

Влияние колистина на электрическую активность тощей кишки и видовой состав микрофлоры кишечника

Н.С. Тропская, И.Г. Шашкова, Т.В. Черненькая, Т.С. Попова

ГБУЗ г. Москвы «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского Департамента Здравоохранения г. Москвы», Москва

Контактная информация: Тропская Наталья Сергеевна, ntropskaya@mail.ru

Исследовано влияние колистина на электрическую активность тонкой кишки и видовой состав микрофлоры кишечника. Электрическую активность регистрировали с имплантированных электродов в мышечный слой тонкой кишки крыс. Показано, что внутрижелудочное введение колистина в течение 7 суток не приводило к нарушению генерации мигрирующего миоэлектрического комплекса тощей кишки, что сопровождалось незначительными изменениями ее микрофлоры с выраженными изменениями количественного состава микрофлоры слепой кишки.

Ключевые слова: кишечная микрофлора, колистин, мигрирующий миоэлектрический комплекс, тонкая кишка.

Введение

В последнее время в литературе уделяется большое внимание взаимосвязи микрофлоры и функционального состояния кишечника [1, 3, 14]. Хорошо известно, что применение антибиотиков изменяет баланс микрофлоры [2, 4]. В экспериментальном исследовании при изучении влияния антибиотиков различного спектра действия (бацитрацин, интрамицин, колистин) на микрофлору кишечника цыплят, было показано, что при краткосрочном введении антибиотиков происходит нарушение баланса кишечной микрофлоры, сохраняющееся через 7 дней после их отмены. Кроме того, характер изменения микрофлоры кишечника зависит от спектра действия антибиотика [13]. К антибиотикам узкого спектра действия относится колистин. Он является поверхностным биологически активным веществом, которое взаи-

модействует с клеточными мембранами грамотрицательных бактерий, в результате чего меняется их структура и функция, что ведет к гибели бактериальной клетки [6]. В работах, посвященных колистину, в основном рассматривается его эффективность по отношению к грамотрицательным патогенам, токсичность, схема дозирования и сравнение с другими препаратами [8, 12]. Так, авторы работы [7] отмечают увеличение резистентности бактерий к колистину в связи с его широким применением для лечения инфекций, вызванных грамотрицательными бактериями. Большинство работ касается нефротоксичности колистина при внутривенном введении. Показано, что нефротоксичность наступает при очень высоких дозах, которые не рекомендованы на сегодняшний день [9, 10, 11, 15]. Нейро- и нефротоксические эффекты исчезают после прекра-

щения введения или при снижении дозы [6]. В работе [5] также подчеркивается, что все изменения в организме лабораторных животных после введения тетраголда (комплексный препарат, содержащий колистин и сульфаниламиды), вызванные 20-дневным введением в высоких дозах, носили обратимый характер. Несмотря на то, что изучение взаимосвязи между микробиотой и моторикой кишечника представляет большой интерес, влияние антибиотиков на моторную функцию кишечника мало изучено.

Цель исследования – изучить влияние колистина на параметры мигрирующего миоэлектрического комплекса тонкой кишки и микробиоту кишечника крыс.

Материалы и методы

Исследования выполнены на 12-ти крысах-самцах популяции линий Wistar массой 360-460 г. Протокол исследований был одобрен локальным комитетом по биомедицинской этике НИИ СП им. Н.В. Склифосовского.

Контрольную группу составили 7 здоровых животных. В опытной группе ($n=5$) для предварительной оперативной подготовки использовали раствор кетамина, который вводили внутривентрально из расчета 0,3 мл на 100 г массы тела. Во время операции проводили срединную лапаротомию, вживляли зонд в антральную часть желудка и три игольчатых электрода в стенку начальной части тощей кишки (5, 10 и 15 см дистальнее связки Трейтца). После фиксации зонд и электроды проводили через мягкие ткани брюшной стенки и тазовой области и затем с помощью специального инструмента протаскивали под кожей хвоста и

выводили наружу. После чего животные помещались в металлические индивидуальные клетки.

