

КИШЕЧНАЯ НЕДОСТАТОЧНОСТЬ И ТРАНСЛОКАЦИЯ ИЕРСИНИЙ ПСЕВДОТУБЕРКУЛЕЗА (YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS) ПРИ РАЗВИТИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГЕНЕРАЛИЗОВАННОЙ ИНФЕКЦИИ

Чичерин И. Ю.¹, Погорельский И. П.², Лундовских И. А.², Дармов И. В.², Горшков А. С.², Шабалина М. Р.²

¹Научное общество «Микробиота», Сергиев Посад

²Вятский государственный университет, Киров

INTESTINAL FAILURE AND YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS TRANSLOCATION IN THE DEVELOPMENT OF EXPERIMENTAL GENERALIZED INFECTION

Chicherin I. Yu.¹, Pogorelsky I. P.², Lundovskikh I. A.², Darmov I. V.², Gorshkov A. S.², Shabalina M. R.²

¹Scientific society «Microbiota», Sergiev Posad

²Vyatka State University, Kirov

Чичерин Игорь Юрьевич

Chicherin Igor Yu
rpatron@mail.ru

Чичерин Игорь Юрьевич Президент научного общества «Микробиота», к.м.н., Научное общество «Микробиота», Сергиев Посад, Россия

Погорельский Иван Петрович Профессор каф. микробиологии Биологического факультета ФГБОУ ВО «ВятГУ», д.м.н., профессор, ФГБОУ ВО «Вятский государственный университет», Киров, Россия,

Лундовских Ирина Александровна Доцент каф. микробиологии Биологического факультета ФГБОУ ВО «ВятГУ», к.х.н., доцент, ФГБОУ ВО «Вятский государственный университет», Киров, Россия,

Дармов Илья Владимирович Зав. кафедрой микробиологии Биологического факультета ФГБОУ ВО «ВятГУ», д.м.н., профессор, ФГБОУ ВО «Вятский государственный университет», Киров, Россия,

Горшков Антон Сергеевич преподаватель Биологического факультета ФГБОУ ВО «ВятГУ», к.м.н., ФГБОУ ВО «Вятский государственный университет», Киров, Россия,

Шабалина Марина Робертовна Зав. кафедрой математики факультета прикладной математики и телекоммуникаций ФГБОУ ВО «ВятГУ», к.п.н., ФГБОУ ВО «Вятский государственный университет», Киров, Россия,

Chicherin Igor Yurevich Scientific society «Microbiota», Sergiev Posad, Russia

Pogorelsky Ivan Petrovich Vyatka State University, Kirov, Russia

Lundovskikh Irina Alexandrovna Vyatka State University, Kirov, Russia

Darmov Ilya Vladimirovich Vyatka State University, Kirov, Russia

Gorshkov Anton Sergeevich Vyatka State University, Kirov, Russia

Shabalina Marina Robertovna Vyatka State University, Kirov, Russia

РЕЗЮМЕ

Цель исследования. Установить значение кишечной недостаточности и транслокации бактерий *Y. pseudotuberculosis* и нормальной микрофлоры кишечника в инициации и генерализации инфекции при экспериментальном псевдотуберкулезе конвенциональных белых мышей, а также патоморфологические ее проявления как реакцию на адгезию и колонизацию слизистой оболочки патогенными бактериями *Y. pseudotuberculosis*.

Материалы и методы. В экспериментах по моделированию псевдотуберкулеза у конвенциональных белых мышей использовали патогенный штамм *Y. pseudotuberculosis* 147 I серотипа, содержащий плазмиду кальцийзависимости с молекулярной массой 47 МДа. Выращивание культуры псевдотуберкулезного микроба с учетом его психрофильности проводили на агаре Хоттингера при температуре (4–5) °С. Штамм лактобацилл *L. plantarum* 8P-A3 выделен из лиофилизированного пробиотического коммерческого препарата Лактобактерин (производство ФГУП «НПО Микроген», Россия) и использован для получения надосадочной жидкости нативной культуры лактобацилл, компонентный состав которой определяли методом газожидкостной хроматографии с масс-селективным детектированием. Гентамицин для парентерального введения произведен ОАО «Биохимик», Россия. Патоморфологические исследования проводили на 4–6 сутки эксперимента. У павших животных для исследования отбирали фрагменты тонкой кишки, печени, почек, легких. Ткани фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, обезживали в изопропанолe и заливали в парафин. Препараты окрашивали гематоксилином Эрлиха и эозином, исследовали на микроскопе «Микмед-2» (ООО «ЛОМО», Россия) при увеличении ×200 – ×1000. Статистическую обработку результатов экспериментов проводили по методу Кербера в модификации И.П. Ашмарина и А.А. Воробьева.

Результаты. Установлена роль кишечной недостаточности и транслокации бактерий *Y. pseudotuberculosis*, а также нормальной микрофлоры кишечника в инициации и генерализации инфекции у животных. Доказано, что пероральное введение животным надосадочной жидкости, содержащей микробные метаболиты, как и внутримышечное введение гентамицина, в одинаковой степени предотвращают развитие генерализованной формы псевдотуберкулеза и выраженность патоморфологических изменений в кишечнике и в других органах животных.

