

УДК 616.34-008.87-0.19

Л.І.Сидорчук

КОЛОНІЗАЦІЙНА РЕЗИСТЕНТНІСТЬ СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ ДИСТАЛЬНОГО ВІДДІЛУ ТОНКОЇ КИШКИ СПЛЕНЕКТОМОВАНИХ БІЛИХ ЩУРІВ

Буковинський державний медичний університет, м. Чернівці

Резюме. У спленектомованих білих щурів з експериментальним імунodefіцитом знижується колонізаційна резистентність слизової оболонки дистального відділу тонкої кишки за рахунок елімінації ентерококів, спостерігається зниження популяційного рівня та аналітичних показників автохтонних облигатних анаеробних бактерій родів *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, факультативних анаеробних й аеробних бактерій

роду *Escherichia*. Незважаючи на це колонізаційна резистентність вказаного відділу кишечника залишається достатньою для того, щоб контаміновані умовно-патогенні ентеробактерії, клостридії та стафілококи не досягали високого популяційного рівня.

Ключові слова: колонізаційна резистентність, мікрофлора тонкої кишки, спленектомія.

Вступ. З-поміж усіх біотопів людського організму шлунково-кишковий тракт є найбільш заселеним мікроорганізмами, при цьому якісний та кількісний склад мікробіоти залежить від його рівня. У фізіологічних умовах вміст бактерій у тонкій кишці налічує до 10^7 в 1 г секрету. Одночасно в дистальних її відділах переважають автохтонні анаеробні та грамнегативні ентеробактерії. Серед представників будь-якого мікробіоценозу завжди трапляються види, що персистують постійно – автохтонна облигатна анаеробна мікробіота (з часткою біля 90 % від загалу), яка є головною [2, 7].

Загальновідомо, що будь-які мікроорганізми, які населяють еконіші тварин та людини, переважно ведуть іммобілізований спосіб життя. Це означає, що в природних умовах «переконлива» більшість мікроорганізмів персистує у вигляді фіксованих до різних поверхонь мікроколоній. Адгезуючись на поверхні слизової оболонки, мікроколонії продукують екзополісахаридний глікокалікс, який обгортає мікробні клітини та всю мікроколонію, формуючи біологічну плівку, всередині якої відбувається ріст і розмноження бактерій, завдяки чому здійснюється міжклітинний взаємозв'язок [1, 9]. Механізми специфічної адгезії зумовлені поверхневими структурами як бактерій, так й епітеліальних клітин. На процес адгезії бактерій на поверхні епітеліоцитів впливають різноманітні фактори: секреторні імуноглобуліни, аналоги рецепторів епітеліальних клітин, лізоцим, інтерферони, білки системи комплементу, хімічні та біологічні препарати та інші. Важливо відмітити, що мікроорганізми біоплівки в десятки-сотні разів більш стійкі до зовнішніх факторів, ніж мікроби, що знаходяться у вмісті порожнини товстої кишки. Товщина біологічної плівки, яка вкриває слизові оболонки кишечника тварин і людини, складається з екзополісахаридів мікробного походження, муцину, який продукують клітини слизової оболонки, та мільярдів мікроколоній, кількість яких може сягати декількох сотень і навіть тисяч на висоті шару [8]. Саме вона формує колонізаційну резистентність слизової оболонки.

Численні дослідження взаємовідносин у системі «мікроорганізми-макроорганізм» показують, що мікробіота слизової оболонки бере активну участь у формуванні колонізаційної резистентності, регуляції перистальтики, регуляції диференціювання та регенерації епітеліальних клітин, детоксикації і виведенні ендо- та екзогенних токсичних речовин, стимуляції функції імунної системи, стимуляції локального імунітету, утворенні імуноглобулінів основних класів та секреторного Ig A. До її функцій також зараховують цитопротекцію, що полягає у підвищенні резистентності епітеліальних клітин щодо мутагенів та канцерогенів, в інгібуванні росту і розмноження патогенів, стримуванні адгезії алохтонних мікроорганізмів до епітелію слизових оболонок та багато інших [4, 10, 15].

