

**Вплив аскорбату хітозану на склад
мікрофлори товстого кишечника при
експериментальному дисбіозі**

Зміст

1. Вступ.....	3
2. Огляд літератури.....	4
3. Матеріали та методи.....	10
4. Результати дослідження.....	13
5. Висновки.....	21
6. Список літератури.....	22

Вступ

Актуальність. Адаптація людини до умов зовнішнього середовища залежить від цілого ряду специфічних та неспецифічних факторів, серед яких мікрофлора тіла людини відіграє важливу роль. Однією з найважливіших функцій нормальної мікрофлори є підтримання колонізаційної резистентності проти зовнішньої експансії патогенних мікроорганізмів. Порушення функціонування нормальної мікрофлори (кількісні та якісні) є причиною різноманітних негативних наслідків та називаються дисбіозом. В практиці для корекції дисбіотичних процесів найчастіше використовують еубіотики. Однак при їх використанні виникає цілий ряд перешкод, які часто зводять нанівець проведену терапію.

Метою нашого дослідження було вивчити вплив аскорбату хітозану на склад мікрофлори товстого кишечника та встановити характер морфологічних змін товстого кишечника в умовах штучного дисбіозу, викликаного введенням грибково-бактеріальних сумішей імуносупресивним щурам.

Завдання дослідження:

1. Вивчити зміни якісного та кількісного складу пристінкової та просвітної мікрофлори товстого кишечника при лікуванні експериментального дисбіозу аскорбатом хітозану.
2. Дослідити рівень транслокації умовно-патогенних мікроорганізмів у тканину легень, серця, про корекції експериментального дисбіозу з використанням аскорбату хітозану.
3. Вивчити характер морфологічних змін товстого кишечника при лікуванні дисбіозу аскорбатом хітозану.

Огляд літератури

В останні роки відбулися істотні зміни в розумінні й значенні мікроорганізмів, що населяють кишечник людини. У процесі філогенетичного розвитку людини сформувалася мікроекологічна система з властивою їй складною динамічною рівновагою між фізіологічним статусом макроорганізму і мікробними популяціями, які її заселяють. Стан динамічної рівноваги між усіма компонентами в даній екологічній системі позначають як еубіотичний [1].

У результаті різних несприятливих дій на людину, формування патологічних станів і порушень відбуваються кількісні та якісні зміни нормальної мікрофлори людини - "дисбіотичні реакції". Дисбіоз розглядають як прояв дисгармонії в екологічній системі [1,2].

Дисбактеріоз (дисбіоз) кишечника - клініко-лабораторний синдром, який розвивається при цілому ряді захворювань та клінічних ситуацій і характеризується зміною якісного і / або кількісного складу мікрофлори певного біотопу, транслокацією різних її представників у невласиві біотопи, а також метаболічними та імунними порушеннями, що супроводжуються у частини пацієнтів клінічними симптомами. Останнім часом широко використовується термін "дисбіоз кишечника", створений з латинських слів "dis" - утруднення, порушення, розлад і "bios" - життя. Дисбіоз кишечника - це порушення функціонування та механізмів взаємодії складових частин екосистеми, які включають зміни з боку макроорганізму людини, її мікрофлори і навколишнього середовища[3].

Дослідження вітчизняних авторів показали, що в нашій країні більше ніж у половини населення виявляються мікробіологічні порушення в кишечнику [3]. У виникненні дисбактеріозу товстої кишки істотну роль грають антагоністичні взаємини представників природних асоціацій. Серед найбільш частих причин дисбактеріозу товстої кишки можна виділити несприятливі зовнішні дії, що пригнічують захисні механізми організму: терапія хіміопрепаратами, антибіотиками, імунодепресантами, стероїдними

гормонами, іонізуюча радіація, рентгенотерапія, рентгенівські обстеження, забруднення біосфери, екстремальні кліматичні умови.

Вивчення дисбактеріозу у хворих не дає змоги визначити початкові механізми виникнення цього явища: тому що, як правило, має місце певний патогенетичний ланцюг, що охоплює різні системи організму. Поряд із клінічними та епідеміологічними спостереженнями досліди на тваринах сприяють розширенню знань про властивості мікроорганізмів та їх взаємодію між собою та з організмом-носієм. Експериментальна модель має широкі можливості при вивченні будь-якого типу патології [1].

Моделювання патологічних станів на тваринах вимагає урахування багатьох факторів: тому що дослідженню підлягають різні сторони реактивних процесів організму. Експериментальна модель на тваринах дозволяє дослідити більшість процесів відповіді макроорганізму, зумовлених багатьма екзо- та ендogenous факторами[2]. Загалом, моделювання використовується для вивчення складних механізмів патогенезу, морфогенезу та імуногенезу хвороби. Ще одним важливим аспектом розробки моделі на тваринах є подальше порівняння її з випадками захворювання людини, адже досягнути ідентичності в клініко-морфологічному відношенні майже неможливо[3]. Моделі на тваринах можна використовувати при випробуванні нових препаратів. В лабораторних дослідженнях переважно використовують мишей та щурів, які вважаються близькими до людини у генетичному плані.

Для всебічного вивчення проблеми виникнення і розвитку дисбактеріозів товстого кишечника необхідно проведення серій експериментів, спрямованих на створення моделі дисбактеріозу товстого кишечника у експериментальних тварин під дією різних факторів. Створення такої моделі дозволяє з'ясувати більшість проблемних питань щодо ролі окремих видів мікроорганізмів, антибіотиків та імуносупресантів в якості чинників дисбактеріозу. Розуміння цих механізмів може сприяти розробці

методів профілактики та лікування порушень екологічної рівноваги мікрофлори товстого кишечника [5].