Все животные содержались в контролируемых условиях окружающей среды при температуре 20-24°C и влажности 45-65%, с режимом освещенности с 8⁰⁰ до 20⁰⁰ – свет, с 20⁰⁰ до 8⁰⁰ – сумеречное освещение.

Эксперименты выполняли после того, как при регистрации электрической активности наблюдалось наличие мигрирующего миоэлектрического комплекса (ММК) – маркера электрической активности тонкой кишки в норме. В качестве антибиотика для селективной деконтаминации грамотрицательной флоры был выбран колистин, который оказывает бактерицидное действие на грамотрицательные бактерии. Записи электрической активности проводили ежедневно в течение 8-ми дней после 18-часовой пищевой депривации. Сначала регистрировали фоновую электрическую активность в течение 1 ч. После этого в желудочный зонд вводили 2 мл раствора колистина в дозе 100 мг/кг и продолжали регистрацию электрической активности в течение 2-х ч. После записей крысам давали стандартный виварный корм и воду. Колистин вводили ежедневно однократно в течение 7-ми суток. На 8-е сутки проводили запись электрической активности, а затем у животных опытной и контрольной групп забирали кал для бактериологического анализа. Затем крыс взвешивали и усыпляли введением летальной дозы наркоза. Вскрывали брюшную полость, проводили забор содержимого тощей кишки (20 см за связкой Трейтца) и слепой кишки для последующего бактериологического анализа.

Электрофизиологические исследования. Записи электрической активности проводились с использованием электронного энцефалографа NVX-52 в полосе от 0,1 до 30 Гц. Выходной сигнал поступал в компьютер IBM PC AT. При обработке данных производили фильтрацию сигналов в полосе 5-30 Гц для выявления спайковой активности.

При анализе электрической активности оценивали ММК. В норме ММК состоит из четко повторяющейся последовательности трех фаз: фаза покоя (фаза I) – более 95% медленных волн без пиковых потенциалов (сокращения отсутствуют), фаза нерегулярной активности (фаза II) – пиковые потенциалы возникают не на каждой медленной волне (сокращения происходят нерегулярно) и фаза регулярной ритмической активности (фаза III) – группы пиковых потенциалов возникают на каждой медленной волне – более 95% медленных волн имеют группы пиковых потенциалов (сокращения происходят регулярно с частотой медленных волн). Кроме того, необходимо подчеркнуть, что ММК возникает в проксимальных отделах тонкой кишки и распространяется в каудальном направлении. Достигнув терминальных отделов тонкой кишки, ММК возникает вновь в проксимальных отделах. Поэтому, помимо оценки цикла ММК в одном конкретном месте тонкой кишки, важным является оценка распространения ММК вдоль тонкой кишки. В связи с тем, что основным ориентиром для оценки распространения ММК служит фаза III, а также тот факт, что окончание фазы III характеризуется внезапным исчезновением групп пиковых потенциалов (хотя единичные пиковые потенци-

алы могут наблюдаться), общепринято, что скорость распространения ММК рассчитывают по скорости распространения фазы III вдоль тонкой кишки.

Оценивали следующие параметры ММК:

- количество ММК в час;
- период каждого цикла ММК (сек) – время от окончания одной фазы III до окончания следующей фазы III на одном электроде;
- процент времени каждой из фаз ММК.

В часовых записях подсчитывали длительность каждой из фаз ММК (в сек), затем длительность каждой фазы умножали на 100 и делили на период ММК. При отсутствии какой-либо фазы ММК в часовых записях подсчитывали длительность регистрируемых фаз (в сек), затем длительность каждой фазы умножали на 100 и делили на 3600 сек (длительность записи);

- скорость распространения фазы III в тощей кишке – расстояние между электродами (5 см), деленное на время от окончания фазы III на 1 (или) 2 электроде до окончания фазы III на 2 или 3 электроде.

Бактериологические исследования. Микробиологическое исследование кала и содержимого тощей и слепой кишок проводилось в соответствии с нормативными документами, принятыми для исследования кала у людей: отраслевым стандартом 91500.11.0004-2003 «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника». Были изучены 8 групп микроорганизмов: *Escherichia coli* (*E.coli*), *Enterococcus* spp., *Proteus mirabilis*, *Enterobacter* spp., *Staphylococcus* spp., плесневые грибы, *Bifidobacterium* spp. и *Lactobacillus* spp.

