

А.В. Путніков¹, Ю.В. Голота¹, Т.М. Сергійчук¹, А.М. Остапчук²,
Л.В. Закордонєць³, Л.І. Остапченко¹, Г.М. Толстанова¹

¹Київський національний університет імені Тараса Шевченка, ННЦ «Інститут біології»,
вул. Володимирська 64/13, Київ, 01601, Україна,
тел.: +38 (044) 521 35 98, e-mail: steling@bigmir.net

²Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, МСП, Д 03680, Україна, тел.: +38 (044) 526 11 89

³Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, бульвар Т. Шевченка, 13,
Київ, 01601, Україна

КІЛЬКІСНІ ТА ФУНКЦІОНАЛЬНІ ПОКАЗНИКИ КИШКОВОЇ НОРМОБІОТИ ЩУРІВ

Мета. Метою даної роботи було визначити референс-діапазони мікробіологічних показників фекального та пристінкового кишкового біотопу лабораторних щурів та провести порівняльний аналіз з існуючими даними для показників людини. **Методи.** Мікробіологічний аналіз фекалій (КУО/г) та пристінкового (КУО/см²) біотопу щурів самців лінії Вістар (170–200 г, n=31) здійснювали шляхом висіву відповідних розведень на елективно-диференційні середовища, спектр та концентрацію коротко-ланцюгових жирних кислот (КЛЖК) визначали методом газо-рідинної хроматографії. **Результати.** У фекаліях щурів кількість мікроорганізмів роду *Bifidobacterium* висівалася в межах 10⁶–10⁹ КУО/г, *Propionibacterium* – 10⁵–10⁹ КУО/г, *Lactobacillus* – 10⁶–10⁸ КУО/г. Встановлено майже рівне співвідношення між *E. coli* з нормальними (10⁴–10⁷ КУО/г) та зміненими (10²–10⁵ КУО/г) ферментативними властивостями. Кількість умовно-патогенних бактерій (*Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter* та ін.) не перевищувала 10³ КУО/г, *Clostridium* spp. – 10²–10⁴ КУО/г, сапрофітних представників роду *Staphylococcus* – 0–10⁷ КУО/г, *S. aureus* – 10³–10⁵ КУО/г, гриби роду *Candida* – 0–10³ КУО/г. Гемолітичних штампів не виявляли. У пристінковому біоптаті товстої і термінального відділу тонкої кишок щурів не було виявлено представників родів *Clostridium* та *Candida*. Анаеробні цукролітичні бактерії родів *Bifidobacterium* (10³–10⁶ КУО/см²), *Lactobacillus* (10²–10⁶ КУО/см²), *Propionibacterium* (10³–10⁶ КУО/см²) висівалися у 100% тварин. Склад КЛЖК фекалій щурів подібний до такого у людини, і містить: оцтову (С2), пропіонову (С3), масляну та ізомасляну (С4, іС4), валеріанову та ізовалеріанову (С5, іС5), а також капронову та ізокапронову (С6, іС6) кислоти. **Висновки.** Для щурів лінії Вістар визначено референс-діапазони основних груп мікроорганізмів фекального біоптату, які враховують при оцінці стану нормобіоти кишечника людини. Вперше визначено референс-діапазони мікробіоти пристінкового біоптату товстої та тонких кишок щурів. Співвідношення КЛЖК у фекаліях щурів лінії Вістар (С2:С3:С4) становить 41,9:32,2:20,9%.

Ключові слова: нормобіота, референс-діапазони, коротколанцюгові жирні кислоти, тонка кишка, товста кишка.



Проблема необхідності аналізу стану мікробіоти шлунково-кишкового тракту (ШКТ) набула особливого значення у зв'язку з ростом гострих та хронічних захворювань органів травлення, негативних наслідків антибіотикотерапії та неефективності методів профілактики та терапії цих станів. Слід зауважити, що проблема наслідків антибіотикотерапії залишається найбільш обговорюваним і, в той же час, найбільш суперечливим питанням сучасної медицини. В Україні та в світі, антибактеріальна терапія займає друге місце за частотою призначень в схемах лікування хворих на різні патології [1, 2]. Емпіричне призначення антибіотиків, а також швидкий ріст бактеріальної резистентності часто вимагає корекції терапії, іноді до трьох змін антибіотику [3].

Порушення кількісного та якісного складу нормобіоти при дисбіозах пов'язано зі змінами метаболічної активності анаеробної цукролітичної мікробіоти, яка відповідальна за розщеплення клітковини до коротко-ланцюгових жирних кислот (КЛЖК). Зниження рівня КЛЖК призводить до дистрофічних змін покривного епітелію, підвищується проникність кишкового бар'єру, порушується всмоктування води та електролітів [4]. Можна вважати, що дослідження кількісного співвідношення КЛЖК є одним з критеріїв оцінки стану мікробіоценозу шлунково-кишкового тракту.

