

*Д.В. Ротар
І.Й. Сидорчук*

Буковинський державний медичний
університет, м. Чернівці

СТАН МІКРОФЛОРИ ТОВСТОЇ КИШКИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ТВАРИН ПРИ НАБРЯКОВІЙ ФОРМІ ГОСТРОГО ПАНКРЕАТИТУ

Ключові слова: *гострий панкреатит, кишкова мікрофлора, дисбактеріоз.*

Резюме. *В експерименті на 35 білих щурах вивчено зміни мікрофлори товстої кишки при набряковій формі гострого панкреатиту. Встановлено, що протягом 24 год від початку захворювання розвивається дисбактеріоз товстої кишки, який прогресує до 120 год. У просвіті товстої кишки дисбіотичні зміни досягають 3-4 ступеня за рахунок елімінації облигатної автохтонної мікрофлори, колонізації та проліферації алохтонних та факультативних умовно патогених мікроорганізмів. Зміни колонізаційної резистентності слизової оболонки відповідають 2-3 ст дисбактеріозу та носять зворотній характер.*

Вступ

Гострий панкреатит (ГП) характеризується виключно високою агресією ферментних, цитокінових та оксидантних систем і часто супроводжується пошкодженням віддалених органів, у першу чергу кишкового тракту [2,3]. Порушення мікрофлори кишкового тракту призводять до формування кишкового дисбіозу, який значно обтяжує основне захворювання і часто виступає причиною гнійно-септичних ускладнень [4].

Мета дослідження

Вивчити зміни видового складу та популяційного рівня мікрофлори порожнини та слизової

оболонки товстої кишки експериментальних тварин із набряковою формою гострого панкреатиту.

Матеріал і методи

Набрякову форму експериментального гострого панкреатиту моделювали в 35 білих щурів масою 200-220 г шляхом внутрішньочеревинного уведення 2,5 г/кг L-аргініну за методом [5]. Контролем слугували 10 білих щурів такої ж маси, яким внутрішньоочеревинно вводили фізіологічний розчин. По 7 щурів кожної групи виводили з експерименту через 24, 48, 72, 96, 120 год. Усі експерименти проводили у відповідності до Ванкуверської декларації про проведення дослідів

на тваринах і положення з етики МОЗ України №281 від 01.11.2000 р. При лапаротомії в стерильних умовах видаляли 3 см дистального відділу ободової кишки, яку використовували для дослідження порожнинної та мукозної мікрофлори товстої кишки (ТК). З видаленої кишки пінцетом видавлювали вміст, який зважували, вносили в стерильну пробірку, додавали десятикратний об'єм (розведення 1:10) стерильного ізотонічного розчину натрію хлориду та ретельно розтирали скляною паличкою до утворення гомогенної маси. Після видалення вмісту відрізок кишки розрізали вздовж стерильними ножицями, 7 разів промивали в проточній стерильній дистильованій воді, зважували на стерильному вощеному папері та ретельно гомогенізували. З гомогенату кишкової стінки та вмісту готували серії десятикратних розведень від 10⁻² до 10⁻¹¹. Із кожного розведення робили висіви мірних об'ємів (0,1 мл) на відповідних живильних середовищах, де після інкубації підраховували кількість колоній і визначали популяційний рівень (ПР) кожної групи мікроорганізмів. Для виділення анаеробних бактерій посіви інкубували 5-10 діб у стаціонарному анаеростаті "CO₂-incubator T-125" фірми ASSAB Medicin AB (Швеція), а для аеробних бактерій і грибів - 1-2 доби в термостаті при температурі 37°C та 28°C відповідно. Ідентифікацію виділених культур анаеробних та аеробних бактерій проводили за морфологічними, тинкторіальними, культуральними, біохімічними властивостями та ознаками патогенності [1]. В окремих випадках для ідентифікації бактерій використовували систему API-20E, API-20A, API-20Staph, а також систему Ентеротест-1,2 [6]. Статистичну обробку результатів дослідження проводили з використанням критеріїв Стьюдента та Фішера.

