

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ  
ВІННИЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
імені М. І. Пирогова**

**ТИМКІВ МАРІЯ ЗЕНОНІВНА**

УДК: 576.851.48.06:616.345

**БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ *E. COLI*, ВИДІЛЕНИХ ВІД ХВОРИХ З  
НЕІНФЕКЦІЙНИМИ ЗАХВОРЮВАННЯМИ ТОВСТОЇ КИШКИ**

**03.00.07 – мікробіологія**

**Автореферат  
на здобуття наукового ступеня  
кандидата медичних наук**

**Вінниця – 2016**

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у Львівському національному медичному університеті імені Данила Галицького МОЗ України.

**Науковий керівник:** доктор медичних наук, професор  
**Корнійчук Олена Петрівна**, Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, завідувач кафедри мікробіології, вірусології та імунології.

**Офіційні опоненти:**

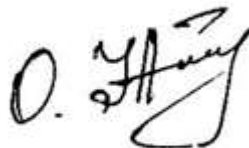
- доктор медичних наук, професор **Климнюк Сергій Іванович**, Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, завідувач кафедри мікробіології, вірусології та імунології;
- кандидат медичних наук, доцент **Сорокоумова Людмила Констянтинівна**, Вінницький національний медичний університет імені М. І. Пирогова МОЗ України, доцент кафедри мікробіології, вірусології та імунології.

Захист дисертації відбудеться « 04 » березня 2016 р. о 10<sup>00</sup> годині на засіданні спеціалізованої вченої ради К 05.600.05 Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова за адресою: 21018, м. Вінниця, вул. Пирогова, 56.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова за адресою: 21018, м. Вінниця, вул. Пирогова, 56.

Автореферат розісланий « 27 » січня 2016 р.

**Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради  
кандидат медичних наук**



**О. А. Назарчук**

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Постійний інтерес до вивчення хронічних запальних захворювань кишечника пов'язаний із зростанням захворюваності на дану патологію у всьому світі: на їх частку припадає 10,0 % всієї хронічної патології органів травлення. (Бойко Т.Й., 2011).

Тривала запальна реакція в окремих випадках призводить до розвитку пухлинного процесу (Freeman H., 2008; Maeda S., 2008; Shacter E., 2002). Кумулятивний ризик ракової трансформації коливається від 2% серед пацієнтів, які страждали на коліт протягом 10 років, до 18% серед пацієнтів, у яких коліт тривав впродовж 30 років. (Joanne A.P., 2008). Колоректальний рак (КРР) входить до п'ятірки найпоширеніших злоякісних новоутворень в Україні.

За даними Бюлетеня Національного канцер-реєстру № 14 – «Рак в Україні, 2011 – 2012», рівень захворюваності колоректального раку в 2011 році становив 44,4 нових випадків на рік на 100 тис. населення. Щорічно в Україні виявляють близько 20 тисяч випадків КРР та понад 10 тисяч людей помирає від цього захворювання.

Оскільки нормальне функціонування травного каналу передбачає участь симбіонтних мікроорганізмів, особливого значення набуває вивчення мікроекологічних аспектів цієї проблеми. Дослідження мікробіоценозу товстої кишки необхідне для вивчення механізмів хронізації запальних захворювань, їх подальшого прогресування і реалізації запальної реакції по шляху ульцерогенезу або розвитку проліферативного процесу (ракова трансформація). Механізми канцерогенезу пов'язані з тим, що в результаті життєдіяльності мікроорганізмів кишкової групи, із екзогенних і ендогенних продуктів макроорганізму можуть утворюватися речовини (канцерогени), які спричиняють дисбаланс процесів диференціації, проліферації та апоптозу колоноцитів, і тим самим сприяють розвитку раку кишечника (Бондаренко В.М., 2007), з іншого боку – кишкова мікробіота є потужним модулятором гуморальної і клітинної ланок імунітету (Савицкая И.С., 2008).

Але дані наукової літератури про кількісні і якісні зміни мікрофлори травного тракту як в нормі, так і при патології різняться між собою. Тому, вивчення мікробіологічних аспектів розвитку захворювань потребує всебічного аналізу.

Дослідження біологічних властивостей *E.coli* заслуговує на особливу увагу у хворих як основного симбіонта з групи грамнегативних факультативних анаеробів, які є джерелом ліпополісахариду (ЛПС). Характеристика популяційних змін, домінування відповідних варіантів, характеристика біологічних властивостей ешерихій в організмі, ураженому пухлинним процесом, є недостатньо вивченими. Є дані про те, що *E. coli* синтезує етіонін, який при різних методах аплікації викликає пухлинний процес у тварин (Янковський Д.С., 2004). З іншого боку, ентеротоксигенна *E. coli* здатна пригнічувати розвиток раку прямої кишки.

Взаємовідносини ентеробактерій з організмом господаря, що призводять до розвитку запальних процесів, відрізняються особливою складністю, пов'язані зі здатністю їх колонізувати травний тракт і проникати в ентеро- та колоноцити. Все це вимагає ретельного вивчення реакції імунної системи. Численні дослідження в

цій галузі стосуються неспецифічних ланок захисних сил організму. Мало вивченими є реакції клітинної, гуморальної ланок імунної системи, питання міжклітинної взаємодії.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота є фрагментом науково-дослідних робіт кафедри мікробіології, вірусології та імунології Львівського національного медичного університету «Моніторинг резистентності до хіміотерапевтичних препаратів грамнегативних і грампозитивних бактерій, виділених від хворих з гострими та хронічними запальними процесами», № державної реєстрації 0105U007857, шифр: ІН.11.13.0001.05 (2005-2009рр.), «Обґрунтування моніторингу діагностики, стратегія профілактики та стандартизація методів лікування кровотеч в шлунково-кишковому тракті» № державної реєстрації 0115U000042, шифр: ІН.21.00.001.15 (01.2015 – 12.2019рр.).

Автор дисертації виконувала фрагменти перерахованих тем, які стосуються теми дисертаційного дослідження.

Тема дисертації затверджена на засіданні Вченої Ради медичного факультету №2 Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького 19.12.2007 р., протокол №3 та на засіданні Проблемної комісії “Мікробіологія” МОЗ та НАМН України (протокол № 77 від 06.04.2009р.). Корегування теми дисертаційної роботи відбулось на засіданні Вченої Ради медичного факультету №2 Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького 07.02.2014 р., протокол №5.

**Мета і завдання дослідження.** Мета – удосконалення принципів діагностики та методів лікування неінфекційних захворювань товстої кишки – неспецифічного виразкового коліту (НВК), хвороби Крона (ХК) і раку товстої кишки (РК) з метою зниження ризику їх розвитку на підставі дослідження характеру мікроекологічних змін та біологічних властивостей *E.coli*.

Для реалізації вказаної мети були поставлені такі **завдання**:

1. Визначити характер дисбіотичних змін при НВК, ХК та РК в товстій кишці.
2. Дослідити біологічні властивості ешерихій, виділених від хворих на НВК, ХК та РК (біохімічні, гемолітичні, адгезивні властивості, антигенний спектр).
3. Вивчити резистентність до хіміотерапевтичних препаратів виділених штамів *E.coli*.
4. Встановити плазмідний спектр штамів *E.coli* у хворих на НВК, ХК, РК.
5. Дослідити вплив ЛПС ешерихій, виділених від хворих на НВК, ХК, РК, на імунну відповідь.
6. Обґрунтувати проведення вибіркової антимікробної хіміотерапії.

**Об'єкт дослідження** – мікроекологічні зміни та альтерація біологічних властивостей ешерихій, ізольованих від хворих на неспецифічний виразковий коліт, хворобу Крона та рак товстої кишки.

**Предмет дослідження** – біологічні властивості ешерихій, їх антигенна характеристика та адгезивні властивості, плазмідний спектр, зміни цитокінового профілю сироватки крові пацієнтів під впливом ЛПС ешерихій.

**Методи дослідження:** мікробіологічні – виділення, ідентифікація та

визначення біологічних властивостей ізолюваних штамів мікроорганізмів (мікроскопічні та культуральні дослідження ізолятів ешерихій при вивченні їх морфології та адгезивних властивостей; визначення чутливості до хіміотерапевтичних препаратів, антигенного спектру); імунологічні для вивчення індукції синтезу цитокінів; біологічні для вивчення гуморальної ланки імунітету; фізико-хімічні (електрофорез); методи математично-варіаційної статистики.

**Наукова новизна отриманих результатів.** Доповнено наукові дані змін мікробіоценозів у хворих на неспецифічний виразковий коліт, хворобу Крона та рак товстої кишки.

Одержано нові дані щодо біологічних властивостей ешерихій, ізолюваних від хворих на неспецифічний виразковий коліт, хворобу Крона та рак товстої кишки. Встановлено міжштамові відмінності ешерихій за адгезивними властивостями, антигенним спектром, плазмідним профілем та його фенотиповими проявами. Проведено порівняльне вивчення серотипового спектру ешерихій, ізолюваних від хворих на НВК, ХК та РК.

Встановлено вибірковість протимікробної дії салюфальку при лікуванні хворих із хронічними запальними процесами товстої кишки.

*In vivo* доведено стимулюючий вплив ЛПС ешерихій гуморальної ланки імунітету у хворих на НВК, ХК та РК.

Встановлено зміни індукції цитокінів ЛПС ешерихій, виділених від хворих на хронічні запальні процеси товстої кишки та онкохворих.