На сьогодні лабораторні щури є найбільш вживаним експериментальним об'єктом для проведення доклінічних досліджень препаратів, скерованих на відновлення мікробіоценозу організму, в тому числі кишечника. Проведення повноцінного експерименту та порівняльного аналізу отриманих результатів передбачає знання широкого спектру нормативних показників піддослідних тварин. Існує досить багато публікацій щодо референтних значень фізіологічних показників гомеостазу: біохімії крові, абсолютній та відносній масі і розмірам внутрішніх органів і багатьом іншим показникам, проте існують лише обмежені повідомлення щодо якісних та кількісних показників нормобіоти кишечника щурів та їх співвідношення з рівнем їх метаболітів, КЛЖК [5].

Експериментальні дані вказують на провідну роль в розвитку патологій мікробіоти, що колонізує пристінковий шар муцину [16]. Дані щодо особливостей змін пристінкової мікробіоти ШКТ у лабораторних тварин обмежені.

Метою даної роботи було визначити референс-діапазони мікробіологічних показників фекального та пристінкового кишкового біотопу лабораторних щурів та провести порівняльний аналіз з існуючими даними для показників людини.

Матеріали та методи

Об'єктом дослідження була мікробіота фекального та пристінкового біоптату товстої кишки, та пристінкового біоптату тонкої кишки.

Експериментальні дослідження проведені на 31 щурі (самці) лінії Вістар (масою 170–200 г). Утримання, харчування та проведення експерименту здійснювали згідно Наказу про Порядок проведення науковими установами дослідів та експериментів на тваринах [6].



Всіх тварин утримували за стандартних умов температурного режиму (21 °С), освітлення (12/12 год), вологості та раціону харчування (повноцінний корм для лабораторних тварин К – 12-4, „Різан-1”, Україна).

Для мікробіологічного аналізу збирали 1 г фекалій, та ділянки слизової оболонки (1 см²) товстої кишки на відстані 2 см від анального отвору та тонкої кишки на відстані 2 см від ілеоцекальної заслінки.

1 г фекалій відбирали у пробірку з 9 мл фізіологічного розчину, після чого здійснювали серію розведень з 10⁻¹ до 10⁻⁹ (фекальний біоптат).

Виявлення основних груп мікроорганізмів здійснювали шляхом висіву відповідних розведень на елективно-диференційні середовища (HiMedia Laboratories Pvt.Ltd, Індія). Подальшу ідентифікацію виділених мікроорганізмів здійснювали за морфологічними, тинкторіальними та фізіолого-метаболічними показниками.

Аналіз спектру КЛЖК здійснювали на газовому хроматографі Trace GC Ultra (Thermo Finnigan USA) [7].

КЛЖК ідентифікували шляхом порівняння з часом утримання стандартів (оцтова, масляна, ізомасляна, пропіонова, валер'янова, ізовалер'янова, гексанова) (Sigma-Aldridi, Німеччина). Кількісну оцінку спектру КЛЖК проводили за методом нормування площин їх піків і визначали у відсотках та мг/г фекалій.

Статистичну обробку результатів здійснювали за допомогою програми SPSS 17. Кореляційний зв'язок між представниками нормобіоти та спектром КЛЖК розраховано за допомогою коефіцієнта Пірсона. Для розрахунку числа тварин з мінімальною, середньою та максимальною кількістю певного виду мікроорганізмів, вираховували відсоток тварин з мінімальним, середнім чи максимальним показником відносно всього масиву даних, приймаючи загальну кількість тварин за 100%. Дані представлені у вигляді середнього значення \pm стандартна помилка середнього ($M \pm m$).

Результати та їх обговорення

Експериментальним шляхом були адаптовані основні розведення для засіву на відповідні елективно-диференційні середовища (HiMedia Laboratories Pvt.Ltd, Індія).

При дослідженні складу нормобіоти людини за характером метаболізму, в першу чергу, звертають увагу на дві основні групи: цукролітичні та протеолітичні мікроорганізми.