Заключение. Метаболиты пробиотических лактобацилл *L. plantarum* 8P-A3 купируют развитие псевдотуберкулезной инфекции у экспериментальных животных, инфицированных возбудителем *Y. pseudotuberculosis*, на ранней стадии развития патологического процесса, обуславливая не только сохранение колонизационной резистентности слизистой оболочки кишечника, предотвращающей адгезию и колонизацию патогена, но и путем антимикробного их воздействия на диссеминированные бактерии возбудителя псевдотуберкулеза в организме животных.

Ключевые слова: псевдотуберкулез, кишечная недостаточность, транслокация, лактобациллы, метаболиты.

Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология 2016; 127 (3): 24–31

SUMMARY

The objective. To determine the value of intestinal failure and translocation of bacteria *Y. pseudotuberculosis*, and normal intestinal microbiota in the initiation and generalization of infection in experimental pseudotuberculosis in conventional white mice, as well as pathological manifestation of it as a response to the adhesion and colonization of the mucous membrane by pathogenic bacteria *Y. pseudotuberculosis*.

Materials and methods. Experimental models of pseudotuberculosis in conventional white mice used the pathogenic *Y. pseudotuberculosis* 147 serotype I strain, containing a calcium-dependence plasmid with a molecular weight of 47 MDa. Cultivation of the pseudotuberculosis pathogen given its psychrophilic was performed on Hottinger agar at a temperature of (4–5) °C. The lactobacilli strain *L. plantarum* 8P-A3 was isolated from a lyophilized commercial probiotic Lactobacterin (manufactured by «NPO Microgen», Russia) and used to obtain native culture supernatant fluid of lactobacilli, the composition of which was detected by gas-liquid chromatography with mass-selective detection. Gentamicin for parenteral administration was manufactured by JSC «Biochemist», Russia. Pathomorphological examination was performed on the 4–6th day of the experiment. Fragments of the small intestine, liver, kidneys, and lungs from dead animals were chosen for examination. Tissues were fixed in 10% neutral formalin, dehydrated in isopropanol and embedded in paraffin. Preparations were stained with Ehrlich hematoxylin and eosin, examined on the microscope «Mikmed-2» (JSC «LOMO», Russia) under magnification $\times 200 - \times 1000$. Statistical processing of the experimental results was carried out according to the method of Kerber in modification of I.P. Ashmarin and A.A. Vorobyov.

Results. The role of intestinal failure and translocation of bacteria *Y. pseudotuberculosis*, and normal intestinal microbiota in the initiation and generalization of infection in animals has been found. It has been proved that the oral administration of supernatant fluid containing microbial metabolites to animals as intramuscular administration of gentamicin equally prevent the development of generalized pseudotuberculosis and intensity of pathomorphological changes in the intestine and other organs of animals.

Conclusion. Metabolites of the probiotic lactobacilli strain *L. plantarum* 8P-A3 jugulate the development of pseudotuberculosis at an early stage of the pathological process in experimental animals infected with pathogen *Y. pseudotuberculosis*, not only causing the preservation of the colonization resistance of the intestinal mucosa that prevents the adhesion and colonization of the pathogen, but also through their antimicrobial impact on the disseminated pseudotuberculosis pathogen bacteria in animals.

Keywords: pseudotuberculosis, intestinal failure, translocation, lactobacilli, metabolites.

Eksperimental'naya i Klinicheskaya Gastroenterologiya 2016; 127 (3): 24–31

Введение

История изучения псевдотуберкулеза, начиная с выделения *L. Malassez* и *W. Vignal* возбудителя инфекции в 1883 г. [1], включает в себя несколько этапов, важнейший из которых связан с проведенными отечественными учеными исследованиями по созданию учения о псевдотуберкулезной инфекции у человека [2]. В этой связи следует особо отметить исследования В.А. Знаменского и А.К. Вишнякова [3], высказавших предположение о том, что псевдотуберкулезный микроб является этиологическим агентом дальневосточной скарлатиноподобной лихорадки, широко распространенной в свое время на Дальнем Востоке, в Сибири, в Ленинградской и Новгородской областях. Опыт самозаражения В.А. Знаменским культурой псевдотуберкулезного микроба позволил ему сделать

окончательный вывод о действительной причастности возбудителя *Y. pseudotuberculosis* к инициации инфекции, которую впоследствии стали именовать эпидемическим псевдотуберкулезом [4].

Псевдотуберкулез широко распространен и встречается повсеместно, хотя и неравномерно [2, 5–7]. Анализ публикаций, посвященных псевдотуберкулезу, дает основание полагать, что в большинстве случаев возбудитель обнаружен в странах Европы, но часто культуры возбудителя выделяют и на других континентах. Получены доказательства того, что возбудитель *Y. pseudotuberculosis* циркулирует на всей территории России и стран СНГ — там, где проводятся диагностические лабораторные исследования и может быть выделен возбудитель [5].

Псевдотуберкулезный микроб относится к патогенным бактериям рода *Yersinia*. Он вызывает острую зоонозную бактериальную инфекцию, для которой характерны: полиморфизм клинических проявлений, поражение желудочно-кишечного тракта и суставов, кожные высыпания, интоксикация, лихорадка, склонность к рецидивам, обострениям и переходу в хроническую форму [2, 5, 6]. Даже при проведении этиотропного лечения заболевания, сопровождающегося псевдотуберкулезной септициемией, летальность может достигать 75% [7].

