАЛЬНОГО ВІДДІЛУ ТОНКОЇ КИШКИ СПЛЕНЕКТОМОВАНИХ БІЛИХ ЩУРІВ

Ключові слова: нормальна мікробіота, тонка кишка, спленектомовані тварини.

Резюме. В експериментальних умовах на білих щурах після спленектомії (імунодефіцитний стан) показано зниження популяційного рівня автохтонних облигатних анаеробних бактерій роду *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Lactobacillus* за одночасної елімінації бактерій роду *Peptostreptococcus* та *Enterococcus*. Закономірним серед тварин виявилися зростання популяційного рівня стафілококів і контамінація порожнини дистального відділу тонкої кишки патогенними й умовно-патогенними ентеробактеріями, пептококом та клостридіями, які досягають мінімального популяційного рівня.

Вступ

Селезінка є периферійним непарним лімфоїдним органом системи імунітету, в якому здійснюється лімфотік у регіонарні лімфатичні вузли першого, другого порядку та формуються різні типи системної імунної відповіді. У селезінці є тимусзалежні (паракортикальні) та тимуснезалежні (гермінативні) центри, де здійснюється затримка антигенів, які несуть генетично чужорідну інформацію, як і патологічно змінених клітин, в тому числі «старих» еритроцитів. Саме цей орган є місцем диференціації, дозрівання і проліферації лімфоцитів, синтезу імуноглобулінів усіх класів та формування різних типів імунної відповіді [2].

На сьогодні загальновідомим є той факт, що будь-які хірургічні втручання сприяють пригніченню функції імунокомпетентних клітин. Такий стан організму людини чи тварини іменують «япрогеним імунодефіцитом», який формується вже впродовж перших чотирьох годин післяопераційного періоду і може тривати навіть до трьох діб [3, 6, 9].

Виняткове значення у формуванні інфекційно-патологічного процесу має дистальний відділ тонкої кишки, який характеризується підвищеною васкуляризацією та локалізацією потужних лімфоїдних скупчень, асоційованих зі слизовою оболонкою (бляшки Пейера), поверхня якої має високу здатність щодо резорбції антигенів, в тому числі мікроорганізмів [8, 10]. Це надає їм особливої схильності до контакту з мікроорганізмами, ксенобіотиками та іншими складовими компонентами. У цього відділі кишечника постійно персистують автохтонні облигатні анаеробні бак-

терії родів *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Lactobacillus*, *Peptostreptococcus* та факультативно анаеробні бактерії родів *Enterococcus*, *Escherichia*, які складають головну мікробіоту кишечника. Регуляція якісного та кількісного складу мікрофлори травного тракту здійснюється системними компонентами імунної відповіді, а також локальною імунною системою слизових оболонок [1, 2, 12]. У спленектомованих тварин формується набутий імунодефіцитний стан, який може порушити регуляторну функцію мікробіоти порожнини кишечника і ступінь цих порушень необхідно встановити.

Мета дослідження

Вивчити якісний та кількісний склад мікробіоти вмісту порожнини дистального відділу тонкої кишки спленектомованих білих щурів.

Матеріал і методи

Бактеріологічним методом досліджено вміст порожнини дистального відділу тонкої кишки у 17 білих щурів масою 220-240 г. До контрольної групи віднесені 10 тварин, а 7 щурів були спленектомовані (дослідна група). Останнім у стерильних умовах виконали оперативне втручання з метою доступу до селезінки з наступним закриттям післяопераційної рани. Дослідним щурам після відповідного доступу до селезінки проводили видалення органу. Після цього протягом двох місяців (60 діб) спостерігали за поведінкою тварин, прийомом корму, реакцією на зовнішні подразники. Далі контрольних та дослідних щурів

забивали під ефірним наркозом. Експериментальна робота проводилася з повним дотриманням основних положень GLP (1981 р.), «Правил проведення робіт з використанням експериментальних тварин» (1977 р.), Конвенції Ради Європи про охорону хребетних тварин, що використовують в експериментах на інших наукових цілях від 18.03.1986 р., Директиви ЄЕС №609 від 24.11.1986 р. і наказу МОЗ України № 281 від 01.11.2000 р. Комісією з питань біомедичної етики БДМУ порушення морально-етичних норм під час досліджень не виявлені.