Особливе значення у формуванні інфекційного процесу має дистальний відділ тонкої кишки, що характеризується посиленою васкуляризацією серед інших відділів кишечника та локалізацією в ньому потужних лімфоїдних скупчень, асоційованих зі слизовою оболонкою (периферійний орган системи імунітету), поверхня якої густо вкрита М-клітинами, що забезпечує їм істотну здатність до резорбції антигенів порівняно з іншими відділами шлунково-кишкового тракту [11-13]. Це надає біоплівці схильності до підвищеного контакту не тільки з автохтонними, але й з алохтонними мікроорганізмами, антибіотиками та іншими лікарськими препаратами [3, 14]. Водночас відомим є факт виникнення імунodefіцитного стану після спленектомії, у зв'язку з чим розроблено експериментальну модель такого поєданого стану з метою вивчення якісного і кількісного складу мікробіоти приепітеліальної плівки слизової оболонки дистального відділу тонкої кишки, яка формує колонізаційну резистентність цього відділу кишечника, що є доцільним та вельми актуальним.

Мета дослідження. Встановити якісний та кількісний склад мікробіоти приепітеліальної біологічної плівки слизової оболонки дистального відділу тонкої кишки спленектомованих білих щурів.

Матеріал і методи. Бактеріологічним методом досліджено матеріал слизової оболонки дистального відділу тонкої кишки в 17 білих щурів масою 220-240 г, з яких 10 тварин віднесені до контрольної групи, а 7 щурів – спленектомовані (дослідна група). Останнім у стерильних умовах виконали оперативне втручання з метою доступу до селезінки з подальшим закриттям післяопераційної рани. Дослідним щурам після відповідного доступу до селезінки проводили видалення органа. Після цього протягом двох місяців (60 днів) спостерігали за поведінкою тварин, прийомом корму, реакцією на зовнішні подразники. Далі контрольних та дослідних тварин 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 та 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. Комісія з питань біомедичної етики БДМУ порушень морально-етичних норм під час досліджень не виявила.

У стерильних умовах відкривали черевну порожнину, відбирали частину (1,5-2 см) тонкої кишки з її вмістом. Кишку розрізали по довжині стерильними ножицями. Ретельно відмивали стінку тонкої кишки від вмісту та порожнинної мікрофлори проточною стерильною дистильованою водою впродовж 3 хв. Відмиту від вмісту стінку тонкої кишки знову відмивали стерильним ізотонічним розчином хлориду натрію в 7 чашках Петрі, зважували і вносили до стінки кишки стерильний ізотонічний розчин у десятикратному об'ємі (розведення 1:10, 10^{-1}). Стінку кишки гомогенізували та одержували наважку мікробів і клітин стінки кишки. З наважки готували серійний десятикратний титраційний ряд пробірок з концентрацією вихідної наважки від 10^{-2} до 10^{-9} . Стерильними мікропіпетками відбирали з кожної пробірки ряду по 0,1 мл і наносили на відповідні, оптимальні для кожного роду, тверді живильні середовища, де за допомогою стерильного скляного шпателя здійснювали посів методом «газону» на сектори чашки Петрі.

Посіви факультативних анаеробних та аеробних мікроорганізмів культивували в термостаті (37 °C) протягом 24-48 годин. Посіви облигатних анаеробних бактерій вирощували в 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 морфотинкторіальними, культуральними і біохімічними властивостями [2, 3].

Враховуючи те, що число бактерій та дріжджоподібних грибків роду *Candida* на одиницю об'єму досягає мільйонів та мільярдів, для зручності викла-

ду 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 критерієм Стьюдента.

Результати дослідження та їх обговорення. Регуляція видового складу та популяційного рівня мікрофлори шлунково-кишкового тракту здійснюється «імуною системою слизових оболонок». У цьому плані дистальний відділ тонкої кишки забезпечений потужною лімфоїдною тканиною, оскільки бляшки Пеера і солітарні інкапсульовані фолікули є периферійними органами системи імунітету організму людини. Імунна система шлунково-кишкового тракту постійно контактує з великою кількістю мікроорганізмів та є першим бар'єром для алохтонних (патогенних) мікроорганізмів, що призводить як до формування імунної відповіді, так і до регуляції якісного та кількісного складу мікробіоти, насамперед мікробіоти приєпітеліальної біоплівки дистального відділу тонкої кишки. Тому першим етапом було вивчення якісного складу мікрофлори приєпітеліальної біоплівки дистального відділу тонкої кишки спленектомованих білих щурів – тварин з «ятрогенним» імунодефіцитним станом. Результати вказаних досліджень наведені в табл. 1.

В інтактних тварин колонізаційну резистентність формують автохтонні анаеробні облигатні бактерії роду *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Bacteroides* і факультативні анаеробні та аеробні бактерії роду *Escherichia* та *Enterococcus*; у деяких тварин виділялися еубактерії.

