

УДК 616.37/Д48

Повар М.А., Ткачук О.В.

СТАН МІКРОБНОЇ ЕКОЛОГІЇ ЗАГАЛЬНОГО ПРЕПАРАТУ ТОВСТОЇ КИШКИ В ЩУРІВ ЗІ СТРЕПТОЗОТОЦИН–ІНДУКОВАНИМ ЦУКРОВИМ ДІАБЕТОМ, УСКЛАДНЕНИМ ІШЕМІЄЮ-РЕПЕРFUZІЄЮ ГОЛОВНОГО МОЗКУ

Буковинський державний медичний університет, м. Чернівці

Порушення нормальної мікрофлори слизових оболонок дистальних відділів кишкового тракту відіграють важливу роль у виникненні та прогресуванні цукрового діабету типу 1 (ЦД), порушенні синаптогенезу в головному мозку. Мета дослідження – вивчити якісний та кількісний склад мікрофлори загального препарату товстої кишки за умов ускладнення експериментального ЦД неповною глобальною ішемією-реперфузією головного мозку. Якісні та кількісні показники мікрофлори визначали шляхом бактеріологічного та мікологічного дослідження. Встановлено, що ускладнення ЦД ішемією-реперфузією головного мозку порушує колонізаційну резистентність слизової оболонки товстої кишки за рахунок вираженого дефіциту фізіологічно корисних анаеробних автохтонних облигатних біфідобактерій та лактобактерій і значного зростання кількості умовно патогенних ентеробактерій (протеїв, клебсієл, ешерихій), клостридій, стафілококів, бактероїдів, пептокока та транзитних аеробних грампозитивних стрептококів, появи дріжджоподібних грибів роду Candida. Висновок. Поєднання цукрового діабету та ішемії-реперфузії головного мозку призводить до формування дисбактеріозу товстої кишки.

Ключові слова: цукровий діабет, товста кишка, порожнинна та мукозна мікрофлора, дисбактеріоз.

Публікація є фрагментом планової науково-дослідної роботи "Порушення функціонування центральних та периферичних ланок нейроімунноендокринної системи за умов гіпоксії та інших несприятливих чинників і розробка шляхів корекції патологічних змін" (№ державної реєстрації 0109U003914), Буковинського державного медичного університету.

Вступ

Сьогодні не виникає жодного сумніву в тому, що нормальна мікрофлора слизових оболонок бере активну участь у формуванні адаптивного імунітету, а її порушення відіграють важливу роль в ініціації низки запальних та автоімунних захворювань [6-8]. Доведена роль дисбіотичних порушень у виникненні та прогресуванні такої автоімунної патології, як цукровий діабет типу 1 (ЦД) [2, 11]. З іншого боку, кишкова мікробіота необхідна для нормального синаптогенезу в головному мозку як у період його розвитку, так і в зрілому віці [9]. За відсутності кишкової мікрофлори або при її порушенні в тканині мозку виникають гістопатологічні зміни, а в таких тварин – поведінкові аномалії. Тому цілком ймовірно, що перебіг ішемічно-реперфузійного пошкодження головного мозку у тварин із ЦД також залежатиме від стану мікробної екології кишкового тракту.

Максимальна кількість мікроорганізмів локалізована в дистальних відділах кишкового тракту [1, 6, 8]. Показано, що за умов ускладнення експериментального ЦД ішемічно-реперфузійним пошкодженням головного мозку виникає дисбактеріоз тонкої кишки [5], однак стан мікробіоти загального препарату товстої кишки при такій поєднаній патології залишається недослідженим.

Мета дослідження

Вивчити якісний та кількісний склад мікрофлори загального препарату товстої кишки за умов ускладнення експериментального цукрового діабету неповною глобальною ішемією-реперфузією головного мозку.

Матеріали та методи дослідження

Експериментальний ЦД відтворювали однократним внутрішньочеревним введенням стреп-

тозототину (Sigma, США, 60 мг/кг маси) щурам віком 2 міс. [4]. Формування дослідних груп здійснювали шляхом відбору щурів із рівнем глікемії вище 10 ммоль/л. Через чотири місяці від моменту введення стрептозототину моделювали неповну глобальну ішемію мозку шляхом припинення кровотоку по загальних сонних артеріях протягом 20 хв. Для проведення контрольних досліджень таке ж втручання здійснювали в групі тварин без модельованого ЦД. Тварин виводили з експерименту шляхом декапітації під каліпсоловим наркозом на 12-ту добу постішемічного періоду.