У стерильних умовах відкривали черевну порожнину, відбирали частину (1,5-2 см) товстої кишки з її вмістом. У стерильних умовах пінцетом витискали вміст кишки на стерильний вощений папір і зважували. До цього вмісту додавали десятикратний об'єм стерильного фізрозчину. З цієї суміші готували серійний десятикратний титраційний ряд пробірок з концентрацією вихідної суміші від 10^{-2} до 10^{-10} . Стерильними мікропіпетками брали з кожної пробірки по 0,1 мл і наносили на відповідні тверді живильні середовища, оптимальні для кожного роду мікробів, де за допомогою стерильного шпателя здійснювали посів на сектори чашок Петрі.

Посів факультативних анаеробних та аеробних мікроорганізмів культивували у термостаті (37 °С) протягом 24-48 годин. Посів облигатних анаеробних бактерій вирощували у стаціонарному анаеростаті «CO₂-Incubator T-125» протягом 5-7 діб (при появі росту), інколи до 14 діб. Після цього вивчали отримані однотипові колонії для кожного роду мікробів, з колоній одержували чисті культури облигатних і факультативних анаеробних та аеробних мікроорганізмів. Чисті культури ідентифікували до роду (виду) за морфо-тинкторіальними, культуральними і біохімічними властивостями [4, 5].

Враховуючи те, що число бактерій та дріжджоподібних грибків роду *Candida* на одиницю об'єму сягає мільйонів та мільярдів, для зручності викладу матеріалу вираховували десятковий логарифм кількісних показників (lg КУО/г) мікрофлори.

Математично-статистичний аналіз одержаних результатів проводили за методом варіаційної статистики з визначенням середньої величини, середньої похибки, ймовірність можливої помилки показників визначали за статистичним *t* критерієм Стьюдента.

Обговорення результатів дослідження

Мікрофлора будь-якого біотопу людини і тварин характеризується видовим складом і популяційним рівнем. Ці показники, як правило, стабільні для кожного біотопу, в тому числі і в порожнині ди-

стального відділу тонкої кишки. Однак імунодефіцитний стан у тварин, який формується після видалення будь-якого периферичного органу імунної системи може вплинути на взаємовідносини у системі «мікроорганізм-макроорганізм». [7, 11].

Тому першим етапом досліджень було встановлення видового складу мікробіоти вмісту порожнини дистального відділу тонкої кишки. Результати аналізу якісного складу мікрофлори цього відділу кишечника в білих спленектомованих щурів порівняно з контрольною групою тварин наведені в табл. 1.

Як видно з одержаних та наведених в табл. 1 результатів мікробіологічного дослідження в інтактних тварин константними мікробами у порожнині дистального відділу тонкої кишки за індексом постійності і частотою зустрічання є автохтонні облигатні анаеробні бактерії родів *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Lactobacillus* та факультативно анаеробні бактерії роду *Enterococcus*, *Escherichia*, а також транзиторні аеробні грампозитивні стрептобацили (*B.subtilis*).

У спленектомованих білих щурів константна мікрофлора даного відділу тонкої кишки за індексом постійності і частотою зустрічання представлена також автохтонними облигатними анаеробними бактеріями родів *Bifidobacterium*, *Bacteroides* і *Lactobacillus*, а також факультативно анаеробними бактеріями родів *Escherichia* та *Staphylococcus*.

Водночас у частини дослідних тварин спостерігається елімінація бактерій родів *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Peptostreptococcus* (у всіх щурів) та факультативно анаеробних бактерій роду *Enterococcus* (у всіх тварин). Перераховані бактерії належать до головної, індигенної мікрофлори (за винятком стафілококів), що свідчить на користь суттєвих порушень мікробіоти порожнини дистального відділу тонкої кишки спленектомованих тварин. На цьому тлі відбувається контамінація порожнини тонкої кишки окремих тварин патогенними (ентеротоксигенними ешерихіями) та умовно-патогенними (бактеріями родів *Klebsiella*, *Edwardsiella*, *Erwinia*, *Proteus*) ентеробактеріями, а також облигатними анаеробними умовно-патогенними бактеріями родів *Clostridium* та *Peptococcus*.