Сама же проблема патогенности бактерий рода *Yersinia*, по мнению Б.М. Мишанькина [8], представляет собой едва ли не самый интересный раздел биологии иерсиний. Эта проблема привлекает внимание ученых в связи с необходимостью разработки средств и методов борьбы с заболеваниями, вызываемыми патогенными иерсиниями. Однако многовариантность проблемы приводит в ряде случаев к столкновению мнений ученых, которое в случае возбудителя *Y. pseudotuberculosis*, к счастью, оказалось конструктивным в плане всеобщего признания того неоспоримого научного факта, что псевдотуберкулез у человека сразу развивается как генерализованная инфекция, и возбудитель быстро проникает в кровяное русло макроорганизма и обсеменяет все внутренние органы [2].

Второе, в чем совпадает мнение ученые, состоит в констатации такого уникального биологического свойства иерсиний псевдотуберкулеза, как психрофильность, что обеспечивает возбудителю высокий потенциал клеточной и тканевой инвазивности и быстрому (в течение 10–15 мин.) проникновению через слизистые оболочки кишечника в кровь и внутренние органы теплокровного организма, обуславливая генерализацию инфекционного процесса [2, 9].

Важно при этом подчеркнуть, что многозначность патогенетической цепи определяет

выраженный полиморфизм и многообразие клинических проявлений различных форм псевдотуберкулеза. В инфекционных стационарах эти проявления регистрируются в виде абдоминальной (40–60%) или энтеральной (30–50%) форм инфекций [2], а в детской хирургической практике псевдотуберкулез скрывается под диагнозами «острый аппендицит», «первичный перитонит», «острый терминальный илеит», «острый мезентериальный илеит» [2, 10, 11]. Выделение на основании материалов, полученных при изучении патогенеза псевдотуберкулеза [10], таких форм инфекций, как абдоминальная, экстраабдоминальная, экзантемная, артралгическая, септическая, комбинированная, стертая, свидетельствует о множественном поражении органов и систем человеческого организма.

Ввиду того, что при энтеральном пути заражения, естественном при псевдотуберкулезе, возбудитель быстро колонизирует слизистую оболочку желудочно-кишечного тракта и проникает в кровь и внутренние органы, можно говорить о том, что возбудитель, первично поражая такой естественный барьер, как слизистая оболочка, вызывает кишечную недостаточность — энтераргию (по Ю.М. Гальперину, 1975 г.) [11]. Под кишечной недостаточностью понимается проявление сочетанного нарушения двигательной, секреторной, переваривающей и всасывательной функций тонкой кишки, что приводит к выключению ее из обменных процессов и создает предпосылки для необратимых расстройств гомеостаза [11, 12].

Цель исследования — установить значение кишечной недостаточности и транслокации бактерий *Y. pseudotuberculosis* и нормальной микрофлоры кишечника в инициации и генерализации инфекции при экспериментальном псевдотуберкулезе конвенциональных белых мышей, а также патоморфологические ее проявления как реакцию на адгезию и колонизацию слизистой оболочки патогенными бактериями *Y. pseudotuberculosis*.

Материал и методы исследования

В экспериментах по моделированию псевдотуберкулеза у конвенциональных белых мышей (n=45) использовали патогенный штамм *Y. pseudotuberculosis* 147 I серотипа, содержащий плазмиду кальцийзависимости с молекулярной массой 47 МДа. Величина LD₅₀ для белых мышей при пероральном введении составляет 8,5·10⁴ живых микробов [9]. Выращивание культуры псевдотуберкулезного микроба с учетом его психрофильности [2, 5, 9] проводили на агаре Хоттингера при температуре (4–5) °С.

Штамм лактобацилл *L. plantarum* 8P-A3 выделен из лиофилизированного пробиотического коммерческого препарата Лактобактерин (производство ФГУП «НПО Микроген», Россия) и использован для получения надосадочной жидкости нативной культуры лактобацилл, компонентный состав

которой определяли методом газожидкостной хроматографии с масс-селективным детектированием.

Гентамицин для парентерального введения произведен ОАО «Биохимик», Россия.

Патоморфологические исследования проводили на 4–6 сутки эксперимента. У павших животных для исследования отбирали фрагменты тонкой кишки, печени, почек, легких. Ткани фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, обезживали в изопропанол и заливали в парафин. Препараты окрашивали гематоксилином Эрлиха и эозином, исследовали на микроскопе «Микмед-2» (ООО «ЛОМО», Россия) при увеличении ×200–×1000.

Статистическую обработку результатов экспериментов проводили по методу Кербера в модификации И.П. Ашмарина и А.А. Воробьева [13].

Порядковый номер	Группа животных	Количество животных		Сроки гибели, сут.
		взятых в опыт	павших от псевдотуберкулеза	
1	Контрольная	15	15	$X(X_{\min} - X_{\max})$ 7,1 (3–10)
2	Опытная: пероральное введение надосадочной жидкости нативной культуры лактобацилл через 6 часов после инфицирования	15	0	-
3	Опытная: внутримышечное введение гентамицина через 6 часов после инфицирования	15	0	-

Таблица
Протективная эффективность метаболитов лактобацилл *L. plantarum* 8P-A3 и антибиотика гентамицина при пероральном заражении конвенциональных белых мышей бактериями *Y. pseudotuberculosis*

Результаты исследования

Использованные в экспериментах конвенциональные белые мыши были разделены на 3 группы по 15 особей в каждой. Животных трех групп перорально инфицировали возбудителем псевдотуберкулеза: заражающая доза составила $10LD_{50}$ (≈ 850000 КОЕ), что обеспечивало гарантированное развитие инфекционного процесса при пероральном введении бактериальной суспензии [9]. Первая группа являлась контрольной: животные этой группы были инфицированы перорально культурой возбудителя псевдотуберкулеза.