Усі втручання та евтаназію здійснювали під каліпсоловим наркозом (70 мг/кг маси тіла) із дотриманням міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей (Страсбург, 1985), ухвали Першого національного конгресу з біоетики (Київ, 2000).

Якісні та кількісні показники мікрофлори визначали шляхом бактеріологічного та мікологічного дослідження з подальшим розрахунком індексу постійності, частоти зустрічання, коефіцієнта кількісного домінування та значущості кожного виду (роду) мікроорганізму в мікробіоценозі загального препарату товстої кишки [3, 4].

Статистичну значимість відмінностей оцінювали за t-критерієм Стьюдента для незалежних виборок. Дані представлені у вигляді середніх арифметичних та стандартного відхилення.

Результати та їх обговорення

Результати вивчення видового складу мікробіоти загального препарату товстої кишки у тварин із ЦД на тлі ішемії-реперфузії головного мозку наведені в таблиці 1.

Таблиця 1
Видовий склад мікрофлори слизової оболонки товстої кишки експериментальних тварин із цукровим діабетом та ішемією-реперфузією головного мозку

Мікроорганізми	Цукровий діабет та ішемія-реперфузія мозку (n=5)			Контроль (n=10)			p
	Виділено штамів	Індекс постійності	Частота зустрічання	Виділено штамів	Індекс постійності	Частота зустрічання	
1. Анаеробні бактерії							
Біфідобактерії	1	20,0	0,03	5	90,0	0,22	p<0,05
Лактобактерії	2	40,0	0,06	10	100,0	0,24	p<0,05
Еубактерії	0	-	-	2	20,0	0,05	
Бактероїди	5	100,0	0,16	6	60,0	0,15	
Пептокок	2	40,0	0,06	0	-	-	-
Пептострептокок	0	-	-	3	30,0	0,07	
Бактерії роду Clostridium	5	100,0	0,16	1	10,0	0,02	p<0,05
2. Аеробні та факультативно аеробні бактерії							
Кишкова паличка	5	100,0	0,16	10	100,0	0,24	
Клебсієла	2	40,0	0,06	0	-	-	-
Протеї	3	60,0	0,09	0	-	-	-
Стрептобацили	2	40,0	0,03	0	-	-	-
Стафілококи	5	100,0	0,16	0	-	-	-
Дріжджоподібні гриби роду Candida	2	40,0	0,05	0	-	-	-

Примітки: p – достовірність змін стосовно контролю

Константними мікроорганізмами приєпітеліальної біоплівки у тварин із поєднанням ЦД та ішемії-реперфузії головного мозку є бактероїди, бактерії роду Clostridium, кишкова паличка, стафілококи та умовно патогенні ентеробактерії (протеї), часто зустрічаються також лактобактерії, умовно патогенний пептокок, ентеробактерії (клебсієли) та транзиторні аеробні грампозитивні стрептобацили. Нечасто виявляються автохтонні облигатні фізіологічно корисні біфідобактерії. Перераховане вище свідчить, що формування та розвиток ЦД на фоні ішемії-реперфузії головного мозку супроводжується елімінацією зі слизової оболонки товстої кишки автохтонних облигатних біфідобактерій (у чотирьох із п'яти тварин), лактобактерій (у трьох із п'яти тварин), еубактерій, пептострептококів. На цьому фоні настає контамінація приєпітеліальної біоплівки умовно патогенними ентеробактеріями (протеями, клебсієлами), стафілококами, пептококом,

бактероїдами та транзиторними грампозитивними стрептобацилами.

В інтактних тварин кількість штамів анаеробних бактерій, що персистують в приєпітеліальній біоплівці товстої кишки, складає 26 (63,4 %), а аеробних та факультативно аеробних – 10 (24,4 %). У щурів із поєднанням ЦД та ішемії-реперфузії головного мозку лише 15 (43,9 %) штамів, що персистують на слизовій оболонці товстої кишки, становлять облигатні анаеробні мікроби (p<0,05), а 17 (53,1 %) штамів, виявлених у приєпітеліальній біоплівці, відносяться до аеробних та факультативно анаеробних бактерій, що є неприродним для цього біотопу.

Результати вивчення кількісного складу мікробіоти приєпітеліальної біоплівки слизової оболонки товстої кишки у тварин із ЦД, поєднаним з ішемією-реперфузією головного мозку, наведені в таблиці 2.