У спленектомованих тварин колонізаційну резистентність у шести тварин формують бактерії роду *Bacteroides* та *Escherichia*, у п'яти - виявляються бактерії роду *Bifidobacterium*, у чотирьох – *Lactobacillus*.

За індексом сталості та частотою зустрічальності константними бактеріями, які формують колонізаційну резистентність слизової оболонки дистального відділу тонкої кишки, є автохтонні облигатні анаеробні бактерії роду *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Bacteroides* та факультативні анаеробні бактерії роду *Escherichia*. Елімінують автохтонні факультативно анаеробні бактерії роду *Enterococcus*, а також анаеробні бактерії роду *Enterobacterium*.

На зазначеному тлі відбувається контамінація приєпітеліальної біоплівки слизової оболонки дистального відділу тонкої кишки умовно-патогенними анаеробними бактеріями роду *Clostridium*, факультативно анаеробними й аеробними ентеробактеріями (бактеріями роду *Klebsiella*) та бактеріями роду *Staphylococcus*, які за індексом сталості та частотою зустрічальності належать до таких, що трапляються в даному біотопі нечасто.

Таким чином, за якісним складом мікробіота приєпітеліальної біоплівки слизової оболонки

Таблиця 1

Якісний склад мікробіоти приепітеліальної біологічної плівки слизової оболонки дистального відділу тонкої кишки спленектомованих білих щурів

Мікроорганізми	Спленектомовані тварини (n=7)			Інтактні тварини (n=10)			p
	N	C, (%)	Pi	N	C, (%)	Pi	
<i>Облігатні анаеробні бактерії</i>							
Біфідобактерії	5	71,4	0,19	10	100,0	0,20	>0,05
Лактобактерії	4	57,1	0,15	10	100,0	0,20	<0,05
Бактероїди	6	85,7	0,23	10	100,0	0,20	>0,05
Еубактерії	0	-	-	2	20	0,04	-
Бактерії роду <i>Clostridium</i>	2	28,6	0,08	0	-	-	-
<i>Факультативно анаеробні та аеробні бактерії</i>							
Кишкова паличка	7	100,0	0,15	10	100,0	0,16	>0,05
Клебсієли	3	42,9	0,07	0	-	-	-
Ентерококи	0	-	-	8	80,0	0,16	-
Стафілококи	2	28,6	0,08	0	-	-	-

Примітка. N – кількість виділених штамів; C (%) – індекс сталості; Pi – частота зустрічальності певного виду штаму; p – ступінь вірогідності за індексом сталості (C, %)

Таблиця 2

Кількісний склад мікрофлори приепітеліальної біологічної плівки слизової оболонки дистального відділу тонкої кишки спленектомованих білих щурів

Мікроорганізми	Спленектомовані тварини (n=7)			Інтактні тварини (n=10)		
	Lg КУО/г	ККД	КЗ	Lg КУО/г	ККД	КЗ
<i>Облігатні анаеробні бактерії</i>						
Біфідобактерії	4,40±0,24	78,7	0,21	6,65±0,27 **	105,5	0,11
Лактобактерії	4,25±0,25	60,8	0,16	6,83±0,14 **	108,4	0,11
Бактероїди	3,91±0,08	84,0	0,23	6,59±0,18 ***	105,0	0,10
Еубактерії	0	-	-	5,34±0,27	17,0	0,03
Клостридії	3,69±0,09	26,4	0,07	0	-	-
<i>Факультативно анаеробні та аеробні бактерії</i>						
Кишкова паличка	3,92±0,10	3,92±0,10	0,23	4,97±0,17 *	82,6	0,17
Клебсієли	4,00	4,00	0,04	0	-	-
Ентерококи	0	0	-	6,17±0,22	68,6	0,14
Стафілококи	3,69±0,09	3,69±0,09	0,07	0	-	-

Примітка. ККД – коефіцієнт кількісного домінування; КЗ – коефіцієнт значущості; * – вірогідні зміни показників при $p < 0,05$; ** – вірогідні зміни показників при $p < 0,01$; *** – вірогідні зміни показників при $p < 0,001$

дистального відділу тонкої кишки спленектомованих тварин відрізняється від якісного складу інтактних тварин зменшенням виявлення в цьому біотопі бактерій роду *Enterococcus* (впритул до елімінації), *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Escherichia* та *Lactobacillus*. При цьому настає контамінація біотопу бактеріями роду *Clostridium*, *Klebsiella* та *Staphylococcus*, які трапляються нечасто.

Результати дослідження популяційного рівня мікробіоти приепітеліальної біоплівки слизової оболонки дистального відділу тонкої кишки спленектомованих білих щурів наведені в табл. 2.