Обговорення результатів дослідження

Із наведених даних табл. 1 випливає, що за видовим складом (ВС) та популяційним рівнем (ПР) до резидентних бактерій, які персистують у порожнині ТК тварин контрольної групи, належали бактероїди, ешерихії, аеробні стрептобацили, біфідобактерії, лактобактерії, ентерококи, еубактерії, стафілококи, фузобактерії та протеї. Інші мікроорганізми (превотели, пептокок, кластридії та пептострептокок) зустрічалися рідше і були другорядними. Склад мукозної мікрофлори, яка забезпечує колонізаційну резистентність, був представлений в основному лактобактеріями, бактероїдами, нормальною кишковою паличкою, біфідобактеріями та ентерококами. У 40% тварин слизову оболонку колонізували також стафілококи, у 30% - еубактерії та превотели.

Через 24 год після індукції ГП у просвіті ТК суттєво зменшувалася частота виділення найбільш фізіологічно важливих автохтонних облигатних мікроорганізмів: біфідобактерій на 63,4%, еубактерій - на 51,4%, лактобактерій - на 32,9%, аеробних стрептобацил - на 57,1%, ентерококів - на 47,1% та знижувалась їх концентрація на 2-3 порядки. Підтримання бактеріального пулу порожнини ТК забезпечувалося збільшенням ПР кишкової палички, стафілококів і кластридій на 2-2,6 lg КУО/мл та зростанням індексу постійності (С%) пептококів, пептострептококів та протею (табл. 1, 2). У вказаний термін відбувалася колонізація просвіту ТК умовно патогеними ентеробактеріями (едварсіслами і клебсіслами) та патогеними гемолітичними штамми ешерихій. Через 48 год спостерігалася повна елімінація еубактерій та аеробних стрептобацил, а через 72 год - ентерококів, одночасно знижувався ПР анаеробних облигатних біфідобактерій на 4,67 lg КУО/мл та лактобактерій на 4,9 lg КУО/мл, що супроводжувалося зростанням концентрації кластридій на 5,59 lg КУО/мл, кишкової палички на 3,01 lg КУО/мл та стафілококів на 1,82 lg КУО/мл. Поглиблення дисбалансу товстокишкового біоценозу сприяло подальшій контамінації та активній проліферації алохтонних патогених (гемолітичних) штамів *E. coli*, що проявлялося наростанням частоти їх виділення на 42,9% та концентрації до 7,69±0,20 lg КУО/мл, а також появи через 48 год у 14,3% тварин дріжджоподібних грибів роду *Candida*. Одночасно збільшувався надлишок умовно патогених ентеробактерій: на 72 год індекс постійності (С%) протеїв досягав 100%, едварсіел та клебсіел - 57,1%.

Розлади біоценозу вмісту ТК були найбільш значними через 96-120 год після індукції ГП. Відбувалася повна елімінація біфідобактерій та практично повне зникнення лактобактерій (виявлялися через 120 год тільки в одній тварині на низькому ПР). Частота виділення умовно патогених пептострептококів та пептокока досягала 85,7% та 100%, зростала концентрація стафілококів до 7,19±0,11 lg КУО/мл (при нормі - 4,49±0,18 lg КУО/мл), зберігався високий вміст кластридій, превотел та ентеробактерій (едварсіел, клебсіел, протею). Такі зміни створювали сприятливі умови для розвитку патогеної мікрофлори: С% гемолітичної кишкової палички досягав 85,7%, а в 71,4% спостережень через 96 год виявлялися дріжджоподібні гриби роду *Candida* на рівні 4,03±0,09 lg КУО/мл.