Таблиця 2
Популяційний рівень (в Іq КУО/г) мікрофлори загального препарату товстої кишки тварин із цукровим діабетом та ішемією-реперфузією головного мозку

Мікроорганізми	Основна група (n=5)			Контроль (n=10)			P
	Популяційний рівень	ККД	КЗ	Популяційний рівень	ККД	КЗ	
1. Анаеробні бактерії							
Біфідобактерії	3,89±0,14	19,0	0,03	3,65±0,27	146,0	0,36	
Лактобактерії	4,17±0,12	40,8	0,06	3,83±0,14	166,6	0,40	
Еубактерії	0	-	-	5,34±0,27	26,1	0,07	
Бактероїди	3,43±0,03	83,9	0,13	2,86±0,04	41,9	0,10	p<0,05
Пептокок	3,90±0,07	38,1	0,06	0	-	-	
Пептострептококи	0	-	-	2,600,04	19,0	0,02	
Бактерії роду Clostridium	4,23±0,04	103,4	0,17	1,60	3,9	0,01	p<0,05
2. Аеробні та факультативно анаеробні бактерії							
Кишкова паличка	4,47±0,04	109,3	0,17	2,84±0,07	69,3	0,17	p<0,05
Клебсієли	3,670,02	35,9	0,05	0	-	-	-
Протеї	5,33±0,13	78,2	0,12	0	-	-	-
Стрептобацили	3,89±0,11	38,0	0,06	0	-	-	-
Стафілококи	3,91±0,05	95,6	0,15	0	-	-	-
Дріжджоподібні гриби роду Candida	4,02±0,18	25,8	0,03	0	-	-	-

Примітки: ККД – коефіцієнт кількісного домінування; КЗ – коефіцієнт значущості; p – достовірність змін у групах порівняння

Вони свідчать про значні зміни популяційного рівня автохтонних облигатних і факультативних та алохтонних бактерій, які персистують на слизовій оболонці товстої кишки. Як згадувалося вище, основу мікробіоти приепітеліальної біоплівки складають анаеробні (90,1 %) бактерії, а аеробні та факультативно анаеробні – лише 9,9 %. У приепітеліальній біоплівці слизової оболонки товстої кишки тварин із ЦД, поєднаним з ішемією головного мозку, анаеробні бактерії складають лише 47,9 %, а аеробні та факультативно анаеробні – 52,1 %. Ці дані свідчать про суттєвий дефіцит анаеробних бактерій та значне зростання кількості аеробних та факультативно аеробних бактерій ($p < 0,05$).

У приепітеліальній біоплівці слизової оболонки товстої кишки тварин із ЦД, поєднаним з ішемією головного мозку, виявлено виражений дефіцит автохтонних облигатних біфідобактерій та лактобактерій – провідних антагоністів патогенних та умовно патогенних ентеробактерій, стафілококів, клостридій та ін. мікроорганізмів. Дефіцит цих бактерій створює підґрунтя для контамінації та проліферації в цьому біотопі невласливих в нормі умовно патогенних та патогенних мікроорганізмів. Унаслідок цього умовно патогенні ентеробактерії (клебсієли, протей, кишкові палички) досягли високого популяційного рівня. Це сприяло суттєвому порушенню (зниженню) колонізаційної резистентності слизової оболонки товстої кишки щурів із ЦД та ішемією-реперфузією головного мозку.

Висновки

Ускладнення чотиримісячного цукрового діабету ішемією-реперфузією головного мозку призводить до глибоких порушень колонізаційної резистентності слизової оболонки товстої кишки за рахунок вираженого дефіциту фізіологічно корисних анаеробних автохтонних облигатних біфідобактерій та лактобактерій, які в інтактних тварин складають основу мікрофлори приепітеліальної біологічної плівки, а також за рахунок

значного зростання кількості умовно патогенних ентеробактерій (протей, клебсієл, ешерихій), клостридій, стафілококів, бактероїдів, пептокока та транзиторних аеробних грамположитивних стрептобацил, появи дріжджоподібних грибів роду *Candida*.

Перспективи подальших досліджень

Планується вивчення мікробної екології інших біотопів у тварин із поєднанням цукрового діабету та ішемії-реперфузії головного мозку.