**Практичне значення отриманих результатів.** Отримані показники мікробіоценозу при хронічних запальних захворюваннях травної системи покладено в основу інформаційних матеріалів щодо визначення груп ризику на предмет можливості розвитку проліферативних процесів та рекомендовано використовувати при проведенні моніторингу хронічних неінфекційних захворювань товстої кишки.

Визначено зміни цитокінового профілю, що дозволяють їх рекомендувати використовувати для призначення лікування імуномодулюючого характеру.

Розроблено інформаційні матеріали з рекомендаціями щодо лікування хворих з хронічними запальними процесами товстої кишки. Доведено необхідність при виділенні мікроорганізмів-опортуністів у таких хворих, окрім салюфальку, призначати протимікробну хіміотерапію та препарати для біокорекції.

**Особистий внесок здобувача.** Автором самостійно здійснено аналіз вітчизняної та зарубіжної літератури за обраною темою. Автором особисто одержані основні результати експериментів, а саме: досліджено мікробіоценоз товстої кишки хворих на НВК, ХК та РК, вивчено біологічні властивості виділених ешерихій (чутливість до антимікробних засобів, визначено адгезивні властивості та антигенний спектр), вивчено їх імуногенні властивості в експериментах *in vitro*, *in vivo*.

Виділення плазмід проведено на базі Інституту мікробіології і вірусології НАН України ім. Д. К. Заболотного, виділення ліпополісахаридів – на базі Інституту біології клітини НАН України, імунологічні дослідження проводили на базі клінічної лабораторії обласного діагностичного центру.

Автором самостійно проведено аналіз результатів досліджень, розроблено

основні теоретичні і практичні положення роботи, висновки і практичні рекомендації, підготовлено до друку наукові праці та написано всі розділи дисертації, оформлено автореферат.

Персональний внесок автора у всіх опублікованих зі співавторами працях наведено за текстом дисертації та в авторефераті у списку фахових публікацій.

**Апробація результатів дисертації.** Основні наукові положення дисертаційної роботи оприлюднено і обговорено на Міжнародній конференції, присвяченій 120-річчю з дня народження Р. С. Вайгля «Мікроорганізми в патогенезі та їх лікарська резистентність» (Львів, 2003); Установчому з'їзді Українського товариства клітинної біології (Львів, 2004); науково-практичній конференції з міжнародною участю «Сучасні проблеми епідеміології, мікробіології та гігієни» (Львів 2008); XII з'їзді товариства мікробіологів України ім. С. М. Виноградського (Ужгород, 2009); XIII з'їзді товариства мікробіологів України ім. С. М. Виноградського (Ялта, 2013); науково-практичній конференції «Інфекційні хвороби: невирішені проблеми (діагностика, етіопатогенетичні особливості, лікування, профілактика)» (Київ, 2013); науково-практичній конференції «Актуальні питання боротьби з інфекційними захворюваннями» (Харків, 2015). Дисертаційна робота апробована на спільному засіданні кафедр мікробіології, вірусології та імунології, медичної біології, паразитології та генетики ЛНМУ імені Данила Галицького.

**Публікації.** Результати роботи висвітлені у 18 опублікованих наукових працях (2 – одноосібно). Серед них 7 статей у фахових наукових виданнях рекомендованих ДАК України (1 стаття опублікована у журналі, який представлений в Scopus, 2 статті в журналах наукометричної бази РІНЦ), 1 інформаційний лист, 10 тез доповідей у матеріалах міжнародних з'їздів та науково-практичних конференцій.

**Структура та обсяг роботи.** Дисертаційна робота викладена на 169 сторінках комп'ютерного тексту і складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, чотирьох розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення одержаних результатів, висновків, практичних рекомендацій, списку використаних джерел літератури та додатку. Список використаної літератури містить 251 джерело, з них 125 – україно- та російськомовних, 126 – англомовних авторів. Дисертаційна робота ілюстрована 16 таблицями та 27 рисунками.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ ДИСЕРТАЦІЇ

У **вступі** обґрунтовано актуальність теми, визначено мету, завдання, об'єкт та предмет дослідження, висвітлено наукову новизну, розкрито теоретичне та практичне значення роботи, визначено особистий внесок автора, викладено обсяг та структуру дисертації.

В **огляді літератури** висвітлено питання, що стосуються значення мікробіоти товстої кишки у розвитку неінфекційних захворювань. Особливу увагу приділено біологічним властивостям *E.coli* як основного симбіонта з групи грамнегативних факультативних анаеробів.

**Матеріали і методи.** Досліджували мікробіоценоз товстої кишки хворих на

неспецифічний виразковий коліт, хворобу Крона і рак товстої кишки. Обстежено 141 особу, в тому числі 38 хворих на НВК (25 чоловіків і 13 жінок у віці від 28 до 64 років), 30 хворих ХК (16 чоловіків і 14 жінок у віці від 28 до 64 років) у стадії загострення, які страждали на дане захворювання протягом 3-7 років, і 38 осіб з вперше виявленим раком товстої кишки (28 чоловіків і 10 жінок у віці від 44 до 70 років), які перебували на лікуванні амбулаторно або стаціонарно в Львівській обласній клінічній лікарні (ЛОКЛ), які, згідно з даними анамнезу, вказували на порушення з боку кишечника протягом тривалого часу (від 2-х до 10 років). У онкологічних хворих була частково збережена прохідність кишечника, не було виявлено метастатичних вогнищ, стан оцінювався як операбельний. Контрольна група - 35 осіб (25 чоловіків і 10 жінок у віці від 30 до 50 років) – особи без порушень з боку травного тракту. У всіх пацієнтів проводили оцінку стану мікробіоценозу товстої кишки з визначенням ступеню дисбіотичних порушень.

Дослідження випорожнень хворих на предмет дисбіозу проводили згідно чинної нормативно-методичної документації. Біологічні властивості ешерихій досліджували класичним методом шляхом розведень фекалій в ізотонічному розчині натрію хлориду ( $10^{-2}$  –  $10^{-9}$ ) та посіву на диференційно-діагностичні середовища. Для виділення ентеробактерій застосовували диференційно-діагностичні середовища Плоскірева і Ендо виробництва Дослідного підприємства бактеріальних заквасок ТІММ УАНН. Ідентифікацію виділених штамів ентеробактерій проводили на основі їх біохімічної активності відповідно до інструктивних матеріалів. При виділенні бактерій з атиповими властивостями використовували СІП-I і СІП-II, ЕНТЕРО-тест 1 і 2. Вид мікроорганізму визначали на основі отриманих біохімічних властивостей згідно з визначником Берджі.

Для виділення бактероїдів використовували середовище Шедлера, культивування клостридій проводили на середовищі Кітта-Тароцці.

Чутливість до антибактеріальних препаратів визначали диско-дифузійним методом. Використовували рекомендований міжнародним стандартом набір індикаторних дисків виробництва HI Media, India до таких препаратів: амікацин, ампіцилін, гентаміцин, канаміцин, тетрациклін, норфлуксацин, офлуксацин, ципрофлоксацин, хлорамфенікол, цефтріаксон, цефотаксим, цефазолін, цефалотин. Результати дослідження інтерпретували у відповідності до наказу Міністерства охорони здоров'я України № 167 від 05.04.2007р. «Про затвердження методичних вказівок «Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів».

Адгезивні властивості бактерій вивчали з використанням нативних еритроцитів людини I (0) групи крові та еритроцитів барана (метод Бриліса, 1991), а також на клітинах букального епітелію за методом Goldmana D., Goetzl E. у модифікації Маянського А.Н., 1999.

Серологічну ідентифікацію ешерихій проводили за допомогою діагностичних ешерихіозних ОК полівалентних сироваток для реакції аглютинації, виготовлених АООТ «Біомед» ім. І. І. Мечникова. Дослідження проводили згідно з інструкцією. Використовували полівалентні сироватки ОКА, ОКВ, ОКС, ОКД, ОКЕ, а також діагностичні імуноглобуліни, які входять в полівалентну сироватку. Отримані результати підтверджували адсорбованими груповими О-сироватками.

Вивчення плазмідного спектру ешерихій проводили з використанням загальноновживаних методів (лужним методом). Наявність плазмід та їх молекулярну масу вивчали з використанням електрофорезу в 0,7-1,0% агарозних гелях. Молекулярну масу плазмідних ДНК визначали за калібровочною кривою, яка була складена з використанням параметрів маркерних плазмід.

Виділення ліпополісахариду проводили спрощеним методом (Варбанець Л. Д., 2006). Виділений ліпополісахарид перевіряли шляхом його пірогенної дії на морських свинках. Досліджуваний ЛПС розчиняли в стерильному ізотонічному розчині, витримували протягом 10 хвилин при 37° С, після чого вводили внутрішньочеревинно 3 піддослідним морським свинкам. Перед введенням свинкам двічі вимірювали температуру з інтервалом 30 хв. Сума підвищених значень температур у трьох свинок склала 2,4° (препарат пірогенний).

Для дослідження індукції синтезу цитокінів (Варбанець Л. Д., 2006) виділений ЛПС культивували з досліджуваними зразками крові в CO<sub>2</sub>-інкубаторі протягом 24 годин, після чого відбирали супернатанти і досліджували на наявність цитокінів методом ІФА за допомогою набору реагентів ProCon TNF $\alpha$  виробництва ООО «Протеїновий контур» Санкт-Петербург. Рівень ФНП- $\alpha$  визначали за допомогою спектрофотометра STAT FAX – 303 plus.