Цукролітичні мікроорганізми (біфідобактерії, лактобацили, лактококи, пропіонібактерії та інші) спрямовують свій метаболізм на ферментацію вуглеводів, що надходять в організм з їжею, і олігоцукридів слизу (муцинів), що синтезуються келихоподібними епітеліоцитами кишечника. За літературними даними референс-показники фекального біоптату людини для *Bifidobacterium* становлять 10⁹–10¹² КУО/г, *Lactobacillus* – 10⁷–10¹⁰ КУО/г, *Propionibacterium* – 10⁷–10¹⁰ КУО/г [1]. За результатами наших досліджень кількість анаеробних цукролітичних мікроорганізмів в 1 г фекалій щурів є на 1–2 порядки нижчою в порівнянні з нормобіотою людини (табл. 1). Так, кількість мікроорганізмів роду



Bifidobacterium висівалась в межах 10^6 – 10^9 КУО/г, *Propionibacterium* – 10^5 – 10^9 КУО/г, *Lactobacillus* – 10^6 – 10^8 КУО/г фекального біоптату. При цьому переважна більшість тварин (71,4%) мала середні значення кількості цукролітичних анаеробних представників на 1 г біоптату: *Bifidobacterium* – $\lg 8,5 \pm 0,5$ КУО/г, *Lactobacillus* – $\lg 7,5 \pm 0,5$ КУО/г, *Propionibacterium* – $\lg 8,2 \pm 0,7$ КУО/г (табл. 2).

Таблиця 1

Референс-діапазони кількісних показників нормобіоти фекалій

Table 1

Reference ranges for quantitative characteristics of faeces normobiota

Мікроорганізми	Кількість мікроорганізмів у щурів, КУО/г	Кількість мікроорганізмів у людини, КУО/г [11]
<i>Bifidobacterium</i>	$10^6 - 10^9$	$10^9 - 10^{12}$
<i>Lactobacillus</i>	$10^6 - 10^9$	$10^7 - 10^{10}$
<i>Propionibacterium</i>	$10^5 - 10^9$	$10^7 - 10^{10}$
<i>E. coli</i> з нормальними ферментатив вл-ми	$10^4 - 10^7$	$10^6 - 10^8$
<i>E. coli</i> зі зміненими ферментативними вл-ми	$10^2 - 10^5$	Не більше 10 %
Умовно-патогенні ентеробактерії	$0 - 10^3$	$0 - 10^3$
<i>Staphylococcus aureus</i>	$10^3 - 10^5$	$10^3 - 10^5$
<i>Staphylococcus sp.</i>	$0 - 10^7$	-
<i>Clostridium sp.</i>	$10^2 - 10^4$	$10^2 - 10^5$
<i>Candida sp.</i>	$0 - 10^3$	$10^2 - 10^4$

Відмінності, у порівнянні з фекальною мікробіотою кишечника людини, виявлені щодо кількісного співвідношення *E. coli* з нормальними та зміненими ферментативними властивостями. «*E. coli* зі зміненими ферментативними властивостями» – кишкові палички зі зниженою здатністю ферментувати лактозу та лактозо-негативні форми. При оцінці мікробного пейзажу біоти товстої кишки для *E. coli* оцінюється здатність ферментувати лактозу, загальноприйнятим є можливість об'єднувати в термін «... зі зміненими ферментативними властивостями» такі форми, які зовсім або частково втратили здатність до ферментації лактози.

Якщо для нормобіоти людини кількість *E. coli* зі зміненими ферментативними властивостями не перевищує 10% від загальної кількості кишкових паличок [11], то для щурів характерним є майже рівне їх співвідношення. Так у більшості тварин значення для *E. coli* з нормальними ферментативними властивостями були в межах $\lg 4,5 \pm 0,5$ КУО/г, а зі зміненими $\lg 3,2 \pm 0,8$ КУО/г.



Таблиця 2

Видовий та кількісний ($M \pm m$) склад нормобіоти фекального біоптату товстої кишки щурів ($n=21$)

Table 2

Species and quantitative composition ($M \pm m$) of normobiota of rats fecal biopsy colon ($n=21$)

Мікроорганізми	Кількість мікроорганізмів, lg КУО/г (число тварин, %)		
	мінімальні значення	середні значення	максимальні значення
<i>Bifidobacterium</i>	$6,8 \pm 0,1$ (14,3)	$8,5 \pm 0,5$ (71,4)	$9,0 \pm 0,3$ (14,3)
<i>Lactobacillus</i>	$6,5 \pm 0,4$ (19,0)	$7,5 \pm 0,5$ (66,7)	$8,5 \pm 0,1$ (14,3)
<i>Propionibacterium</i>	$5,5 \pm 0,2$ (14,3)	$8,2 \pm 0,7$ (71,4)	$9,2 \pm 0,1$ (14,3)
<i>E. coli</i> з нормальними ферментативними властивостями	$3,9 \pm 0,1$ (9,5)	$4,5 \pm 0,5$ (76,2)	$6,8 \pm 0,2$ (14,3)
<i>E. coli</i> зі зміненими ферментативними властивостями	$1,7 \pm 0,4$ (14,3)	$3,2 \pm 0,8$ (57,1)	$4,7 \pm 0,3$ (28,6)
Умовно-патогенні ентеробактерії	$0,0 \pm 0,0$ (14,3)	$2,4 \pm 0,3$ (47,6)	$3,0 \pm 0,2$ (38,1)
<i>Staphylococcus aureus</i>	$2,0 \pm 0,1$ (9,5)	$3,5 \pm 0,3$ (47,6)	$4,5 \pm 0,2$ (42,8)
<i>Staphylococcus sp.</i>	$0,0 \pm 0,0$ (23,8)	$4,5 \pm 0,8$ (61,9)	$6,6 \pm 0,2$ (14,3)
<i>Clostridium sp.</i>	$1,8 \pm 0,2$ (9,5)	$2,0 \pm 0,1$ (61,9)	$3,0 \pm 0,6$ (28,6)
<i>Candida sp.</i>	$0,0 \pm 0,0$ (14,3)	$1,8 \pm 0,3$ (57,1)	$2,8 \pm 0,2$ (28,6)