Статистическая обработка результатов исследований. Для каждой группы животных для всех параметров рассчитывали среднее значение, стандартное отклонение, медиану, персентили. В связи с тем, что распределение значений не носило нормального характера, данные в окончательном варианте представляли как медиану и персентили – Me (25;75)% – и для статистического анализа использовали непараметрические критерии. При сравнении параметров электрической активности до введения колистина с фоновыми значениями после введения колистина с 1-х по 8-е сутки применяли непараметрический критерий – ранговый дисперсионный анализ по Фридману. При сравнении данных бактериологических исследований опытной группы с контрольной группой (здоровые животные) использовали непараметрический U- критерий Манна-Уитни. Статистически значимыми считались значения при $p < 0,01$ и $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

В фоновых записях (до введения колистина) в межпищеварительном периоде электрическая активность тощей кишки характеризовалась выраженной ритмичностью с чередованием периодов покоя и активности и наличием ММК (4 ММК в час). ММК представлял собой циклическую, повторяющуюся сократительную активность тонкой кишки в межпищеварительный период. Период ММК в тощей кишке составлял 725 (625;770) сек. Процентное соотношение фаз ММК представлено на рисунке. Скорость распространения фазы III ММК по тощей кишке между 1 и 2 электродами составила 2,2 (1,9;2,5) см/мин, между 2-3 электродами – 1,8 (1,7;2,3) см/мин.

Начиная со вторых суток, происходило статистически значимое снижение длительности фазы I и статистически значимое увеличение длительности фазы II относительно контроля. При этом период ММК составил 585 (545;685)

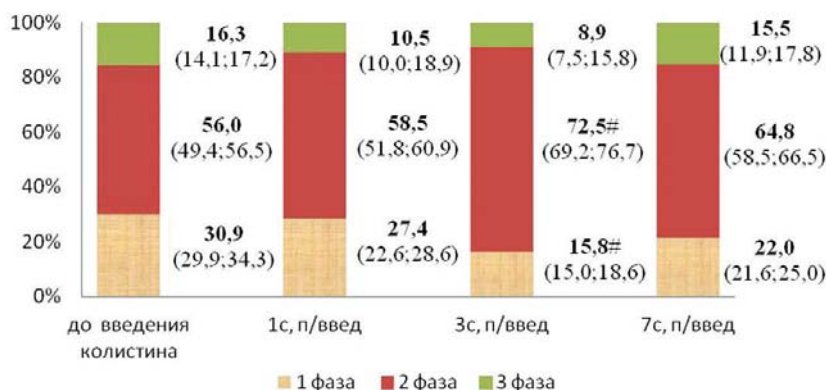


Рис. Динамика длительности фаз ММК в различные сроки после введения колистина. На диаграмме представлены данные электромиограмм, зарегистрированных с электродов, расположенных на расстоянии 10 см за связкой Трейтца.

Примечание: # – $p < 0,05$, отличия значений параметров до введения и в различные сроки после введения колистина статистически значимы.

сек. Число ММК статистически значительно снизилось до 2 (2;2) ММК в час. Скорость распространения фазы III ММК по тощей кишке между 1 и 2 электродами незначительно снизилась и составила 2,0 (1,1;2,5) см/мин, между 2-3 электродами – увеличилась и составила 2,8 (1,4;3,2) см/мин.

На третьи сутки наблюдались максимальные изменения в соотношении фаз (рис.). При этом период ММК составил 785 (545;845) сек. Количество ММК статистически значительно уменьшилось до 1 (1;2) ММК в час. Скорость распространения фазы III ММК по тощей кишке между 1 и 2 электродами увеличилась до 2,3 (1,8;2,5) см/мин, между 2-3 электродами – до 3,3 (2,3;3,3) см/мин.