Література

1. Дисбіоз кишечника в діабетології / [Сидорчук І.Й., Ляшук Р.П., Пашковська Н.В. та ін.]. – Чернівці : Мед університет, 2006. – 120 с.
2. Зависимость тяжести проявлений сахарного диабета 1-го типа у детей от степени кишечного дисбактериоза / Г.Н. Розанова, Д.А. Воеводин, М.А. Стенина [и др.] // Вопросы современной педиатрии. – 2003. – № 2. – С. 30-32.
3. Лабораторные тесты. Микробиологическая и вирусологическая диагностика / под. Ред. Турьянова М.Х. – Ч. I. – М. : Каппа, 1995. – 144 с.
4. Основные методы лабораторных исследований в клинической бактериологии / Руководство ВОЗ. – Женева, 1994. – 132 с.
5. Ткачук О.В. Якісний і кількісний склад мікрофлори загального препарату тонкої кишки у тварин із поєднаним впливом стрептозоцин-індукованого діабету та ішемії-реперфузії головного мозку / О.В. Ткачук // Актуальні проблеми сучасної медицини. Вісник Української медичної стоматологічної академії. – 2011. – Т. 11, Вип. 2 (34). – С. 87-90.
6. Tkachuk O.V., Hogenovb H. Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases / H. Tkachuk, Hogenovb, R. Stepankovb, T. Hudcovic [et al.] // Immunol. Lett. – 2004. – Vol. 93, № 2-3. – P. 97-108.
7. Feng T. Adaptive immunity in the host-microbiota dialog / T. Feng, C.O. Elson // Mucosal Immunol. – 2011. – Vol. 4, № 1. – P. 15-21.
8. Frick J.S. The gut microflora and its variety of roles in health and disease / J.S. Frick, I.B. Autenrieth // Curr. Top. Microbiol. Immunol. – 2013. – Vol. 358. – P. 273-289.
9. Diamond B. It takes guts to grow a brain: Increasing evidence of the important role of the intestinal microflora in neuro- and immune-modulatory functions during development and adulthood / B. Diamond, P.T. Huerta, K. Tracey [et al.] // Bioessays. – 2011. – Vol. 33, № 8. – P. 588-591.
10. Lee Y.K. Has the microbiota played a critical role in the evolution of the adaptive immune system? / Y.K. Lee, S.K. Mazmanian // Science. – 2010. – Vol. 330, № 6012. – P. 1768-1773.
11. Round J.L. Coordination of tolerogenic immune responses by the commensal microbiota / J.L. Round, R.M. O'Connell, S.K. Mazmanian // J. Autoimmun. – 2010. – Vol. 34, № 3. – P. 220-225.

Реферат

СОСТОЯНИЕ МИКРОБНОЙ ЭКОЛОГИИ ОБЩЕГО ПРЕПАРАТА ТОЛСТОЙ КИШКИ У КРЫС СО СРЕПТОЗОТОЦИН-ИНДУЦИРОВАННЫМ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ, ОСЛОЖНЕННЫМ ИШЕМИЕЙ-РЕПЕРФУЗИЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА
Повар М.А., Ткачук А.В.

Ключевые слова: сахарный диабет, толстая кишка, полостная и мукозная микрофлора, дисбактериоз.

Нарушение нормальной микрофлоры слизистых оболочек дистальных отделов кишечника играют важную роль в возникновении и прогрессировании сахарного диабета типа 1 (СД), нарушении синаптогенеза в головном мозге. Цель исследования – изучить качественный и количественный состав микрофлоры общего препарата толстой кишки в условиях осложнения экспериментального СД неполной глобальной ишемией-реперфузией головного мозга. Качественные и количественные показатели микрофлоры определяли путем бактериологического и микологического исследования. Установлено, что осложнение СД ишемией-реперфузией головного мозга нарушает колонизационную резистентность слизистой оболочки толстой кишки за счет выраженного дефицита физиологически полезных анаэробных автохтонных облигатных бифидобактерий и лактобактерий и значительного роста количества условно патогенных энтеробактерий (протей, клебсиелл, эшерихий), клостридий, стафилококков, бактероидов, пептококков и транзиторных аэробных грамположительных стрептобацилл, появления дрожжеподобных грибов рода *Candida*. Вывод. Сочетание сахарного диабета и ишемии-реперфузии головного мозга приводит к формированию дисбактериоза толстой кишки.

Summary

STATE OF MICROBIAL ECOLOGY OF THE GENERAL COLON SPECIEMEN IN RATS WITH STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETES COMPLICATED BY CEREBRAL ISCHEMIA-REPERFUSION

Povar M.A., Tkachuk A.V.

Key words: diabetes mellitus, colon, cavity and mucous microflora, dysbacteriosis.

