

© Коллектив авторов, 2016
УДК 616.345-006.6-089-06.577.486

С. Ф. Багненко¹, А. А. Захаренко¹, А. Н. Суворов², И. В. Шлык¹, О. А. Тен¹,
Ш. Р. Джамиллов, М. А. Беляев¹, А. А. Трушин¹, А. С. Натха¹, Д. А. Зайцев¹,
К. Н. Вовин¹, В. А. Рыбальченко¹

ПЕРИОПЕРАЦИОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ КИШЕЧНОГО МИКРОБИОЦЕНОЗА У БОЛЬНЫХ РАКОМ ТОЛСТОЙ КИШКИ

¹ ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова» (ректор — академик РАН проф. С. Ф. Багненко),

² ФБГНУ «Институт экспериментальной медицины» (врио дир. — проф. Е. В. Шайдаков), Санкт-Петербург

Ключевые слова: рак толстой кишки, кишечная микробиота, дисбактериоз

Введение. В настоящее время трудно недооценить роль влияния кишечной микробиоты на организм человека. С развитием технологий в области молекулярной генетики значительно изменились представления о качественном и количественном составе микроорганизмов.

По современным представлениям, абсолютное большинство (89%) в составе микробиоты здорового человека занимают микроорганизмы, относящиеся к двум крупным сообществам — бактероидам (Bacteroidetes) и фирмикутам (Firmicutes), каждое из которых состоит из множества родов. Бактероиды — группа анаэробных грамотрицательных бактерий трех классов (Bacteroidetes, Flavobacteria и Sphingobacteria). Фирмикуты — преимущественно грамположительные бактерии двух основных классов — бацилл и клостридий. К фирмикутам относятся стрептококки, стафилококки, лактобациллы, энтерококки и менее известные большинству врачей, но более многочисленные вейлонеллы, руминококки, зубактерии, пепто-стрептококки. Самые же распространенные фирмикуты — клостридии. Установлено, что общее количество всех бифидобактерий, которые

входят в семейство актиномицетов, обычно не превышает 5% от общего количества бактерий толстой кишки, а лактобацилл — не более 1%. [7]

В отечественной литературе достаточно много публикаций, в которых изучались особенности микробиоты толстой кишки у больных с колоректальным раком (КРР), в том числе применительно к хирургической практике. Большинство российских исследователей для определения состава микробиоты использовали бактериологический метод. В результате практически у всех пациентов выявлены различной степени нарушения микробиоценоза кишечника в виде снижения количества лакто- и бифидобактерий и роста условно-патогенной флоры [2, 4–6].

Несмотря на современные возможности хирургии и интенсивной медицины, небольшое число осложнений после операций, соблюдение протоколов ранней реабилитации пациентов, сохраняется определённый процент осложнений, ведущую роль в патогенезе которых играет кишечная микрофлора (абдоминальный сепсис, антибиотикоассоциированные колиты, несостоятельности кишечных анастомозов) [3, 9].

Предложены множество путей коррекции кишечных дисбиозов — от назначения зубиотиков и пробиотиков до фекальной трансплантации,

Сведения об авторах:

Багненко Сергей Фёдорович (e-mail: bagnenko_spb@mail.ru), Захаренко Александр Анатольевич (e-mail: 9516183@mail.ru), Шлык Ирина Владимировна (e-mail: irina_shlyk@mail.ru), Тен Олег Андреевич (e-mail: ten888oleg@mail.ru), Джамиллов Шерали Раджабалиевич (e-mail: scherali88@mail.ru), Беляев Михаил Алексеевич (e-mail: 8628926@mail.ru), Трушин Антон Александрович (e-mail: anton.trushin@rambler.ru), Натха Александр Сергеевич (e-mail: natkhaas@gmail.com), Зайцев Данила Александрович (e-mail: nu_ngr@mail.ru), Вовин Кирилл Николаевич (e-mail: kirill.vovin@mail.ru), Рыбальченко Виталий Александрович (e-mail: vitaliirybalchenko@yandex.ru), Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова, 197022, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6–8;

Суворов Александр Николаевич (e-mail: alexandr_suvorov1@hotmail.com), Институт экспериментальной медицины, 197376, Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, 12

однако все они пока не вошли в стандарты оказания медицинской помощи, и их эффективность недостаточно изучена [1, 9].

