

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-РЕПЕРФУЗІЄЮ ГОЛОВНОГО МОЗКУ**

Буковинський державний медичний університет, м. Чернівці

*Порушення нормальної мікрофлори слизових оболонок дистальних відділів кишечнику 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 транзиторних аеробних грампозитивних стрептобацил, 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 нейроімуноендокринної 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 кишечнику.

Максимальна кількість мікроорганізмів локалізована в дистальних відділах кишечнику [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 уведенням стрептозоточину (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 уведення стрептозоточину 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 (родини) 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	
<b>1. Анаеробні бактерії</b>							
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
<b>2. Аеробні та факультативно аеробні бактерії</b>							
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 (протейями, 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 шурів 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	
<b>1. Анаеробні бактерії</b>							
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
<b>2. Аеробні та факультативно анаеробні бактерії</b>							
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; р – 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 приєпітеліальної біоплівки складають анаеробні (90,1 %) бактерії, а аеробні та факультативно анаеробні – лише 9,9 %. У приєпітеліальній 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 приєпітеліальній 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 невластивих 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 приєпітеліальної біологічної плівки, а також за рахунок значного зростання кількості умовно патогенних ентеробактерій (протей, клебсієл, ешерихій), клостридій, стафілококів, бактероїдів, пептокока та транзитних аеробних грампозитивних 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 стрептозотоцин-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. Tlaskalovb-Hogenovb H. Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases / H. Tlaskalovb-Hogenovb, R. Stepbnkovb, 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 СТРЕПТОЗОТОЦИН-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, cavitary 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 speciemen 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 indigenus bifidobacteria and lactobacilli and a significant increase in the number of opportunistic enterobacteria (*Proteus*, *Klebsiella*, *Escherichia*), *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Bacteroides*, and transient aerobic gram-positive streptobatsilli, appearance yeasts of genus *Candida*. Conclusion. The combination of diabetes and cerebral ischemic reperfusion leads to the formation of colon dysbacteriosis.