У фекаліях щурів виявляли умовно-патогенні бактерії (*Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter* та ін.), проте їх кількість не перевищувала 10^3 КУО/г. Середні показники висівання зазначених представників, становили $\lg 2,4 \pm 0,3$ КУО/г.

При ідентифікації бактерій роду *Staphylococcus* кількість сапрофітних представників досягала 10^7 КУО/г, а кількість представників виду *S. aureus* коливалась в межах 10^3 – 10^5 КУО/г. Гемолітичних штамів не виявляли.

Представників роду *Clostridium* відносять до умовно-патогенних бактерій, а *C. difficile* вважають одним з факторів розвитку псевдомембранозного коліту [8]. З іншого боку з'являється все більша кількість повідомлень про необхідність їх присутності у складі біотопу шлунково-кишкового тракту. Їх позитивну роль пов'язують з тим, що вони є найбільш активними продуцентами бутирату (масляна кислота), який є найкращим енергетичним субстратом



для клітин епітелію товстої кишки та відіграє суттєву роль в їх проліферації і диференціації [9, 10]. В наших дослідженнях представники роду *Clostridium* висівались у 100% тварин, а межі їх висівання були від $\lg 1,8 \pm 0,2$ КУО/г до $\lg 3,0 \pm 0,6$ КУО/г (табл. 2).

Гриби роду *Candida* висівались у 85,7% досліджуваних тварин, а їх титри не перевищували 10^3 КУО/г.

Фекальну мікробіоту не можна вважати як таку, що повноцінно відображає мікробний пейзаж слизової оболонки товстої кишки. Пристінкова мікробіота більш стабільна і фізіологічна, так як щільно зв'язана з муциновим шаром слизової оболонки. Вона існує у вигляді мікроколоній і у фізіологічному, структурному і функціональному відношенні є невід'ємним компонентом приепітеліальних біологічно активних плівок. За нормальних умов вона представлена доміантними мікроорганізмами, які в синергізмі з іншими компонентами біоплівки (імуноглобулінами, імунними клітинами, ферментами, полісахаридами, та ін.) виконує найбільш значимі фізіологічні функції. Отже пристінкова мікробіота для макроорганізму є найбільш цінною частиною мікробіоти, зміни якої найбільш суттєво відображаються на всіх процесах, що відбуваються у макроорганізмі [10,12]. Тому наступним етапом нашої роботи було дослідження кількісного та якісного складу пристінкової біоплівки товстої кишки умовно-здорових щурів (табл. 3).

На відміну від фекального біоптату в пристінковому не було виявлено представників родів *Clostridium* та *Candida*. Анаеробні цукролітичні бактерії родів *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium* висівались у 100% тварин. Так *Bifidobacterium* та *Propionibacterium* висівались в межах 10^3 – 10^6 КУО/см², а *Lactobacillus* – 10^2 – 10^4 КУО/см².

Лактозопозитивні *E. coli* не висівались у 14,3% тварин, а у 71,4% їх кількість становила $\lg 1,7 \pm 0,2$ КУО/см².

В епітеліальному біоптаті умовно-патогенні бактерії висіяно у 14,3% тварин у титрі $\lg 1,4 \pm 0,3$ КУО/см².

Представники виду *Staphylococcus aureus* висівались у 28,6% тварин в кількості $\lg 1,9 \pm 0,4$ КУО/см², а титр сапрофітних стафілококів досягав $\lg 2,7 \pm 0,1$ КУО/см² (28,6% тварин).

За аналізу стану мікробіоценозу шлунково-кишкового тракту традиційно враховують лише зміни, що відбуваються у товстій кишці, і практично ніколи не береться до уваги мікробіота тонкої кишки, зміни якої (перш за все підвищення бактеріального обсіменіння тонкої кишки) відіграють суттєву роль в патології травного тракту [13].

