

ПАТОГЕНЕЗ ГНОЙНО-СЕПТИЧЕСКИХ ОСЛОЖНЕНИЙ ПРИ КАЛЬКУЛЕЗНОМ ХОЛЕЦИСТИТЕ

Р. Андреев^{1, 4},
Ю. Винник¹, доктор медицинский наук, профессор,
Е. Серова^{1, 3}, кандидат медицинских наук,
Л. Диденко², доктор медицинских наук,
Н. Шевлягина², кандидат медицинских наук,
И. Прусов³, **А. Ширококов**³,
Д. Здзитовецкий^{1, 4}, доктор медицинских наук,
С. Маслов⁴, **П. Базарин**⁴, **А. Ковалев**⁴

¹Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого

²Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи

³Красноярская межрайонная клиническая больница №4

⁴Красноярская межрайонная клиническая больница скорой медицинской помощи им. Н.С. Карповича

E-mail: ekaterina_s_07@mail.ru

На поверхности желчных конкрементов при деструктивных формах калькулезного холецистита обнаружены биопленки микроорганизмов. Значительно больше бактерий выявлялось внутри камня, чаще это были вегетативные формы. Очевидно, что экзоклеточный матрикс биопленки надежно защищает бактерии от внешней агрессивной среды. Поэтому в профилактике осложнений желчнокаменной болезни должны применяться методы, способные разрушить экзополиматрикс биопленок.

Ключевые слова: желчнокаменная болезнь, острый калькулезный холецистит, биопленки микроорганизмов, электронно-микроскопическое исследование.

Течение желчнокаменной болезни (ЖКБ), хронического калькулезного холецистита часто осложняется острым воспалением, наиболее тяжелыми формами которого являются флегмонозный и гангренозный калькулезный холецистит [4, 5].

Формирование конкрементов в желчном пузыре связано с изменением коллоидных свойств желчи в результате дисбаланса в содержании органических соединений — холестерина, пигментов, желчных кислот, соединений кальция и т.д., с недостаточным содержанием жидкостной фазы желчи, снижением эвакуаторной функции желчного пузыря при слабой сократительной активности его гладкомышечной мускулатуры, наличием механических препятствий для оттока желчи (перегибы желчного протока, кисты, опухоли) [5].

Неоднократно было показано, что микроорганизмы способствуют инициации процесса формирования желчных конкрементов [10]. По мнению ряда авторов, миграция бактерий в желчный пузырь происходит гематогенным или лимфогенным путем, а также в результате дуоденобилиарного рефлюкса (энтерогенный путь) [6].

Желчь оказывает эффективное бактерицидное или бактериостатическое действие на многие патогенные для человека микроорганизмы; в норме она является стерильной [11–13].

В то же время патогенные бактерии (в частности, семейства *Enterobacteriaceae* и др.) устойчивы к антимикробным факторам желчи и выделяются из содержимого желчи при гнойно-воспалительных осложнениях ЖКБ [10].

Очевидно, что микроорганизмы, локализующиеся в желчном пузыре, являются основной причиной развития гнойных осложнений, но для реализации острого инфекционного процесса необходимо сочетание нескольких факторов риска, к которым относят окклюзию желчного протока камнем, нарушение кровоснабжения желчного пузыря вследствие атеросклеротических изменений сосудов, дуоденобилиарный рефлюкс из-за недостаточности сфинктера Одди [9].

В патогенезе ЖКБ наименее изучены вопросы о персистенции микроорганизмов в желчном пузыре и причине активации микрофлоры, что приводит к гнойно-воспалительным процессам [14].

В настоящее время принято условно выделять разные формы существования бактерий: планктонные вегетативные

формы бактерий с активным метаболизмом и размножением, способные к колонизации любых поверхностей, в том числе биологических объектов; бактерии в форме организованного сообщества или биопленок, которые по свойствам отличаются от планктонных форм; формирующиеся под влиянием различных неблагоприятных для них факторов L-формы или бактерии с дефектной клеточной стенкой, низким уровнем метаболизма, способные к реверсии в вегетативные формы [1–3, 7, 8, 15, 16].

Нами проведено электронно-микроскопическое исследование желчных конкрементов и поверхности эпителиальной выстилки желчного пузыря после холецистэктомии при деструктивных формах калькулезного холецистита.

У 6 больных с диагнозом ЖКБ, остро го гангренозного калькулезного холецистита интраоперационно были получены конкременты и образцы тканей желчного пузыря. Материал брали в стерильных условиях и фиксировали 10% раствором формалина.

Для исследования методом сканирующей электронной микроскопии были приготовлены образцы камней, у которых изучали поверхность, обращенную в полость желчного пузыря, и внутреннюю поверхность скола камня, а также эпителиальную выстилку желчного пузыря в области шейки. Фиксированные образцы были напылены золотом в установке SPI-ModuleSputter/CarbonCoaterSystem (SPI Inc., США) и не подвергались дегидратации и дополнительной фиксации. Образцы были проанализированы в сканирующем электронно-ионном микроскопе Quanta 200 3D (FEI Company США) в режиме высокого вакуума.