Malfunctioning of normal mucosal microflora in the distal portions of the intestine plays an important role in the onset and progression of type 1 diabetes mellitus (DM) and may contribute to the interfering synaptogenesis in the brain. This study was aimed to investigate qualitative and quantitative composition of microflora of general colon specimen in rats with modelled streptozotocin-induced diabetes complicated by cerebral ischemia-reperfusion. Quantitative and qualitative parameters of the microflora were determined by bacteriological and mycological examination. It was found that the complications of DM by cerebral ischemia-reperfusion affected colonization resistance of the colon mucosa due to marked shortage of physiologically useful obligate anaerobic indigenous bifidobacteria and lactobacilli and a significant increase in the number of opportunistic enterobacteria (*Proteus*, *Klebsiella*, *Escherichia*), *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Bacteroides*, and transient aerobic gram-positive streptobacilli, appearance yeasts of genus *Candida*. Conclusion. The combination of diabetes and cerebral ischemic reperfusion leads to the formation of colon dysbacteriosis.

УДК 616.311+616.12-005.4]-018

Рябушко Н.О., Дворник В.М., Баля Г.М.

ЯСЕНЕВИЙ МІЖЗУБНИЙ СОСОЧОК: ГІСТОЛОГІЧНА БУДОВА В НОРМІ ТА ПРИ ІШЕМІЧНІЙ ХВОРОБІ СЕРЦЯ

ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія», м. Полтава

Проведено дослідження гістологічних зрізів ясеневих міжзубних сосочків померлих людей, в анамнезі яких не зазначалася ішемічна хвороба серця (прийнято за норму) та з ІХС. Виявили стереотипні зміни, викликані в першу чергу гіпоксичним станом тканин. В досліджуваних гістологічних зрізах ясеневого міжзубного сосочку при ішемічній хворобі серця ми спостерігаємо переважно явища атрофії, зниження регенераторної активності епітелію і зміни кровоносних судин. В артеріальних судинах мало місце потовщення стінки і звуження просвіту, що є наслідком артеріальної гіпертензії, що часто супроводжує ішемічну хворобу.

Ключові слова: ясеневий міжзубний сосочок, ішемічна хвороба серця, епітелій, мікросудини.

Вступ

Багаточисленні спостереження і дослідження стоматологів свідчать про наявність взаємозв'язку між патологією внутрішніх органів і систем організму з ураженням порожнини рота [1,2,4]. Особливо гостро стає питання про вплив загальносоматичної патології організму на стан порожнини рота.

За даними авторів слизова оболонка порожнини рота при хронічній ішемічній хворобі серця може бути блідою, сухою, стоншеною і легко травмуватися зубами, їжею та знімними конструкціями зубних протезів. В більш тяжких випадках ІХС – ділянки почервоніння неправильної форми («географічний язик») і афтозні зміни [3,5].

Мета роботи

Вивчення гістологічної будови ясеневого міжзубного сосочка в нормі та при ішемічній хворобі серця (ІХС).

Об'єкти та методи

Об'єктом нашого дослідження стали гістологічні зрізи слизової оболонки ясеневого міжзубного сосочка померлих людей, в анамнезі яких не зазначалася ішемічна хвороба серця (прийнято за норму) та з ішемічною хворобою серця. Вони були забарвлені гематоксиліном та еозинном і розглянуті на світлооптичному рівні.

Результати дослідження та їх обговорення

Описуваний ясеневий міжзубний сосочок померлих людей, в анамнезі яких не зазначалася ІХС, покритий багатошаровим плоским зроговіваючим епітелієм, товщина якого, за нашими даними, складає, в середньому 230-260 мкм. За загальним планом будови, він в цілому аналогічний епітеліальному покриву всієї ротової порожнини, але при цьому є деякі характерні особливості. Так в його базальному шарі частіше виявляються фігури мітозу, що свідчить про його високу регенеративну активність, також в ньому виявляється значна кількість меланоцитів. Зернистий шар в ряді випадків має дещо більшу товщину.

Епітелій ясен покриває власну пластинку, в складі якої розрізняють сосочковий і сітчастий шари. Сосочковий шар утворений пухкою сполучною тканиною, що містить значну кількість дрібних кровоносних судин і нервових волокон з великою кількістю вільних і інкапсульованих нервових закінчень. Як відомо, вільні нервові закінчення відносяться до больових і температурних рецепторів, а інкапсульованих – до механорецепторів. Клітинні елементи сосочкового шару представлені переважно фібринобластами, в безпосередній близькості від епітеліального покриву виявляються макрофаги і групові скупчення лімфоцитів з незначною кількістю плазматичних клітин (рис.1).