В последующие сутки наблюдалась тенденция к нормализации параметров

ММК. На седьмые сутки процентное соотношение фаз было статистически незначимым относительно контроля, период ММК составлял 670 (630;925) сек, что близко к норме. Наблюдалось 3 (2;3) ММК в час, что статистически значимо не отличалось от нормы. Скорость распространения фазы III ММК по тощей кишке между 1 и 2 электродами незначительно снизилась и составила 1,8 (1,6;2,2) см/мин ($p>0,05$) между 2-3 электродами – увеличилась и составила 2 (2;4,5) см/мин ($p>0,05$).

Таким образом, введение колистина в течение семи суток не изменяет основные параметры ММК и не оказывает существенного влияния на моторику тонкой кишки.

Данные по бактериологическим исследованиям представлены в табл. 1 и 2.

Таблица 1

Содержание различных видов микроорганизмов в тощей, слепой кишке и кале в контрольной (здоровые животные) и опытной группе (животные после семисуточного введения колистина), КОЕ/мл, Ме (25;75)%

Вид микроорганизмов	Тощая кишка		Слепая кишка		Кал	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
<i>Staphylococcus</i> spp.	0(0;10 ³)	10 ³ (0;10 ⁴)	10 ³ (10 ³ ;10 ⁶)	0(0;10 ³)#	10 ³ (0;10 ⁴)	10 ⁴ (0;10 ⁵)
<i>Enterococcus</i> spp.	0(0;10 ³)	10 ⁴ (10 ³ ;10 ⁶)#	10 ³ (0;10 ⁵)	10 ⁵ (10 ⁴ ;10 ⁶)	10 ³ (0;10 ⁴)	10 ⁵ (10 ⁴ ;10 ⁶)*
<i>E.coli</i>	0(0;10 ³)	10 ² (0;10 ⁵)	10 ⁴ (10 ³ ;10 ⁵)	10 ³ (10 ² ;10 ⁴)	10 ³ (10 ³ ;10 ⁵)	0(0;10 ²)#
<i>Proteus mirabilis</i>	0(0;0)	0 (0;10 ⁴)	0(0;10 ³)	0(0;10 ²)	0(0;0)	10 ² (0;10 ³)
<i>Enterobacter</i> spp.	0(0;0)	0(0;0)	0(0;0)	0(0;10 ⁴)	0(0;0)	0(0;0)
Плесневые грибы	0(0;0)	0(0;10 ²)	0(0;0)	10 ² (10 ² ;10 ⁵)*	0(0;0)	0(0;10 ²)
<i>Lactobacillus</i> spp.	0(0;0)	0(0;0)	10 ⁷ (10 ⁴ ;10 ⁷)	10 ⁴ (10 ³ ;10 ⁴)*	10 ⁶ (10 ⁶ ;10 ⁷)	10 ⁴ (10 ³ ;10 ⁵)*
<i>Bifidobacterium</i> spp.	0(0;0)	0(0;0)	10 ⁵ (10 ⁴ ;10 ⁶)	10 ⁴ (10 ⁴ ;10 ⁴)*	10 ⁵ (10 ⁵ ;10 ⁶)	10 ⁴ (10 ⁴ ;10 ⁴)*

Примечание: * – $p<0,01$; # – $p<0,05$ отличия опытной группы от контрольной статистически значимы. При сравнении данных бактериологических исследований опытной группы с контрольной группой (здоровые животные) использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни.

Таблица 2

Представленность различных видов микроорганизмов в тощей, слепой кишке и кале в контрольной (здоровые животные) и опытной группе (животные после семисуточного введения колистина) и изменение количества микроорганизмов в опытной группе по сравнению с контрольной

Вид микроорганизмов	Тошная кишка		Слепая кишка		Кал		Тошная кишка	Слепая кишка	Кал
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт			
<i>Staphylococcus</i> spp.	3/7	4/7	7/7	2/7	4/7	4/7		#	
<i>Enterococcus</i> spp.	3/7	6/7	5/7	7/7	5/7	7/7	#		*
<i>E.coli</i>	3/7	5/7	6/7	6/7	6/7	2/7			#
<i>Proteus mirabilis</i>	0/7	3/7	2/7	2/7	1/7	4/7			
<i>Enterobacter</i> spp.	0/7	1/7	1/7	2/7	1/7	1/7			
Плесневые грибы	0/7	2/7	0/7	7/7	0/7	2/7		*	
<i>Lactobacillus</i> spp.	0/7	0/7	7/7	7/7	7/7	7/7		*	*
<i>Bifidobacterium</i> spp.	0/7	0/7	7/7	7/7	7/7	7/7		*	*