Таким чином, у спленектомованих тварин у порожнині дистального відділу тонкої кишки за індексом постійності, частотою зустрічання константними мікроорганізмами є бактерії родів *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Lactobacillus*, *Escherichia* та *Staphylococcus*, що частково відрізняється від видового складу мікробіоти цього біотопу в інтактних тварин. Зміни якісного складу порож-

Таблиця 1

Видовий склад мікробіоти порожнини дистального відділу тонкої кишки білих щурів

Мікроорганізми	Спленектомовані тварини (n=7)			Інтактні тварини (n=10)		
	Виділено штамів	Індекс постійності	Частота зустрічальності	Виділено штамів	Індекс постійності	Частота зустрічальності
<i>Облігатні анаеробні бактерії</i>						
Біфідобактерії	6	85,7	0,14	10	100,0	0,17
Лактобактерії	5	71,4	0,11	10	100,0	0,17
Еубактерії	2	28,6	0,05	2	20,0	0,03
Бактероїди	5	71,4	0,11	10	100,0	0,17
Пептострептококи	0	-	-	2	20,0	0,03
Пептокок	2	28,6	0,05	0	-	-
Бактерії роду <i>Clostridium</i>	2	28,6	0,05	0	-	-
<i>Факультативно анаеробні та аеробні бактерії</i>						
Кишкова паличка	7	100,0	0,16	7	70,0	0,13
<i>E. coli Hly⁻</i>	2	28,6	0,05	-	-	-
Протеї	2	28,6	0,05	-	-	-
Едвардсієли	2	28,6	0,05	-	-	-
Клебсієли	3	42,9	0,07	-	-	-
Ервінії	2	28,6	0,05	-	-	-
Ентерококи	0	-	-	7	70,0	0,13
Стафілококи	4	57,1	0,09	2	20,0	0,03
Аеробні стрептобацили	0	-	-	9	90,0	0,16

Таблиця 2

Популяційний рівень мікробіоти порожнини дистального відділу тонкої кишки спленектомованих білих щурів (lg КУО/г, M±m)

Мікроорганізми	Спленектомовані тварини (n=7)			Інтактні тварини (n=10)			p
	Lg КУО/г	ККД	КЗ	Lg КУО/г	ККД	КЗ	
<i>Облігатні анаеробні бактерії</i>							
Біфідобактерії	5,17±0,48	104,0	0,17	6,65±0,19	115,1	0,20	<0,05
Лактобактерії	4,80±0,37	80,5	0,12	6,84±0,14	118,3	0,20	<0,01
Еубактерії	4,34±0,44	29,1	0,05	5,72±0,32	19,8	0,03	<0,05
Бактероїди	5,00±0,16	83,8	0,13	6,56±0,17	113,5	0,19	<0,001
Пептострептококи	0	-	-	5,80±0,21	20,7	0,03	-
Пептокок	4,50±0,50	30,2	0,05	0	-	-	-
Бактерії роду <i>Clostridium</i>	4,50±0,50	30,2	0,05	0	-	-	-
<i>Факультативно анаеробні та аеробні мікроорганізми</i>							
Кишкова паличка	5,22±0,15	122,5	0,20	5,88±0,41	71,2	0,12	>0,05
<i>E. coli Hly⁺</i>	3,45±0,21	23,2	0,04	0	-	-	-
Протеї	3,50±0,50	23,5	0,04	0	-	-	-
Едвардсієли	3,69±0,09	24,8	0,04	0	-	-	-
Клебсієли	3,72±0,06	37,5	0,06	0	-	-	-
Ервінії	3,69±0,09	24,8	0,04	0	-	-	-
Ентерококи	0	-	-	6,78±0,27	93,8	0,16	-
Стафілококи	3,84±0,03	25,8	0,05	2,30±0,08	8,00	0,01	<0,001
Аеробні стрептобацили	0	-	-	5,52±0,23	86,0	0,15	-

Примітка. ККД – коефіцієнт кількісного домінування; КЗ – коефіцієнт значущості; p – відповідний ступінь вірогідності порівняно з контролем

нинної мікрофлори дистального відділу тонкої кишки спленектомованих тварин слугують підста-

вою для вивчення кількісного складу мікробіоти даного біотопу в експериментальних білих щурів.

Результати вивчення кількісного складу мікробіоти порожнини дистального відділу тонкої кишки спленектомованих тварин наведені в табл. 2.

В інтактних тварин за популяційним рівнем, коефіцієнтом кількісного домінування і коефіцієнтом значущості до домінантних мікроорганізмів належать автохтонні облигатні анаеробні бактерії родів *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacteroides* і факультативно анаеробні бактерії роду *Enterococcus*, а також транзиторні грампозитивні стрептобацили й частково кишкові палички.