Большая часть современных научных работ посвящены изучению возможной роли микробиоты в канцерогенезе рака толстой кишки и разработке подходов к терапии рака посредством восстановления естественного микробиоценоза. Дополнительно ведется поиск микробиологических маркеров в качестве средств ранней диагностики рака толстой кишки [8, 10]

С другой стороны — мало публикаций, в которых с помощью современных генетических методов исследования отслежено состояние толстокишечной микробиоты у больных с КРР до и после операции.

В связи с этим цель исследования — поиск корреляций между состоянием кишечной микробиоты и характером осложнений, локализацией опухоли, проводимой периоперационной антибиотикопрофилактикой.

Материал и методы. Проведённое исследование по характеру относится к проспективному сравнительному. Изучена микробиота кишечника у 38 больных с КРР. Среди них женщин оказалось несколько больше, чем мужчин, — 55,5 (n=21) и 44,5% (n=17) соответственно. Большую часть пациентов (73%) составили люди пожилого и старческого возраста. В исследование включены все пациенты, которым проводили хирургическое вмешательство с диагнозом «рак толстой кишки». Исключали пациентов с отдалёнными метастазами.

Опухоль локализовалась у 40% (n=15) больных в правых отделах толстой кишки, у 26% (n=10) — в области ректосигмоидного перехода, у 18% (n=7) — в прямой кишке и у 16% (n=6) — в левой половине ободочной кишки. У всех пациентов опухоль верифицирована как аденокарцинома (табл. 1).

У 37% (n=14) больных опухоль стенозировала просвет кишки (просвет непроходим для колоноскопа диаметром 1 см и имелась клиническая картина субкомпенсированных нарушений кишечной проходимости) с признаками паратуморозного инфильтрата. Неоадьювантная химиолучевая

терапия проведена 4 (57%) из 7 больных раком прямой кишки.

Предоперационная подготовка кишечника включала бесшлаковую диету в течение 7 сут перед операцией. Пациентам с опухолями прямой кишки назначали очистительные клизмы вечером и утром перед операцией. Солевые слабительные не применяли.

Все пациенты были прооперированы в плановом порядке.

Оперативные вмешательства стандартного объёма проведены лапароскопическим доступом у 66% (n=25) пациентов, 34% (n=13) — хирургическое вмешательство выполнено «открытым» способом. Оперативные вмешательства в объёме передней резекции прямой кишки с тотальной мезоректумэктомией сопровождались обязательным выведением привентивной трансверзостомы (табл. 2).

Всем больным проводили антибиотикопрофилактику. Наиболее часто применяемая схема: интраоперационно — ампицид 1 г, послеоперационно — трифамокс 1,5 г 3 раза в день в течение 3 сут. У 7 пациентов к данной схеме добавляли метронидазол 400 мг 2 раза/сут, преимущественно из-за признаков паратуморозного воспаления.

У всех пациентов изучена микрофлора кишки за 7 сут до операции и на 10-е сутки после операции. Взятие, транспортирование и хранение каловых масс проводили в строгом соответствии с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР (полимеразная цепная реакция) диагностики», разработанными ФБГУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (М., 2012). Контейнер с материалом доставляли в лабораторию и хранили до начала исследования при температуре 2–8 °С. Время от взятия материала до начала исследования не превышало 48 ч.