Все исследованные камни при увеличении от 50 до 100 раз имели гладкую поверхность; при большем увеличении (≥ 200 раз) на поверхности визуализировались гладкие и пористые участки. Кроме этого, выявлялись мелкие крошкovidные наложения и тяжи (рис. 1).

Пористая наружная поверхность и внутренняя поверхность камня состояла из совокупности кристаллоподобных структур – правильной геометрической формы, в виде параллелепипедов, между ними просматривались свободные пространства; тяжи идентичны по строению соединительнотканным волокнам с фибробластами (рис. 2).

На поверхности камня, обращенного в полость желчного пузыря, были выявлены бактериальные биопленки, состоявшие из плотного экзоклеточного матрикса, под которым можно было видеть контуры бактерий. Следует отметить наличие тесной анатомической связи биопленок с соединительнотканными волокнами (рис. 3).

На поверхности скола желчного камня выявлено множество вегетативных форм бактериальных клеток. Бактериальные биопленки локализовались на поверхности кристаллоподобных структур и между ними в свободных пространствах (рис. 4).

При исследовании эпителиальной выстилки желчного пузыря в области шейки (рис. 5) и холедоха выявлены бактериальные биопленки (рис. 6).

Таким образом, было доказано наличие на поверхности желчных камней и внутри него бактериальной микрофлоры. Следует подчеркнуть, что значительно больше бактерий выявлялось внутри камня, и подавляющее их большинство составляли вегетативные формы. Биопленки локализовались преимущественно на поверхности камня, что, очевидно, связано с неблагоприятным воздействием желчи на бактерии, а экзоклеточный матрикс биопленки был защитным барьером для бактерий от внешней агрессивной среды.

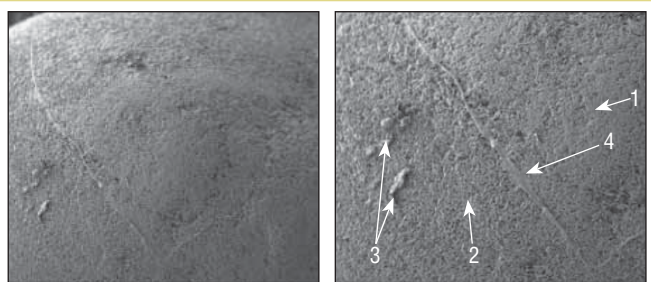


Рис. 1. Поверхность камня с участками гладкой (1) и пористой (2) поверхности, крошкovidными наложениями (3), тяжами (4)

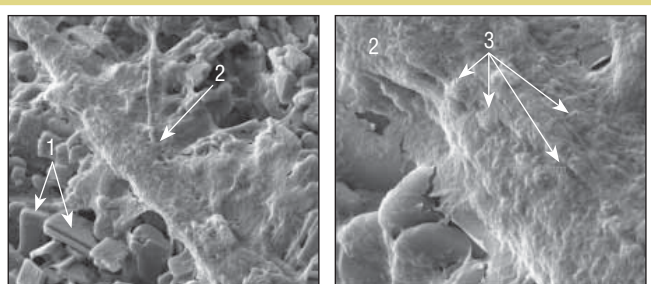


Рис. 2. Кристаллоподобные структуры камня (1), соединительнотканное волокно (2) тяжей и фибробласты (3)

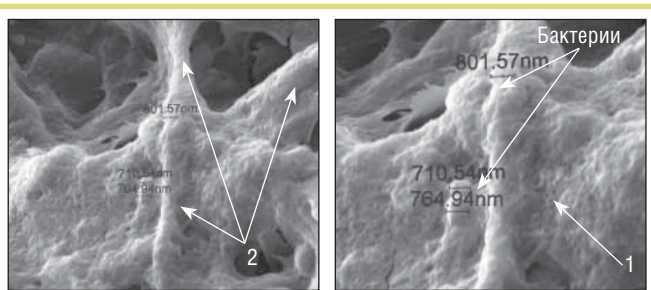


Рис. 3. Анатомическая связь биопленки (1) с соединительнотканными тяжами (2)

Наличие соединительнотканых волокон на поверхности камня указывает на пролиферацию фибробластов на поверхности камня и формирование коллагеновых волокон, которые могут фиксировать конкремент в полости желчного пузыря. В свою очередь, соединительнотканые волокна являются объектом колонизации со стороны бактерий и формирования на них биопленки.