Найчастіше при дисбіозах кишечника відбувається зростання кількості таких мікроорганізмів як *Candida spp.* та *Staphylococcus spp.* Для корекції кандидозної та стафілококової інфекцій використовується різноманітні антибіотичні препарати [4]. Ряд останніх досліджень свідчать про зростання кількості резистентних до антибіотиків штамів серед умовно патогенних мікроорганізмів та низьку ефективність еубіотичних препаратів при корекції дисбіотичних процесів [5]. Для подолання всіх цих перешкод необхідно проведення пошуку нових та ефективних препаратів для лікування порушень мікробіоценозу.

Більшість робіт, які присвячені вирішенню даної проблеми, базуються на вивченні антимікотичної та бактерицидної активності препаратів *in vitro*. Ряд дослідників вивчали протигрибкову та бактерицидну активність ефірних масел [4], інші - визначили, що жирні кислоти (каприкова, лаурикова, 10- та 12-карбонатнасичені кислоти) найкраще та найбільш ефективно знищують усі досліджувані штами *C. albicans*, викликаючи дезорганізацію цитоплазми та порушуючи мемри різних концентраціях та тривалості експозиції [5]. Лише в деяких роботах було вивчено вплив антимікотичних та антибактеріальних препаратів на мікрофлору лабораторних тварин при індукованому дисбіозі та встановлено їх дію на склад пристінкової мікрофлори товстого кишечника [6, 9]. Ряд робіт було присвячено вивченню антимікотичної та антибактеріальної активності хітозану та його похідних *in vitro* [5], який на наш погляд є перспективним препаратом.

Хітозан є аміносахаридом, який отримують з панцирів червононогих крабів або з нижчих грибів шляхом видалення ацилу, який надає жорсткості хітину. Даний препарат має багато властивостей, що робить можливим застосовувати його у великій кількості галузей. За деякими даними, хітозан знижує рівень холестерину, сечової кислоти і глюкози в крові, має антибактеріальні та протигрибкові властивості. Хітозан здатний сорбувати

жири, запобігати їх всмоктуванню та накопиченню в клітинах і тканинах. Він підсилює перистальтику кишечника та прискорює виведення з організму харчових жирів, шлаків і токсинів, сприяючи нормалізації кишкової мікрофлори. Для хітозану також притаманні мукоадгезивні властивості, тобто здатність до прилипання до слизових оболонок, здатність зв'язувати вільні радіонукліди та виводити їх з організму людини [4-8]. Особливо виділена роль хітозану у збільшенні числа корисних біфідобактерій [11].

Хітозан має також імуномодельючі властивості. Експерименти на тваринах дозволяють припустити, що хітозан та його похідні, стимулюють неспецифічну імунну реакцію: вони підсилюють синтез імуноглобулінів та інтерферонів, допомога у відтворенні лімфоцитів, макрофагів, нейтрофілів - основних елементів імунної системи. Японські дослідники виявили, зокрема, що одночасно з підвищенням імунітету, хітозан діє як протипухлинний агент в декількох напрямках одразу. Було доведено, що у щурів, які отримували хітозан, здатність виживати була на 20% більше. Автори дослідження пояснили результати здатністю хітозану нейтралізувати дію вільних радикалів, які утворюються при радіаційному опроміненні [20].

Ще одним напрямком використання хітозану є його застосування для лікування ран. Було встановлено, що цей біополімер сприяє регенерації тканин. Хітозанові компоненти близькі за своєю структурою і властивостями до людських тканин тіла і клітин, тому вони допомагають у "будівництві" нових клітин і прискорюють відновлення пошкоджених органів і тканин, не викликаючи алергічних реакцій в процесі [10].

Біоцидній активності хітозана присвячена велика кількість експериментальних робіт. З'ясовано, що наночастинки на основі хітозану виявляли антибактеріальну активність по відношенню до *E.coli*, *S. choleraesuis*, *S. typhimurium*, *S. aureus*, при цьому вони були більш ефективними у порівнянні з вихідним хітозаном [12-13]. Проявляючи інгібуючу дію на бактерії та гриби хітозан не впливає на клітини ссавців [14]. На жаль, серед опублікованих робіт, присвячених синтезу

біокомпозитів хітина / хітозана, лише мала частина описує повний цикл досліджень, які включають в себе тести *in vivo*. Механізми антибактеріальної та антимікотичної дії цього біополімера на клітинному і молекулярному рівнях також залишаються до кінця не з'ясованими [15].

Хітозан виявляє інгібуючу активність по відношенню до прокаріотичних та еукаріотичних мікроорганізмів, що вказує на відмінність клітинних структур, які виступають у якості мішеней для біополімера.

Відомо, що хітозан діючи на грам-негативні бактерії порушує їх нормальне функціонування та будову зовнішніх структур клітинної стінки, цитоплазматичної мембрани, цитозоллю, порушує обмін речовин між клітиною та навколишнім середовищем, що призводить до лізису бактерій.

У грам-позитивних бактерій хітозан також порушує проникність цитоплазматичної мембрани, що призводить до зменшення мембранного потенціалу та вивільненню клітиною в середовище іонів калію [16], низькомолекулярних нуклеотидів та коензимів та навіть цитоплазматичних ферментів [17]. В одній з робіт відмічається, що інгібування росту золотистих стафілококів хітозаном супроводжувалось зменшенням експресії генів, залучених в біосинтез РНК і білків, а також метаболізму вуглеводів, амінокислот, нуклеотидів та нуклеїнових кислот, ліпідів і коензимів [16].

Механізм протигрибкової дії хітозану залишається на сьогоднішній день маловивченим. По аналогії з бактеріями дію хітозану пов'язують із порушенням структури клітинної стінки, що веде до зміни морфології міцелію, розміру і форми спор [18], порушення цілісності грибною цитоплазматичної мембрани, що призводить до виходу з клітин цитоплазматичного вмісту. Оскільки дріжджоподібні та плісневі гриби відносяться до еукаріотичних мікроорганізмів, вірогідно, антимікотична активність хітозану буде відрізнятися від такої порівняно з його дією на прокаріот [19].