Порушувалася також і колонізаційна резистентність слизової оболонки ТК. Як випливає з даних табл. 2 через 24 год зменшувався ПР кишкової

Таблиця 1

Видовий склад мікрофлори просвіту товстої кишки при набряковій формі гострого панкреатиту (M+m)

Виділені мікроорганізми	К (n=10)			24 год (n=7)			48 год (n=7)			72 год (n=7)			96 год (n=7)			120 год (n=7)		
	N	C%	Pi	N	C%	Pi	N	C%	Pi	N	C%	Pi	N	C%	Pi	N	C%	Pi
Біфідобактерії	9	90	0,1	2	28,6	0,03	2	28,6	0,05	2	28,6	0,03	1	14,3	0,02	0	0	0
Лактобактерії	9	90	0,1	4	57,1	0,06	4	57,1	0,09	3	42,9	0,05	2	28,6	0,03	1	14,3	0,02
Бактероїди	10	100	0,11	7	100	0,11	7	100	0,16	7	100	0,11	7	100	0,11	7	100	0,11
Превотели	4	40	0,04	3	42,9	0,05	0	0	0	4	57,1	0,07	4	57,1	0,06	5	71,4	0,08
Еубактерії	8	80	0,09	2	28,6	0,03	0	0	0	0	0	0	1	14,3	0,02	1	14,3	0,02
Фузобактерії	5	50	0,05	2	28,6	0,03	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Пептокок	4	40	0,04	5	71,4	0,08	2	28,6	0,05	3	42,9	0,05	4	57,1	0,06	7	100	0,11
Пентострептококи	1	10	0,01	2	28,6	0,03	2	28,6	0,05	4	57,1	0,07	0	0	0	6	85,7	0,09
Клострідії	2	20	0,02	5	71,4	0,08	4	57,1	0,09	7	100	0,11	3	42,9	0,05	5	71,4	0,08
Ешеріхії	10	100	0,11	7	100	0,11	7	100	0,16	7	100	0,11	7	100	0,11	7	100	0,11
Гемолітичні ешеріхії	0	0	0	1	14,3	0,02	3	42,9	0,07	4	57,1	0,07	4	57,1	0,1	6	85,7	0,09
Едварсієли	0	0	0	4	57,1	0,06	4	57,1	0,09	4	57,1	0,07	5	71,4	0,08	5	71,4	0,08
Клебсієли	0	0	0	2	28,6	0,03	2	28,6	0,05	4	57,1	0,07	4	57,1	0,06	3	42,9	0,05
Протей	5	50	0,05	7	100	0,11	1	14,3	0,02	7	100	0,11	7	100	0,11	7	100	0,11
Ентерококи	9	90	0,1	3	42,9	0,05	1	14,3	0,02	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Аеробні стрептобацили	10	100	0,11	3	42,9	0,05	0	0	0	0	0	0	1	14,3	0,02	0	0	0
Стафілококи	6	60	0,07	6	85,7	0,09	4	57,1	0,09	5	71,4	0,08	5	71,4	0,08	5	71,4	0,08
Дріжджоподібні гриби роду Candida	0	0	0	0	0	0	1	14,3	0,02	0	0	0	5	71,4	0,08	0	0	0

Примітка. К - контрольна група. N - кількість виділених штамів. C% - індекс постійності. Pi - частота виявлення. * - p<0,05

Популяційний рівень мікрофлори просвіту товстої кишки при набряковій формі гострого панкреатиту (M+n)