Обнаружение бактериальных биопленок, связанных с поверхностью эпителиальной выстилки желчных протоков, указывает на их сохранение в протоках после холецистэктомии и соответственно на потенциальную угрозу развития послеоперационных осложнений. Это может быть одним из обсуждающихся до сих пор этиологических факторов развития патологического симптомокомплекса после холецистэктомии: в раннем послеоперационном периоде – инфекционно-воспалительных осложнений, в отдаленном – рецидивного холангиолитиаза, холангита.

На основании данных, полученных в настоящем исследовании, можно говорить об активации микрофлоры при флегмонозном и гангренозном калькулезном холецистите, при этом желчный камень является резервуаром патогенной микрофлоры. Очевидно, что в этом случае антибиотики не способны проникнуть в очаг инфекции (внутри камня). Кроме этого, бактериальные биопленки, локализованные на поверхности камня, устойчивы к действию антибактериальных препаратов. В связи с этим назначение антибиотиков в целях профилактики гнойно-септических осложнений при калькулезном холецистите не представляется оптимальным для эрадикации патогенной микрофлоры. Поэтому единственно патогенетически обоснованным способом лечения является холецистэктомия. Но при этом больному необходимы рациональная антибиотикопрофилактика и антимикробная химиотерапия с учетом чувствительности микроорганизмов.

Следует учитывать колонизацию эпителия слизистой оболочки желчевыводящих путей бактериальными биопленками, которые не удаляются при холецистэктомии. В связи с этим необходимо применять антибиотики, сохраняющие высокую концентрацию в желчи, а также к которым чувствительна микрофлора, персистирующая в желчных протоках.

Одним из кардинальных направлений в профилактике осложнений ЖКБ должна стать разработка методов, способных разрушить экзополимагрикс биопленок.

Литература

1. Афиногенова А.Г., Даровская Е.Н. Микробные биопленки ран: состояние вопроса // Травматол. и ортопед. России. – 2011; 3 (61): 119–25.

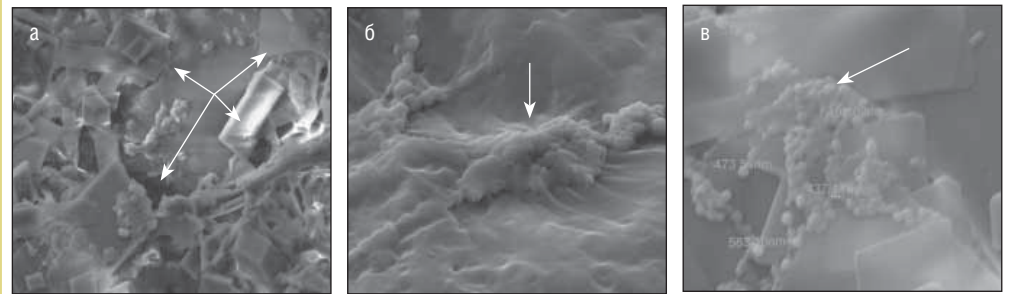


Рис. 4. Поверхность скола желчного конкремента: а – кристаллоподобные структуры; б – биопленка; в – кокковидные бактерии

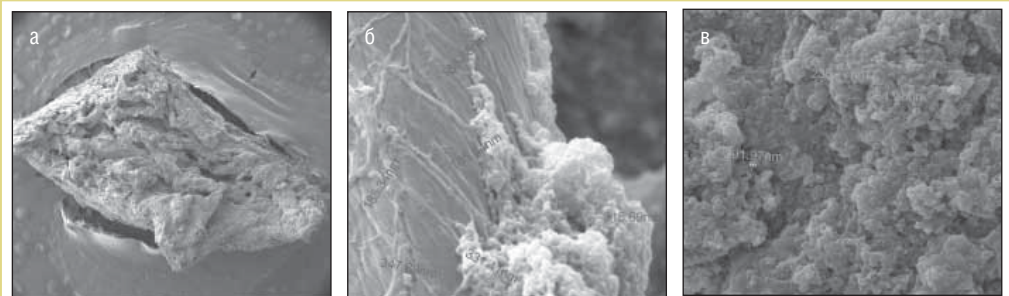


Рис. 5. Внутренняя поверхность желчного пузыря: а – соединительнотканые тяжи; б – биопленка; в – микроорганизмы

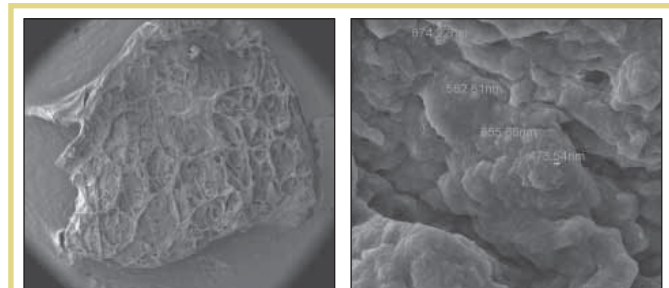


Рис. 6. Внутренняя поверхность холедоха (а) и биопленка с микроорганизмами (б)