Использовали метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени с применением набора реагентов «КОЛОНОФЛОР», который включает: смесь для ПЦР-амплификации, специфичную для ДНК всех бактерий (общая бактериальная масса); смеси для амплификации, специфичные для каждого выявляемого вида (или группы) бактерий (перечень выявляемых микроорганизмов приведен в табл. 3).

Таблица 2

Объём и способ хирургических вмешательств

Характер операции	Лапароскопическая	Открытая
Брюшно-промежностная экстирпация прямой кишки	2	1
Передняя резекция прямой кишки с тотальной мезоректумэктомией	7	2
Правосторонняя гемиколэктомия	9	6
Левосторонняя гемиколэктомия	5	1
Операция Гартмана	2	3
Всего	25	13

Таблица 1

Характеристика пациентов по локализации опухоли

Локализация опухоли	Число пациентов	%
Рак правых отделов ободочной кишки	15	40
Рак ректосигмоидного отдела толстой кишки	10	26
Рак прямой кишки	7	18
Рак левых отделов ободочной кишки	6	16
Всего	38	100

Таблица 3

**Перечень выявляемых микроорганизмов
и каналы детекции результатов амплификации**

№ пробиры	Название смеси для амплификации	
	FAM	HEX
1	Общая бактериальная масса	—
2	Lactobacillus spp.	—
3	Bifidobacterium spp.	—
4	Escherichia coli	—
5	Bacteroides fragilis group	—
6	Faecalibacterium prausnitzii	—
7	Klebsiella pneumoniae	Klebsiella oxytoca
8	Candida spp.	Staphylococcus aureus
9	Escherichia coli enteropathogenic	—
10	Enterococcus spp.	—
11	Bacteroides thetaiotaomicron	—
12	Clostridium difficile	Clostridium perfringens
13	Proteus spp.	—
14	Enterobacter spp./ Citrobacter spp.	—
15	Fusobacterium nucleatum	—
16	Salmonella spp.	Shigella spp.

Результаты и обсуждение. Анализ результатов исследования показал, что изменения в качественном и количественном составе микрофлоры до и после операции выявлены у всех пациентов (табл. 4). Преимущественно изменения характеризуются повышением общей бактериальной массы, количества Lactobacillus spp. и Bifidobacterium spp., значительным анаэробным дисбалансом и прогрессирующим увеличением количества условно-патогенной флоры. До операции у 87% больных повышена общая бактериальная масса, у 95% — Lactobacillus spp., у 97% — Bifidobacterium. У 32% больных выявлен анаэробный дисбаланс, преимущественно за счет значительного (у 89%) повышения Bacteroides fragilis group. У половины пациентов до операции увеличено количество Escherichia coli, у 71% — Enterobacter spp. Из условно-патогенной флоры у 63% выявлен высокий уровень Escherichia coli enteropathogenic, у каждого третьего повышено содержание Fusobacterium spp. и Clostridium perfringens. Clostridium difficile обнаружена у 8% пациентов до операции.

В послеоперационном периоде обращает внимание нарастание анаэробного дисбаланса, который диагностирован у 63% пациентов. При

Таблица 4

**Динамика видов кишечных микроорганизмов
в периоперационном периоде**

Показатель		До операции		После операции	
		n	%	n	%
Общая бактериальная масса	↑	33	87	29	97
Lactobacillus spp.	↑	36	95	29	97
Bifidobacterium spp.	↑	37	97	26	87
Escherichia coli	↑	19	50	21	70
Bacteroides fragilis group	↑	34	89	20	67
Соотношение Bacteroides fragilis/ Faecalibacterium prausnitzii (анаэробный дисбаланс)	↑	12	32	19	63
Enterobacter spp.	↑	27	71	28	93
Escherichia coli enteropathogenic	↑	24	63	22	73
Fusobacterium spp.	+	13	34	5	17
Clostridium perfringens	+	12	32	3	10
Klebsiella oxytoca	↑	7	18	6	20
Klebsiella pneumoniae	↑	5	13	11	29
Clostridium difficile	+	3	8	10	26
Citrobacter spp.	↑	5	13	6	20
Enterococcus spp.	↑	4	10	7	23
Proteus vulgaris	↑	2	5	2	7
Candida spp.	↑	1	3	2	7
Staphylococcus aureus	↑	1	3	3	10

Примечание. ↑ — повышенное количество; + — наличие бактерий.

