

УДК 616.34-008.87:615.33-019

О.І.Голяр

ЕФЕКТИВНІСТЬ САМОВІДНОВЛЕННЯ МІКРОБІОТИ ДИСТАЛЬНОГО ВІДДІЛУ ТОНКОЇ КИШКИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ТВАРИН, ЯКІ ОТРИМУВАЛИ ПРОТЯГОМ П'ЯТИ ДНІВ СЕРЕДНЮ ТЕРАПЕВТИЧНУ ДОЗУ ТЕТРАЦИКЛІНУ ГІДРОХЛОРИДУ

Буковинський державний медичний університет, м. Чернівці

Резюме. Пероральне використання тетрацикліну призводить до порушення мікробіоти порожнини дистального відділу тонкої кишки. Самовідновлення цих порушень проходить малоефективно протягом 10 днів після завершення прийому антибіотика. Зростає кількість у цьому біотопі експериментальних тварин бактероїдів та кишкових паличок. Формується тенденція до зростання автохтонних облігатних анаеробних біфідобактерій, лактобактерій, еубактерій та інших мікроорганізмів.

Самовідновлення мікробіоти приєпітеліальної біологічної плівки слизової оболонки дистального від-

ділу тонкої кишки характеризується зростанням кількості в угрупованні біфідобактерій, бактероїдів, пептокока, клостридій, умовно – патогенних ентеробактерій та контамінацією цими бактеріями (у 40% тварин) слизової оболонки дистального відділу тонкої кишки, що засвідчує про глибокі порушення колонізаційної резистентності слизової оболонки тонкої кишки.

Ключові слова: мікробіота, дистальний відділ тонкої кишки, колонізаційна резистентність.

Вступ. У попередніх роботах нами показано, що середня терапевтична доза (20 мг/кг) тетрацикліну гідрохлориду при пероральному введенні інтактним білим щурам протягом п'яти днів призводить до елімінації із порожнини дистального відділу тонкої кишки ентерококів, сінної палички, пептострептококів, у частини тварин біфідобактерій, лактобактерій. Під впливом цих доз у тварин настає потужна контамінація порожнини дистального відділу тонкої кишки патогенними та умовно-патогенними ентеробактеріями, стафілококами та іншими мікробами. Це призводить до формування вираженого дефіциту автохтонних облігатних бактерій та зростання популяційного рівня факультативних умовно-патогенних ентеробактерій та інших бактерій. У результаті виникають глибокі порушення якісного та кількісного складу мікробіоти приєпітеліальної біологічної плівки слизової оболонки тонкої кишки, що характеризує суттєве порушення колонізаційної резистентності слизової оболонки дистального відділу тонкої кишки, що може призвести не тільки до послаблення неспецифічного протиінфекційного захисту шлунково-кишкового тракту, а також до транслокацій патогенних та умовно-патогенних ентеробактерій та інших мікроорганізмів у внутрішні органи макроорганізму (Голяр О.І., Сидорчук І.Й., 2009).

З метою розробки методів та заходів, направлених на деконтамінацію патогенних та умовно-патогенних ентеробактерій та інших мікроорганізмів із порожнини та слизової оболонки дистального відділу тонкої кишки експериментальних тварин, необхідно встановити процеси самовідновлення автохтонних облігатних та факультативних мікроорганізмів у цьому біотопі, які проходять протягом 10 днів.

Мета дослідження. Встановити ефективність самовідновлення якісного та кількісного складу мікробіоти порожнини та приєпітеліаль-

ної біологічної плівки дистального відділу тонкої кишки з встановленням індексу постійності, частоти зустрічальності, коефіцієнта кількісного домінування та коефіцієнта значущості кожного учасника (виду, роду) мікробного угруповання цього біотипу на 10-й день після завершення перорального введення тетрацикліну гідрохлориду в дозі 20 мг/кг.

Матеріал і методи. Експерименти проведені на 15 білих безпородних щурах з масою тіла від 220 до 240 г. Після завершення 5-денного перорального введення тетрацикліну в дозі 20 мг/кг тварин забивали методом евтаназії.