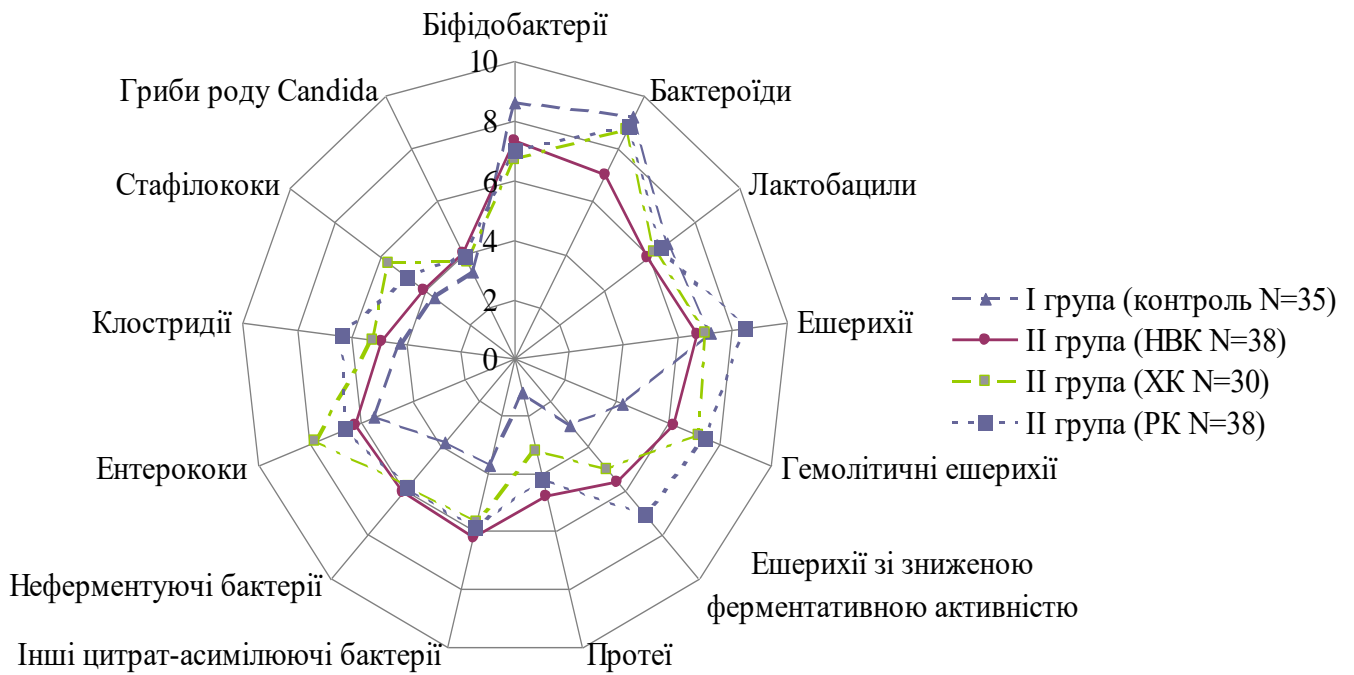
У дослідженні були передбачені заходи стосовно безпеки здоров'я пацієнта, дотримання його прав, людської гідності та морально-етичних норм у відповідності до принципів Гельсінської декларації прав людини, Конвенції Ради Європи про права людини і біомедицину та відповідних законів і наказів Міністерства охорони здоров'я України. Комісією з питань біоетики Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького (протокол №6 від 16.06.2014р.) встановлено, що порушень морально-етичних норм під час проведення досліджень не виявлено.

**Результати досліджень.** Результати власних досліджень викладено у третьому-шостому розділах.

За результатами мікробіологічних досліджень проаналізовано характер мікробіоценозу товстої кишки хворих на НВК, ХК та РК із врахуванням популяційних показників облигатних та факультативних мікробних симбіонтів досліджуваного біотопу. Патогенні мікроорганізми не були виявлені в жодного хворого.

При виразкових колітах – НВК та ХК кількісні показники основної мікробіоти відрізнялися незначно. Так, частота висівання біфідобактерій, лактобацил та бактероїдів була достатньо високою – на рівні 85-97% проти 100% в контролі (рис.1). Популяційний рівень біфідобактерій був нижчим і склав  $(7,3 \pm 0,4)$  lg КУО/г у хворих на НВК ( $p < 0,05$ ),  $(6,7 \pm 0,3)$  lg КУО/г у хворих на ХК ( $p < 0,001$ ). У хворих на НВК зафіксовано зниження частоти висівання ентерококів до  $(65,8 \pm 7,7)\%$ , чого не спостерігали в контролі та при ХК. Кількість їх в загальній мікробній популяції достовірно не змінилася і склала  $(6,2 \pm 1,1)$  lg КУО/г. Ешерихії виявляли у всіх обстежених осіб інтактною та дослідних груп, проте неоднорідність їх популяції була більш вираженою в хворих з патологічними процесами в товстій кишці.





**Рис. 1. Характеристика мікробіоценозу товстої кишки у хворих НВК, ХК та РК (lg КУО/г).**

Зафіксовано активацію ентеробактерій-опортуністів як при НВК, так і при ХК. Так, неферментуючі бактерії висівали у  $(7,9 \pm 4,4)\%$  хворих на НВК в кількості  $(6,1 \pm 1,2)$  lg КУО/г, протеї у  $(23,7 \pm 6,9)\%$  хворих в кількості  $(4,8 \pm 0,9)$  lg КУО/г ( $p < 0,01$ ), інші цитратасимілюючі бактерії висівали у  $(39,5 \pm 7,9)\%$  обстежених у кількості  $(6,2 \pm 1,4)$  lg КУО/г. У хворих на НВК частіше висівали клострідії  $(73,7 \pm 7,1)\%$  і в більших кількостях  $(4,9 \pm 0,7)$  lg КУО/г порівняно з контролем  $(4,2 \pm 0,7)$  lg КУО/г.

Активація дріжджоподібних грибів роду *Candida* була незначною. Збільшення кількості *Candida* виявлено у  $(28,9 \pm 7,4)\%$  хворих НВК в кількості  $(4,0 \pm 0,8)$  lg КУО/г.

У хворих на хворобу Крона неферментуючі бактерії виділено у  $(20,0 \pm 7,3)\%$  хворих в кількості  $(5,8 \pm 1,1)$  lg КУО/г. Деяко рідше висівали кандиди  $(13,3 \pm 6,2)\%$  в кількості  $(3,7 \pm 0,6)$  lg КУО/г. У цих хворих частіше висівали протеї (у  $(40,0 \pm 8,9)\%$   $p < 0,05$  в кількості  $(3,2 \pm 0,5)$  lg КУО/г) та інші цитратасимілюючі бактерії (у  $(30,0 \pm 8,4)\%$  в кількості  $(5,7 \pm 0,9)$  lg КУО/г). Зафіксовано також зростання популяційного рівня ентерококів до  $(7,8 \pm 0,6)$  lg КУО/г  $p < 0,05$ .

Зміни мікробіоценозу у хворих на НВК та ХК дозволили констатувати в таких хворих помірний дисбіоз – I компенсованої стадії (НВК) та I субкомпенсованої стадії (ХК).

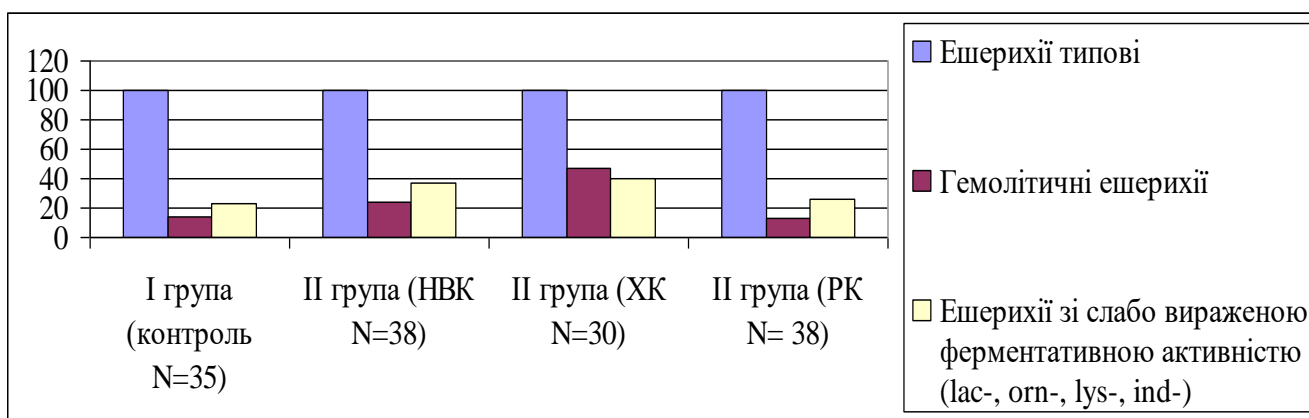
Таким чином, на фоні незначного зниження кількості облигатних бактерій у хворих із запальними захворюваннями кишки підвищувалась кількість і питома вага факультативної мікрофлори, що призводило до порушення колонізаційної резистентності кишки, сенсibiliзації організму до антигенів коменсальної мікрофлори, деякого спотворення дигестивної функції кишечника та процесів

всмоктування.