Животным второй опытной группы через 6 ч после перорального инфицирования культурой возбудителя псевдотуберкулеза также перорально вводили надосадочную жидкость нативной культуры лактобацилл *L. plantarum* 8P-A3 в объеме 0,2 мл. Ранее [14], в экспериментах на конвенциональных белых мышах была установлена её высокая эффективность при иерсиниозах при профилактическом и лечебном курсах. Изучение компонентного состава надосадочной жидкости методом газожидкостной хроматографии показало, что основным её компонентом (70% от общего количества метаболитов) является молочная кислота, содержание которой составило (2400 ± 170) мкг·мл⁻¹. Вторым значимым компонентом надосадочной жидкости (14% от общего количества) являются соли фосфорной кислоты. В состав остальных компонентов надосадочной жидкости входили аминокислоты, карбоновые кислоты, жирные кислоты, сахара и многоатомный спирт.

Животным третьей опытной группы после перорального инфицирования культурой возбудителя псевдотуберкулеза через 6 ч вводили внутримышечно гентамицин в суточной терапевтической дозе. Результаты исследований приведены в таблице.

Из представленных в таблице результатов видно, что животные контрольной группы в результате инфицирования псевдотуберкулезным микробом погибли на 3–10 сутки после перорального введения суспензии микробов. Из всех внутренних органов павших животных была выделена чистая культура иерсиний псевдотуберкулеза, что является свидетельством генерализации инфекционного процесса. Практически во всех случаях при патологоанатомическом исследовании павших

животных в брюшной полости выявлялся серозный или серозно-фибринозный экссудат, содержащий иерсинии псевдотуберкулеза и представителей кишечной микрофлоры.

Бактериологическое изучение содержимого толстой кишки павших от псевдотуберкулеза конвенциональных белых мышей выявило рост на селективной питательной среде бактерий *Y. pseudotuberculosis* на уровне $(1,6 \pm 0,5) \cdot 10^8$ КОЕ·г⁻¹. При этом отмечалось снижение общего количества нормальной микрофлоры в $3,9 \cdot 10^5$ раз, бифидобактерий — в $6,2 \cdot 10^4$ раз, лактобацилл — в $3,1 \cdot 10^6$ раз, эшерихий — в $1,5 \cdot 10^3$ раз.

Надосадочная жидкость нативной культуры лактобацилл, вводимая в объеме 0,2 мл перорально животным второй группы через 6 ч после инфицирования культурой *Y. pseudotuberculosis* на протяжении 6 дней, полностью купировала размножение псевдотуберкулезного микроба в кишечнике, генерализацию процесса, и, соответственно, гибель животных. В фекалиях этой группы животных иерсинии псевдотуберкулеза выявлены не были, однако было установлено некоторое снижение как общего количества кишечной микрофлоры (в $2,5 \cdot 10^2$ раз), так и ее представителей — бифидобактерий (в $1,6 \cdot 10^1$ раз), лактобацилл (в $1,9 \cdot 10^1$ раз) и эшерихий (в $1,3 \cdot 10^1$ раз).

Антибиотик гентамицин, вводимый парентерально по 1 мг в сутки в течение 6 дней, также полностью предотвратил генерализацию инфекционного процесса и гибель подопытных животных. У выживших после инфицирования псевдотуберкулезным микробом животных третьей опытной группы в фекалиях иерсинии псевдотуберкулеза выявлены не были. В то же время в фекалиях выживших животных этой группы было установлено снижение как общего количества кишечной микрофлоры (в $4,5 \cdot 10^4$ раз), так и бифидобактерий (в $1,5 \cdot 10^3$ раз), лактобацилл (в $3,5 \cdot 10^3$ раз) и эшерихий (в $3,6 \cdot 10^2$ раз).

При гистологическом исследовании терминального отдела тонкой кишки видно, что стенка кишки расслоена и резко истончена, слизистая некротизирована, оставшиеся клетки железистого эпителия, со стороны просвета кишки определяются некротические массы (см. рисунок на цветной вклейке).

Изменения в других внутренних органах животных являются следствием интоксикации организма микробными токсинами *Y. pseudotuberculosis*, а также продуктами распада тканей кишечника. В частности, в легких просветы альвеол свободные, межальвеолярные перегородки в целом тонкие, хотя некоторые утолщены. Сосуды полнокровны, ткань легкого в отдельных полях зрения инфильтрирована клеточными элементами крови. Структура печени сохранена, сосуды полнокровны. В портальных трактах выявлена умеренная лимфо-гистиоцитарная инфильтрация, в перипортальных зонах гепатоциты с выраженными дистрофическими изменениями, встречаются порто-портальные некрозы. Для эпителия канальцев почек характерна

зернистая дистрофия, единичные клетки эпителия канальцев некротизированы и слущены в просвет канальца, в некоторых клубочках определяются эритроциты.

В опытных группах, где не отмечено случаев гибели животных, гистологические изменения минимальны. Так, структура тонкой кишки полностью сохранена (рисунок, 2). Печень: балочное строение сохранено, центральные вены не расширены. В некоторых полях зрения встречаются двухъядерные гепатоциты. Почка: эпителий некоторых канальцев некротизирован и слущен в просвет канальцев. Большинство канальцев не изменены, клетки эпителия имеют четкие границы и ядра. Клубочки без патологических особенностей.