Виділені мікроорганізми	К (n=10)			24 год (n=7)			48 год (n=7)			72 год (n=7)			96 год (n=7)			120 год (n=7)			
	ПР	С	ККД	ПР	С	ККД	ПР	С	ККД	ПР	С	ККД	ПР	С	ККД	ПР	С	ККД	
Біфідобактерії	8,96±0,31	0,11	104,4	5,02±0,09	0,02	21,2	4,91±0,18	0,04	22,8	4,37±0,19	0,02	18,4	4,00	0,01	9,37	-	0	0	0
Лактобактерії	9,87±0,33	0,13	115	6,14±0,17	0,06	52	4,97±0,19	0,07	46,1	5,03±0,23	0,04	31,7	4,31±0,18	0,02	20,2	4,00	0,01	8,6	8,6
Бактероїди	9,77±0,37	0,14	126,5	7,63±0,18	0,12	113	8,01±0,16	0,21	130	7,77±0,17	0,13	114	7,44±0,14	0,14	122	7,71±0,22	0,12	116	116
Превотели	9,78±0,27	0,06	50,65	7,17±0,23	0,05	45,5	-	0	0	7,67±0,19	0,07	64,5	6,82±0,29	0,07	63,9	7,18±0,19	0,08	77	77
Еубактерії	9,37±0,34	0,11	97,06	8,01±0,08	0,04	33,9	-	0	0	-	0	0	4,15±0	0,01	9,72	4,20	0,01	9	9
Фузобактерії	8,17±0,27	0,06	52,89	6,78±0,11	0,03	28,7	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	0
Пептококи	8,78±0,27	0,05	45,48	7,92±0,21	0,09	83,8	7,54±0,23	0,06	34,9	7,39±0,21	0,05	46,6	7,25±0,21	0,08	67,9	7,47±0,18	0,12	112	112
Пептострептококи	8,89	0,01	11,51	7,34±0,17	0,03	31,1	8,11±0,27	0,06	37,6	7,26±0,29	0,07	61	-	0	0	6,83±0,23	0,09	88	88
Клостридії	3,29±0,21	0,01	8,52	5,29±0,21	0,06	56	7,37±0,24	0,11	68,3	7,88±0,24	0,13	116	7,66±0,27	0,06	53,8	7,81±0,22	0,09	84	84
Ешеріхії	5,11±0,17	0,07	66,17	7,57±0,11	0,12	112	6,58±0,09	0,17	107	8,12±0,11	0,14	119	7,94±0,21	0,15	130	7,92±0,14	0,13	119	119
Гемолітичні еширихії	-	0	0	5,78	0,01	12,2	5,69±0,13	0,06	39,6	7,69±0,2	0,07	64,6	7,15±0,28	0,11	100	7,07±0,23	0,1	91	91
Едварсієли	-	0	0	8,17±0,13	0,07	69,2	6,78±0,21	0,1	62,9	7,33±0,22	0,07	61,6	6,92±0,18	0,09	81	7,09±0,18	0,08	76	76
Клебсієли	-	0	0	7,94±0,18	0,04	33,6	6,17±0,11	0,05	28,6	7,61±0,17	0,07	64	7,08±0,17	0,07	66,3	6,87±0,24	0,05	44	44
Протей	3,17±0,12	0,02	20,52	3,75±0,12	0,06	55,6	3,78	0,01	8,76	4,46±0,26	0,08	65,6	5,58±0,16	0,1	91,5	5,07±0,21	0,08	76	76
Ентерококи	8,71±0,21	0,11	101,5	6,89±0,21	0,05	43,7	6,00	0,02	13,9	-	0	0	-	0	0	-	0	0	0
Аеробні стрептобацили	9,76±0,34	0,14	126,4	6,17±0,22	0,04	39,2	0	0	0	-	0	0	5	0,01	11,7	-	0	0	0
Стафілококи	4,49±0,18	0,04	34,88	7,19±0,21	0,1	91,3	6,61±0,16	0,1	61,3	5,79±0,21	0,07	60,8	6,19±0,23	0,08	72,5	7,19±0,11	0,08	77	77
Дріжджоподібні гриби роду Candida	-	0	0	-	0	0	3,78	0,01	8,76	-	0	0	4,03±0,09	0,05	47,2	-	0	0	0

Примітка. ПР - популяційний рівень, С - індекс значущості, ККД - коефіцієнт кількісного домінування, * - p<0,05

Таблиця 3

Видовий склад слизової оболонки товстої кишки при набряковій формі гострого панкреатиту (М+п)