Аналіз мікроекологічних зсувів у товстій кишці серед пацієнтів на РК дозволив виділити їх в окрему групу, оскільки на тлі деякого зменшення популяційних рівнів біфідобактерій та лактобактерій до  $(7,0 \pm 0,4)$  lg КУО/г ( $p < 0,01$ ), та  $(6,5 \pm 0,4)$  lg КУО/г, зафіксовано зростання кількості типових ешерихій до  $(8,4 \pm 1,4)$  lg КУО/г.

У хворих на РК виявлено також зростання кількості стафілококів  $(4,8 \pm 1,0)$  lg КУО/г у  $(15,8 \pm 5,9)\%$ , клостридій  $(6,3 \pm 0,5)$  lg КУО/г у  $(73,7 \pm 7,1)\%$  хворих), дріжджоподібних грибів роду *Candida* у  $(13,2 \pm 5,5)\%$  в кількості  $(3,9 \pm 0,7)$  lg КУО/г.

Аналізуючи штами ешерихій, які виділяли від осіб дослідних груп, за їх біологічною активністю, слід вказати на значний відсоток виявлення слабоферментуючих форм у хворих на НВК з частотою виявлення  $(36,8 \pm 7,8)\%$  в кількості  $(5,6 \pm 0,2)$  lg КУО/г ( $p < 0,001$ ), та наявність гемолітичних форм  $(23,7 \pm 6,9)\%$  і  $(6,2 \pm 0,3)$  lg КУО/г відповідно  $p < 0,001$ ) (рис.2).



**Рис. 2. Частота висівання гемолітичних та ешерихій зі слабо вираженою ферментативною активністю у хворих на НВК, ХК ,РК та осіб контрольної груп (%).**

При середньому популяційному рівні ешерихій у пацієнтів з хворобою Крона  $(7,0 \pm 1,4)$  lg КУО/г, гемолітичні *E.coli* було виділено від  $(46,7 \pm 8,4)\%$  вказаної групи обстежених в кількості  $(7,2 \pm 0,4)$  lg КУО/г ( $p < 0,001$ ), ешерихії зі зниженими біохімічними властивостями виділено у  $(40,0 \pm 8,3)\%$  в кількості  $(5,0 \pm 0,4)$  lg КУО/г ( $p < 0,001$ ).

Серед ентеробактерій, виділених від осіб з пухлинами товстої кишки, ешерихії з гемолітичними властивостями висівали в  $(13,2 \pm 5,5)\%$  випадків і в кількості  $(7,4 \pm 0,4)$  lg КУО/г ( $p < 0,001$ ). Кількість ешерихій зі зниженою біохімічною активністю склала  $(7,1 \pm 0,3)$  lg КУО/г ( $p < 0,001$ ) при частоті висівання  $(26,3 \pm 7,1)\%$ .

При дослідженні чутливості *E.coli* до хіміотерапевтичних препаратів встановлено, що штами, ізольовані від хворих на НВК, виявили абсолютну чутливість до ципрофлоксацину, цефтріаксону. Ці штами мікроорганізмів виявились резистентними до тетрацикліну  $(89,3 \pm 6,0\%)$ , офлоксацину  $(71,4 \pm 5,0\%)$  та ампіциліну  $(67,9 \pm 9,0\%)$ . Серед вказаних ізолятів не виявлено штамів, резистентних до канаміцину, норфлоксацину, хлорамфеніколу.

Культури ешерихій, виділені від осіб, хворих на ХК, виявили абсолютну чутливість до ципрофлоксацину, а також до гентаміцину. (52,4±11,2)% штамів *E.coli*, ізольованих від цих пацієнтів, проявили стійкість до ампіциліну. Значно більше стійких штамів в цій групі мікроорганізмів до тетрацикліну (57,1±11,1%), дещо менше до офлоксацину (42,9±11,1%) та цефалотину (38,0±10,9%). Серед бактерій цієї групи відсутні штами резистентні до гентаміцину, ципрофлоксацину та норфлоксацину.

У цілому найкращу чутливість ізольовані від онкохворих ешерихії виявили до фторованих оксихінолонів: до офлоксацину чутливі (88,5±6,4)% штамів, (84,6±7,2)% до норфлоксацину та ципрофлоксацину. Найгіршу чутливість встановлено до ампіциліну (34,6±9,5%). Найбільшу кількість резистентних штамів виявлено саме до цього антибіотика (30,8±9,2%), а також до тетрацикліну (30,8±9,2%) та хлорамфеніколу (23,1±8,4%). До цефалоспоринів чутливість до антибіотиків характеризується по-різному. Так, до цефтріаксону і цефазоліну виділені ешерихії виявили однакову чутливість – зареєстровано (88,5±6,4)% штамів чутливими до вказаних антибіотиків. Найбільше резистентних штамів до цефалоспоринів виявлено до антибіотика цефалотин (23,1±8,4%), на другому місці – цефотаксим (15,4±7,2%).

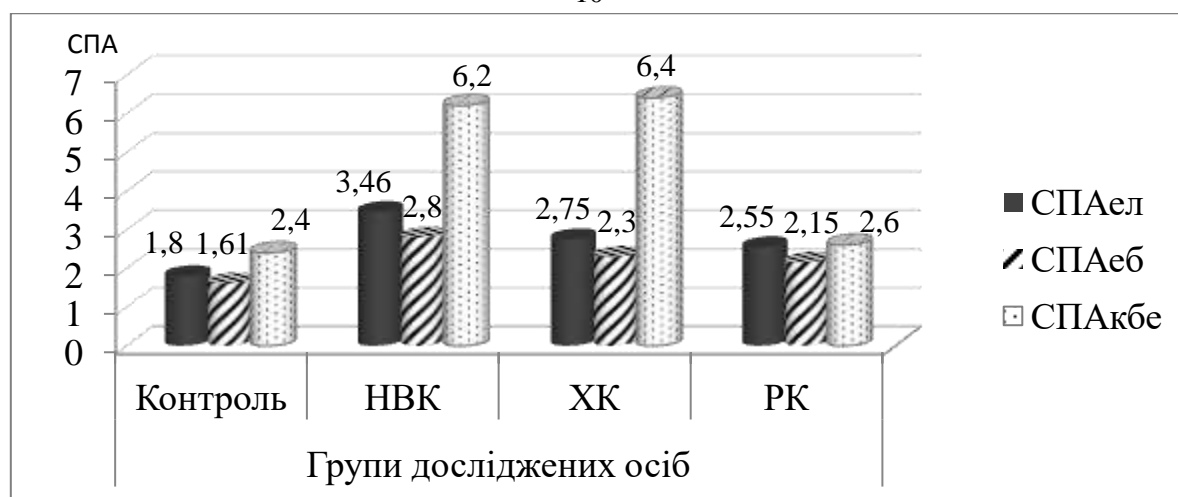
При вивченні адгезивних властивостей ешерихій на еритроцитах людини I (0) групи крові встановлено, що коефіцієнт участі еритроцитів був найнижчим в групі контролю – (71,8±1,3)%, а найвищим – у групі НВК (83,4±2,0)%. При оцінці середнього показника адгезії у ізолятів встановлено, що всі штами, виділені від хворих, мали середню адгезивність, а ізоляти контрольної групи – низьку. Показники ступеню інтенсивності прилипання (СПА) в групі НВК достовірно збільшені у порівнянні з контролем у 1,9 разів, в групі ХК – у 1,5 рази, у групі РК – у 1,4 рази (рис.3).

За СПА бактерій до еритроцитів барана в ізолятах кишкових паличок, виділених від осіб усіх дослідних груп, виявлено більш високі показники адгезії у порівнянні з контролем. Так, СПА в групі ХК перевищував відповідний показник у порівнянні з контролем у 1,4 рази, у групі НВК збільшення склало 1,8 рази, а для осіб РК збільшення становило 1,4 рази.

При оцінці індексу адгезивності встановлено, що ізоляти, виділені від хворих осіб на ХК та РК, були середньоадгезивними щодо еритроцитів людини (3,3 та 3,4 відповідно), а від осіб НВК – високоадгезивними (4,1). Ізоляти контрольної групи виявилися низькоадгезивними (2,5).

При порівняльному аналізі індексу адгезивності щодо еритроцитів людини та еритроцитів барана встановлено, що у групах ХК та НВК показники індексу адгезивності щодо еритроцитів барана були знижені. Показники контрольної групи і РК залишились незмінними.

При використанні клітин букального епітелію серед контрольних штамів ешерихій як на моделі клітин організму господаря, так і на інтактних епітеліоцитах, встановлено незначні рівні адгезії, що мало відрізнялися між собою. Близькими до показників контрольних зразків були коефіцієнти адгезивних властивостей ешерихій, ізольованих від онкохворих.