Як видно з наведеного хітозан, на відміну від класичних речовин з антибіотичними властивостями, не має єдиної мішені для своєї дії, а його

антибактеріальний и протигрибковий ефект являється сукупністю декількох можливих механізмів, які складаються в складний процес, який призводить в кінцевому підсумку до загибелі клітин мікроорганізмів. Тому дослідження властивостей хітозану та його наночасточок для встановлення біоцидної активності дозволяє отримати ефективні та екологічно безпечні препарати [20 -22].

Проведений аналіз теоретичних джерел переконливо свідчить про те, що необхідно приділити увагу дослідженню питань, які недостатньо або суперечливо відображені в літературі:

1. Мало досліджена динаміка складу мікрофлори товстого кишечника при лікуванні аскорбатом хітозану у тварин з експериментальним дисбіозом.
2. Не вивчено характер морфологічних змін в товстому кишечнику при лікуванні дисбіозу препаратами хітозану.

Матеріали та методи

Досліди було проведено на 15 безпородних білих лабораторних щурах, віком 8-10 тижнів, вагою 200-220 г, яких утримували у стандартних умовах.

Індукцію дисбактеріозу, зараження, лікування та виведення щурів з експерименту проводили відповідно до положень Ухвали Першого національного конгресу з біоетики «Загальні етичні принципи експериментів на тваринах» (2001 р.), Конвенції ради Європи про охорону хребетних тварин, що використовуються в експериментах та інших наукових цілях від 18.03.1986 р., Директиви ЄЕС № 609 від 24.11.1986 р., норм закону України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» і наказу МОЗ України № 66 від 13.02.2006 р. Усіх тварин утримували в однакових умовах (температура, вологість, освітлення, а також раціон харчування).

З метою створення експериментального дисбіозу тваринам проводили імуносупресію шляхом внутрішньом'язевого введення циклофосфаміду: добова доза становила 0,6 мг протягом 7 днів.

Екзогенне мікробне навантаження здійснювали введенням у стравохід з використанням спеціальної калібрувальної канюлі 1 мл суспензії *Staphylococcus aureus* та *Candida albicans* (1×10^{10} клітин / мл) упродовж 3 днів.

Наступне лікування тварин проводили протягом 7 днів. Залежно від типу терапії тварин було поділено на три групи: щурів першої лікували з використанням водорозчинних форм аскорбату хітозану, другій групі давали декаметоксин, третя група, контрольна, залишалась без лікування. Концентрацію хітозану розраховували, виходячи з даних, отриманих з попередніх досліджень *in vitro* (125 мкг/мл). Дозу декаметоксину розраховували згідно інструкції з перерахунком на одиницю маси тварини. Препарати вводили у стравохід з використанням спеціальної калібрувальної канюлі.

Потім через 1, 2, 3, 5, 7 днів від початку лікування по 1 щуру з кожної групи виводили з експерименту. Евтаназію тварин здійснювали у стані наркозу ефіром шляхом дислокації шийних хребців.

Для вивчення порожнинної мікрофлори кишечника забирали кал. Для дослідження стану пристінкової мікрофлори кишечника у стерильних умовах видаляли 3 см дистального відділу ободової та здухвинної кишок. Матеріал вносили у стерильний фосфатний буфер (рН=6,0) у співвідношенні 1 мг тканини на 100 мкл розчину на 2 години для розрідження муцину. Для встановлення міграційної здатності мікроорганізмів в асептичних умовах забирали шматочки серця та легень. Здійснювали підготовку серійних десятикратних розведень гомогенату дослідного матеріалу у стерильному ізотонічному розчині натрію хлориду до концентрації 10^{-2} та по 0,1 мл розведеного матеріалу засівали на поживні середовища (табл. 1).

Таблиця 1

Результати бактеріологічного дослідження

Поживне середовище	Мікроорганізми, що виділялись
МРС агар	Лактобактерії
Ендо	Ентеробактер, <i>E. coli</i>
ЖСА	Стафілококи
Сабуро	Дріжджоподібні гриби
Біфідоагар	Біфідобактерії
Кров'яний агар	Стрептококи, ентерококи та інші мікроорганізми

Кількість бактерій в 1г матеріалу підраховували по кількості колоній мікроорганізмів, що вирости. Культури ідентифікували за результатами вивчення морфологічних, тинкторіальних та біохімічних ознак згідно до «Приказа МОЗ СРСР № 535 «Об унификации микробиологических

(бактериологических) методов исследования, применяемых в клинко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений» от 22.04.1985 р.».

Частина матеріалу з товстого кишечника фіксувалась у розчині формаліну та підлягала гістологічному дослідженню за стандартною методикою (збарвлення за Романовським Гімзе).

Статистичну обробку результатів дослідження проводили шляхом обрахунку середнього арифметичного (M), середньої похибки (m) та коефіцієнта Стьюдента.

Результати дослідження

Мікробіоценоз організму відіграє важливу роль у його нормальному функціонуванні. Підтримання сталості складу мікрофлори набуває особливого значення в зв'язку з тим, що порушення мікроекологічної рівноваги викликає цілу низку патологічних процесів, що здатні змінювати імунний та гормональний статус, а отже і впливати на загальний стан здоров'я. Однак про сталість мікробіоценозу слід говорити у сенсі підтримання домінування сапрофітних форм мікроорганізмів. Вивчення характеру мукозної мікрофлори кишечника у експериментальних тварин, що піддавалися впливу екзогенного антигенного навантаження на тлі медикаментозної імуносупресії, дозволило встановити, що воно призводить до змін у складі кишкового мікробіоценозу. При цьому змінюється кількість і частота виявлення представників як облигатної, так і транзитної флори.

Аналіз отриманих даних дозволяє говорити, що розвиток експериментального дисбіозу в групі контролю супроводжувався елімінацією з порожнини товстої кишки автохтонних облигатних анаеробних (біфідобактерії, лактобактерії) мікроорганізмів, які в інтактних білих щурів становили основу мікробної популяції товстої кишки. Через 24 години після моделювання дисбіозу у нелікованих тварин відбувається колонізація товстої кишки стафілококами, клостридіями, грибами роду *Candida*.