Виділені мікроорганізми	К (n=10)			24 год (n=7)			48 год (n=7)			72 год (n=7)			96 год (n=7)			120 год (n=7)		
	N	C%	Pi	N	C%	Pi	N	C%	Pi	N	C%	Pi	N	C%	Pi	N	C%	Pi
Біфідобактерії	9	90	0,16	6	85,7	0,1	5	71,4	0,1	3	42,9	0,07	2	28,6	0,04	4	57,1	0,07
Лактобактерії	10	100	0,18	7	100	0,12	5	71,4	0,1	6	85,7	0,13	4	57,1	0,08	4	57,1	0,07
Бактероїди	10	100	0,18	7	100	0,12	5	71,4	0,1	5	71,4	0,11	6	85,7	0,12	7	100	0,13
Превотели	3	30	0,05	3	42,9	0,05	3	42,9	0,06	2	28,6	0,04	2	28,6	0,04	2	28,6	0,04
Еубактерії	3	30	0,05	0	0	0	1	14,3	0,02	0	0	0	0	0	0	2	28,6	0,04
Пептококи	0	0	0	4	57,1	0,07	1	14,3	0,02	3	28,6	0,04	4	28,6	0,04	3	14,3	0,02
Клострії	0	0	0	7	100	0,12	2	28,6	0,04	7	42,9	0,07	7	57,1	0,08	7	42,9	0,06
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ешеріхії	10	100	0,18	7	100	0,12	7	100	0,14	3	100	0,15	5	100	0,14	5	100	0,13
Гемолітичні ешеріхії	0	0	0	0	0	0	1	14,3	0,02	2	42,9	0,07	3	71,4	0,1	4	71,4	0,09
Едварсієли	0	0	0	0	0	0	3	42,9	0,06	2	28,6	0,04	3	42,9	0,06	3	57,1	0,07
Клебсієли	0	0	0	0	0	0	3	42,9	0,06	4	28,6	0,04	5	42,9	0,06	6	42,9	0,06
Протей	0	0	0	4	57,1	0,07	4	57,1	0,08	2	57,1	0,09	0	71,4	0,1	0	85,7	0,11
Ентерококи	7	70	0,13	7	100	0,12	4	57,1	0,08	5	28,6	0,04	0	0	0	0	0	0
Стафілококи	4	40	0,07	7	100	0,12	6	85,7	0,12	5	71,4	0,11	5	85,7	0,12	5	85,7	0,11

Примітка. К - контрольна група, N - кількість виділених штамів, C% - індекс постійності, Pi - частота виявлення, * - p<0,05

палички на 3 порядки, ентерококів, бактероїдів та превотел - на 4 порядки. Слизову оболонку колонізували кластридії та стафілококи в усіх дослідних тварин, пептококи та протей - у 57,1% спостережень. Через 48 год зменшувалася частота виділення облигатних біфідобактерій на 18,6%, лактобактерій - на 28,6%, ентерококів - на 23,1%, а їх концентрація на 0,8, 0,9 та 4,25 Іг КУО/мл відповідно. У подальші терміни спостереження вміст фізіологічно важливої мікрофлори продовжував знижуватись, особливо в ентерококів: через 72 год вони виявлялися тільки у 28,6% тварин (при нормі 70%), а через 96 год повністю зникали з поверхні слизової оболонки ТК. Індекс постійності біфідумбактерій через 72 год зменшувався в два рази, а через 96 год - у три рази. Більш стійкими були лактобактерії: їх вміст зменшувався тільки на 42,9%, а ПР - на 3,23 Іг КУО/мл. У вказані терміни збільшувалася частота висівання факультативної умовно патогеної мікрофлори: протей та стафілококів до 85,7%, кластридій та едварсіел - до 57,1%, клебсіел - до 42,4%, хоча їх ПР практично не змінювався. Вільні ніші біотопу колонізувала гемолітична кишкова паличка - її індекс сталості зростав з 14,3% на 48 год до 71,4% через 120 год, але концентрація залишалася на сталому рівні (1,52-1,60 Іг КУО/мл), що вказує на відсутність активної проліферації. Через 120 год спостереження збільшувалася частота виділення біфідобактерій та лактобактерій до 57,1%, відновлювалася кількість суббактерій, а також суттєво (у два рази) зменшувався вміст кластридій та пептококів, що може свідчити про початок відновлення нормального мікробіоценозу слизової оболонки ТК.