В інтактних білих щурів за популяційним рівнем, коефіцієнтом кількісного домінування та коефіцієнтом значущості головна мікробіота при-

епітеліальної біоплівки слизової оболонки дистального відділу тонкої кишки представлена автохтонними облігатними анаеробними бактеріями роду *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*; *Bacteroides* і факультативними анаеробними та аеробними бактеріями роду *Enterococcus* та *Escherichia*.

У дослідних тварин з ятрогенним імунодефіцитним станом головна мікробіота приепітеліальної біологічної плівки слизової оболонки дистального відділу тонкої кишки також представлена індигенними бактеріями родів *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium* та *Escherichia*.

Водночас у спленектомованих тварин відмічається дефіцит автохтонних облігатних анаеробних бактерій роду *Bifidobacterium* на 51,1 %, *Lac-*

tobacillus - на 60,7 %, *Bacteroides* - на 68,5 %, а також факультативних анаеробних та аеробних бактерій роду та *Escherichia* - на 26,8 %. При цьому бактерії роду *Enterococcus* елімінують із приєпітеліальної біологічної плівки слизової оболонки дистального відділу тонкої кишки.

Контаміновані автохтонні факультативні анаеробні бактерії родів *Clostridium*, *Staphylococcus* і *Klebsiella* досягають мінімального популяційного рівня, що свідчить як про достатню захисну функцію автохтонної облигатної, факультативної анаеробної та аеробної мікрофлори приєпітеліальної біологічної плівки слизової оболонки дистального відділу тонкої кишки, так і про формування відповідної колонізаційної резистентності слизової оболонки цього відділу кишечника.

Таким чином, у спленектомованих тварин (експериментальний імунodefіцит) знижується колонізаційна резистентність слизової оболонки дистального відділу тонкої кишки за рахунок зниження популяційного рівня та аналітичних показників автохтонних облигатних анаеробних бактерій роду *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Bacteroides*, факультативних анаеробних й аеробних бактерій роду *Escherichia* та елімінації ентерококів. Незважаючи на певне зниження колонізаційної резистентності слизової оболонки дистального відділу тонкої кишки, вона все ж залишається достатньою для того, щоби контаміновані умовно-патогенні ентеробактерії, клостридії та стафілококи не досягли високого популяційного рівня.

Висновки

1. У спленектомованих білих щурів змінюється якісний склад мікробіоти приєпітеліальної біологічної плівки слизової оболонки дистального відділу тонкої кишки за рахунок елімінації з цього біотопу бактерій роду *Enterococcus*, *Eubacterium* та в незначній (від 14,3 % до 43,9 %) кількості тварин елімінували бактерії родів *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Escherichia*. Контамінують цей біотоп у незначній кількості тварин бактерії роду *Clostridium* (у 28,6 %), ентеробактерії (у 14,3 %) та *Staphylococcus* (28,6 % випадків).

2. Експериментальний імунodefіцитний стан (спленектомія) призводить до помірного (від 26,8 до 68,5 %) дефіциту автохтонних облигатних анаеробних бактерій роду *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Bacteroides*, факультативних анаеробних та аеробних бактерій роду *Escherichia*. На цьому тлі настає помірна (від $3,69 \pm 0,09$ до $4,00$ lg КУО/г) контамінація приєпітеліальної біологічної плівки слизової оболонки дистального відділу тонкої кишки, що засвідчує помірне зниження колонізаційної резистентності слизової оболонки тонкої кишки.

Перспективи подальших досліджень. Одержані та наведені результати є підставою для вивчення впливу антибіотиків, що використовуються в лікуванні захворювань відділу тонкої кишки на мікробіоту дистального відділу тонкої кишки спленектомованих пацієнтів або експериментальних тварин.