Мікробіота приєпітеліальної біологічної плівки у нелікованих щурів зазнавала таких же змін, як і мікрофлора з просвіту товстої кишки. Протягом 24-72 годин у них спостерігалось прогресування кишкового дисбіозу, а після 96 годин спостерігалась стабілізація видового складу та популяційного рівня як патогенних так і умовно патогенних ентеробактерій, стафілококів, грибів роду *Candida*, з тенденцією до самовідновлення. Під кінець експерименту домінантними мікроорганізмами залишалися стафілококи, гриби роду *Candida*, клібсієли, протеї (табл. 2).

Таблиця 2

**Видовий склад та популяційний рівень (lg КУО/г) мікрофлори
кишечника щурів при експериментальному дисбіозі в контрольній групі**

Виділені мікроорганізми		Тривалість захворювання					
		Інтактні тварини	1 доба	2 доба	3 доба	5 доба	7 доба
Bifidobacterium spp.	Прос.	6,87±0,19	3,57±0,08*	-	-	-	-
	Прис.		3,84±0,2*	-	-	-	-
Lactobacillus spp.	Прос.	6,51±0,24	3,67±0,11*	-	-	-	-
	Прис.	-	5,01±0,4*	-	-	-	-
Пепто-стрептококи	Прос.	-	4,68±0,09	4,61±0,10	4,58±0,08	4,72±0,15	4,84±0,06
	Прис.	-	4,32±0,07	4,22±0,11	4,13±0,06	4,43±0,12	4,34±0,09
Clostridium spp.	Прос.	-	4,67±0,09	4,87±0,08	4,36±0,17	4,88±0,12	4,72±0,07
	Прис.	-	4,53±0,19	4,47±0,07	4,32±0,11	4,30±0,1	4,56±0,12
Staphylococcus spp.	Прос.	-	4,17±0,2	4,1±0,1	4,23±0,09	4,29±0,14	4,1±0,1
	Прис.	-	5,12±0,25	5,09±0,17	5,05±0,08	5,06±0,06	5,01±0,1
Candida spp.	Прос.	-	3,93±0,1	3,95±0,09	3,86±0,12	3,77±0,11	3,85±0,13
	Прис.	-	5,0±0,21	5,32±0,12	5,22±0,09	5,13±0	5,3±0,02
Клебсієли	Прос.	-	-	4,89±0,11	4,95±0,05	4,72±0,26	5,39±0,23
	Прис.		-	4,75±0,1	4,88±0,1	4,67±0,12	5,02±0,08
Proteus spp.	Прос.	-	-	3,96±0,06	4,19±0,11	4,07±0,07	4,17±0,07
	Прис.	-	-	3,72±0,1	4,11±0,091	4,01±0,05	4,24±0,08
E.coli	Прос.	-	-	-	-	-	
	Прис.	-	-	-	-	-	

Примітка * - наявність статистично достовірних розбіжностей (P<0,05).

Прис. – пристінкова мікрофлора, прос. – просвітна мікрофлора.

Перебіг експериментального дисбіозу в групі щурів, які отримували аскорбат хітозану також супроводжувався порушенням стану мікрофлори порожнини товстого кишечника та мукозальної мікрофлори. Через 24 години після моделювання дисбіозу у тварин даної групи відбувається колонізація товстої кишки умовно патогенними стафілококами та грибами роду *Candida*, при збереженій кількості анаеробних представників нормальної мікрофлори (біфідобактерії та лактобактерії). Використання аскорбату хітозану для корекції дисбіозу у щурів призвело до повної елімінації з кишечника грибів роду *Candida* на 6-у добу та достовірного зниження кількості стафілококів на 7-у добу експерименту. Особливістю мікрофлори товстого кишечника даної групи тварин була відсутність патогенних клебсієл та протеїв, а також присутність ешерихій, на відміну від групи контролю (табл. 3).

В групі щурів, що отримували декаметоксин протягом 24-72 годин відбувалось прогресування дисбіозу із стабілізацією стану після 3 доби та регресією мікробіологічних ознак дисбіозу до кінця тижня.

Автохтонна мікрофлора товстого кишечника у щурів даної групи була представлена біфідобактеріями, лактобактеріями, пептострептококами, клостридіями та умовнопатогенними стафілококами та грибами роду *Candida*. Кількість останніх прогресивно зменшувалась до повної елімінації наприкінці курсу лікування (табл. 4).

Відомо, що при надмірній колонізації слизової оболонки тонкої та товстої кишки патогенними та умовно патогенними бактеріями підвищується проникливість кишкової стінки і відбувається транслокація бактерій із просвіту кишки в регіональні мезентеріальні вузли, портальну вену очеревину та внутрішні органи. Нами було проведено оцінку міграційних здатностей бактерій у тварин з експериментальним дисбіозом із кишечника в серце та легені.