Експериментальна робота проводилась із дотриманням положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986) та Постанови Першого Національного конгресу з біоетики (Київ, 2001). Біоетичною комісією Буковинського державного медичного університету порушень морально-етичних норм під час проведення досліджень не виявлено.

Для дослідження брали за стерильних умов (боксах) кусочки тонкої кишки. Стерильним пінцетом видавлювали (вичавлювали) із кишки вміст, який зважували і відбирали 0,1 г. Потім у стерильних умовах розрізали кишку по довжині. Отриманий кусочок стінки тонкої кишки промивали стерильною проточною водою для відмивання вмісту від стінки (слизової оболонки) тонкої кишки протягом 2-3 хвилин. Потім цей кусочок промивали стерильним фізіологічним натрію хлориду 7 разів у чашці Петрі. Зважений та промитий кусочок (відділений вміст від слизової оболонки) тонкої кишки гомогенізували у 10-кратному об'ємі ізотонічного розчину натрію хлориду, одержували первинне розведення 1:10 (1^{-1}). Із цієї суміші готували в стерильному фізіологічному розчині натрію хлориду серійний тит-

раційний ряд від 10^{-2} до 10^{-10} , аналогічним чином після зважування готували титраційний ряд із вмісту порожнини тонкої кишки.

Із кожної пробірки титраційного ряду, як вмісту, так і тканини стінки тонкої кишки, відбирали 0,1 мл зависі і здійснювали висів (посів) шпателем на оптимальне для кожного виду (роду) мікроорганізму тверде поживне середовище та інкубували аеробні і факультативно анаеробні мікроорганізми протягом 1-2 діб у термостатах при оптимальних температурних режимах.

Враховуючи те, що число бактерій та інших мікроорганізмів на одиницю маси сягає мільйонів – мільярдів, для зручності використовували десятковий логарифм кількісного показника кожного мікроорганізму (lg КУО/г) угруповання.

Отримані цифрові результати експериментальних досліджень опрацьовані згідно з відомими методами статистичного аналізу з використанням критерію (t) при нормальному розподіленні величин, що аналізуються. Різницю між порівнюваними величинами вважали вірогідною при $P \leq 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення.

Узагальнені результати вивчення рівня самовідновлення якісного та кількісного складу мікробіоти порожнини дистального відділу тонкої кишки експериментальних тварин, які отримували тетрациклін з метою моделювання дисбактеріозу цього біотопу, наведені в таблиці 1.

Одержані та наведені результати з вивчення якісного та кількісного складу мікробіоти порожнини дистального відділу тонкої кишки експериментальних тварин за період самовідновлення (10 днів) засвідчує про те, що за цей період зріс популяційний рівень бактероїдів – на 29,4 % ($P < 0,05$), кишкової палички – на 26,0 % ($P < 0,05$), намітилась тенденція до зростання популяційного рівня в автохтонних облигатних біфідобактерій – на 7,9 % ($> 0,05$), лактобактерій – на 7,7 % ($> 0,05$), а також в еубактерій – на 9,4 %, пептокока – на 12,5 %, клостридій – на 12,8 %, едвардсіел – на 9,7 %, стафілококів – на 19,4 % та інших умовно-патогенних бактерій. Відсутність ефективного самовідновлення (елімінація тільки ервіній) сприяло контамінації порожнини дистального відділу тонкої кишки у 2 з 15 експериментальних тварин дріжджоподібними грибами роду *Candida*.

Таким чином, через 10 днів з моменту завершення введення тетрацикліну експериментальним тваринам, в яких встановлено порушення якісного та кількісного складу мікробіоти порожнини дистального відділу тонкої кишки, процес самовідновлення характеризується елімінацією із порожнини окремих видів (*E. herbicola*) умовно-патогенних ентеробактерій, зростанням кількості бактероїдів та кишкових паличок, а також намічається тенденція до зростання кількості автохтонних облигатних біфідобактерій і лактобактерій та в більшості умовно-патогенних ентеробактерій, пептокока, клостридій, стафілококів та інших бактерій. У частини (40,0 %) тварин настає контамінація порожнини дистального відділу тонкої

кишки. Перераховане вище засвідчує про необхідність використання бактеріотерапії пробіотиками після застосування тетрацикліну, що сприяють деконтамінації патогенних та умовно - патогенних мікроорганізмів із порожнини тонкої кишки, а також пробіотиками, що корегують якісний та кількісний склад мікробіоти порожнини дистального відділу тонкої кишки.