Мікробіота, що була виділена нами з пристінкового біоптату дистального відділу тонкої кишки майже не відрізнялась від такої товстої кишки (табл. 4). Основну її масу складали представники анаеробних цукролітичних бактерій. В тонкій кишці зовсім не було виявлено умовно-патогенних бактерій, клостридій та грибів роду *Candida*.



Таблиця 3

Видовий та кількісний ($M \pm m$) склад нормобіоти пристінкового біоптату товстої кишки щурів ($n = 21$)

Table 3

Species and quantitative composition ($M \pm m$) of normobiota of wall surface biopsy of rats colon ($n = 21$)

Мікроорганізми	Кількість мікроорганізмів, lg КУО/см ² (число тварин, %)			Референс-діапазон (КУО/см ²)
	мінімальні значення	середні значення	максимальні значення	
<i>Bifidobacterium</i>	2,7 ± 0,3 (14,3)	4,0 ± 0,3 (42,8)	5,7 ± 0,1 (42,8)	10 ³ – 10 ⁶
<i>Lactobacillus</i>	2,0 ± 0,9 (14,3)	3,0 ± 0,2 (28,6)	3,6 ± 0,4 (57,1)	10 ² – 10 ⁴
<i>Propionibacterium</i>	2,9 ± 0,1 (14,3)	4,2 ± 0,7 (57,1)	5,7 ± 0,4 (28,6)	10 ³ – 10 ⁶
<i>E. coli</i> з нормальними ферментативними властивостями	0,0 ± 0,0 (14,3)	1,7 ± 0,3 (71,4)	3,0 ± 0,5 (14,3)	0 – 10 ³
<i>E. coli</i> зі зміненими ферментативними властивостями	0,0 ± 0,0 (28,6)	0,7 ± 0,2 (57,1)	1,6 ± 0,3 (14,3)	0 – 10 ²
Умовно-патогенні ентеробактерії	0,0 ± 0,0 (71,4)	- (0,0)	1,4 ± 0,3 (28,6)	0 – 10 ²
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,0 ± 0,0 (71,4)	- (0,0)	1,9 ± 0,4 (28,6)	0 – 10 ²
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0,0 ± 0,0 (57,1)	0,7 ± 0,4 (28,6)	2,7 ± 0,1 (14,3)	0 – 10 ³
<i>Clostridium sp.</i>	0,0 ± 0,0 (100,0)	- (0,0)	- (0,0)	0
<i>Candida sp.</i>	0,0 ± 0,0 (100,0)	- (0,0)	- (0,0)	0

Примітка: «-» – показники в даному діапазоні відсутні

Note: «-» – indices in given range are absent

Виявлений в останні роки фундаментальний факт обміну низькомолекулярними метаболітами між індигенною мікробіотою і макроорганізмом послугував основою для створення принципово нових методів оцінки стану мікробіоценозу та участі її метаболітів у забезпеченні локальних і системних функцій макроорганізму. Встановлено, що до метаболітів, відповідальних за енергозабезпечення епітелію, постачання субстратів ліпо- і гліуконеогенезу, підтримання іонного обміну, активації місцевого імунітету, регуляції та диференціювання епітелію, тощо, відносять КЛЖК, які продукуються мікроорганізмами товстої кишки. Вивчення КЛЖК при патології ШКТ має більш високу чутливість і специфічність у порівнянні з традиційним бактеріологічним дослідженням та дозволяє розглянути стан мікробіоценозу на молекулярно-біохімічному рівні. [4, 14].



Видовий та кількісний ($M \pm m$) склад нормобіоти пристінкового біоптату тонкої кишки лабораторних щурів ($n = 21$)

Species and quantitative composition ($M \pm m$) of normobiota of wall surface biopsy of laboratory rats colon ($n = 21$)

Мікроорганізми	Кількість мікроорганізмів, Іг КУО/см ² (число тварин, %)			Референс-діапазон (КУО/см ²)
	мінімальні значення	середні значення	максимальні значення	
<i>Bifidobacterium</i>	4,0 ± 0,3 (21,4)	5,3 ± 0,3 (78,6)	6,0 ± 0,1 (7,1)	10 ⁴ – 10 ⁶
<i>Lactobacillus</i>	4,0 ± 0,3 (36,4)	5,0 ± 0,3 (45,4)	6,2 ± 0,1 (18,0)	10 ⁴ – 10 ⁶
<i>Propionibacterium</i>	3,1 ± 0,2 (33,3)	4,0 ± 0,1 (11,1)	5,0 ± 0,1 (55,6)	10 ³ – 10 ⁵
<i>E.coli</i> з нормальними ферментативними властивостями	0,0 ± 0,0 (57,1)	2,7 ± 0,3 (28,6)	5,0 ± 0,7 (14,3)	0 – 10 ⁶
<i>E.coli</i> зі зміненими ферментативними властивостями	0,0 ± 0,0 (71,4)	- (0,0)	2,7 ± 0,4 (28,6)	0 – 10 ³
Умовно-патогенні ентеробактерії	0,0 ± 0,0 (100,0)	- (0,0)	- (0,0)	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,0 ± 0,0 (85,7)	- (0,0)	3,3 ± 0,5 (14,3)	0 – 10 ⁴
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0,0 ± 0,0 (57,1)	2,9 ± 0,1 (14,3)	4,9 ± 0,2 (28,6)	0 – 10 ⁵
<i>Clostridium sp.</i>	0,0 ± 0,0 (100,0)	- (0,0)	- (0,0)	0
<i>Candida sp.</i>	0,0 ± 0,0 (100,0)	- (0,0)	- (0,0)	0

