

УДК 57.083.18:57.085.2:591.29:664—405

**І.В. Страшнова, З.Є. Захарієва, Ю.Ю. Дуденко, А.О. Данилова,
В.О. Іваниця**

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна,
тел.: +38(0482) 68 79 64, e-mail: fabiyanska@ukr.net

ВПЛИВ ХАРЧОВИХ ВОЛОКОН НА МІКРОБІОТУ ТОВСТОЇ КИШКИ У ЩУРІВ З АЛОКСАНОВИМ ДІАБЕТОМ

*Встановлено, що таксономічний склад мікробіоти товстої кишки здорових щурів і щурів з алоксановим діабетом представлений мікроорганізмами родів *Lactobacillus*, *Escherichia*, *Enterococcus*, *Enterobacter*, *Staphylococcus*, *Proteus*, *Bacillus* і *Candida*. Кількість бактерій родів *Lactobacillus* і *Escherichia* у товстій кишці здорових щурів була вищою, ніж у тварин з алоксановим діабетом, у яких у більшій кількості виявлено мікроорганізми родів *Staphylococcus*, *Proteus*, *Bacillus*, *Candida*. За споживання харчових волокон із бурякового жому як у здорових щурів, так і у щурів з алоксановим діабетом спостерігалось збільшення кількості бактерій родів *Lactobacillus* і *Escherichia*.*

Ключові слова: мікроорганізми, товста кишка, щурі, алоксановий діабет, харчові волокна.

У хворих цукровим діабетом досить часто спостерігаються різні клінічні прояви, пов'язані із ураженнями шлунково-кишкового тракту (ШКТ), у тому числі із розвитком дисбактеріозу. Для усунення дисбактеріозу необхідна корекція мікробіоти кишечника [1, 3, 4].

У цьому аспекті важливу роль відіграють про- і пребіотичні препарати. Стимулювання ними біохімічної активності біоценозу кишечника здатне індукувати корисні ефекти не тільки на рівні ШКТ, але й на рівні організму загалом, тобто викликати системні ефекти і нормалізувати співвідношення мікроорганізмів [5, 12, 13]. Споживання пребіотиків, до яких відносяться і харчові волокна (ХВ), вибірково стимулює розвиток корисних для організму представників кишкової мікробіоти, до яких, у першу чергу, відносяться біфідобактерії і лактобацили [2, 7].

Відомо, що тварини, у тому числі і щурі, є моделлю для проведення багатьох експериментальних досліджень, результати яких потім екстраполюються на людей [9].



Метою роботи було дослідити вплив харчових волокон із буряково-го жому на кількісний і таксономічний склад мікробіоти товстої кишки фізіологічно здорових щурів і щурів з алоксановим діабетом.

Матеріали і методи

Об'єктом дослідження були білі лабораторні щурі. Всі дослідження проводили згідно норм, встановлених законом України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» та норм, прийнятих Європейською конвенцією по захисту хребетних тварин, що використовуються з експериментальною та науковою метою від 20.09.1985 [10].

Усі експериментальні тварини були розділені на 4 групи і утримувалися на стандартному збалансованому раціоні віварію. Перша група (контрольна) була представлена здоровими тваринами ($n = 10$), другу групу склали щурі з алоксановим діабетом ($n = 10$), третю — здорові щурі, які отримували протягом чотирьох тижнів, окрім стандартного корму, ХВ ($n = 40$), четверту — щурі з алоксановим діабетом, які разом зі стандартним раціоном отримували протягом чотирьох тижнів ХВ ($n = 40$).

Алоксановий діабет є однією з експериментальних моделей інсулін-залежного цукрового діабету і широко використовується для вивчення різних порушень при даній патології [9].

Експериментальну гіперглікемію моделювали внутрішньочеревним введенням 1% водного розчину алоксангідрату у дозі 10 мг/100 г для індукування слабкого цукрового діабету, через три тижні повторно вводили 1,5% водний розчин алоксангідрату у дозі 15 мг/100 г для індукування діабету середньої важкості з поступовим розвитком важкої форми діабету.

ХВ попередньо дробно стерилізували при 50–60 °С протягом семи днів. Додавали до основної їжі у кількості 5% від маси раціону.