Обсуждение полученных результатов

Проведенные исследования свидетельствуют о том, помимо бактериологического доказательства развития экспериментального псевдотуберкулеза у конвенциональных белых мышей первой (контрольной) группы получены достаточно веские патоморфологические доказательства генерализации инфекционного процесса вследствие реализации высокого потенциала клеточной и тканевой инвазивности возбудителя [2, 5, 9]

Очевидно, что псевдотуберкулез, развившийся как генерализованная инфекция при пероральном введении конвенциональным белым мышам бактерий *Y. pseudotuberculosis*, не ограничивается лишь поражением органов желудочно-кишечного тракта, но и затрагивает другие органы и системы. Важно при этом отметить, что при некротизации слизистой оболочки кишечника происходит нарушение структуры микробно-тканевого комплекса и его биопленки с последующей транслокацией бактерий нормобиоты кишечника в брюшную полость и параллельным развитием выраженного дисбиоза кишечника, о чем свидетельствует изучение содержимого толстой кишки павших от псевдотуберкулеза конвенциональных белых мышей: при сохранении в кишечном содержимом бактерий псевдотуберкулеза отмечается явное снижение количественных и качественных показателей представителей нормальной кишечной микробиоты.

Животные второй группы, получавшие перорально метаболиты лактобацилл в составе надосадочной жидкости нативной культуры пробиотических микроорганизмов, перенесли инфицирование бактериями *Y. pseudotuberculosis* без летального исхода. Иными словами, при сохранении колонизационной резистентности слизистой оболочки кишечника под влиянием метаболитов лактобацилл для индигенной микробиоты кишечника создается определенное экологическое преимущество перед патогенными иерсиниями, что предотвращает адгезию, инвазию и колонизацию слизистой оболочки кишечника возбудителем *Y. pseudotuberculosis*, не достигающей размеров летальной популяции и, тем самым, еще на ранней стадии купируется развитие инфекционного процесса.

Полученные результаты еще раз подтверждают опубликованные данные [2, 5], согласно которым

псевдотуберкулезная инфекция может прерываться на ранней стадии и ограничиваться клинической симптоматикой расстройства функционирования желудочно-кишечного тракта.

Внутримышечное введение животным третьей группы гентамицина полностью предотвратило развитие инфекционного процесса. В то же время у выживших животных, наряду с элиминацией из организма возбудителя инфекции, были выявлены определенные изменения состава микробиоты кишечника, которые можно расценивать как среднюю степень развития дисбиоза, развившегося под воздействием антибиотика (антибиотико-ассоциированный дисбиоз).

Выделение от погибших животных бактерий псевдотуберкулезного микроба и представителей кишечной микробиоты, а также выявление во внутренних органах в ходе патогистологического исследования выраженных патологических изменений, свидетельствуют о выраженной кишечной недостаточности и развившейся на этом фоне транслокации возбудителя *Y. pseudotuberculosis* и других бактерий кишечной группы.

Весьма важным является мнение клиницистов, согласно которому синдром кишечной недостаточности выявляется при многих заболеваниях. Первые упоминания о развитии кишечной недостаточности датированы 1888 г. и связаны с изучением патофизиологических изменений у экспериментальных животных [15, 16]. Эти изменения включают в себя нарушения двигательной, секреторной, всасывательной и барьерной функций кишечника, что сопровождается резким изменением количества и качества просветной и пристеночной микробиоты, нарушением барьерной функции кишечника, созданием условий для транслокации бактерий кишечного содержимого и их токсинов в просвет брюшной полости и кровотока.

Кишечная недостаточность и, как следствие, транслокация кишечной микробиоты, могут способствовать или потенцировать развитие системной полиорганной недостаточности, либо ее прогрессирование. Таким образом, желудочно-кишечный тракт становится источником эндотоксической интоксикации бактериальной и дисметаболической природы [15–17]. В этой связи уместно

упомануть болезнь Крона, среди факторов риска и причин которой на первом месте стоит инфекция, в частности псевдотуберкулезной этиологии [16]. Именно генерализация псевдотуберкулеза и тромбоз мезентериальных сосудов являются ведущими причинами кишечной недостаточности [16–18].

Само понятие «бактериальная транслокация» связано с именем американского ученого R.D. Berg [19, 20]. Однако первые сведения о бактериемии вследствие транслокации кишечной микробиоты появились в конце XIX века [21]. Именно R.D. Berg [19] впервые представил доказательства того, что травмы слизистой кишечника и бактериальные эндотоксины индуцируют развитие бактериальной транслокации. Им же в соавторстве с W.E. Owens [22] подробно описана транслокация бактерий из желудочно-кишечного тракта у тимусэктомированных мышей.

С течением времени понятие «бактериальная транслокация» получило право на существование, главным образом, благодаря исследованиям клиницистов — хирургов [23], терапевтов [24], педиатров [25], врачей отделений интенсивной терапии [26]. Несмотря на то, что в настоящее время взаимосвязь кишечной недостаточности с бактериальной транслокацией (эндотоксемией), инфекциями пищеварительного тракта, септическими состояниями и полиорганной недостаточностью полностью до конца еще не исследована, однако все более очевидным является тот факт, что кишечная недостаточность и транслокация кишечных бактерий или эндотоксинов в порталную, воротную или системную венозную сеть являются вполне возможными [20, 22, 27].