Таблиця 3

**Видовий склад та популяційний рівень (lg КУО/г) мікрофлори
кишечника щурів, які отримували аскорбат хітозану**

Виділені мікроорганізми		Тривалість захворювання				
		1 доба	2 доба	3 доба	5 доба	7 доба
Bifidobacterium spp.	Прос.	4,52±0,08	4,78±0,22	5,34±0,07	5,92±0,1	6,8±0,06*
	Прис.	4,84±0,21	4,93±0,12	5,56±0,08	5,9±0,08	6,3±0,09*
Lactobacillus spp.	Прос.	4,74±0,1	5,12±0,11	5,43±0,9	5,75±0,14	6,0±0,12
	Прис.	5,56±0,14	5,72±0,09	5,86±0,12	6,12±0,06	6,34±0,11
Пепто- стрептококи	Прос.	4,1±0,09	3,61±0,10	3,58±0,08	3,72±0,15	3,24±0,06
	Прис.	4,2±0,07	3,22±0,11	3,13±0,06	3,03±0,12	3,04±0,09
Clostridium spp.	Прос.	-	-	4,0±0,09*	4,5±0,06	4,6±0,2
	Прис.	-	-	4,0±0,09*	4,3±0,1	4,4±0,12
Staphylococcus spp.	Прос.	4,32±0,12	5,1±0,1	3,7±0,09	3,6±0,14	2,1±0,1*
	Прис.	4,4±0,25	5,7±0,17	3,7±0,08	3,06±0,06	3,01±0,1*
Candida	Прос.	6,0±0,02	3,8±0,08*	3,7±0,12	3,6±0,06	.*
	Прис.	-	4,0±0,1*	3,7±0,12	-	-
Клебсієли	Прос.	-	-	-	-	-
	Прис.	-	-	-	-	-
Proteus spp.	Прос.	-	-	-	-	-
	Прис.	-	-	-	-	-
E.coli	Прос.	4,83±0,28	3,45±0,07	3,32±0,13	2,97±0,11	2,76±0,21*
	Прис.	4,83±0,28	3,45±0,07	3,32±0,13	2,97±0,11	2,76±0,21*

Примітка * - наявність статистично достовірних розбіжностей ($P < 0,05$).

Прис. – пристінкова мікрофлора, прос. – просвітна мікрофлора.

Таблиця 4

**Видовий склад та популяційний рівень (lg КУО/г) мікрофлори
кишечника щурів, які отримували декаметоксин**

Виділені мікроорганізми		Тривалість захворювання				
		1 доба	2 доба	3 доба	5 доба	7 доба
Bifidobacterium spp.	Прос.	4,41±0,08	4,56±0,2	4,74±0,07	5,12±0,1	5,8±0,06
	Прис.	4,53±0,2	4,61±0,11	4,83±0,12	5,3±0,08	5,3±0,09
Lactobacillus spp.	Прос.	4,78±0,16	4,91±0,1	5,3±0,9	5,25±0,14	5,6±0,12
	Прис.	4,56±0,11	4,72±0,11	4,86±0,12	5,12±0,06	5,34±0,11
Peptostreptococ cus spp.	Прос.	3,7±0,09	3,41±0,10	3,2±0,1	3,2±0,1	3,04±0,1
	Прис.	4,0±0,07	3,0±0,11	2,8±0,09	2,63±0,2	2,24±0,05
Clostridium spp.	Прос.	4,0±0,09	4,7±0,1	5,1±0,1	5,4±0,13	6,0±0,12
	Прис.	4,0±0,09	4,7±0,1	5,1±0,1	5,4±0,13	6,0±0,12
Staphylococcus spp.	Прос.	4,78±0,1	4,73±0,1	4,2±0,08	3,64±0,1	.*
	Прис.	4,64±0,2	4,67±0,17	4,2±0,08	3,06±0,06	.*
Candida	Прос.	4,0±0,07	4,6±0,08	4,9±0,2	.*	-
	Прис.	-	4,0±0,1	4,9±0,2	2,0±0,23*	-
Klebsiella spp.	Прос.	-	-	-	-	-
	Прис.	-	-	-	-	-
Proteus spp.	Прос.	-	-	-	-	-
	Прис.	-	-	-	-	-
E.coli	Прос.	-	-	-	-	-
	Прис.	-	-	-	-	-

Примітка * - наявність статистично достовірних розбіжностей (P<0,05)

Прис. – пристінкова мікрофлора, прос. – просвітна мікрофлора.

Після 24 годин у всіх трьох групах відмічалась транслокація мікроорганізмів із кишечника в легені та серце (гриби роду Candida, Streptococcus spp. та Clostridia spp.). Впродовж семи діб відбувалось зменшення обсягів усіх органів. Характер колонізації серця та легень на цьому добу від початку лікування відображено в таблиці 5.

Як видно з наведеного у всіх трьох групах зберігалось обсіменіння паренхіматозних органів мікроорганізмами. Однак із легень щурів, які отримували аскорбат хітозану, мікроорганізми не виділялись взагалі, а рівень обсіменіння серця бактеріями був достовірно нижчим порівняно з іншими двома групами. Отримані результати свідчать про ефективність аскорбату хітозану лише на рівні кишечника, який хоча й не перешкоджає міграції мікроорганізмів із кишечника, однак сприяє більш швидкій елімінації мікроорганізмів не тільки з кишечника, але й з інших органів.

Таблиця 5

Рівень мікробної транслокації умовно-патогенних мікроорганізмів в тканину легень та серце на 7-му добу від початку лікування

Вид мікроорганізма/ група та орган	Контроль		Декаметоксин		Аскорбат хітозану	
	Легені	Серце	Легені	Серці	Легені	Серце
<i>Candida spp.</i>	4,6±0,02	4,9±0,1	4,6±0,02	-	-	-
<i>Streptococcus spp.</i>				2,47±0,12	-*	2,0±0,2*

Примітка * - наявність статистично достовірних розбіжностей ($P < 0,05$)

В експериментальній роботі для кращого розуміння патогенетичних механізмів, які відбуваються при лікуванні дисбіотичних процесів з використанням різних препаратів, було розглянуто морфологічні зміни в кишечнику. Результати даних досліджень відображені в рисунках 1- 3.

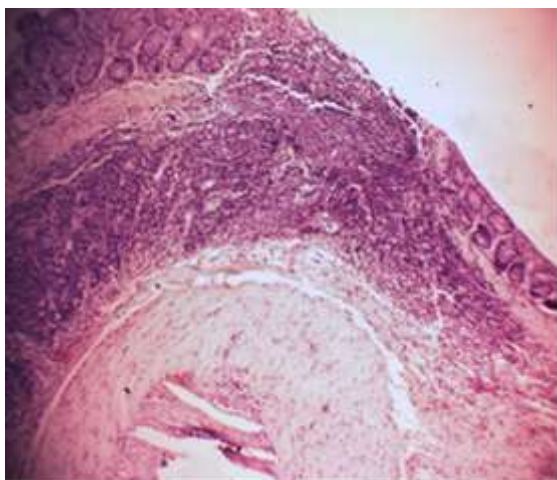


Рис. 1. Кишечник щурів інтактної групи. Зabarвлення гематоксилін-еозин. Збільшення 10x10.