Слизова оболонка дистального відділу тонкої кишки характеризується значною васкуляризацією та наявністю лімфоїдних скупчень, асоційованих із слизовою оболонкою, а специфічний епітелій, що покриває слизову оболонку, має підвищену здатність щодо резорбції бактерій та інших мікроорганізмів. Показано, що антибіотики призводять до глибоких порушень мікробіоти приепітеліальної біологічної плівки слизових оболонок травного тракту. Це знайшло підтвердження в наших дослідженнях.

Проведені експериментальні дослідження направлені на вивчення процесів самовідновлення порушеного мікробіоценозу приепітеліальної біологічної плівки слизової оболонки дистального відділу тонкої кишки білих щурів, яким протягом п'яти днів перорально вводили тетрациклін у дозі 20 мг/кг і в яких розвинулися глибокі зміни. Через 10 днів після завершення аплікації тетрацикліну в експериментальних тварин вивчені якісні та кількісні зміни (самовідновлення) порушеної колонізаційної резистентності слизової оболонки тонкої кишки. Результати дослідження популяційного рівня, коефіцієнта кількісного домінування та коефіцієнта значущості кожного виду (роду) мікроба в угрупованні мікробіоти, що формує колонізаційну резистентність слизової оболонки тонкої кишки, наведені в таблиці 2.

Протягом 10 днів після завершення перорального введення тетрацикліну самовідновлення якісного та кількісного складу мікробіоти приепітеліальної біологічної плівки проходить більш активно, ніж порожнинної мікрофлори (табл. 1, 2). У приепітеліальній біоплівці зростає кількість автохтонних анаеробних біфідобактерій – на 36,9 % ($P < 0,05$), лактобактерій – на 10,5 %, бактероїдів – на 30,6 % ($P < 0,01$), а також автохтонних анаеробних факультативних умовно – патогенних клостридій – на 17,5 % ($P < 0,05$) та пептокока – на 15,2 % ($P < 0,05$).

Зміни кількісного складу автохтонних облигатних та факультативних аеробних мікроорганізмів носять різноманітний характер. Кількість кишкової палички, гемолітичних ешерихій, протеїв і стафілококів не змінюється, але зростає, що є негативним, кількість інших ентеробактерій: клебсіел – на 20,4 % ($P < 0,001$), едвардсіел – на 18,0 % ($P < 0,01$), ервіній – на 22,2 % ($P < 0,05$). Крім того, приепітеліальну біологічну плівку контаминують дріжджоподібні гриби роду *Candida*, що може бути небезпечним для макроорганізму і виникнути кандидамікоз шлунково-кишкового тракту. Все це засвідчує про поступові позитивні зміни мікробіоти приепітеліальної

біологічної плівки слизової оболонки дистального відділу тонкої кишки. Разом з тим, наявність великої кількості патогенних (ентеротоксигенних ешерихій ($5,19 \pm 0,13 \lg \text{ КУО/г}$) та умовно-патогенних ентеробактерій (клебсіел, едвардсіел, ервінії) засвідчує про недостатню кількість аутохтонних облигатних анаеробних антагоністично активних біфідобактерій, лактобактерій та еубактерій, які пригнічують ріст та розмноження патогенних та умовно-патогенних ентеробактерій (Сидорчук І.Й., Коваль Г.Д., 2010). Перераховане вище засвідчує лише про початок самовідновлення мікробіоти приєпітеліальної біоплівки слизової оболонки дистального відділу тонкої кишки.

Таким чином, процес самовідновлення якісного та кількісного складу мікробіоти приєпітеліальної біоплівки слизової оболонки тонкої кишки розпочинається пізно і проходить повільно, що потребує активного використання біфідо- та лактовісних пробіотиків для підвищення колонізаційної резистентності слизової оболонки дистального відділу тонкої кишки.