Посівним матеріалом були зразки змивів з товстої кишки щурів. Для цього стерильними ножицями відрізали 20 см дистального відділу кишки, подрібнювали на шматочки розмірами 1 см і переносили у 20 мл стерильного фізіологічного розчину. Перемішували протягом 10–15 хв. при кімнатній температурі. Після цього готували серію розведень до 10^{-7} .

Посіви проводили на середовища: МПА — для обліку загального мікробного числа (ЗМЧ), Ендо — для виявлення бактерій групи кишкової палички (БГКП), MRS — молочнокислих бактерій (МКБ). На МПА посіви проводили із розведень 10^{-7} , на середовища Ендо і MRS — із розведень 10^{-5} . Усі посіви були зроблені у трьох повторах і культивувалися при 37–39 °С протягом 1–3 діб з щоденним обліком результатів.

Кількісний склад мікроорганізмів визначали за формулою:

$$M = \bar{a} \cdot 10^n / V, \text{ де}$$



M — кількість колонієутворюючих одиниць мікроорганізмів у мілілітрі змиву з кишки (КУО/мл); \bar{a} — середнє число колоній на паралельних чашках; 10^n — розведення; V — об'єм посівного матеріалу.

Після отримання чистих культур виділених мікроорганізмів вивчали їх основні біологічні властивості і проводили ідентифікацію [8, 11].

Отримані дані статистично обробляли з використанням програми «Excel XP» за загальноприйнятими методиками з урахуванням t -критерію Стьюдента, рівень вірогідності становив 95%, $n = 3$ [6].

Результати та їх обговорення

Проведені дослідження показали, що як ЗМЧ, так і кількість БГКП і МКБ у здорових щурів була більшою, ніж у щурів з алоксановим діабетом. При цьому ЗМЧ і кількість БГКП була більшою приблизно на 3 порядки, а кількість МКБ — на 2 порядки (табл. 1).

Таблиця 1
Кількісний склад мікробіоти товстої кишки щурів, Іг КУО/мл

Table 1
The quantities composition of the microbiota of rats large intestine, Іg CFU/ml

Група мікроорганізмів	Здорові щурі	Щурі з алоксановим діабетом
ЗМЧ	11,96±0,04	8,90±0,12
БГКП	8,90±1,02	5,96±0,38
МКБ	6,91±0,44	4,89±1,22

Дослідження таксономічного складу мікробіоти товстої кишки щурів показало, що вона представлена бактеріями родів *Escherichia*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus* і дріжджеподібними грибами роду *Candida* (табл. 2).

Таблиця 2
Таксономічний склад мікробіоти товстої кишки щурів

Table 2
The taxonomic composition of the microbiota of rats large intestine

Рід	Кількість мікроорганізмів, Іг КУО/мл	
	Здорові щурі	Щурі з алоксановим діабетом
<i>Lactobacillus</i>	5,69±0,12	3,17±0,36
<i>Escherichia</i>	6,35±0,28	4,75±0,12
<i>Enterococcus</i>	1,50±0,32	1,80±0,24
<i>Enterobacter</i>	1,51±0,41	0,00
<i>Staphylococcus</i>	1,54±0,22	0,84±0,14
<i>Proteus</i>	1,39±0,30	1,53±0,52
<i>Bacillus</i>	1,53±0,27	2,06±0,44
<i>Candida</i>	1,34±0,21	1,79±0,48



Таксономічний склад мікробіоти як здорових тварин, так і тварин з алоксановим діабетом був майже однаковим (виключення склали представники роду *Enterobacter*, які із товстої кишки тварин з алоксановим діабетом не виділялися).

Основні відмінності виявилися у кількісному співвідношенні виділених мікроорганізмів. У тварин з алоксановим діабетом у значно меншій кількості у кишечнику виявлені представники нормальної мікробіоти (бактерії родів *Lactobacillus* і *Escherichia*). Якщо у здорових щурів бактерії цих родів були виявлені у кількості $5,69 \pm 0,12$ lg КУО/мл і $6,35 \pm 0,28$ lg КУО/мл, відповідно, то у тварин з алоксановим діабетом — $3,17 \pm 0,36$ lg КУО/мл і $4,75 \pm 0,12$ lg КУО/мл, відповідно. Привертає увагу, що у щурів з алоксановим діабетом спостерігали у більшій кількості умовно-патогенні мікроорганізми (представники родів *Staphylococcus*, *Proteus*, *Bacillus*, *Candida*).