Література

1. Хавкин А.И. Микробиоценоз кишечника и иммунитет / А.И.Хавкин // Рус. мед. ж. - 2003. - Т. 11, № 3. - С. 1-16.
2. Янковский Д.С. Микробная экология человека: современные возможности её поддержания и восстановления / Д.С.Янковский. - К.: Эксперт ЛТД, 2005. - 388 с.
3. Adrenergic modulation of *Escherichia coli* O157:H7 adherence to the colonic mucosa / B.T.Green, M.Lyte, C.Chen [et al.] // Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. - 2004. - Vol. 287. - P. 1238-1246.
4. Baumgart D.C. Intestinal barrier function / D.C.Baumgart, A.U.Dignass // Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care. - 2002. - Vol. 5. - P. 685-694.
5. Boone D. R. The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*: 2nd ed. - 2001. - Vol. 1. - 721 p.
6. Brenner D.J. The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*: 2nd ed. - 2005. - Vol. 2. - 1108 p.
7. Ding L.A. Gut in diseases: physiological elements and their clinical significance / L.A.Ding, J.S.Li // World J. Gastroenterol. - 2003. - Vol. 9. - P. 2385-2389.
8. Diversity of the human intestinal microbial flora / P.B.Eckburg, E.M.Bik, C.N.Bernstein [et al.] // Science. - 2005. - Vol. 308. - P. 1635-1638.
9. Effect of intestinal microbiota on the induction of regulatory CD25+ CD4+ T cells / H.Ishikawa, K.Tanaka, Y.Maeda [et al.] // Clin. Exp. Immunol. - 2008. - Vol. 1, № 153. - P. 127-135.
10. From the fetal liver to spleen and gut: the highway to natural antibody / M.M.Rosado, A.Aranburu, F.Capolunghi [et al.] // Mucosal Immunol. - 2009. - Vol. 2, № 4. - P. 351-361.
11. Immunosuppression following surgical and traumatic injury / F.Kimura, H.Shimizu, H.Yoshidome [et al.] // Surg. Today. - 2010. - Vol. 40, № 9. - P. 793-808.
12. Influence of intestinal dysbacteriosis on immune and hematopoietic function in mice / Q.H.Liang, L.Zhang, S.C.Duan [et al.] // Zhonghua Er Ke Za Zhi. - 2004. - Vol. 42, № 9. - P. 708-711.
13. Modulating effect of microflora metabolites of the human and animals on lymphoid tissue culture / T.Y.Vakhitov, N.I.Chalisova, N.A.Balikina [et al.] // Dokl. Biol. Sci. - 2009. - Vol. 428. - P. 395-397.
14. Schroff K. Commensal enteric bacteria engender a self-limiting humoral mucosal immune response while permanently colonizing the gut / K.Schroff, K.Meslin, J.Cebra // Infect. Immun. - 1995. - Vol. 63. - P. 3904-3913.
15. Splenic hypofunction and the spectrum of autoimmune and malignant complications in celiac disease / A.Di Sabatino, M.M.Rosado, P.Cazzola [et al.] // Clin. Gastroenterol. Hepatol. - 2006. - Vol. 4, № 2. - P. 179-186.

КОЛОНИЗАЦИОННАЯ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ДИСТАЛЬНОГО ОТДЕЛА ТОНКОЙ КИШКИ СПЛЕНЭКТОМИРОВАННЫХ КРЫС*Л.И.Сидорчук*

Резюме. В спленэктомированных белых крыс с экспериментальным иммунодефицитом понижается колонизационная резистентность слизистой оболочки дистального отдела тонкой кишки за счёт элиминации энтерококков, снижения популяционного уровня и аналитических показателей автохтонных облигатных анаэробных бактерий родов *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, факультативных анаэробных и аэробных бактерий рода *Escherichia*. Несмотря на это колонизационная резистентность указанного отдела кишечника остаётся достаточной для того, чтобы контаминированные условно-патогенные энтеробактерии, клостридии и стафилококки не достигали высокого популяционного уровня.

Ключевые слова: колонизационная резистентность, микрофлора тонкой кишки, спленэктомия.

COLONIZATION RESISTANCE OF THE MUCOUS COAT OF THE SMALL INTESTINAL DISTAL PORTION OF SPLENECTOMIZED ALBINO RATS*L.I.Sydorchuk*

Abstract. The colonization resistance of the mucous membrane of the distal portion of the small intestine decreases at the expense of eliminating enterococci in splenectomized albino rats with experimental immunodeficiency. A reduction of the population level and analytical parameters of the autochthonous obligate anaerobic bacteria of the following genera: *Lactobacilli*, *Bacteroides*, *Bifidobacteria*, facultative anaerobic and aerobic bacteria of *Escherichia* genus is observed. In spite of this the colonization resistance of the said intestinal portion remains sufficient lest contaminated opportunistic enterobacteria, clostridia and staphylococci should reach a high population level.

Key words: colonization resistance, small intestinal microflora, splenectomy.

Bukovinian State Medical University (Chernivtsi)

Рецензент – проф. С.Є.Дейнека

Buk. Med. Herald. – 2011. – Vol. 15, № 1 (57). – P. 150-154

Надійшла до редакції 16.11.2010 року