Значні порушення якісного та кількісного складу мікрофлори порожнини (табл. 1) та приєпітеліальної біологічної плівки (табл. 2) слизової оболонки тонкої кишки експериментальних тварин під впливом середньої терапевтичної дози (20 мг/кг) тетрацикліну гідрохлориду завідчують про поступове та малоефективне самовідновлення мікробіоти цього біотопу, що вимагає зразу після завершення уведення антибіотика використовувати пробіотики, які мають деконтамінуючу дію патогенних та умовно - патогенних ентеробактерій, пептокока, кластридій, стафілококів та дріжджоподібних грибів роду *Candida*. Якщо компоненти пробіотика містять бактерії, резистентні до тетрацикліну – використовувати цей пробіотик перед застосуванням тетрацикліну і продовжувати його вживати певний проміжок часу, який необхідний для повної деконтамінації патогенних та зменшення кількості умовно - патогенних ентеробактерій, пептокока, кластридій, стафілококів та інших мікроорганізмів, формуючи показники нормофлори цього біотопу.

Таблиця 1

Рівень самовідновлення мікробіоти порожнини дистального відділу тонкої кишки експериментальних тварин, які отримували протягом п'яти днів тетрациклін у дозі 20 мг/кг

Мікроорганізми	Після уведення антибіотика (n=10)			Через 10 днів самовідновлення (n=5)			P
	Популяційний рівень (M±m)	Індекс постійності (%)	Коефіцієнт кількісного домінування	Популяційний рівень (M±m)	Індекс постійності (%)	Коефіцієнт кількісного домінування	
I. Анаеробні бактерії							
Біфідобактерії	4,92±0,09	50,0	56,56	5,31±0,45	60,0	55,41	>0,05
Лактобактерії	4,66±0,21	60,0	53,67	5,02±0,12	60,0	52,38	>0,05
Еубактерії	5,01±0,37	30,0	28,91	5,48±0,26	40,0	38,12	>0,05
Бактероїди	4,87±0,45	100,0	93,47	6,30±0,24	100,0	109,57	<0,05
Пептокок	5,29±0,51	60,0	60,92	5,95±0,15	60,0	62,09	>0,05
Кластридії	5,61±0,45	80,0	86,14	6,33±0,31	80,0	87,61	>0,05
II. Аеробні та факультативно анаеробні мікроорганізми							
Кишкова паличка	5,55±0,48	100,0	106,53	6,99±0,26	100,0	121,57	<0,05
<i>E.coli</i> Hly+	5,78±0,39	60,0	66,56	5,82±0,06	60,0	60,73	>0,05
Клебсіели	5,81±0,46	50,0	55,76	5,84±0,08	40,0	40,63	>0,05
Едвардсіели	5,47±0,35	30,0	31,50	6,00±0,19	60,0	62,61	>0,05
Ервінії	5,09±0,41	60,0	58,62	0	-	-	-
Протеї	4,00±0,12	90,0	69,10	4,17±0,11	40,0	29,01	>0,05
Стафілококи	5,71±0,52	40,0	43,84	6,82±0,17	80,0	94,89	<0,05
Дріжджоподібні гриби роду <i>Candida</i>	0	-	-	4,75±0,21	40,0	33,04	-

Таблиця 2

Рівень самовідновлення мікробіоти приєпітеліальної біологічної плівки слизової оболонки дистального відділу тонкої кишки експериментальних тварин, які отримували протягом п'яти днів тетрациклін у дозі 20 мг/кг