Примітка: «-» – тварини з показниками в даному діапазоні відсутні
 Note: «-» – animals with characteristics in given range are absent

Нами показано, що склад КЛЖК фекалій щурів подібний до такого у людини [15], і містить: оцтову (С2), пропіонову (С3), масляну та ізомасляну (С4, іС4), валеріанову та ізовалеріанову (С5, іС5), а також капронову та ізокапронову (С6, іС6) кислоти. Найбільша кількість, так само як і у людини [15], припадала на оцтову кислоту (0,211–0,923 мг/г), дещо меншою є кількість пропіонової (0,159–0,897 мг/г) та масляної (0,071–0,633 мг/г) кислот (табл. 5)

У процентному співвідношенні склад зазначених КЛЖК (С2:С3:С4) для дорослої людини дорівнює 63,6 : 19,2 : 17,2% [7]. В наших дослідженнях, для щурів лінії Вістар він становив 41,9 : 32,2 : 20,9 %. Інші КЛЖК (С5, С6), аналогічно для людей [4], присутні у слідових кількостях.



Кореляційний аналіз не виявив чіткої закономірності між складом фекальної нормобіоти та вмістом КЛЖК. Тому, для більш реальної оцінки картини стану мікробіоти кишкового тракту клініцисти пропонують комплексне використання методів оцінки показників мікробного гомеостазу (класичного бактеріологічного та сучасного біохімічного – визначення КЛЖК) [4]. На нашу думку вони є взаємодоповнюючими, а не виключаючими один одного.

Таблиця 5

**Вміст коротко-ланцюгових жирних кислот (мг/г)
у фекальному біоптаті щурів та людини**

Table 5

Contents of short-chain fatty acids (mg/g) in rats and humans fecal biopsy

Жирні кислоти	Власні дослідження (щурів)		Літературні відомості [15]		
	M±m n=31	Референс-діапазон	Щури		Люди
			M±m	Референс-діапазон	M±m
Оцтова	0,455± 0,170	0,211-0,923	2,818± 0,720	1,523-3,587	0,634± 0,004
Пропіонова	0,374± 0,164	0,159-0,897	0,268± 0,073	0,145- 0,364	0,189± 0,001
Масляна	0,252± 0,132	0,071-0,633	1,387± 0,613	0,286-0,155	0,176± 0,004
Валер'янова	0,021± 0,019	0,008-0,035	0,053± 0,022	0,022-0,092	-
Ізо-валер'янова	0,018± 0,162	0,005-0,030	0,041± 0,017	0,018-0,062	-

Примітка: «-» – не зазначено

Note: «-» – are absent

Таким чином, не зважаючи на те, що щурів не можна вважати цілком адекватною моделлю організму людини у зв'язку з відмінностями у анатомічній будові ШКТ і особливостями фізіології (криса є копрофагом), проте знання про відмінності кількісних та функціональних показників мікробіоти лабораторних щурів та людини можуть бути використані для подальших досліджень впливу різноманітних факторів на мікроекологічний статус ШКТ.

Висновки: Для щурів лінії Вістар визначено референс-діапазони основних груп мікроорганізмів фекального біоптату, які враховують при оцінці стану нормобіоти кишечника людини. Вперше визначено референс-діапазони мікробіоти пристінкового біоптату товстої та тонкої кишок щурів. Основними КЛЖК, які виявляються у фекальному біоптаті щурів, є оцтова (C2), пропіонова (C3) та масляна (C4) кислоти. Їх співвідношення становить (C2:C3:C4) 41,9:32,2:20,9%.