У спленектомованих щурів за вказаними аналітичними показниками до домінантних мікроорганізмів порожнини дистального відділу тонкої кишки належать також автохтонні облигатні анаеробні бактерії родів *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* і *Bacteroides*. Істотну роль у мікробіоценозу цього біотопу відіграють кишкові палички.

Характерним для мікробіоти порожнини дистального відділу тонкої кишки виявилось суттєве зниження популяційного рівня та аналітичних показників автохтонних облигатних анаеробних бактерій родів *Bifidobacterium* на 28,6%, *Lactobacillus* - на 42,5%, *Eubacterium* - на 31,8%, *Bacteroides* - на 31,2%, а факультативно анаеробних бактерій роду *Escherichia* - на 12,6% відповідно.

Водночас, із цього біотопу елімінують автохтонні анаеробні пептострептококи, факультативно анаеробні й аеробні бактерії роду *Enterococcus*. Такі зміни кількісного складу головної мікробіоти порожнини дистального відділу тонкої кишки призводять до контамінації цього біотопу патогенними та умовно-патогенними ентеробактеріями, які досягають мінімального (від $3,45 \pm 0,21$ до $3,72 \pm 0,06$ ІгКУО/г) популяційного рівня, а також пептококом, клостридіями і стафілококами, що також досягають низьких кількісних значень (від $3,84 \pm 0,03$ до $4,50 \pm 0,50$ ІгКУО/г).

Таким чином, в експериментальних умовах на білих дослідних щурах після спленектомії (імунodefіцитний стан) показано зниження популяційного рівня автохтонних облигатних анаеробних бактерій роду *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Lactobacillus* за одночасної елімінації бактерій роду *Peptostreptococcus* та *Enterococcus*. Закономірним у даній групі тварин вважаємо зростання популяційного рівня стафілококів і контамінацію порожнини дистального відділу тонкої кишки патогенними та умовно-патогенними ентеробактеріями, пептококом, клостридіями, які досягають мінімального популяційного рівня.

Висновки

1. За індексом постійності, частотою зустрічальності у порожнині дистального відділу тон-

кої кишки спленектомованих тварин константними мікроорганізмами є автохтонні облигатні анаеробні бактерії родів *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* і *Bacteroides* та факультативні анаеробні бактерії роду *Escherichia* і *Staphylococcus*. У цих тварин настає елімінація бактерій роду *Peptostreptococcus* і *Enterococcus*, а в частини дослідних білих щурів (14,3-28,6%) відмічено елімінацію навіть представників головної мікрофлори цього біотопу.

2. За популяційним рівнем, коефіцієнтами кількісного домінування і значущості до головної групи (домінантних мікроорганізмів) порожнини дистального відділу тонкої кишки спленектомованих тварин належать індигенні анаеробні бактерії родів *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* та *Bacteroides*, а також факультативно анаеробні бактерії роду *Escherichia*.

3. У спленектомованих тварин із порожнини дистального відділу тонкої кишки елімінують бактерії роду *Peptostreptococcus* та *Enterococcus*, на тлі чого відбувається контамінація цього біотопу у незначній кількості тварин (28,6-42,9%) патогенними (ентеротоксигенними ешерихіями) та умовно-патогенними ентеробактеріями (родів *Klebsiella*, *Edwardsiella*, *Erwinia*, *Proteus*), пептококом та бактеріями роду *Clostridium*, які досягають мінімального популяційного рівня.

Перспективи подальших досліджень

Одержані та викладені в статті результати є підставою для вивчення мікробіоти слизової оболонки (при-епітеліальної біоплівки) дистального відділу тонкої кишки спленектомованих тварин.