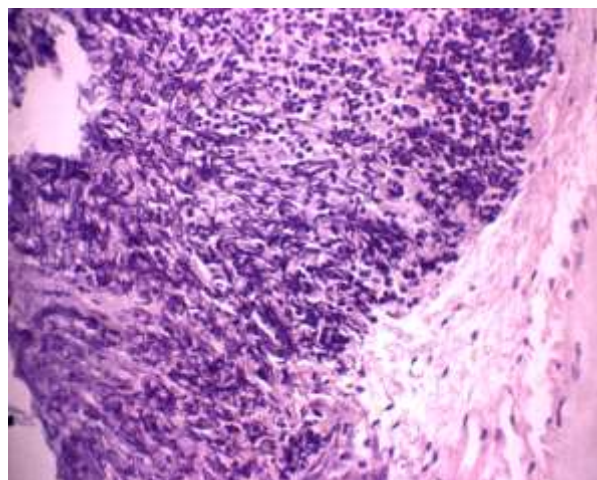


Рис. 2. Кишечник щурів інтактної групи. Зabarвлення гематоксилін-еозин. Збільшення 10x40.

У щурів контрольної групи на гістологічному препараті товстого кишечника відмічалось потоншення слизової оболонки, атрофічні зміни з елементами загальної інфільтрації. Виявлялася зона повної відсутності слизового шару. Дифузна поліморфно-клітинна інфільтрація (еозинофільна, лейкоцитарна), яка поширювалася на слизову оболонку та підслизовий шар. В інфільтраті підслизової між поліморфними клітинами спостерігалися ниткоподібні тяжі.

У щурів, які отримували аскорбат хітозану в гістологічному препараті з товстого кишечника покривний епітелій (одношаровий призматичний) був збережений, залози слизової розташовані густо, їх форма та розміри відповідали нормі, містили велику кількість келихоподібних екзокриноцитів. Останні знаходились на різних стадіях секреції. В базальній частині цитоплазми клітин знаходились великі округлі ядра. Власна пластинка слизової оболонки була утворена тонкими сполучно - тканинними прошарками.

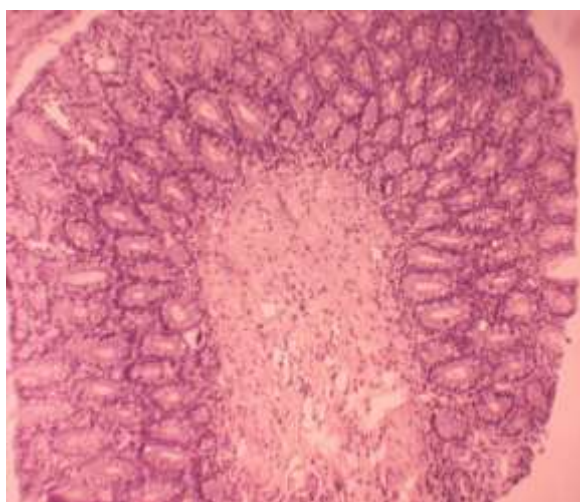


Рис. 3. Кишечник щурів, які отримували аскорбат хітозану. Забарвлення гематоксилін-еозин. Збільшення 10x10.

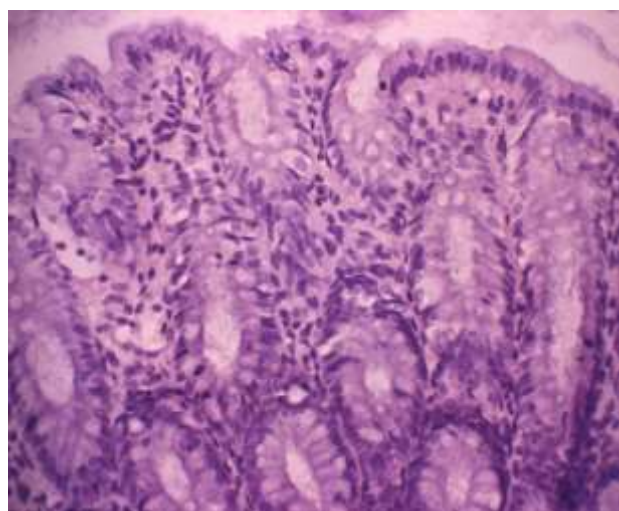


Рис. 4. Кишечник щурів, які отримували аскорбат хітозану. Забарвлення гематоксилін-еозин. Збільшення 10x40.

На препаратах щурів, які отримували в якості терапії декаметоксин видно процеси відновлення (регенерації) слизової оболонки та покривного епітелію. Спостерігається зменшення набряку слизової оболонки та строми, зниження кількості осередків поліморфної круглоклітинної інфільтрації між залозами. Загалом стінка кішки набуває нормальної будови. В проміжках між криптами знаходили дріжджоподібні клітини.

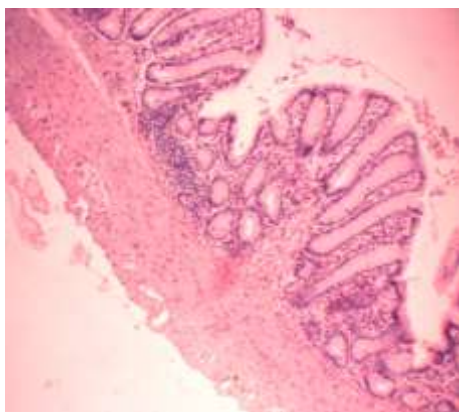


Рис. 5. Кишечник щурів, які отримували декаметоксин.