Защитные механизмы, а это касается в первую очередь барьерной функции кишечника, у здоровых людей обычно задерживают бактерии или эндотоксины внутри кишечника. Этот барьер на пути транслокации микробов состоит из трех относительно автономных составных элементов: физического, врожденно-иммунного и адаптивного иммунного [28]. Физическим барьером является эпителий, который покрыт мощным слоем (наружным и внутренним) слизи. Фолликулярные образования ворсинчатого эпителия содержат определенные специализированные клетки (М-клетки), которые из просвета кишечника повсеместно захватывают микроорганизмы и представляют их дендритным клеткам, которые распознают поглощенные бактерии и, мигрируя в эффекторные участки иммунной системы, опосредуют иммунный ответ.

Комменсальные микроорганизмы, в частности *F. prausnitzii* и *B. thetaiotaomicron* [29], принимают активное участие в формировании структурно-функциональной организации слизистой оболочки и ее иммунной системы: обеспечивают во всем кишечном тракте увеличение бокаловидных клеток, продуцирующих слизь, стимулируют появление реактивных и защитных морфо-функциональных образований, поддерживающих внутрикишечный гомеостаз; препятствуют вторжению представителей кишечной микробиоты и условно-патогенных микроорганизмов внутрь макроорганизма; создают состояние «неизменного физиологического воспаления».

Физический барьер (эпителий), дополненный ассоциацией с факторами врожденного иммунитета и комменсалами, формирует колонизационную резистентность, играет ведущую роль в индукции и экспрессии адаптивной иммунной реакции слизистой оболочки кишечника. Именно благодаря колонизационной резистентности микробно-тканевого комплекса поддерживается внутрикишечный гомеостаз — эволюционно сложившееся динамичное равновесие между реактивностью и толерантностью к микроорганизмам просвета кишечного тракта [30].

При эффективной колонизационной резистентности блокируется адгезия патогенных и условно-патогенных микроорганизмов к эпителиоцитам слизистой оболочки кишечника с участием иммуноглобулинов, неспецифической иммунной защиты, фагоцитарной активности макрофагов и лейкоцитов, системы комплемента и лизоцима, факторов клеточного иммунитета. Эффективность колонизационной резистентности предполагает также сохранение нормальной микробиоты кишечника и в целом полноценное функционирование микробно-тканевого комплекса, обеспечивающего подавление роста уже имеющихся в кишечнике патогенных микроорганизмов, активизацию конкуренции кишечной микробиоты с патогенными микроорганизмами за питательные вещества и рецепторы связывания с эпителием, а также усиление выработки нормальной микробиотой метаболитов, ингибирующих рост патогенов [31].

Одними из ведущих представителей кишечной микробиоты являются лактобациллы. Их антагонизм в отношении экзогенных патогенов обусловлен образованием не только молочной кислоты, но и таких антимикробных соединений, как лизоцим, перекись водорода, лактоцины, короткоцепочечные жирные кислоты, диацетил, гистамин и другие амины [32, 33]. Спектр антимикробной активности метаболитов лактобацилл включает сальмонеллы, шигеллы, клостридии, псевдомонады, стрептококки, стафилококки, листерии, некоторые виды грибов [34].

Использованная нами надосадочная жидкость нативной культуры лактобацилл *L. plantarum* 8P-A3 содержит молочную кислоту (до 70% от общего количества метаболитов), а также другие значимые компоненты (соли фосфорной кислоты, дипептиды, азотистые соединения, аминокислоты, длинноцепочечные жирные кислоты) и некоторые другие компоненты.

Введение надосадочной жидкости нативной культуры лактобацилл *L. plantarum* 8P-A3 перорально конвенциональным белым мышам, инфицированным возбудителем псевдотуберкулеза, со всей очевидностью показало возможность блокирования рецепторов на эпителиоцитах, что предотвратило адгезию патогенных иерсиний и устранило начальный этап инфекционного процесса — колонизацию. Именно этим обстоятельством можно объяснить факт выживания подопытных животных. В совокупности с другими компонентами надосадочной жидкости, являющимися метаболитами лактобацилл *L. plantarum* 8P-A3, молочная кислота,

судя по данным литературы [35], препятствует образованию медиаторов воспаления, стимулируемых ферментами и токсинами иерсиний, что предупреждает увеличение проницаемости клеточных мембран и межклеточных пространств, гипоксию тканей, нарушение микроциркуляции и свертываемости крови, ведущих к снижению барьерной функции эпителия слизистой оболочки кишечника, развитию кишечной недостаточности и транслокации бактерий.

Лечебно-профилактический эффект комплекса метаболитов лактобацилл *L. plantarum* 8P-A3, входящих в состав надосадочной жидкости, связанный с предотвращением развития системного псевдотуберкулеза у экспериментальных животных, аналогичен лечебному эффекту антибиотика гентамицина, хотя механизм действия последнего иной и связан с нарушением синтеза белка рибосомами, а антибактериальная активность антибиотика зависит от его максимальной (пиковой) концентрации в сыворотке крови.