**Рис. 3. СПА *E.coli*, ізольованих від осіб, хворих на ХК, ВК та РК щодо еритроцитів людини, еритроцитів барана та клітин букального епітелію організму господаря.**

Для ешерихій, виділених від хворих на ХК, встановлено коефіцієнти адгезії на рівні  $(89,0 \pm 1,1)\%$  (автоштами) та  $85,9 \pm 1,1\%$  (інтактні) проти  $(77,8 \pm 1,6)\%$  і  $(65,8 \pm 1,5)\%$  відповідно у контролі, та значні рівні показників СПА автоштамів  $(6,4 \pm 0,5)$  та СПА інтактних  $(5,7 \pm 0,4)$ . Для ешерихій, виділених від хворих на НВК, навпаки, середні показники адгезії до клітин інтактного організму були дещо вищими, ніж на моделі власних клітин букального епітелію організму господаря, –  $(6,9 \pm 0,6)$  проти  $(6,2 \pm 0,5)$ .

При вивченні манозорезистентної адгезії, яка забезпечує довготривалу фіксацію бактерій за рахунок специфічного зв'язування рецепторів, встановлено, що блокування першого типу пілей при додаванні манози знизило коефіцієнт адгезії (КУКбемр) у контрольній групі до  $(51,0 \pm 0,2)\%$  та в групі онкохворих  $(72,7 \pm 0,3)\%$ . В групах ХК та НВК коефіцієнт участі клітин букального епітелію залишався високим і склав  $(86,9 \pm 0,4)\%$  та  $(84,0 \pm 0,3)\%$  відповідно.

При цьому штами ешерихій, ізольовані від хворих на ХК та НВК залишались високоадгезивними (індекс адгезивності перевищував 4), а штами контрольної групи та групи РК – середньоадгезивними (індекс адгезивності знаходився в межах 2,5 – 4).

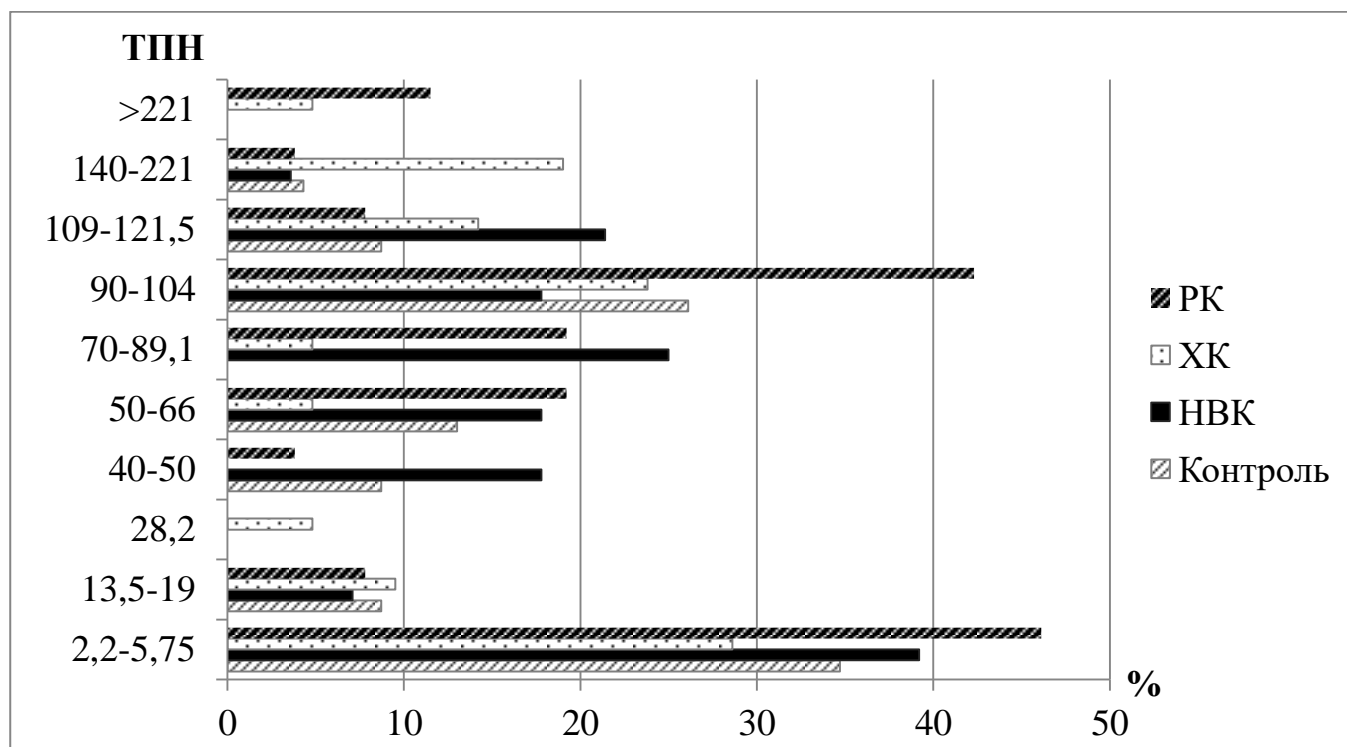
При аналізі СПА до клітин букального епітелію в присутності манози (СПАбемр) встановлено, що даний показник в групах ХК та НВК залишався високим і достовірно перевищував показники контрольної групи в 3,9 та 4,3 рази відповідно.

Таким чином, у всіх досліджуваних групах хворих показники адгезивності кишкових паличок до різних типів клітин збільшені у порівнянні з контролем, що свідчить про наявність адгезинів різних видів, які опосередковують прилипання ешерихій до клітин господаря. Підвищена манозорезистентна адгезивна активність ешерихій у хворих може відігравати суттєву роль у патогенезі захворювання.

Ентеропатогенні кишкові палички виділялись у всіх групах, в тому числі  $(32,1 \pm 9,0)\%$  у хворих на НВК,  $(33,3 \pm 10,5)\%$  виявлено у хворих на ХК,  $(38,5 \pm 9,7)\%$  у групі РК та  $(17,4 \pm 8,1)\%$  ЕПКП в осіб контрольної групи. Відомо, що ешерихії

серогрупи O25 та O126 відносяться до ентеротоксигенних, відсоток виявлення яких становив  $(8,7\pm 6,0)\%$  у групі контролю,  $(23,1\pm 8,4)\%$  – у РК,  $(19,1\pm 8,8)\%$  – у хворих на ХК,  $(24,9\pm 8,3)\%$  – при НВК. У групах ХК та РК виявлено інвазивні ешерихії серогрупи O143  $(9,5\pm 6,6)\%$  та  $(7,7\pm 5,3)\%$  відповідно. У групі онкохворих ізолювано ешерихії серогрупи O408  $(7,7\pm 5,3)\%$ , що рідко зустрічаються.

Серед ізолятів інтактних осіб плазмідмісткі штами склали 65,2%, у осіб, хворих на ХК – 71,4,0%, у хворих на неспецифічний виразковий коліт – 85,7%, а у онкохворих – 80,7%. Більшість досліджених штамів характеризувалась множинністю вмісту плазмід.



**Рис. 4. Розмірні класи плазмідних елементів (%).**

При аналізі плазмідних профілів ізолятів ешерихій встановлено, що серед контрольних штамів переважали ізоляти з дрібними плазмідами. Також відносно часто (26,1%) виявляли генетичні елементи розміром 90-104 т.п.н., що вірогідно визначали синтез мікроросинок. У осіб, хворих на ХК, превалювали великі плазміди розмірного класу 140-221 т.п.н. (19%). Такого розміру плазміди визначали інвазивні властивості у шигел та ентероінвазивних ешерихій. Від пацієнтів на НВК вдалося виділити найбільшу кількість штамів з плазмідами розмірного класу 70-89 (25,0%) т.п.н. Серед плазмід вказаного розміру зустрічали елементи, що детермінували адгезивні ознаки. В ізолятах ешерихій, виділених від пухлинних хворих частіше, ніж від хворих інших груп, зустрічали надвеликі плазмідні елементи розміром >221 т.п.н. (11,5%). Такі плазміди нерідко визначають метаболічні функції. Від хворих на рак товстої кишки дрібні плазміди зустрічали у 46,1% досліджуваних штамів. До плазмід, що виявилися характерними для ешерихій групи РК, віднесено також генетичні елементи розмірного класу 55-60 т.п.н.

При дослідженні впливу ешерихій на гуморальну ланку імунітету вдалося встановити, що ліпополісахарид, отриманий з культур ешерихій, ізольованих від хворих на НВК, ХК та РК стимулював імунні процеси, про що свідчило підвищення селезінкового індексу в 1,3 – 1,6 рази, причому ефект стимуляції був значно вищим при введенні мишам ЛПС, виділеного із штамів *E. coli*, ізольованих від хворих на ХК. При встановленні числа клітин-продуцентів антитіл (КПА) найвищий показник також зафіксований у групі ХК ( $36,5 \pm 1,0$ ). Дещо нижчим цей показник був у групі хворих на НВК ( $29,5 \pm 0,8$ ). У групах, які отримували ЛПС здорових осіб і хворих на РК, показники КПА виявилися нижчими ( $28,6 \pm 1,3$  і  $22,8 \pm 1,2$  відповідно).

При визначенні індукції синтезу цитокінів встановлено, що в групі хворих на НВК в порівнянні з контролем мало місце зростання усіх досліджених показників як при використанні ЛПС, отриманих з інтактних штамів (ЛПСі), так і при виділенні їх з автоштамів хворих (ЛПСа) (табл. 1).