этом количество Lactobacillus spp., Bifidobacterium и Bacteroides fragilis group оставалось повышенным или нормализуется. Обращает внимание увеличение пациентов с повышенным содержанием Escherichia coli (у 70%), Enterobacter spp. (у 93%), Escherichia coli enteropathogenic (у 73%). Практически у каждого третьего больного после операции выявлен повышенный уровень Clostridium difficile, Klebsiella pneumoniae, Citrobacter spp. и Enterococcus spp.

Многофакторный анализ показал отсутствие статистически значимой зависимости выявленных изменений в микрофлоре от пола и возраста пациентов, объема и способа оперативных вмешательств, наличия опухолевого стеноза и инфильтрата ($p \leq 0,05$).

Статистически значимыми оказались повышенный уровень Lactobacillus spp., Bifidobacterium и Bacteroides fragilis group у всех категорий пациентов, что несколько расходится с данными известных публикаций. Достоверно

чаще диагностировался анаэробный дисбаланс в послеоперационном периоде, особенно после антибиотикопрофилактики и терапии. Достоверно чаще диагностированы *Clostridium difficile* и *Clostridium perfringens* у пациентов с опухолями правого фланга толстой кишки ($p \leq 0,05$).

Послеоперационные осложнения возникли у 5 больных (13,2%): у 1 — абсцесс малого таза (инфицированная гематома), у 2 — воспаление послеоперационной раны и у 2 — несостоятельности анастомоза (6%). Летальных исходов не было. Обращает на себя внимание, что все пациенты оперированы лапароскопически. Двум из них была проведена предоперационная химиолучевая терапия.

Детальный анализ изменений в составе микрофлоры у осложнённых больных показал тенденцию к нормализации повышенных значений *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* и *Bacteroides fragilis* group. При этом больше, чем у остальных пациентов, нарастал анаэробный дисбаланс, за счёт доминирования условно-патогенной микрофлоры, оценить значимость конкретных видов которой не представляется возможным из-за малого количества наблюдений (табл. 5).

Следует отметить, что бифидобактерии и лактобациллы, которые большинство авторов рассматривают в качестве индикаторов

нормального состояния микробиоценоза кишечника, у пациентов с колоректальным раком были повышены как до-, так и в послеоперационном периоде. Через 1 мес после операции у 34% ($n=13$) пациентов присутствовали признаки синдрома раздражённой толстой кишки, у большинства из которых в послеоперационном периоде было диагностировано наличие *Clostridium difficile*. Данный факт потребовал проведение декантомицинии энтеротропными антибиотиками и назначение пробиотиков.

Затронутая нами проблема крайне актуальна в настоящее время. Существуют множество публикаций, в которых проводится подробный анализ толстокишечной микрофлоры у онкоколопроктологических больных и практически сразу предлагается способ коррекции выявленных изменений обычно путём комбинации эу- и пробиотика. Несмотря на это, в повседневной работе хирурга проблема дисбиозов остаётся «тёмной лошадкой». В стандарты оказания специализированной медицинской помощи больным хирургического профиля и всем категориям пациентов с КРР не включен ни один метод анализа состояния микрофлоры толстой кишки ни до, ни после операции.