Выводы

1. Пероральное введение конвенциональным белым мышам бактерий псевдотуберкулезного микроба (*Y. pseudotuberculosis*) в дозе, равной 10 LD₅₀, вызывает развитие генерализованной инфекции с летальным исходом подопытных животных.
2. С использованием бактериологического и патогистологического методов изучения внутренних органов и кишечного содержимого павших от псевдотуберкулеза подопытных животных выявлены гистологические изменения внутренних органов с выделением из них бактерий псевдотуберкулезного микроба, свидетельствующие о сформировавшейся кишечной недостаточности и транслокации бактерий *Y. pseudotuberculosis* и нормальной микрофлоры кишечника в брюшную полость и кровоток экспериментальных животных, что имеет существенное значение в генерализации псевдотуберкулезной инфекции.
3. Сравнительный анализ терапевтической эффективности внутримышечного введения

Лактобациллы благодаря своим биологическим свойствам и широкому распространению в окружающей среде представляют значительный научный и практический интерес. В последние годы этот вид микроорганизмов привлекает внимание ученых и клиницистов в связи с возможностью их применения для профилактики и лечения инфекционно-воспалительных заболеваний человека и животных.

Полученные нами экспериментальные данные, как и результаты исследований других авторов в данном направлении, могут стать основой разработки новых перспективных технологий, обеспечивающих выделение из бесклеточных фильтратов или супернатантов нативных культур пробиотических микроорганизмов биологически активных метаболитов. Этот новый класс лекарственных препаратов, уже именуемых «метабиотиками», безусловно войдет в арсенал средств лечения и профилактики желудочно-кишечных заболеваний инфекционной природы, в том числе псевдотуберкулеза.

- антибиотика гентамицина и перорального введения метаболитов надосадочной жидкости нативной культуры лактобацилл *L. plantarum* 8P-A3 свидетельствует о полном освобождении организма инфицированных подопытных животных под воздействием введенных антибактериальных средств от возбудителя псевдотуберкулеза и прерывании развития псевдотуберкулезной инфекции.
4. Проведенными исследованиями доказана возможность прерывания псевдотуберкулезной инфекции у экспериментальных животных, инфицированных возбудителем *Y. pseudotuberculosis*, на ранней стадии развития псевдотуберкулезной инфекции не только путем сохранения колонизационной резистентности слизистой оболочки кишечника под воздействием метаболитов лактобацилл *L. plantarum* 8P-A3, предотвращающих адгезию и колонизацию патогена, но и путем антимикробного их воздействия на диссеминированные бактерии возбудителя псевдотуберкулеза в организме животных.

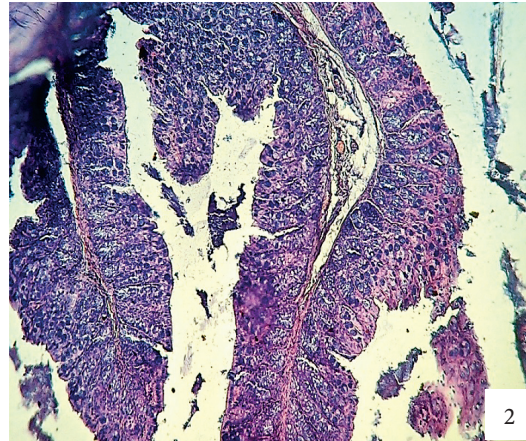
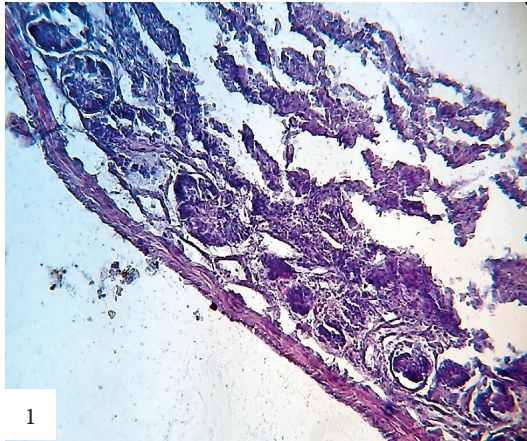
Литература

1. Malassez L., Vignal W. Sur le microorganisme de la tuberculose zoologique // Arch. Physiol. — 1883. — Vol.4. — P. 81–105.
2. Сомов Г. П., Покровский В. И., Беседнова Н. Н., Антоненко Ф. Ф. Псевдотуберкулез. — 2-е изд., перераб. и доп. — М.: Медицина, 2001. — 256 с.
3. Знаменский В. А., Вишняков А. К. Этиология дальневосточной скарлатиноподобной лихорадки // Журн. микробиол. — 1967. — № 2. — С. 125–130.
4. Знаменский В. А. Дальневосточная скарлатиноподобная лихорадка (псевдотуберкулез). — Природно-очаговые болезни в Приморском крае, Владивосток, 1975. — С. 136–161.
5. Юшук Н. Д., Ценева Г. Я., Кареткина Г. Н., Бродов Л. Е. Иерсиниозы. — М.: Медицина, 2003. — 208 с.
6. Борисова М. А. Клиника иерсиниозов. — Владивосток: Изд-во ДВГУ, 1991. — 196 с.
7. Butler T., Dennis D. T. Yersinia species, including plague. Principles and practice of infectious diseases / Ed. G. L. Mandell, J. E. Bennet, R. Dolin; 6th ed. — Churchill Livingstone, Philadelphia, PA 2005. — 2701 p.
8. Мишанькин Б. М. Интегративный характер вирулентности *Yersinia pestis* // Журн. микробиол. — 1987. — № 2. — С. 102–108.
9. Маракулин И. В., Дармов И. В., Погорельский И. П., Дробков В. И., Паутов В. Н. Экспериментальная модель псевдотуберкулезной инфекции у обезьян // Бюлл. эксп. биол. и мед. — 1994. — Т. 118, № 7. — С. 59–62.