Мікроорганізми	Після уведення антибіотика (n=10)			Через 10 днів самовідновлення (n=5)			P
	Популяційний рівень (M±m)	Індекс постійності %	Коефіцієнт кількісного домінування %	Популяційний рівень (M±m)	Індекс постійності %	Коефіцієнт кількісного домінування %	
I. Анаеробні бактерії							
Біфідобактерії	3,55±0,29	50,0	37,77	4,86±0,06	60,0	32,52	<0,05
Лактобактерії	4,21±0,41	60,0	53,74	4,65±0,26	80,0	68,63	>0,05
Еубактерії	4,80±0,09	90,0	91,91	6,27±0,22	100,0	115,68	<0,01
Бактероїди	4,94±0,10	50,0	52,55	5,69±0,26	100,0	104,98	<0,05
Пептокок	5,09±0,14	80,0	86,64	5,98±0,14	100,0	110,33	<0,05
Клостридії	4,89±0,16	20,0	20,81	0	-	-	-
II. Аеробні та факультативно анаеробні мікроорганізми							
Кишкова паличка	5,21±0,27	100,0	110,85	5,74±0,28	100,0	105,90	>0,05
E.coli Ну+	4,94±0,21	60,0	63,06	5,19±0,13	40,0	38,30	>0,05
Клебсієли	4,90±0,09	40,0	41,70	5,90±0,09	80,0	87,08	<0,001
Едвардсієли	4,95±0,16	30,0	31,60	5,84±0,08	40,0	43,10	<0,01
Ервінії	4,78±0,03	60,0	81,02	5,84±0,08	40,0	43,10	<0,05
Протеї	3,86±0,20	70,0	57,49	4,60±0,14	100,0	84,87	>0,05
Стафілококи	4,96±0,16	40,0	42,21	5,21±0,55	60,0	57,68	>0,05
Дріжджоподібні гриби роду Candida	0	0	0	4,69±0,13	40,0	34,61	-

Висновки

1. Пероральне використання тетрацикліну призводить до порушення мікробіоти порожнини дистального відділу тонкої кишки. Самовідновлення цих порушень проходить малоефективно протягом 10 днів після завершення прийому антибіотика. При цьому в даному біотопі експериментальних тварин зростає кількість бактероїдів та кишкових паличок. Формується тенденція до зростання автохтонних облигатних анаеробних біфідобактерій, лактобактерій, еубактерій та інших мікроорганізмів.

2. Самовідновлення мікробіоти приєпітеліальної біологічної плівки слизової оболонки дистального відділу тонкої кишки характеризується зростанням кількості в угрупованні біфідобактерій, бактероїдів, пептокока, клостридій, умовно-патогенних ентеробактерій, та контамінацією цими бактеріями (у 40 % тварин) слизової оболонки дистального відділу тонкої кишки, що засвідчує про глибокі порушення колонізаційної резистентності слизової оболонки тонкої кишки.

Перспективи подальших досліджень. Для ефективності відновлення мікробіоти тонкої кишки необхідно вивчити вплив пробіотиків на нормалізацію показників мікрофлори цього біотопу.

Література

1. Ардатская М.Д. Дисбактериоз кишечника: современные аспекты изучения проблемы, принципы диагностики и лечения / М.Д.Ардатская, А.В.Дубинин, О.Н.Минушкин // Терапевт. арх. – 2001. – № 2. – С. 67-72.
2. Бактериально-грибковые ассоциации кишечника в условиях колонизации дрожжеподобными грибами рода Candida / О.В.Бухарин, А.В.Вальшев Н.Б.Перунова [и др.] // Ж. микробиол. – 2002. – № 5. – С. 45-48.
3. Барановский А.Ю. Дисбактериоз и дисбиоз кишечника. – 2-е изд., испр. / А.Ю.Барановский, Э.А.Кондрашина. – СПб. и др.: Питер, 2002. – 209 с.
4. Колициногенная активность кишечной микрофлоры как показатель дисбиотического состо-