А.В. Путніков¹, Ю.В. Голота¹, Т.М. Сергійчук¹, А.Н. Остапчук²,
Л.В. Закордонець³, Л.И. Остапченко¹, А.Н. Толстанова¹

¹Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, ОНЦ «Институт биологии»,
ул. Владимирская 64/13, Киев, 01601, Украина

²Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, ул. Академика
Заболотного 154, Киев, ГСП, Д 03680, Украина

³Национальный медицинский университет имени О.О. Богомольца, бульвар Т. Шевченко, 13,
Киев, 01601, Украина

КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ КИШЕЧНОЙ НОРМОБИОТЫ КРЫС

Реферат

Цель. Целью данной работы было определить референс-диапазоны микробиологических показателей фекального и пристеночного кишечного биотопа лабораторных крыс и провести сравнительный анализ с существующими данными для показателей человека. **Методы.** Микробиологический анализ фекалий (КОЕ/г) и пристеночного (КОЕ/см²) биотопа крыс самцов линии Вистар (170–200 г, n = 31) осуществляли путем высева соответствующих разведений на селективные-дифференциальные среды, спектр и концентрацию коротко-цепочечных жирных кислот (КЦЖК) определяли методом газо-жидкостной хроматографии. **Результаты.** В фекалиях крыс количество микроорганизмов рода *Bifidobacterium* высевались в пределах 10⁶–10⁹ КОЕ/г, *Propionibacterium* – 10⁵–10⁹ КОЕ/г, *Lactobacillus* – 10⁶–10⁸ КОЕ/г. Установлено почти равное соотношение между *E. coli* с нормальными (10⁴–10⁷ КОЕ/г) и измененными (10²–10⁵ КОЕ/г) ферментативными свойствами. Количество условно-патогенных бактерий (*Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter* и др.) не превышало 10³ КОЕ/г, *Clostridium* sp. – 10²–10⁴ КОЕ/г, сапрофитных представителей рода *Staphylococcus* – 0–10⁷ КОЕ/г, *S. aureus* – 10³–10⁵ КОЕ/г, грибы рода *Candida* – 0–10³ КОЕ/г. Гемолитических штаммов не выявляли. В пристеночном биоптате толстой и терминальном отделе тонкой кишки крыс не было обнаружено представителей родов *Clostridium* и *Candida*. Анаэробные сахаролитические бактерии родов *Bifidobacterium* (10³–10⁶ КОЕ/см²), *Lactobacillus* (10²–10⁶ КОЕ/см²), *Propionibacterium* (10³–10⁶ КОЕ/см²) высевались у 100% животных. Состав КЦЖК фекалий крыс подобен таковому у человека, и содержит: уксусную (С2), пропионовую (С3), масляную и изомаляную (С4, iС4), валерьяновую и изовалериановую (С5, iС5), а также капроновую и изокапроновую (С6, iС6) кислоты. **Выводы.** Для крыс линии Вистар определены референс-диапазоны основных групп микроорганизмов фекального биоптата, которые учитывают при оценке состояния нормобиоты кишечника человека. Впервые определены референт диапазоны микробиоты пристеночного биоптата толстой и тонкой кишок крыс. Соотношение КЦЖК в фекалиях крыс линии Вистар (С2: С3: С4) составляет 41,9: 32,2: 20,9%.

Ключевые слова: нормобиота, референс-диапазон, коротко-цепочечные жирные кислоты, тонкая кишка, толстая кишка.



A.V. Putnikov¹, Yu.V. Holota¹, T.M. Sergeychuk¹, A.M. Ostapchuk²,
L.V. Zakordonets³, L.I. Ostapchenko¹, G.M. Tolstanova¹

Kyiv National Taras Shevchenko University, Educational and Scientific Center "Institute of Biology",
64/13 Volodymyrska str., Kyiv, 03022, Ukraine

D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of NASU,
154, akad. Zabolotny str., Kyiv, MSP, D 03680, Ukraine

Bogomolets National Medical University, 13, Bulvar Shevchenko, Kyiv, 01601, Ukraine