Література. 1. Бондаренко В.Н. Микрофлора человека: норма и патология / В.Н. Бондаренко // Наука в России. - 2007. - № 1. - С. 4-9. 2. Дранник Г.Н. Клиническая иммунология и аллергология / Г.Н. Дранник: СПб, Библиомед - 2003. - 604 с. 3. Кузнецова О.В. Роль цитокінів у механізмах розвитку післяспленектомічної А-клітинної гіпоергічної імунної реакції / Кузнецова О.В. // Бук. мед. вісник. - 2001. - Т.5, № 3-4. - С.177-179. 4. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* / Boone D. R., Castenholz R. W. - Vol. 1: The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria. - 2nd ed., 2001, XXI, 721 p. 5. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* / Brenner D. J.; Krieg N. R., Staley J. R. Vol. 2: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria. - 2nd ed., 2005. - XXVIII, 1108 p. 6. Di Sabatino A. Splenic hypofunction and the spectrum of autoimmune and malignant complications in celiac disease / Di Sabatino A., Rosado M.M., Cazzola P., Riboni R. // Clin. Gastroenterol. Hepatol. - 2006. - Vol. 4, № 2. - P. 179-186. 7. Ishikawa H. Effect of intestinal microbiota on the induction of regulatory CD25+ CD4+ T cells / Ishikawa H., Tanaka K., Maeda Y., Aiba Y. // Clin. Exp. Immunol. - 2008. - № 153, Vol. 1. - P. 127-135. 8. Kasper D.L. A paradigm for commensalism: the role of a specific microbial polysaccharide in health and disease / Kasper D.L. // Nestle Nutr. Workshop Ser. Pediatr. Program. - 2009. - Vol. 64. - P. 1-8. 9. Kimura F. Immunosuppression following surgical and traumatic injury / Kimura F., Shimizu H., Yoshidome H., Ohtsuka M. // Surg. Today. - 2010. - Vol. 40, № 9. - P. 793-808. 10. Liang Q.H. Influence of intestinal dysbacteriosis on immune and hematopoietic function in mice / Liang Q.H., Zhang L., Duan

S.C., Wang P // Zhonghua Er Ke Za Zhi. – 2004. – Vol. 42, № 9. – P. 708-711. 11. Vakhitov T.Y. Modulating effect of microflora metabolites of the human and animals on lymphoid tissue culture / Vakhitov T.Y., Chalisova N.I., Balikina N.A., Petrov L.N // Dokl. Biol. Sci. – 2009. – Vol. 428. – P. 395-397. 12. Todar's Online Textbook of Bacteriology // Available at <http://www.textbookofbacteriology.net/normalflora.html>

**АВТОХТОННАЯ ОБЛИГАТНАЯ,
ФАКУЛЬТАТИВНАЯ АНАЭРОБНАЯ И АЭРОБНАЯ
МИКРОБИОТА ПОЛОСТИ ДИСТАЛЬНОГО
ОТДЕЛА ТОНКОЙ КИШКИ
СПЛЕНЭКТОМИРОВАННЫХ БЕЛЫХ КРЫС**

Л. И. Сидорчук

Резюме. В экспериментальных условиях на белых крысах после спленэктомии (иммунодефицитное состояние) показано снижение популяционного уровня автохтонных облигатных анаэробных бактерий рода *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Lactobacillus* при одновременной элиминации бактерий рода *Peptostreptococcus* и *Enterococcus*. Закономерным среди животных оказались рост популяционного уровня стафилококков и контаминация полости дистального отдела тонкой кишки патогенными и условно-патогенными энтеробактериями, пептококками, клостридиями, которые достигают минимального популяционного уровня.

Ключевые слова: нормальная микрофлора, тонкая кишка, спленэктомированные животные.

**AUTOCHTHONOUS OBLIGATE, FACULTATIVE
ANAEROBIC AND AEROBIC MICROBIOTA OF THE
DISTAL PART OF THE SMALL BOWEL CAVITY OF
SPLENECTOMIZED ALBINO RATS**

L. I. Sydorчук

Abstracts. It have been demonstrated the decrease of population level of indigenous obligate anaerobic bacteria of the *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Lactobacillus* genera with the simultaneous elimination of the bacteria of *Peptostreptococcus* and *Enterococcus* genera in experimental conditions on albino rats after splenectomy (immunodeficiency state). Naturally, among animals there were the rise of population level of staphylococci and the contamination of distal part of the small bowel cavity with pathogenic and opportunistic pathogenic enterobacteria, peptococci, clostridium, which reached a minimum population level.

Key words: normal microflora, small bowel, splenectomized animals.

Bukovinian State Medical University (Chernivtsi)

Clin. and experim. pathol. - 2011. - Vol.10, №2 (36). - P.91-95.

Надійшла до редакції 24.05.2011

Рецензент – проф. С. С. Ткачук

© Л. І. Сидорчук, 2011