↑	0	↓

Примечание: в левой части таблицы в числителе указано количество животных, у которых были выявлены микроорганизмы, а в знаменателе – общее число животных в группе; в правой части таблицы:

увеличение количества микроорганизмов в опытной группе по сравнению с контрольной (заштриховано черным цветом);

уменьшение количества микроорганизмов в опытной группе по сравнению с контрольной (заштриховано серым цветом);

0 – количество микроорганизмов не изменилось.

* – $p<0,01$; # – $p<0,05$ отличия опытной группы от контрольной статистически значимы.

Бактериологические исследования показали, что в контрольной группе у трех животных из семи в содержимом тощей кишки из восьми групп микроорганизмов присутствовали только *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp. и *E.coli*. При анализе микрофлоры каждо-

го отдельного животного было установлено, что микробиоценоз тощей кишки здоровых животных составлял от 0 до 3 видов бактерий. В содержимом слепой кишки у всех животных присутствовали *Staphylococcus* spp., *Lactobacillus* spp. и *Bifidobacterium* spp. У большинства жи-

вотных высевались *E.coli*, *Enterococcus* spp. У двух животных из семи присутствовали *Proteus mirabilis*, и у одного животного высевался *Enterobacter* spp. Состав микрофлоры слепой кишки каждого животного составлял от трех до шести видов микроорганизмов. В кале у всех животных выявлялись *Lactobacillus* spp. и *Bifidobacterium* spp. У большинства присутствовали *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., *E.coli*. У одного животного высевались *Proteus mirabilis* и *Enterobacter* spp. Микробиоценоз кала каждого животного был представлен 2-6 видами бактерий.

В опытной группе после семисуточного введения колистина отмечались следующие изменения. Так, в содержимом тощей кишки у трех животных появились *Proteus mirabilis*, у одного животного – *Enterobacter* spp., и у двух – плесневые грибы. Статистически значимо увеличилось количество *Enterococcus* spp. Также отмечалось увеличение количества *Staphylococcus* spp., *E.coli*, но оно было статистически незначимым. Видовое разнообразие микрофлоры тощей кишки у каждого животного увеличилось по сравнению с контролем и составляло от одного до пяти видов микроорганизмов. В содержимом слепой кишки у всех животных появились плесневые грибы. Статистически значимо уменьшилось количество *Staphylococcus* spp., *Lactobacillus* spp. и *Bifidobacterium* spp. Статистически незначимо увеличилось количество *Enterococcus* spp. и *Enterobacter* spp. Видовое разнообразие микрофлоры слепой кишки у каждого животного практически не изменилось по сравнению с контролем и составляло 4-7 видов микроорганизмов. В кале статисти-

чески значимо увеличилось количество *Enterococcus* spp. Статистически значимо уменьшилось количество *E.coli*, *Lactobacillus* spp. и *Bifidobacterium* spp. Также произошло увеличение количества *Proteus mirabilis* и плесневых грибов, но эти изменения были статистически незначимы. Видовое разнообразие микрофлоры кала у каждого животного практически не изменилось по сравнению с контролем и составляло от четырех до семи видов микроорганизмов.

Таким образом, введение колистина в течение семи суток приводит к увеличению количества *Enterococcus* spp. в содержимом тощей кишки, к увеличению количества грибов в содержимом слепой кишки и *Enterococcus* spp. в кале при одновременном снижении количества *Staphylococcus* spp, *Lactobacillus* spp. и *Bifidobacterium* spp. в слепой кишке и *E.coli*, *Lactobacillus* spp. и *Bifidobacterium* spp. в кале.