2. Романова Ю.М., Диденко Л.В., Толордава Э.Р. и др. Биопленки патогенных бактерий и их роль в хронизации инфекционного процесса. Поиск средств борьбы с биопленками // Вестн. РАМН. – 2011; 10: 31–9.
3. Гостев В.В., Сидоренко С.В. Бактериальные биопленки и инфекции // Журн. инфектол. – 2010; 2 (3): 4–15.
4. Винник Ю.С., Миллер С.В., Серова Е.В. и др. Желчнокаменная болезнь и постхолецистэктомический синдром / Красноярск: Версо, 2010; 234 с.: ил.
5. Скворцова Т.Э., Ситкин С.И., Радченко В.Г. и др. Желчнокаменная болезнь. Современные подходы к диагностике, лечению и профилактике: пособие для врачей / М.: Форте принт, 2013; 32 с.: ил.
6. Зубарева Н.А., Сандаков П.Я., Карпунина Т.И. О возможном механизме инфицирования желчных путей при холелитиазе // Анн. хирургии. – 1998; 1: 55–7.
7. Толордава Э.Р., Перепанова Т.С., Егамбердиев Д.К. и др. Изучение процесса образования биопленки патогенными микроорганизмами на поверхности почечных камней // Клин. лабораторная диагностика. – 2010; 9: 31–2.
8. Толордава Э.Р., Тиганова И.Г., Алексеева Н.В. и др. Микрофлора почечных камней при мочекаменной болезни и поиск средств борьбы с биопленками уропатогенных бактерий // Журн. микробиол. – 2012; 4: 56–62.

9. Михайлова Е.С. Микробиоценозы эзофагогастродуоденальной зоны у больных с патологией желчевыводящих путей. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 2009; 24 с.

10. Диденко Л.В., Андреевская С.Г., Тиганова И.Г. и др. Роль сальмонелл в билиарном литогенезе // Эксперим. и клин. гастроэнтерол. – 2009; 3: 3–11.

11. Серова Е.В. Профилактика постхолецистэктомического синдрома у больных острым калькулезным холециститом. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Красноярск, 2010; 25 с.

12. Тонких Ю.Л., Цуканов В.В. *Helicobacter pylori* и заболевания желчевыводящих путей: существует ли взаимосвязь? // Врач. – 2013; 8: 66–8.

13. Leung J., Liu Yan-Lei, Lau Gene C. et al. Bacteriologic analyses of bile and brown pigment stones in patients with acute cholangitis // Gastrointestinal endoscopy. – 2001; 54 (3): 340–5.

14. Hamada T., Yokota K., Ayada K. Detection of *Helicobacter hepaticus* in human bile samples of patients with biliary disease // *Helicobacter*. – 2009; 14 (6): 545–51.

15. Donlan R., Costerton J. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2002; 15 (2): 167–93.

16. Hall-Stoodley L., Stoodley P. Evolving concept sinbiofilm infections // *Cell Microbiol.* – 2009; 11 (7): 1034–43.

THE QUESTION OF PATHOGENESIS SEPTIC COMPLICATIONS IN CALCULOUS CHOLECYSTITIS AND DEVELOPMENT OF METHODS FOR THEIR PREVENTION

R. Andreev^{1,4}; Professor **Yu. Vinnik**¹, MD; **E. Serova**^{1,3}, Candidate of Medical Sciences; **L. Didenko**², MD; **N. Shevlyagina**², Candidate of Medical Sciences; **I. Prusov**³; **A. Shirobokov**³; **D. Zdzitovetsky**^{1,4}, MD; **S. Maslov**⁴; **P. Bazarin**⁴; **A. Kovalev**⁴

¹Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V.F. Voyno-Yasenetsky

²Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology named after N.F. Gamaleya

³Krasnoyarsk Interdistrict Hospital №4

⁴Krasnoyarsk Interdistrict Hospital ambulance named after N.S. Karpovich

In the present study performed electron microscopic examination of gallstones and the surface of the epithelial lining of the gallbladder in destructive forms of calculous cholecystitis and found biofilm microorganisms. Significantly more bacteria were detected inside the stone, the vast majority of whom were vegetative forms. Biofilms mainly localized on the surface of the stone, which is obviously due to the adverse effects of bile bacteria and outer cell matrix of the biofilms a protective barrier against external aggressive environment for bacteria. These provisions may be used in the correction of preoperative and postoperative therapy in patients with cholelithiasis, acute calculous cholecystitis with pathogenetic point of view. One of the cardinal directions of the future in the prevention of complications of gallstone disease should be to develop techniques capable of destroying outer cell matrix of the biofilms.

Key words: cholelithiasis, acute calculous cholecystitis, biofilm microorganisms, electron microscopic examination.