Забарвлення гематоксилін-еозин.

Збільшення 10x10.

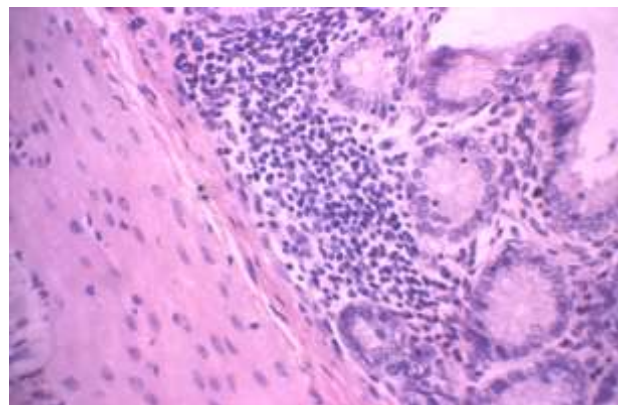


Рис. 6. Кишечник щурів, які отримували декаметоксин.

Забарвлення гематоксилін-еозин.

Збільшення 10x40.

Гістологічне дослідження кишечника тварин, яких лікували аскорбатом хітозаном, показало суттєве зменшення кількості *C.albicans*, у порівнянні з контрольною групою, яку лікували декаметоксином, що відповідає раніше описаним мікробіологічним даним. Таким чином дані результати відповідали мікробіологічним результатам та підтверджує ефективність даного препарату при корекції дисбіотичних порушень.

Патологоанатомічні дані підтвердили результати експериментального дослідження та дозволили встановити характер патологічного процесу та характер запальної реакції.

Висновки

1. Встановлено, що при застосуванні аскорбату хітозану, відмічається повна елімінація грибів роду *Candida* та достовірне зменшення кількості стафілококів в кишечнику щурів з експериментальним дисбіозом.
2. Гістологічне дослідження кишечника щурів з експериментальним дисбіозом, які отримували аскорбат хітозану, виявило наявність незначних змін в слизовій, підслизовій та м'язовій оболонках кишечника, що підтверджує ефективність даного препарату.
3. При дисбіотичних порушеннях в кишечнику, на тлі імуносупресії, відбувається транслокація мікроорганізмів в легені та серце. Застосування аскорбату хітозану сприяє більш швидкій елімінації мікроорганізмів з паренхіматозних органів.

Список літератури

1. Ардатская М.Д. Дисбактериоз кишечника: эволюция взглядов. Современные принципы диагностики и фармакологической коррекции/ М. Д. Ардатская // Consilium medicum. Приложение гастроэнтерология.- 2006.- №2.- С. 14-18.
2. Бондаренко В.М. Дисбактериозы и препараты с пробиотической функцией/ В.М. Бондаренко // Журнал микробиологии.-2004.- №1.- С. 84-92.
3. Дисбактериоз кишечника. Руководство по диагностике и лечению / Под редакцией проф. Е.И. Ткаченко, проф. А.Н. Суворова. – СПб.: Спецлит, 2007. – 280с.
4. Ермакова Т.С. Антимикотическое действие эфирных масел на дрожжеподобные и плесневые грибы / Т.С. Ермакова, Л.П. Титов // Успехи медицинской микологии. 2008. – Т. I, Глава 3.- 119с.
5. Chami N. Study of anticadidial activity of carvacrol and eugenol in vitro and in vivo/ N. Chami, F. Chami, S. Bennis, J. Trouillas, A. Remmal. // Oral microbial immunology. - 2005. - №20. - P. 106-111.
6. Шендеров Б. А. Медицинская микробная экология и функциональное питание : в 2 т. / Б. А. Шендеров. - М. : Грантъ, 1998. - Т. 1 : Микрофлора человека и животных и ее функции. - 228 с.
7. Shahidi F. Isolation and characterization of nutrients and value-added products from snow crab (*Chionoecetes opilio*) and shrimp (*Pandalus borealis*) processing discards/ F. Shahidi, J. Synowiecki // Journal of Agricultural and Food Chemistry.- 1991. - № 39. – P. 1527-1532.
8. Хисматуллина Н. З. Апитерапия / Н. З. Хисматуллина. // Пермь: Мобиле, 2005. – 70 с.
9. Sogias I.A., Why is chitosan mucoadhesive?/ I.A. Sogias, A.C. Williams, V.V. Khutoryanskiy // Biomacromolecules. - 2008. - № 9.- P.1837—1842.

10. Медведева О.А. Влияние иммуномодулятора полиоксидония на состав пристеночной микрофлоры толстого кишечника и функционально-метаболическую активность нейтрофилов мишей при экспериментальном лекарственном дисбиозе в условиях воздействия магнитного поля повышенной напряженности/ О.А. Медведева, П.В. Калущий, А.В. Беседин, Л.В. Жилева, С.К. Медведева, А.П. Калущий // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». – 2011. - №2. – С. 15-21.
11. Медведева О.А. Влияние лактобактерина на состав пристеночной микрофлоры толстого кишечника и функционально-метаболическую активность нейтрофилов мишей при экспериментальном лекарственном дисбиозе в условиях воздействия магнитного поля повышенной напряженности/ О.А. Медведева, П.В. Калущий, А.В. Беседин,, С.К. Медведева // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». – 2010.- №2. – С. 10 -15.
12. Lim S.H. Review of chitosan and its derivatives as antimicrobial agents and their uses as textile chemicals / S.H. Lim, S.M. Hudson // - 2003.- V. 43(2). – P. 233-269.
13. Rabea E.I. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action / E.I. Rabea, M.E. Badaway, C.V. Stevens et al.// *Biomacromol.* – 2003. – V. 4(6). – P. 1457-1465.
14. Rhoades J. Antimicrobial actions of degraded and native chitosan agents spoilage organisms in laboratory media and foods / J. Rhoades, S. Roller // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2000.- V. 66 . – P. 80-86.
15. Куликов С.Н. Роль структуры в биологической активности хитозана / С.Н. Куликов, Ю.А. Тюрин, Д.А. Долбин и др. // *Вестн. Каз технол. Универ.* - 2007 . - № 6. – С. 10-15.
16. Raafat D. Insight into the mode of action of chitosan as an antibacterial compound / D. Raafat, K. Barga, A. Haas et al.// *Appl. Env. Microbiol.* – 2008. - № 74(12). – P. 3764-3773.