Можливо, зменшення кількості представників нормобіоти у товстій кишці щурів з алоксановим діабетом пов'язано як з порушенням обміну речовин (зокрема вуглеводного обміну), так і з порушеннями цілісності і деформацією слизової оболонки, які мають місце за даної патології, що є сприятливим фактором для розмноження умовно-патогенних і патогенних мікроорганізмів.

Дані літератури свідчать, що споживання ХВ підвищує опірність організму до екстремальних впливів довкілля, покращує моторну діяльність кишечника і стан мікробіоценозу у ньому [5, 7, 13].

При додаванні ХВ із жому до основного раціону щурів відмічали збільшення основних мікробіологічних показників: ЗМЧ, БГКП і МКБ (рис. а, б).

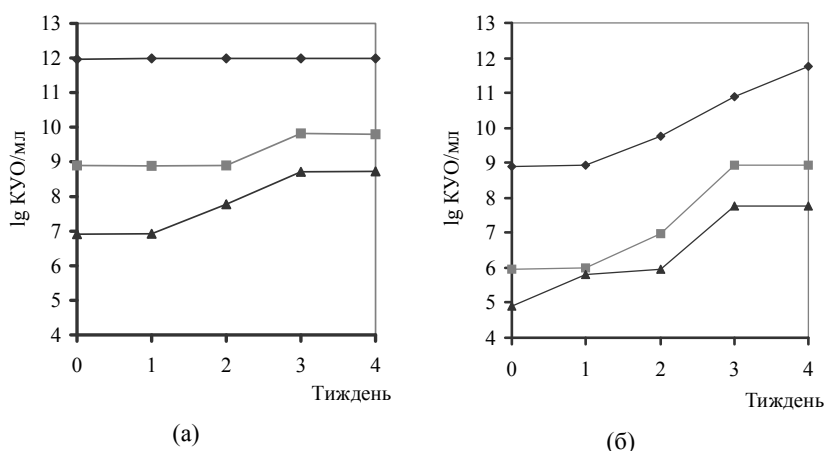


Рис. Зміна кількісного складу мікробіоти товстої кишки фізіологічно здорових щурів (а) і щурів з алоксановим діабетом (б) під впливом харчових волокон

Fig. Change the quantities composition of the microbiota of large intestine of physiologically healthy rats (a) and rats with alloxan diabetes (b) rats under the influence of dietary fibres



У здорових щурів протягом всього терміну експерименту (чотири тижні) додавання волокон майже не вплинуло на ЗМЧ. Якщо до вживання цієї добавки ЗМЧ становило $11,96 \pm 0,04$ lg КУО/мл, то через тиждень споживання — $11,98 \pm 0,60$ lg КУО/мл, а через чотири тижні — $11,99 \pm 0,60$ lg КУО/мл (рис. а).

Кількість БГКП протягом двох тижнів споживання здоровими щурами ХВ практично була такою самою, як у здорових щурів, у раціон яких вони не додавалися (рис. а). Кількість БГКП почала збільшуватися, починаючи з третього тижня експерименту.

Кількість МКБ після тижня годівлі щурів волокнами практично не змінилась у порівнянні з кількістю цих мікроорганізмів, що була визначена при споживанні щурами стандартного корму (рис. а). Однак, починаючи з другого тижня, кількість МКБ поступово почала збільшуватися і після четвертого тижня вживання волокон склала $8,72 \pm 0,25$ lg КУО/мл.

Отже, при вживанні здоровими щурами ХВ спостерігалось збільшення кількості МКБ і БГКП, починаючи з другого і третього тижня експерименту, відповідно. При цьому кількість цих мікроорганізмів не перевищувала допустимі для щурів норми [8].

У тварин з алоксановим діабетом, вживання ХВ протягом першого тижня не призвело до суттєвих змін ЗМЧ (рис. б). Але під час подальшого проведення експерименту спостерігали збільшення ЗМЧ кожного наступного тижня. Через чотири тижні цей показник збільшився до $11,77 \pm 0,10$ lg КУО/мл.