- жня желудочно-кишечного тракта / О.В.Бухарин, А.В.Вальшев, О.Е.Челпаченко [и др.] // Ж. микробиол. – 2002. – № 4. – С. 55-57.
5. Лыкова Е.А. Дисбактериоз кишечника при антибактериальной терапии и перспективы лечения антибиотикорезистентными пробиотиками / Е.А.Лыкова // Антибиотики и химиотерапия. – 2001. – № 3. – С. 21-25.
 6. Мавзютов А.Р. “Острова” патогенности условно-патогенных энтеробактерий / А.Р.Мавзютов, С.В.Фиалкина, В.М.Бондаренко // Ж. микробиол. – 2002. – № 6. – С. 5-9.
 7. Самсыгина Г.А. Особенности становления биоценоза кишечника и кишечный дисбактериоз / Г.А.Самсыгина // Леч. врач. – 2003. – № 5; Пер. с англ. – С. 52-57.
 8. Сидоренко С.В. Инфекционный процесс как «диалог» между хозяином и паразитом / С.В.Сидоренко // Клин. микробиол. и антимикроб. химиотер. – 2001. – Т. 3, № 4. – С. 301-315.
 9. Сравнительное изучение пристеночной и просветной микрофлоры толстой кишки в эксперименте на мышах / Воробйов А.А., Несвижский Ю.В., Зуденков А.Е., Буданова Е.В. // Ж. микробиол. – 2001. – № 1. – С. 62-67.

ЭФЕКТИВНОСТЬ САМООБНОВЛЕНИЯ МИКРОФЛОРЫ ДИСТАЛЬНОГО ОТДЕЛА ТОНКОЙ КИШКИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ, КОТОРЫЕ ПОЛУЧАЛИ НА ПРОТЯЖЕНИИ ПЯТИ ДНЕЙ СРЕДНЮЮ ТЕРАПЕВТИЧЕСКУЮ ДОЗУ ТЕТРАЦИКЛИНА ГИДРОХЛОРИДА

О.И.Голяр

Резюме. Пероральное применение тетрациклина приводит к нарушению микрофлоры полости дистального отдела тонкой кишки. Самообновление этих нарушений проходит малоэффективно на протяжении 10 дней после завершения приёма антибиотика. Возрастает количество в этом биотопе экспериментальных животных бактериоидов и кишечных палочек. Формируется тенденция к возрастанию автохтонных облигатных анаэробных бифидобактерий, лактобактерий, зубактерий и других микроорганизмов.

Самообновление микрофлоры приэпителиальной биологической пленки слизистой оболочки дистального отдела тонкой кишки характеризуется возрастанием количества бифидобактерий, бактериоидов, пептокока, клостридий, условно – патогенных энтеробактерий, и контаминацией этими бактериями (у 40 % животных) слизистой оболочки дистального отдела тонкой кишки, что свидетельствует о глубоких нарушениях колонизационной резистентности слизистой оболочки тонкой кишки.

Ключевые слова: микрофлора, дистальный отдел тонкой кишки, колонизационная резистентность.

THE EFFICACY OF MICROBIOTA SELF - RECOVERY IN THE DISTAL PART OF THE SMALL INTESTINE IN EXPERIMENTAL ANIMALS TREATED WITH A MEDIUM CURATIVE DOSE OF TETRACYCLINE HYDROCHLORIDE FOR 5 DAYS

О.І.Голяр

Abstract. A peroral use of tetracycline results in a disturbance of the microbiota the cavity of the distal part of the small intestine. The self - recovery of these disturbances proceeds ineffectively, and takes 10 days after terminating an antibiotic intake. It is accompanied with an increase of the amount of bacteroids and colibacilli in this biotope of experimental animals. There is a tendency to an increase in the number of autochthonous obligatory anaerobic bifidobacteria, lactobacteria, bacteroids, eubacteria and other microorganisms. Self - recovery of the microbiota in the preepithelial biological film of the mucous membrane of the distal part of the small intestine is characterized by an increase in the number of bifidobacteria, bacteroids, peptococcus, clostridia, opportunistic-pathogenic enterobacteria and by a contamination (in 40 % of the animals) of the mucous membrane of the distal part of the small intestine, being indicative of profound disturbances of the colonization resistance of the mucous membrane of the small intestine.

Key words: microbiota, distal part of small intestine, colonization resistance.

Bukovinian State Medical University (Chernivtsi)

Рецензент – проф. С.С.Дейнека

Buk. Med. Herald. – 2011. – Vol. 15, № 3 (59). – P. 77-81

Надійшла до редакції 14.06.2011 року