QUANTITATIVE AND FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF RAT INTESTINAL MICROBIOTA

Summary

Aim. The aim of this study was to determine reference ranges of microbiological parameters of laboratory rats faecal and parietal intestinal biotope and a comparative analysis of existing data for the human indicators. **Methods.** Study was done on male Wistar rats (170–200 g, n=31). The fecal (CFU/g) and parietal (CFU/cm²) microbiota have been analyzed by bacteriological culture methods, levels of SCFA – by gas chromatography. **Results.** Rat feces contained 10⁶–10⁹ CFU/g, *Bifidobacterium* sp. 10⁵–10⁹ CFU/g, *Propionibacterium* sp. 10⁵–10⁹ CFU/g and *Lactobacillus* 10⁶–10⁸ CFU/g. There were determined almost equal ratio between lactose (+) *E. coli* (10⁴–10⁷ CFU/g) and lactose (-) *E. coli* (10²–10⁵ CFU/g). Quantity of conditionally-pathogenic bacteria (*Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, etc.) did not exceed 10³ CFU/g, *Clostridium* sp. – 10²–10⁴ CFU/g, *Staphylococcus* sp. – 0–10⁷ CFU/g, *S. aureus* – 10³–10⁵ CFU/g, *Candida* spp. – 0–10³ CFU/g. Hemolytics trains were not detected. Mucosa of the colon and the terminal ileum was not colonized by *Clostridium* spp. and *Candida* spp. But 100% of investigated animals were colonized with *Bifidobacterium* (10³–10⁶ CFU/cm²), *Lactobacillus* (10²–10⁶ CFU/cm²), *Propionibacterium* (10³–10⁶ CFU/cm²). The composition of rat's SCFA in faeces is similar to human's and contains: acetic (C2), propionic (C3), butyric and isobutyric (C4 iS4) valeric and isovaleric (C5 iC5) hexanoic and isocaproic (C6 iC6) acids. **Conclusion.** Wistar rats were determined with reference ranges of major groups of microorganisms fecal biopsies, which are taken into account when assessing the state of human intestinal normobiota. For the first time reference ranges of rats colon and small intestine parietal microbiota biopsies are defined. The ratio of SCFA of Wistar rats feces (C2: C3: C4) is 41.9: 32.2: 20.9%.

Key words: normobiota, reference-range, short chain fatty acids, small intestine, colon.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Корнеева О.Н., Ивашкин В.Т. Антибиотико-ассоциированный колит: патоморфология, клиника, лечение // РЖГТК. – 2007. – № 3. – С. 65–70.
2. Cho J., Yamanishi S., Cox L. et al. Antibiotics in early life alter the murine colonic microbiome and adiposity // Nature. – 2012. – 7413, N 488. – P. 621–626.
3. Blaser M. Antibiotic overuse: Stop the killing of beneficial bacteria // Nature. – 2011. – 476, N 24. – P. 393–396.
4. Ардатская М.Д. Клиническое значение короткоцепочечных жирных кислот при патологии желудочно-кишечного тракта. Автореф. дис. д-ра. биол. наук. – Москва, 2003. – 45 с.



5. *Mikelssaar M., Siigur U.* Metronidazole and the Intestinal Microecology of Rats // *Microbial ecology in health and disease.* – 1992, № 5. – P. 139–146.
6. *Наказ* Міністерства освіти і науки молоді та спорту України від 01.03.2012 №249 «Про затвердження Порядку проведення науковими установами дослідів та експериментів на тваринах» Зареєстровано в Міністерстві юстиції України 16 березня 2012 р. за № 416/20729.
7. *Sheveleva M.A., Ramenskaya G.V.* Gas chromatographic analysis of short-chain fatty acids in the standartization of medicinal formulations based on bacterial substrates // *Pharmaceutical Chemistry Journal.* – 2010. –44, N 6. – P. 334–336.
8. *McFarland L.V.* Alternative treatments for Clostridium difficile disease: what really works? // *J. Med. Microbiol.* – 2005. –54 – P. 101–111.
9. *Головенко О.В., Халиф И.Л. Головенко А.О.* Роль масляной кислоты в лечении органических и функциональных заболеваний толстой кишки // *Клинические перспективы гастроэнтерологии, гепатологии.* – 2011. – № 3. – С. 20–29.
10. *Watnick P., Kolter R.* Biofilm, City of Microbes // *J. Bacteriol.* – 2000. – 182, N 10. – P. 2675–2679.
11. *Янковский Д.С., Дымент Г.С.* Микрофлора и здоровье человека. – Київ: ТОВ «Червона Рута-Турс», 2008. – 552 с.
12. *Macfarlane S., Dillon F.* Microbial biofilms in the human gastrointestinal tract // *J. Appl Microbiol.* – 2012. – 12, N 1 – P. 47–55.
13. *Белюсова Е.А.* Синдром избыточного бактериального роста тонкой кишки в свете общей концепции о дисбактериозе кишечника. Взгляд на проблему // *Фарматека.* – 2009 – № 2 – С. 116–122.
14. *Topping D.I., Clifton P.M.* Short-Chain Fatty Acids and Human Colonic Function: Roles of Resistant Starch and Nonstarch Polysaccharides // *Physiological Reviews.* – 2001. – 81. N 3. – P. 1031–1064.
15. *Rocio Garcia-Villalba Juan A., Gimenez-Bastida Maria T., Garcia-Conesa Francisco A. et al.* Alternative method for gas chromatography-mass spectrometry analysis of shot-chain fatty acids in faecal samples. // *J. Sep. Sci.* – 2012. – 35, – P. 1906–1913.
16. *Sekirov I., Russell S. L., Antunes L.C.M., Finlay B.B.* Gut Microbiota in Health and Disease // *Physiological Reviews.* – 2010. – 90. – P. 859–904.

Стаття надійшла до редакції 07.07.2014 р.