Заключение

Подавление грамотрицательной микрофлоры колистином в течение семи суток у здоровых животных не изменяло основные параметры ММК и не оказывало существенного влияния на моторику тонкой кишки, что свидетельствовало о сохранении нормальной пропульсивной перистальтики. В работе [5] также отмечалось, что как однократное, так и длительное введение тетраголда (препарат на основе колистина) в течение 20-ти дней не влияло на перистальтическую активность тонкого кишечника. В нашем исследовании наиболее выраженные изменения наблюдались в количественном составе микрофлоры слепой кишки и кала, в то время как изменения микробиоты в тощей кишке

были незначительны, что, по-видимому, связано с сохранением распространяющего ММК в тощей кишке и нормальной пропульсивной перистальтики.

Список литературы

1. Ардатская М.Д., Минушкин О.Н. Современные принципы диагностики и фармакологической коррекции // Consilium Medicum. Гастроэнтерология. 2006. № 2. С. 4-17.
2. Бельмер С.В. Антибиотик-ассоциированный дисбактериоз кишечника // Русский медицинский журнал. 2004. № 3. С. 148.
3. Бельмер С.В., Гасилова Т.В. Нарушения моторики органов пищеварения и общие принципы их коррекции // Лечащий врач. 2010. № 7. С. 12-15.
4. Скворцов В.В. Дисбиоз кишечника и антибиотик-ассоциированная диарея // Лечащий врач. 2008. № 2. С. 43-47.
5. Чернов В.В. Фармако-токсикологическая характеристика тетраголда: автореф. дис.... канд. вет. наук / В.В. Чернов. – Воронеж. 2008. 22 с.
6. Beringer P. The clinical use of colistin in patients with cystic fibrosis // Curr. Opin. Pulm. Med. 2001. Vol. 7. No. 6. P. 434-440.
7. Bialvaei A.Z., Kafil H.S. Colistin, mechanisms and prevalence of resistance // Curr. Med. Res. Opin. 2015. Vol. 31, No. 4. P. 707-721.
8. Hachem R.Y., Chemaly R.F., Ahmar C.A., et al. Colistin is effective in treatment of infections caused by multidrug-resistant pseudomonas aeruginosa in cancer patients // Antimicrob Agents Chemother. 2007. Vol. 51, No. 6. P. 1905-1911.
9. Koch-Weser J., Sidel V.W., Federman E.B., et al. Adverse effects of sodium colistimethate. Manifestations and specific reaction rates during 317 courses of therapy // Ann. Intern. Med. 1970. Vol. 72. No. 6. P. 857-868.
10. Ledson M.J., Gallagher M.J., Cowperthwaite C., et al. Four years' experience of intravenous colomycin in an adult cystic fibrosis unit // Eur. Respir. J. 1998. Vol. 12. No. 3. P. 592-594.
11. Li J., Nation R.L., Milne R.W., et al. Evaluation of colistin as an agent against multi-resistant Gram-negative bacteria // Int. J. Antimicrob. Agents. 2005. Vol. 25. No. 1. P. 11-25.
12. Li J., Nation R.L., Turnidge J.D., et al. Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections // Lancet Infect. Dis. 2006. Vol. 6. No. 9. P. 589-601.
13. Ohya T., Sato S. Effects of dietary antibiotics on intestinal microflora in broiler chickens // Natl. Inst. Anim. Health Q. - Tokyo. 1983. Vol. 23. No. 2. P. 49-60.
14. Quigley E.M. Microflora modulation of motility // J. Neurogastroenterol. Motil. 2011. Vol. 17. No. 2. P. 140-147.
15. Wolinsky E., Hines J.D. Neurotoxic and nephrotoxic effects of colistin in patients with renal disease // N. Engl. J. Med. 1962. Vol. 266. P. 759-768.

The effect of colistin on the electrical activity of the jejunum and the species composition of the intestinal microbiota

N.S. Tropaskaya, I.G. Shashkova, T.V. Chernen'kaya, T.S. Popova

The effect of colistin on the electrical activity of the small intestine and microbiota was studied. The electrical activity was recorded by electrodes implanted in the muscle layer of the rat jejunum. It is shown that the intragastric administration of colistin for 7 days did not result in disruption of generation of the migrating myoelectric complex in jejunum that was accompanied by minor modifications of its microflora with marked changes in the quantitative composition of microflora in the cecum.

Key words: intestinal microbiota, colistin, migrating myoelectric complex, jejunum.