Результаты нашего исследования несколько противоречат данным литературы. Установлено повышенное содержание лакто- и бифидофлоры,

Таблица 5

Периоперационная динамика кишечных микроорганизмов у больных (1–5) с послеоперационными осложнениями

Показатель	1-й		2-й		3-й		4-й		5-й	
	До	После	До	После	До	После	До	После	До	После
Общая бактериальная масса	↑	↑	N	↑	↑	N	N	↓	↑	↑
<i>Lactobacillus</i> spp.	↑↑	↑	↑	N	↑	↑↑	↑↑	↑	↑	N
<i>Bifidobacterium</i> spp.	↑	↑↑	↑	↑↑	↑↑	↑	↑	N	↑	↑
<i>Escherichia coli</i>	N	↑	↑	↑↑	N	↑	↑	↓	↑	↑
<i>Bacteroides fragilis</i> group	↑	↑↑	↑	↑↑	↑	↓	↑	↓	↑	N
Соотношение <i>Bacteroides fragilis</i> / <i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	N	N	N	↑	N	0	↑	↑↑	↑	↑↑
<i>Enterobacter</i> spp.	N	↑	↑	↑↑	↑	↑↑	↑↑	↑	↑	↑
<i>Escherichia coli</i> enteropathogenic	N	↑	↑	↑	N	↑	↑	0	↑	↑
<i>Fusobacterium</i> spp.	0	0	↑	0	0	0	↑	0	↑	0
<i>Clostridium perfringens</i>	0	0	↑	0	↑	0	↑	0	0	0
<i>Klebsiella oxytoca</i>	N	↑	N	N	N	N	N	N	N	N
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	N	N	N	N	N	N	↑	N	N	N
<i>Clostridium difficile</i>	0	0	0	↑	0	0	0	0	0	↑
<i>Citrobacter</i> spp.	N	N	N	N	↑	N	↑	N	N	N
<i>Enterococcus</i> spp.	N	↑	N	N	N	N	N	N	N	N
<i>Proteus vulgaris</i>	N	N	N	N	N	N	↑	N	N	N
<i>Candida</i> spp.	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
<i>Staphylococcus aureus</i>	N	N	N	N	N	N	↑	N	N	N

Примечание. ↑ — повышенное количество; ↑↑ — значительно повышенное количество; 0 — отсутствие бактерий; N — нормальное значение.

причем как до, так и после операции. У единичных пациентов они были на нижней границе нормы. Практически у всех больных диагностирован анаэробный дисбаланс, преимущественно за счет повышения количества бактериоидов и условно-патогенной микрофлоры. Количественный и качественный состав условно-патогенных микробов также отличался от описанных в других работах. Особенно интересен анализ послеоперационной картины кишечного микробиоценоза. У каждого третьего больного преимущественно с опухолями правого фланга толстой кишки выявлена *S. difficile* и множество других условно-патогенных микробов. При этом, если повышение выявляемости *S. difficile*, энтерококков, энтеробактера и энтеропатогенной кишечной палочки в послеоперационный период можно объяснить проводимой антибиотикотерапией, то уменьшение числа *S. perfringens* или фузобактерий требует дополнительного осмысления.

Исследование ставит вопросы, на которые обязательно необходимо найти ответы. Где граница между повышенным количеством условно-патогенных микроорганизмов и инфекцией? Требуется ли предоперационная деконтаминация условно-патогенной микрофлоры? Следует ли персонализировать антибиотикопрофилактику с учётом изменений в микробиоте? В чем состоит место и значимость эу- и пробиотиков в периоперационном периоде с учётом полученных результатов?

По данным нашего исследования, тяжело сказать о роли дисбиоза в возникших осложнениях. Но очевидно, что состояние микрофлоры перед выпиской больного из стационара требует контроля. У каждого третьего больного диагностировано повышенное содержание условно-патогенных микроорганизмов. Развитие дисбиоза влияет на качество жизни этих пациентов, что требует динамического наблюдения и коррекции в амбулаторных условиях.

Выводы. 1. Больным раком толстой кишки целесообразно выполнение анализа кала на микробиоту до и после хирургического вмешательства.

2. При дооперационном повышении количества условно-патогенной микрофлоры необходимо проводить деконтаминацию энтеротропными антибиотиками или персонализировать антибиотикопрофилактику с обязательным послеоперационным контролем и амбулаторным лечением.