Таблиця 1

**Індукція цитокінів ліпополісахаридами ешерихій-автоштамів та інтактних ізолятів**

Групи обстежених осіб	НВК		ХК		РК		Контроль	
	Індукція ліпополісахаридами ешерихій-автоштамів або інтактних ізолятів							
Рівень цитокінів пг/мл	Автоштами	Інтактні	Автоштами	Інтактні	Автоштами	Інтактні	Автоштами	Інтактні
ІЛ-8	$239,8 \pm 10,5$	$178,2 \pm 9,8$	$347,2 \pm 22,5$	$302,3 \pm 24,5$	$142,1 \pm 16,0$	$109,2 \pm 9,3$	$84,0 \pm 9,2$	$82,1 \pm 10,4$
ІЛ-10	$75,6 \pm 6,2$	$62,3 \pm 5,6$	$64,1 \pm 6,4^*$	$49,2 \pm 4,3$	$19,0 \pm 1,3$	$27,6 \pm 2,5$ $p > 0,05$	$28,6 \pm 3,1$	$31,0 \pm 2,9$
ФНП- $\alpha$	$438,5 \pm 38,5$	$402,3 \pm 22,1$	$463,7 \pm 30,2$	$408,9 \pm 22,2$	$250,7 \pm 30,2$	$168,5 \pm 18,2$	$254,9 \pm 25,0$	$263,2 \pm 19,8$

Індукція ІЛ-10 перевищувала відповідні показники контрольної групи у 2,6 рази для ЛПСа та у 2 рази для ЛПСі. В цілому у хворих на НВК рівні індукції ІЛ-10 вищі, ніж в групі ХК та РК ( $75,6 \pm 6,2$ ) проти ( $64,1 \pm 6,4$ ) та ( $19,0 \pm 1,3$ ).

Рівень ІЛ-8 у хворих на НВК перевищив показники цитокіну осіб контрольної групи у 2,9 рази. Меншою мірою спостерігалось зростання вказаного показника при індукції ІЛ-8 ЛПС інтактних штамів, але зміна даного показника теж була значною (2,2 рази). У групі хворих на НВК зростання рівня ФНП- $\alpha$  склало 1,7 рази для автоштамів і 1,5 рази для інтактних у порівнянні з групою контролю. В порівнянні з групою ХК зростання рівнів ФНП- $\alpha$  було незначним для цієї групи

хворих ( $438,5 \pm 38,5$ ) проти ( $463,7 \pm 30,2$ ) для автоштамів ( $p < 0,001$ ) та ( $402,3 \pm 22,1$ ) проти ( $408,9 \pm 22,2$ ) для інтактних ( $p < 0,001$ ).

Аналіз вказаних показників у групі хворих на ХК показав також їх зростання. Найбільш вираженим було зростання ФНП- $\alpha$ , яке склало 1,8 і 1,6 рази в порівнянні з контролем для ЛПС $\alpha$  і ЛПС $\beta$  відповідно. Рівень ІЛ-10 перевищив цей показник у порівнянні з контрольною групою у 2,2 рази для автоштамів і 1,6 рази для інтактних. Хоча в порівнянні з групою НВК цей показник був менш вираженим і склав ( $64,1 \pm 6,4$ ) проти ( $75,6 \pm 6,2$ ) для автоштамів та ( $49,2 \pm 4,3$ ) проти ( $62,3 \pm 5,6$ ) для інтактних. Зростання ІЛ-8 серед осіб цієї групи склало 4,1 і 3,7 рази відповідно в порівнянні з групою контролю.

У хворих на рак товстої кишки індукція ІЛ-8 також була активнішою, ніж у здорових осіб, проте значно меншою, ніж при виразковому коліті і хворобі Крона ( $142,1 \pm 16,0$ ) проти ( $239,8 \pm 10,5$ ) та ( $347,2 \pm 22,5$ ) відповідно). При використанні ЛПС $\alpha$  та ЛПС $\beta$  показники рівня ІЛ-8 у зросли у 1,7 та 1,3 рази в порівнянні з контролем. Показники індукції ФНП- $\alpha$  у порівнянні з контролем незначно відрізнялися, проте в онкохворих значно вищою була активність індукуючої дії ЛПС $\alpha$ , ніж ЛПС $\beta$ . ІЛ-10 виявлено у хворих на РК на рівні ( $19,0 \pm 1,3$ ) (індукція ЛПС $\alpha$ ) і ( $27,6 \pm 2,5$ ) (індукція ЛПС $\beta$ ), що є значно нижчим показником, ніж у контрольній групі і ще більшою мірою в порівнянні з показниками осіб дослідних груп НВК і ХК. Пригнічення індукції ІЛ-10 в онкохворих в порівнянні з хворими на ХК та НВК було особливо вираженим при застосуванні ЛПС $\alpha$ , показники відрізнялися більш, як у 3 рази ( $19,0 \pm 1,3$ ) проти ( $64,1 \pm 6,4$ ) та ( $75,6 \pm 6,2$ ) відповідно  $p < 0,001$ ).

Таким чином, характер імунної відповіді при дії ЛПС *E. coli*, ізольованих від хворих різних клінічних груп, відрізнявся. Кількісні відмінності у дії ЛПС виділених від здорових осіб, від осіб, хворих на НВК, хворобу Крона і від онкохворих на імунну відповідь можна пояснити генетичними особливостями структури епітеліальних клітин слизової оболонки кишки, що визначали природні специфічні механізми взаємодії між бактерійними симбіонтами і клітинами господаря. Найбільшу активність виявлено у ліпополісахаридів бактерій, виділених у осіб, хворих на ХК, для патогенезу якої доведено імунопатологічний компонент і що може, відповідно, зумовлювати певні особливості перебігу хвороби. Можна припустити, що бактерійні симбіонти є носіями індивідуальних властивостей організму-хазяїна, є компетентними клітинами. З іншого боку, вони набувають властивостей, які забезпечують їхню участь у патогенезі захворювання, що не залежить від походження виділених мікроорганізмів.

При проведенні дослідження впливу салюфальку на мікроорганізми встановлено наявність його протимікробної дії відносно стандартних культур стафілококу, дещо менше – відносно ешерихій, клебсієл та цитробактеру. Відносно клінічних штамів досліджених видів мікроорганізмів за альтернативною оцінкою (наявність факту мінімальної дії) результати зводилися до наступного: *Staphylococcus aureus* були 100% чутливими до салюфальку. Невелика кількість резистентних штамів була виявлена серед *Escherichia coli* ( $7,9 \pm 1,7$ )%, *Klebsiella pneumoniae* ( $6,9 \pm 2,1$ ) %, *Citrobacter koseri* ( $10,0 \pm 4,7$ ) %. Найбільшу кількість

резистентних штамів виявлено серед *Proteus vulgaris* (80,4±3,8) %, *Proteus mirabilis* (50±4,0) % та *Pseudomonas aeruginosa* (50,0±7,2) %. Таким чином, наявність вибіркової протимікробної дії може сприяти проліферації умовно-патогенної мікрофлори під час прийому препарату на тлі пригнічення ешерихій. Незважаючи на незначну його дію в кількісному відношенні, ефекти протимікробної дії можуть бути клінічно значимі та сприяти рецидивуванню захворювання. При виділенні мікроорганізмів-опортуністів необхідно, окрім салофальку, призначати протимікробну терапію з визначенням чутливості їх до хіміопрепаратів. Для елімінації стійких форм мікроорганізмів та відновлення еубіозу товстої кишки слід надавати перевагу засобам біологічного походження (бактеріофагам та препаратам, що містять мікроорганізми з вираженою антагоністичною активністю).

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі наведено теоретичне узагальнення та вирішення наукового завдання щодо дослідження мікроекологічного статусу і біологічних властивостей ешерихій, виділених від хворих з неінфекційними захворюваннями товстої кишки. Обґрунтовані нові підходи по вдосконаленню основних принципів мікробіологічного моніторингу хронічних неінфекційних захворювань товстої кишки, які включають бактеріологічні та імунологічні дослідження при неспецифічному виразковому коліті, хворобі Крона та раку товстої кишки і можуть бути використані як з діагностичною, так і з лікувальною та профілактичною метою.

1. При дослідженні мікробіоценозу товстої кишки хворих на НВК, ХК та РК виявлено загальну тенденцію до зниження кількісних показників основних мікробних нормосимбіонтів кишечника. В порівнянні з їх популяційними рівнями у здорових осіб, зміни були незначними і складала для показника біфідобактерій 12% (НВК), 22% (ХК) та 19% (РК). З боку популяційного рівня ешерихій – 7% (НВК) та 3% (ХК), що дозволило констатувати у таких хворих помірний дисбіоз – І компенсованої стадії (НВК) та І субкомпенсованої стадії (ХК). У хворих на рак товстої кишки кількісний рівень ешерихій є вищим за відповідний показник осіб контрольної групи на 16%. У жодного хворого з обстежених груп патогенних ентеробактерій не виявлено.

2. Дисбіотичні зміни в кишечнику хворих на виразкові коліти супроводжуються зростанням частоти висівання гемолітичних форм та кишкових паличок із зниженою біохімічною активністю до (23,7±6,9)% та (36,8±7,8)% у хворих на НВК, (46,7±8,4)% ( $p<0,01$ ) та (40,0±8,3)% у хворих на ХК, проти (14,3±5,9% та 22,9±7,1% у контролі. Найвищі кількісні показники гемолітичних ешерихій та кишкових паличок із зниженою біохімічною активністю встановлено для ізолятів від хворих на РК – 7,4±0,4 lg КУО/г ( $p<0,001$ ) та 7,1±0,3 lg КУО/г ( $p<0,001$ ) відповідно проти 4,2±0,4 lg КУО/г та 3,0±0,4 lg КУО/г у контролі.