Для БГКП у товстій кишці щурів з алоксановим діабетом, які вживали волокна, відмічено подібну закономірність, як і для ЗМЧ. Кількість бактерій цієї групи, як і ЗМЧ, почала збільшуватися з другого тижня вживання цієї добавки і через чотири тижні визначена на рівні $8,94 \pm 0,21$ lg КУО/мл.

Відносно МКБ, то їх кількість почала збільшуватися вже через тиждень вживання волокон. Через тиждень кількість МКБ у товстій кишці тварин з алоксановим діабетом становила $5,80 \pm 0,21$ lg КУО/мл (рис. б), що на порядок вище, ніж цей же показник хворих щурів, які знаходились на звичайному годуванні. Вже після четвертого тижня цей показник збільшився до $7,78 \pm 0,19$ lg КУО/мл.

Отже, вживання щурами з алоксановим діабетом біологічно активних добавок у вигляді ХВ із бурякового жому сприяло збільшенню ЗМЧ, МКБ та помірного збільшенню БГКП.

Визначення таксономічного складу мікроорганізмів товстої кишки проводили через чотири тижні введення до раціону щурів ХВ із жому.

Таксономічний склад мікробіоти товстої кишки як хворих, так і здорових щурів за умови вживання волокон був представлений у значній кількості бактеріями родів *Escherichia* і *Lactobacillus* (табл. 3).

Таблиця 3

Таксономічний склад мікробіоти щурів
після 4-х тижневого вживання харчових волокон

Table 3

The taxonomic composition of the microbiota of rats
after 4-week consumption of dietary fibres

Рід	Кількість мікроорганізмів, Іг КУО/мл	
	Здорові щурі	Щурі з алоксановим діабетом
<i>Lactobacillus</i>	7,37±0,12	6,31±0,10
<i>Escherichia</i>	8,72±0,22	6,88±1,15
<i>Enterococcus</i>	1,46±0,10	1,59±0,13
<i>Enterobacter</i>	1,06±0,12	1,05±0,14
<i>Proteus</i>	0,00	0,45±0,06
<i>Bacillus</i>	2,54±0,11	2,70±0,30
<i>Candida</i>	0,00	0,45±0,07

Бактерії інших родів були виявлені у незначній кількості. У здорових щурів, на відміну від хворих на алоксановий діабет, не були виявлені бактерії роду *Proteus* і гриби роду *Candida*. Вживання волокон призвело до зникнення у товстій кишці як здорових, так і хворих щурів бактерій роду *Staphylococcus*.

Порівнюючи отримані дані щодо таксономічного складу мікробіоти товстої кишки у здорових і хворих щурів, в раціон яких було введено харчові волокна (табл. 3), зі складом мікроорганізмів щурів на стандартному раціоні (табл. 2), можна відмітити, що додавання волокон призвело до збільшення кількості бактерій нормальної мікробіоти (*Lactobacillus* та *Escherichia*), які є природними мешканцями товстої кишки і відіграють велику роль у формуванні складу нормобіоти і підтримуванні загального стану організму через нормалізацію роботи ШКТ і імунної системи. Таким чином, у результаті проведених досліджень показано позитивний вплив ХВ із бурякового жому на склад мікробіоти товстої кишки щурів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Воронин А. А., Тараненко Л. А., Сидоренко С. В. Лечение дисбактериоза кишечника у детей, больных сахарным диабетом // Антибиотики и химиотерапия. — 1999. — № 3. — С. 22–24.

2. Ипатов А. Г., Кочеткова А. А., Нечаев А. П., Тарасова В. В., Филатова А. А. Пищевые волокна в продуктах питания // Пищевая промышленность. — 2007. — № 5. — С. 8–10.



3. *Касаткина Э. П.*, Воронин А. А., Тараненко Л. А. Особенности микробиоценоза кишечника у детей, больных сахарным диабетом // Журн. микробиол. — 1996. — № 6. — С. 84–85.

4. *Козыренко Ю. В.* Фармакологическая коррекция нарушений биоценоза кишечника у больных сахарным диабетом 2 типа: Дис... канд. мед. наук. — Волгоград, 2009. — 107 с.

5. *Коршунов В. М.*, Ефимов Б. А., Пикина А. П. Характеристика биологических препаратов и пищевых добавок для функционального питания и коррекции микрофлоры кишечника // Журн. микробиол. — 2000. — 3. — С. 86–91.