3. В профильных врачебных сообществах необходимо рассмотреть вопрос о включении анализа кишечной микробиоты до и после операции в стандарты медицинской помощи.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Агейченко А. В., Калуцкий П. В., Медведева О. А. и др. Влияние поликомпонентных пробиотиков на состав микробиоценоза кишечника при экспериментальном дисбиозе // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2015. № 4. С. 80–84.
2. Афанасьева З. А., Старостина М. А., Губаева М. С. и др. Биоценоз кишечника у больных колоректальным раком // Практ. мед. 2012. № 12. С. 97–99.
3. Ерюхин И. А., Гельфанд Б. Р., Шляпников С. А. Хирургические инфекции: Руководство для врачей / Под ред. И. А. Ерюхина. СПб.: Питер, 2003. 864 с.
4. Жуков В. И., Перепадя С. В., Зайцева О. В. и др. Исследование профиля микробиоценоза кишечника у больных колоректальным раком // Украинск. мед. альманах. 2010. № 2. С. 146–148.
5. Жуков В. И., Перепадя С. В., Зайцева О. В. и др. Особенности микробиоценоза кишечника у больных колоректальным раком // Пробл. мед. 2010. № 1. С. 8–9.
6. Захаренко А. А., Суворов А. Н., Шлык И. В. и др. Нарушения микробиоценоза кишечника у больных колоректальным раком и способы их коррекции // Колопроктология. 2016. № 2. С. 48–56.
7. Суворов А. Н., Симаненков В. И., Сундукова З. Р. и др. Способ получения аутопробиотика на основе *Enterococcus faecium*, представителя индигенной микрофлоры кишечника хозяина // Вестн. Росс. акад. мед. наук. 2013. № 2. С. 56–62.
8. Borges-Canha M., Portela-Cidade J. P., Dinis-Ribeiro M. et al. Role of colonic microbiota in colorectal carcinogenesis: a systematic review // Rev. Esp. Enferm. Dig. 2015. Vol. 107, № 11. P. 659–671.
9. Lopez J., Grinspan A. Fecal microbiota transplantation for inflammatory bowel disease // Gastroenterol. Hepatol. 2016. Vol. 12, № 6. P. 374–379.
10. Wang X., Huycke M. M. Colorectal cancer: role of commensal bacteria and bystander effects // Gut. microbes. 2015. Vol. 6, № 6. P. 370–376.

Поступила в редакцию 09.09.2016 г.

S. F. Bagnenko¹, A. A. Zakharenko¹, A. N. Suvorov²,
I. V. Shlyk¹, O. A. Ten¹, Sh. R. Dzhamilov, M. A. Belyaev¹,
A. A. Trushin¹, A. S. Natkha¹, D. A. Zaitsev¹, K. N. Vovin¹,
V. A. Rybal'chenko¹

PERIOPERATIVE CHANGES OF COLON MICROBIOCENOSIS IN PATIENTS WITH COLON CANCER

¹ I. P. Pavlov First Saint-Petersburg State Medical University;

² Institute of Experimental Medicine, Saint-Petersburg

The colon microflora was investigated by PCR method in real time before and after planned operation in 38 patients with colon cancer. A multifactor analysis showed absence of statistically significant dependence of revealed changes in microflora from sex, age of patients, volume and method of surgery, presence of tumor stenosis and infiltrate. An anaerobic imbalance was often registered in postoperative period, especially after antibiotic prophylaxis and therapy. *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* were often detected in patients with tumor of the right part of colon ($p < 0,05$). The irritable colon syndrome was noted in 34% ($n=13$) patients after one month. Clostridial infection was revealed in majority of these cases. The authors recommend to perform the microbiota analysis before and after surgery.

Key words: colon cancer, intestinal microbiota, disbacteriosis, colitis, colorectal cancer