3. Резистентність до антимікробних хімотерапевтичних препаратів характеризується множинністю детермінант стійкості і поєднанням серед ізолятів ешерихій від хворих на НВК стійкості до ампіциліну, тетрацикліну, офлоксацину, від хворих на ХК стійкості до ампіциліну, тетрацикліну, цефалотину, офлоксацину,



від хворих на РК – до ампіциліну, тетрацикліну, хлорамфеніколу та цефалотину.

4. Встановлено, що для всіх дослідних груп хворих на ХК, НВК та РК спостерігається зростання кількості адгезивних кишкових паличок до різних типів клітин у порівнянні з контролем. Адгезія до клітин букального епітелію автоштамів перевищувала показники інтактних клітин у всіх групах, окрім групи НВК, у якій середні показники адгезії до клітин інтактного організму були дещо вищими, ніж на моделі власних клітин букального епітелію організму господаря, -  $6,9 \pm 0,6$  проти  $6,2 \pm 0,5$ . Блокування першого типу пілей при додаванні манози знизило коефіцієнт адгезії (КУКбемр) у контрольній групі до  $51,0 \pm 0,2\%$  та в групі онкохворих ( $72,7 \pm 0,3\%$ ). В групах ХК та НВК коефіцієнт участі клітин букального епітелію залишався високим і склав  $86,9 \pm 0,4\%$  та  $84,0 \pm 0,3\%$  відповідно.

5. В результаті дослідження вдалося встановити, що від одного пацієнта висівається від 1 до 3 сероваріантів ешерихій. Ці дані вказують на виражену неоднорідність популяції ешерихій, що є результатом впливу різноманітних біотичних факторів при виразкових та пухлинних процесах, які забезпечують високий рівень модифікаційної та рекомбінантної мінливості мікробних симбіонтів. У хворих на ХК та РК виявлено інвазивні штами серогрупи O143 ( $9,5 \pm 6,56\%$  та  $7,7 \pm 5,33\%$  відповідно).

6. Встановлено, що серед ізолятів інтактних осіб плазмідмісткі штами склали  $65,2\%$ , у хворих на ХК –  $71,4\%$ , у хворих на неспецифічний виразковий коліт –  $85,7\%$ , а в онкохворих –  $80,7\%$ . Більшість досліджених штамів характеризувалась множинністю вмісту плазмід. В групі хворих на ХК та РК виділені плазміди великих розмірних класів (140—221 т.п.н. та  $>221$  т.п.н.), що визначають інвазивні та метаболічні функції ешерихій. Виявлено серед ешерихій всіх дослідних груп хворих дрібні плазміди, з якими пов'язують множинну лікарську стійкість.

Таким чином, за антигенним та плазмідним профілем ешерихій, виділених від осіб, хворих на ХК, мікробіота при ХК більшою мірою задіюється у процеси, пов'язані з колоканцерогенезом, ніж при НВК.

7. За результатами експериментального дослідження впливу ЛПС ешерихій різного походження на гуморальну ланку імунітету найвищі показники селезінкового індексу встановлені при використанні ЛПС ешерихій, виділених від хворих на ХК –  $1,5 \pm 0,1$ , кількість клітин-продуцентів антитіл – ( $36,5 \pm 1,0$ ), найнижчі – при використанні ЛПС, виділених від хворих на РК ( $(1,1 \pm 0,1)$  та  $(22,8 \pm 1,2)$  відповідно).

8. Показано стимулюючий вплив ЛПС ешерихій, виділених від хворих на ХК на індукцію ІЛ-8 та ФНП- $\alpha$ , які посилюють процеси, пов'язані із запальним пошкодженням тканини кишки. Про задіювання в розвиток патологічних процесів автоімунних реакцій свідчать більш високі рівні індукції вказаних цитокінів, а також ІЛ-10 ЛПС автоштамів у порівнянні з дією ендотоксинів інтактних ешерихій.

Про пригнічення механізмів протипухлинного захисту свідчать відносно низькі показники ІЛ-10 ( $19,0 \pm 1,3$  пг/мл), індукованого ЛПС ешерихій, виділених від хворих на РК та ФНП- $\alpha$  ( $250,7 \pm 30,2$  пг/мл).

Високий рівень індукції ІЛ-10 ЛПС ешерихій, ізольованих від хворих на НВК, свідчить про незначний рівень ризику розвитку РК на тлі НВК в порівнянні з ХК (відповідно до запальної теорії канцерогенезу).

9. Встановлено протимікробну дію салофальку щодо клінічних штамів факультативних симбіонтів кишечника : *S. aureus* (100%), дещо менше – щодо *E. coli* ((7,9±1,7)% резистентних штамів), *K. pneumoniae* ((6,9±2,1)% резистентних штамів), *Citrobacter koseri* ((10,0±4,7)% стійких штамів). Найбільшу кількість резистентних до салофальку штамів виявлено серед ізолятів *Proteus vulgaris* ((80,4±3,8)%), *Proteus mirabilis* ((50±4,0)%) та *Pseudomonas aeruginosa* ((50,0±7,2)%). Таким чином, доцільно при виділенні мікроорганізмів-опортуністів у хворих на запальні захворювання кишечника, окрім салофальку, призначати протимікробну хіміотерапію з наступною біокорекцією.

## ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. З метою попередження рецидивів та хронізації запальних захворювань товстої кишки, а також розвитку неопластичного процесу є доцільною розробка основних принципів мікробіологічного моніторингу хронічних неінфекційних захворювань товстої кишки.

2. Зміни цитокінового профілю рекомендовано використовувати як маркер при формуванні груп ризику щодо можливості хронізації запальних процесів кишки і розвитку проліферативних процесів, та для призначення лікування імуномодуючого характеру.

3. При виділенні мікроорганізмів-опортуністів у хворих, окрім салофальку, необхідно призначати протимікробну хіміотерапію та препарати біологічного походження.

## СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Плазмидные спектры и фаготипы штаммов *Escherichia coli*, выделенных от больных с опухолями толстого кишечника / Е. П. Корнейчук, В. В. Данилейченко, Ф. И. Товкач, М. З. Тымків // Мікробіологічний журнал . – 2004. – Т. 66, № 5. – С. 30-39. (Дисертантом проведено виділення та ідентифікацію мікроорганізмів, визначення їх антибіотикочутливості, статистичну обробку отриманих даних, підготовлено статтю до друку).

2. Характеристика мікрофлори, ізольованої з різних ділянок кишок осіб з пухлинами товстої кишки / О. П. Корнійчук, В. В. Данилейченко, М. З. Тимків [та ін.] // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. – 2007. – № 1. – С. 59-63. (Дисертантом проведено виділення мікроорганізмів, їх ідентифікацію, проведено аналіз та узагальнення одержаних результатів, підготовлено статтю до друку).

3. Фактор некрозу пухлин при хворобі Крона і раку товстої кишки / М. З. Тимків, О. П. Корнійчук, Ю. С. Лозинський [та ін.] // Львівський медичний часопис. – 2011. – Т.17, №4. – С. 36-39. (Дисертантом проведено виділення та ідентифікацію мікроорганізмів, інкубацію ліпополісахаридів з досліджуваною кров'ю, визначення рівня цитокінів, аналіз та узагальнення одержаних результатів, підготовлено статтю до друку).

4. Тимків М. З. Дослідження впливу ліпополісахаридів ешерихій, виділених

при захворюваннях товстої кишки, на імунну відповідь в експерименті / М. З. Тимків // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. – 2012. – №1. – С. 42-44. (Дисертантом проведено виділення та ідентифікацію мікроорганізмів, експериментальну частину роботи по імунізації мишей еритроцитами барана та ліпополісахаридами ешерихій різних груп, визначення селезінкового індексу та кількості клітин - продуцентів антитіл, аналіз та узагальнення одержаних результатів, підготовлено статтю до друку)

5. Фактор некроза опухолі при болезні Крона и раке толстой кишки / М. З. Тымків, Е. П. Корнейчук, Ю. С. Лозинский [и др.] // Колопроктологія. – 2012. – №3. – С. 31-33. (Дисертантом проведено виділення та ідентифікацію мікроорганізмів, інкубацію ліпополісахаридів з досліджуваною кров'ю, визначення рівня цитокінів, аналіз та узагальнення одержаних результатів, підготовлено статтю до друку).

6. Эшерихии как триггерный фактор в развитии неинфекционных заболеваний толстой кишки [Електронний ресурс] / Е. П. Корнейчук, В. В. Данилейченко, М. З. Тымків, Л. М. Бурова // Universum: Медицина и фармакологія: електрон. научн. журн. – 2015. – №5-6. (18). - Режим доступу : <http://7universum.com/ru/med/archive/item/2206> (Дисертантом проведено виділення мікроорганізмів, їх ідентифікацію, визначення чутливості до антибіотиків, серотипування, аналіз та узагальнення одержаних результатів, підготовку статті до публікації).

7. Роль бактеріального фактору та імунологічних змін при неінфекційних захворюваннях мікробного генезу / О. П. Корнійчук, М. З. Тимків, О. В. Мельник, З. Д. Воробець // Аналі Мечниківського інституту. – 2015. – №2. – С. 228-233. (Дисертантом проведено експериментальну частину роботи по вивченню індукції ліпополісахаридами ешерихій синтезу цитокінів, аналіз та узагальнення отриманих даних).