6. *Лапач С. Н.*, Чубенко А. В., Бабич П. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. — К.: Морион, 2001. — 260 с.

7. *Малкоц А. В.*, Бельшер С. В. Пребиотики и их роль в формировании кишечной микрофлоры // Педиатрия. — 2009. — т. 87, № 4. — С. 34–41.

8. *Методы* общей бактериологии: В 3 т. / Пер. с англ. Ф. Герхардта. — М.: Мир, 1983. — 264 с.

9. *Пальчикова Н. А.*, Бгатова Н. П. Влияние приема пробиотика «Биовестин — лакто» на течение аллоксанового диабета и структуру слизистой оболочки экспериментальных животных // Бюллетень СО РАМН. — 2006. — т. 119, № 1. — С. 67–71.

10. *Резніков О.* Проблеми етики при проведенні експериментальних медичних і біологічних досліджень на тваринах // Вісник НАНУ. — 2001. — № 1. — С. 5–7.

11. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* — 9th ed. — Baltimore; London, 1986 — 1599 p.

12. *Floch M. H.*, Hong-Curtiss J. Probiotics and functional foods in gastrointestinal disorders // Curr. Gastroenterol. Rep. — 2001. — 3, № 4. — P. 343–350.

13. *Roberfroid M. B.* Prebiotics: preferential substrates for specific germs? // Am. J. Clin.Nutr. — 2001. — 73 (suppl). — P. 406–409.

И.В. Страшнова, З.Е. Захариева, Ю.Ю. Дуденко, А.О. Данилова, В.А. Иваниця

Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, тел.: +38(0482) 68 79 64,
e-mail: fabiyanska@ukr.net

ВЛИЯНИЕ ПИЩЕВЫХ ВОЛОКОН НА МИКРОБИОТУ ТОЛСТОЙ КИШКИ КРЫС С АЛЛОКСАНОВЫМ ДИАБЕТОМ

Реферат

Показано, что таксономический состав микробиоты толстой кишки здоровых крыс и крыс с аллоксановым диабетом был представлен микроорганизмами родов *Lactobacillus*, *Escherichia*, *Enterococcus*, *Enterobacter*, *Staphylococcus*, *Proteus*, *Bacillus* и *Candida*. Количество бактерий родов *Lactobacillus* и *Escherichia* в толстой кишке здоровых крыс было больше, чем у животных с аллоксановым диабетом, у которых в большем количестве выявлены микроорганизмы родов *Staphylococcus*, *Proteus*, *Bacillus*, *Candida*. Употребление пищевых волокон из сахарной свеклы положительно повлияло на увеличение количества бактерий родов *Lactobacillus* и *Escherichia* как у здоровых крыс, так и у крыс с аллоксановым диабетом.

Ключевые слова: микроорганизмы, толстая кишка, крысы, аллоксановый диабет, пищевые волокна.

I.V. Strashnova, Z.E. Zacharieva, J.J. Dudenko, A.O. Danilova, V.O. Ivanytsia

Odesa National Mechnikov University,
Dvoryanska str., 2, Odesa, 65082, Ukraine, tel.: +38(0482) 68 79 64
e-mail: fabiyanska@ukr.net

EFFECT OF DIETARY FIBRES ON MICROBIOTA LARGE INTESTINE OF SICK AT ALLOXAN DIABETES RATS

Summary

It was shown that the taxonomic composition of the large intestine of healthy rats and rats with alloxan diabetes was presented by microorganisms genera *Lactobacillus*, *Escherichia*, *Enterococcus*, *Enterobacter*, *Staphylococcus*, *Proteus*, *Bacillus* and *Candida*. The number of bacteria genera *Lactobacillus* and *Escherichia* in the intestine of healthy rats was higher than animals with alloxan diabetes in the intestine which in large quantities identified bacteria of genera *Staphylococcus*, *Proteus*, *Bacillus*, *Candida*. Use of dietary fibers from sugar beet had a positive impact on increasing the number of bacteria genera *Lactobacillus* and *Escherichia* both healthy rats and rats with alloxan diabetes.

Key words: microorganisms, large intestine, rats, alloxan diabetes, dietary fibers.