17. Liu H. Chitosan kills bacteria through cell membrane damage / H. Liu, Y. Du, X. Wang, L. Sun // *Int. J. Food Microbiol.* - 2004 . - № 95. – P. 147-155.
18. Hernandez – Lauzardo A.N. Antifungal effects of chitosan with different molecular weights on in vitro development of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) / A.N. Hernandez – Lauzardo, S. Bautista-Banos, M.G. Velazquez-del Valle et al.// *Vuill. Carbohydr. Polym.* – 2008. - № 73. – P. 541-547.
19. Куликов С.Н. Антибактериальная и антимикотическая активность хитозана: механизмы действия и роль структуры / С.Н. Куликов, Ю.А. Тюрин, Р.С. Фассахов, В.П. Варламов // *Журнал микробиологии.* - 2009.- №5.-С.91-97.
20. Rhoades J. Antimicrobial actions of degraded and native chitosan against spoilage organism in laboratory media and foods / Rhoades J., Roller S. // *Applied and environmental microbiology.* - 2000. - Vol 66, № 1. - P. 80 - 86.
21. Preparation of amphiphilic chitosan and their antimicrobial activities / Byung-Ok Jung, Chun- Ho Kim, Kyu-Suk Choi, [et al.]. / *J. Appl. Polym. Sci.* - 1999. - Vol. 72. - P. 1713 - 1719.
22. Antibacterial and antifungal activity of chitosan / Baliska-Ramis A., Wojtasz-Pajak A., Pilarczyk B. [et al.]. // *ISAH.*- 2005. - Vol. 2. - P. 406 - 408.

Анотація

наукової роботи під девізом “Primum non nocere”

Актуальність. Адаптація людини до умов зовнішнього середовища залежить від цілого ряду специфічних та неспецифічних факторів, серед яких мікрофлора тіла людини відіграє важливу роль. Однією з найважливіших функцій нормальної мікрофлори є підтримання колонізаційної резистентності проти зовнішньої експансії патогенних мікроорганізмів. Порушення функціонування нормальної мікрофлори (кількісні та якісні) є причиною різноманітних негативних наслідків та називаються дисбіозом. В практиці для корекції дисбіотичних процесів найчастіше використовують еубіотики. Однак при їх використанні виникає цілий ряд перешкод, які часто зводять нанівець проведену терапію.

Метою нашого дослідження було вивчити вплив аскорбату хітозану на склад мікрофлори товстого кишечника та встановити характер морфологічних змін товстого кишечника в умовах штучного дисбіозу, викликаного введенням грибково-бактеріальних сумішей імуносупресованим щурам.

Завдання дослідження:

4. Вивчити зміни якісного та кількісного складу пристінкової та просвітної мікрофлори товстого кишечника при лікуванні експериментального дисбіозу аскорбатом хітозану.
5. Дослідити рівень транслокації умовно-патогенних мікроорганізмів у тканину легень, серця, про корекції експериментального дисбіозу з використанням аскорбату хітозану.
6. Вивчити характер морфологічних змін товстого кишечника при лікуванні дисбіозу аскорбатом хітозану.

ВІДГУК

наукового керівника на студентську наукову роботу
під шифром “Primum non nocere”

Робота присвячена актуальній проблемі сучасної медицини – пошуку нових ефективних препаратів для лікування дисбіотичних процесів кишечника. В останні роки відбулися істотні зміни в розумінні й значенні мікроорганізмів, що населяють кишечник людини. У результаті різних несприятливих дій на людину та формування патологічних станів відбуваються кількісні та якісні зміни нормальної мікрофлори людини - "дисбіотичні реакції". Значне поширення дисбіотичних станів серед населення зумовлює актуальність даної проблеми.

Автором самостійно проведено вивчення літератури з даної проблеми та визначено основні напрямки дослідження. Власноруч проведено інфікування тварин та досліджено вплив аскорбату хітозану на склад мікрофлори кишечника та паренхіматозних органів. Здобувач у своїй роботі застосував сучасні методи дослідження: мікробіологічні, морфологічні, статистичні. Отримані результати були самостійно опрацьовані автором та оформлені в роботу. Висновки обґрунтовані та базуються на результатах експериментальних досліджень.

Отримані в роботі результати можуть бути використані в подальших дослідженнях та отриманні нових препаратів, для коригування мікрофлори кишечника.

Науковий керівник

Загальна характеристика наукової роботи.

Наукова робота складається з вступу, огляду літератури, матеріалів і методів, результатів дослідження, висновків, списку літератури. Робота представлена на 24 сторінках, ілюстрована 6 малюнками, 5 таблицями. Список літератури містить 22 посилання.

Новизна роботи: Експериментально визначені зміни мікробіоти кишечника, що характеризуються вираженим дефіцитом автохтонних облигатними анаеробних мікроорганізмів та колонізацією порожнини та слизової товстої кишки умовно-патогенними мікроорганізмами.

Встановлено характер морфологічних особливостей товстого кишечника у щурів експериментальних та контрольної груп.

Досліджено характер транслокації мікроорганізмів з кишечника в паренхіматозні органи.

Практична і теоретична значущість роботи:

Проведені дослідження експериментально доводять ефективність використання аскорбату хітозану для корекції дисбіозу кишечника.

Ключові слова: експериментальний, дисбактеріоз, хітозан, кишечник, щури.

Науковий керівник _____