10. Исачкова Л. М., Жаворонков А. А., Антоненко Ф. Ф. Патология псевдотуберкулеза. — Владивосток: Дальнаука, 1994. — 189 с.
11. Учайкин В. Ф., Молочный В. П. Неотложные состояния в педиатрии: практическое руководство. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2005. — 256 с.
12. Савельев В. С., Петухов В. А., Каралкин А. В., Сон Д. А., Подачин П. В., Романенко К. В., Иванов В. В. Синдром кишечной недостаточности в ургентной абдоминальной хирургии: новые методические подходы к лечению // Трудный пациент. — 2005. — № 4. — С. 30–37.
13. Ашмарин И. П., Воробьев А. А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. — Л.: Медгиз, 1962. — 280 с.
14. Чичерин И. Ю., Погорельский И. П., Лундовских И. А., Дармов И. В., Малов А. А. Антибактериальная активность и состав надосадочной жидкости нативной культуры *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 // Журн. международной медицины. — 2013. — Т. 1, № 2. — С. 131–139.
15. surgeryzone.net Медицинский сайт Кишечная недостаточность — Гастроэнтерология.
16. mymedicalportal.net Медицинский портал. Болезнь Крона — симптомы, диагностика и лечение.
17. Попова Т. С., Тамазаишвили Т. Ш., Шестопалов А. Е. Синдром кишечной недостаточности в хирургии. — М.: Медицина, 1991. — 240 с.
18. Bounous G. The intestinal factor in VOF and shock // Surgery. — 1990. — Vol. 107(1). — P. 118–119.
19. Berg R. D. Translocation of indigenous bacteria from the intestinal tract. — Human intestinal microflora in health and disease. — N.Y. Academic Press, 1983. — P. 333–352.
20. Berg R. D. Bacterial translocation from intestines // Jikken Dobutsu. — 1985. — Vol. 34, № 1. — P. 1–16.
21. Edmiston C. E. Jr., Condon R. E. Bacterial translocation // Surg., Gynecol., Obstet. — 1991. — Vol. 173, № 1. — P. 73–83.
22. Owens W. E., Berg R. D. Bacterial translocation from gastrointestinal tracts of thymectomized mice // Current Microbiology. — 1982. — Vol. 7, № 3. — P. 169–174.
23. Хлебников Е. П., Вишневецкий В. А., Ключкина Л. П. Бактериальная транслокация при операциях очаговых новообразований печени. <http://www.medsovet.info/book/content1797>.
24. Кунст М. А. Роль микробной инфекции и проницаемости кишечника в патогенезе ревматоидного артрита. <http://pmarchive.ru/rol-mikrobnoj-infekcii-i-pronicaemosti-kischechnika-v-patogeneze-revmatoidnogo-artrita/>.
25. Урсова Н. И. Особенности формирования микробиоценоза у грудных детей и дисбактериоз кишечника. <http://medi.ru/doc/a161117.htm>.
26. De-Souza D. A. Intestinal permeability and system infections in critically ill patients: effect of glutamine // Critical Care Med. — 2005. — Vol. 33, № 5. — P. 1125–1135.
27. Запольский К. В. Связь между кишечной и полиорганной недостаточностью. <http://www.zapolskiy.ru>.
28. Бондаренко В. М. Механизмы транслокации бактериальной аутофлоры в развитии эндогенной инфекции, 2013. <http://refereed.ru/ref8fb276fc273796ca929fc45c2bc661.html>.
29. Hill D. A., Artis D. Intestinal bacteria and regulation of immune cell homeostasis // Annual. Rev. Immunol. — 2010. — Vol. 8, № 1. — P. 411–420.
30. Петров Л. Н. Бактериальные пробиотики. Биотехнология, клиника, метод выбора. — СПб.: Изд-во ФГУП ГосНИИ ОЧБ, 2008. — 136 с.
31. Shenderov B. A. // Microbial Ecology in Health and Disease. — 2013. — Vol. 24. — P. 20399. <http://dx.doi.org/10.3042/mehd.v.240.20399>
32. Шендеров Б. А. Медицинская микробная экология и функциональное питание: в 3 т. Том 3: Пробиотики и функциональное питание. — М.: ГРАНТЪ, 2001. — 289 с.
33. Глушанова Н. А. Биологические свойства лактобацилл // Бюл. Сибирской медицины. — 2003. — № 4. — С. 50–58.
34. Тюрин М. В., Шендеров Б. А., Рахимова Н. Г., Поспелова В. В., Лагода И. В. К механизму антагонистической активности лактобацилл. // Журн. микробиол. — 1989. — № 2. — С. 3–8.
35. Бондаренко В. М. Метаболические пробиотики: механизмы терапевтического эффекта при микробиологических нарушениях // Consilium Medicum. Гастроэнтерология. — 2005. — Т. 7, № 6. — С. 41–45.

К статье

Кишечная недостаточность и транслокация иерсиний псевдотуберкулеза (*Yersinia pseudotuberculosis*) при развитии экспериментальной генерализованной инфекции (стр. 24–31)



Рисунок

Микропрепарат стенки тонкой кишки:

1 — при развившемся псевдотуберкулезе;
2 — при купировании инфекционного процесса метаболитами лактобацилл (увеличение $\times 200$, окраска гематоксилином Эриха и еозином)