Висновки

1. При набряковій формі гострого панкреатиту протягом 24 год від початку захворювання розвивається дисбактеріоз товстої киши, який прогресує і до 120 год досягає 3-4 стадії.

2. У просвіті товстої киши дисбіотичні зміни виникають за рахунок елімінації облигатної аутохтонної мікрофлори, посиленої контамінації та проліферації факультативних умовно патогених ентеробактерій, кластридій, стафілококів, патогених гемолітичних штамів кишкової палички та дріжджоподібних грибів роду *Candida*.

3. Порушення колонізаційної резистентності слизової оболонки товстої киши відповідають 2-

3 ступеню дисбактеріозу, однак мають зворотній характер, що запобігає активній проліферації факультативної умовно патогеної та алохтонної патогеної мікрофлори.

Перспективи подальших досліджень

Література. 1. Митрохин С.Д., Минаев В.И., Минушкин О.И. Бактериологическая диагностика и терапия дисбактериоза на современном этапе // Клини. вестник.-997.-№4.-С.38-41. 2. Тарасенко В.С., Никитенко В.И. Острый панкреатит и транслокация бактерий // Вестн. хирургии им. И.И. Грскова.-2000.-№6.-С.86-89. 3. Шляпак И.П., Мищенко Д.Л. Острый панкреатит: профилактика и лечение панкреатической инфекции // Клиническая антимикробно-профилактика.-2004.-№4.-С.10-14. 4. Cicales L., Schai A., Silest P. et al. Acute pancreatitis and bacterial translocation // Dig. Dis. Sc.-2001.-V.46.-P.1127-1135. 5. Hegyi P., Rakonczay J., Sari R. et al. L-arginine-induced experimental pancreatitis // World. J. Gastroenterol.-2004.-V.10.-P.2003-2009. 6. Merelis B., Lopes P. Metodos de aislamiento y técnicas de identificación convencionales de las enterobacteria // Laboratorio.-1986.-V.82.-P.245-283.

СОСТОЯНИЕ МИКРОФЛОРЫ ТОЛСТОЙ КИШКИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ ПРИ ОТЕЧНОЙ ФОРМЕ ОСТРОГО ПАНКРЕАТИТА

Д.В. Ротарь, И.И. Сидорчук

Резюме. В эксперименте на 35 белых крысах изучены изменения микрофлоры толстой кишки при отечной форме острого перитонита. Установлено, что в течении 24 ч. с начала заболевания развивается дисбактериоз толстой кишки, прогрессирующий к 120 ч. В полости толстой кишки дисбиотические изменения достигают 3-4 степени за счет элиминации облигатной аутохтонной микрофлоры, колонизации и пролиферации алохтонных и факультативных условно патогенных микроорганизмов. Изменения колонизационной резистентности слизистой оболочки отвечают 2-3 ст. дисбактериоза и имеют обратимый характер.

Ключевые слова: острый панкреатит, кишечная микрофлора, дисбактериоз.

STATE OF LARGE INTESTINAL MICROFLORA AT EDEMICUS FORM OF ACUTE PANCREATITIS

D.V. Rotar, I.I. Sidorchuk

Abstract. In experiments on 35 white rats the changes of large intestinal microflora at edemicus form of acute pancreatitis have been studied. It was discovered that disbacteriosis of large intestine had appeared during 24 hours from onset of disease, which progressed until 120 hour. In large bowel lumen disbiotic changes reached 3-4-th stage due to elimination of obligate autochthonic microflora, intensive colonization and proliferation of allochthonic and elective conditionally pathogenic microorganism. Changes of colonic resistance were corresponded to 2-3-d stage of disbacteriosis and had reversind character.

Key words: acute pancreatitis, intestinal microflora, disbacteriosis.

Bukovinian State Medical University (Chernivtsi)

Clin. and experim. pathol. - 2008. - Vol.7. №1.-P.97-102

Надійшла до редакції 20.10.2007

Рецензент - проф. Ф.Г. Кулачек