8. Протимікробна терапія у хворих на виразковий коліт та хворобу Крона : Інформ. лист №244 / О. П. Корнійчук, Ю. С. Лозинський, М. З. Тимків. – К., 2012. (Дисертантом проведено виділення та ідентифікацію мікроорганізмів, експериментальну частину роботи по вивченню впливу салофальку на мікроорганізми, аналіз та узагальнення одержаних результатів, підготовлено інформаційний лист до друку).

9. Tymkiv M. Antigenic composition Escherichia coli, selected from ill with tumours of a colon / М. Tymkiv // Microorganisms in pathogenesis and their resistance : International Weighl Conference. – Lviv, 2003. – P. 70. (Дисертантом проведено виділення та ідентифікацію мікроорганізмів, визначення адгезивних властивостей мікроорганізмів, статистично опрацьовано результати, підготовлено публікацію до друку).

10. Електронно-мікроскопічне дослідження ешерихій, виділених з нормальної та малігнізованої тканини товстої кишки / О. П. Корнійчук, М. З. Тимків, В. В. Данилейченко, В. І. Ковалишин // Установчий з'їзд Українського товариства клітинної біології: тези доп. – Львів, 2004. – С. 259. (Дисертантом проведено виділення та ідентифікацію мікроорганізмів, підготовку мікроорганізмів до

електронної мікроскопії).

11. Корнійчук О. П. Адгезивні властивості кишкових паличок, ізольованих від осіб з пухлинами товстої кишки / О. П. Корнійчук, М. З. Тимків, В. В. Данилейченко // Установчий з'їзд Українського товариства клітинної біології: тези доп. – Львів, 2004. – С. 266. *(Дисертантом проведено виділення мікроорганізмів, їх ідентифікацію, експериментальну частину роботи, пов'язану з визначенням адгезивних властивостей, статистично опрацьовано результати, підготовлено публікацію до друку).*

12. Оцінка резистентності ентеробактерій, виділених при запальних процесах з різних біотопів / О. П. Корнійчук, В. В. Данилейченко, Й. М. Федечко, [та ін.] // Сучасні проблеми епідеміології, мікробіології та гігієни : наук.-практ. конф. з міжнар. участю. – Львів. – 2008. – С.45-48. *(Дисертантом проведено виділення мікроорганізмів, їх ідентифікацію, визначення чутливості мікроорганізмів до антибіотиків, статистично опрацьовано результати).*

13. Корнійчук О. П. Протимікробна дія месалазину (салофальку) / О. П. Корнійчук, М. З. Тимків // XII з'їзд товариства мікробіологів України ім. С. М. Виноградського: тези доп. - Ужгород, 2009. – С. 210. *(Дисертантом проведено виділення та ідентифікацію мікроорганізмів, експериментальну частину роботи по вивченню впливу салофальку на мікроорганізми, аналіз та узагальнення одержаних результатів, підготовлено інформаційний лист до друку).*

14. Корнійчук О. П. Індукція імунної відповіді ЛПС ешерихій при неінфекційних захворюваннях товстої кишки / О. П. Корнійчук, М. З. Тимків / XIII з'їзд товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського: тези доп. – Ялта, 2013. – С. 266. *(Дисертантом проведено виділення та ідентифікацію мікроорганізмів, інкубацію ліпополісахаридів з досліджуваною кров'ю, визначення рівня цитокінів, аналіз та узагальнення одержаних результатів, підготовлено статтю до друку).*

15. Тимків М. З. Адгезивні властивості ешерихій, ізольованих від осіб з неінфекційними захворюваннями товстої кишки / М. З. Тимків, О. П. Корнійчук // Інфекційні хвороби: невирішені проблеми (діагностика, етіопатогенетичні особливості, лікування, профілактика) : наук.-практ. конф. – Київ, 2013. – С. 108. *(Дисертантом проведено виділення мікроорганізмів, їх ідентифікацію, експериментальну частину роботи, пов'язану з визначенням адгезивних властивостей, проведено аналіз та узагальнення одержаних результатів, підготовлено публікацію до друку).*

16. Профіль антибіотикорезистентності E. coli, виділених від пацієнтів хірургічного стаціонару / О. П. Корнійчук, М. З. Тимків, О. О. Немченко [та ін.] // Сучасні проблеми епідеміології, мікробіології, гігієни та туберкульозу : зб. наук. праць. – Львів, 2013. – Вип.10. – С. 54 – 57. *(Дисертантом проведено виділення мікроорганізмів, їх ідентифікацію, визначення чутливості мікроорганізмів до антибіотиків, статистично опрацьовано результати).*

17. Тимків М.З. Імунологічні зміни в організмі хворих НВК, ХК та РК під дією ліпополісахаридів ешерихій / М.З. Тимків, О.П. Корнійчук // Актуальні питання боротьби з інфекційними захворюваннями : наук.-практ. конф. – Харків,

2015. – С. 62. (Дисертантом проведено виділення та ідентифікацію мікроорганізмів, інкубацію ліпополісахаридів з досліджуваною кров'ю, визначення рівня цитокінів, аналіз та узагальнення одержаних результатів, підготовлено статтю до друку).

18. Тимків М. З. Біологічні властивості ешерихій, виділених від хворих неспецифічним виразковим колітом, хворобою Крона та раком товстої кишки / М. З. Тимків, О. П. Корнійчук, Л. М. Бурова // Актуальні питання боротьби з інфекційними захворюваннями : наук.-практ. конф. – Харків, 2015. – С. 59. (Дисертантом проведено виділення мікроорганізмів, їх ідентифікацію, визначення антибіотикочутливості, серотипування, аналіз та узагальнення одержаних результатів, підготовлено статтю до друку).

## АНОТАЦІЯ

**Тимків М. З. Біологічні властивості *E.coli*, виділених від хворих з неінфекційними захворюваннями товстої кишки – На правах рукопису.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 03.00.07 – мікробіологія. – Вінницький національний медичний університет імені М. І. Пирогова МОЗ України, Вінниця, 2016.

Дисертація присвячена мікробіологічному дослідженню мікробіоценозу кишечника, змін імунологічного статусу хворих неінфекційними захворюваннями товстої кишки. Встановлено помірний дисбіоз I компенсованої стадії у хворих на НВК та I субкомпенсованої стадії у хворих на ХК. Наведено результати досліджень біологічних властивостей ешерихій, ізольованих від хворих на НВК, ХК та РК, встановлено міжштамові відмінності ешерихій за адгезивними властивостями, антигенним спектром, плазмідним профілем та його фенотиповими проявами. Більшість досліджених штамів характеризувались множинністю вмісту плазмід. В групі хворих на ХК та РК виділені плазмідні великих розмірних класів (140–221 т.п.н. та >221 т.п.н.). Наведено результати досліджень чутливості ешерихій до протимікробних препаратів та вибіркової протимікробної дії салюфальку. Вивчено зміни цитокінового профілю під дією ліпополісахаридів ешерихій, ізольованих від хворих з неінфекційними захворюваннями товстої кишки. Показано різною мірою стимулюючий вплив ЛПС ешерихій, виділених від хворих на НВК, ХК та РК на індукцію ІЛ-8, ІЛ-10 та ФНП- $\alpha$ .

На підставі проведеного аналізу розроблено інформаційні матеріали з рекомендаціями щодо лікування хворих з хронічними запальними процесами товстої кишки. Доведено необхідність при виділенні мікроорганізмів-опортуністів у таких хворих, окрім салюфальку, призначати протимікробну хіміотерапію та препарати для біокорекції мікроекологічних порушень.

**Ключові слова:** дисбіоз, неспецифічний виразковий коліт, хвороба Крона, рак товстої кишки, *E.coli*, цитокіни.

## АННОТАЦИЯ

**Тымкив М. З. Биологические свойства *E.coli*, изолированных от больных с неинфекционными заболеваниями толстой кишки – На правах рукописи.**

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.00.07 – микробиология. – Винницкий национальный медицинский университет имени Н.И. Пирогова МЗ Украины, Винница, 2016.

Диссертация посвящена микробиологическому исследованию микробиоценоза кишечника, изменений иммунологического статуса больных неинфекционными заболеваниями толстой кишки. Установлен умеренный дисбиоз I компенсированной стадии у больных НЯК и I субкомпенсированной стадии у больных БК. Приведены результаты исследований биологических свойств эшерихий, изолированных от больных НЯК, БК и РК, установлены межштаммовые различия эшерихий по адгезивным свойствам, антигенному спектру, плазмидному профилю и его фенотипическим проявлениям. Большинство исследованных штаммов характеризовались множественностью содержания плазмид. В группе больных БК и РК выделены плазмиды больших размерных классов (140-221 т.п.н. и > 221 т.п.н.). Приведены результаты исследований чувствительности эшерихий к противомикробным препаратам и избирательности противомикробного действия салофалька. Изучены изменения цитокинового профиля под действием липополисахаридов эшерихий, изолированных от больных с неинфекционными заболеваниями толстой кишки. Показано разной степени стимулирующее влияние ЛПС эшерихий, выделенных от больных НЯК, БК и РК на индукцию ИЛ-8, ИЛ-10 и ФНО- $\alpha$ .

На основании проведенного анализа разработаны информационные материалы с рекомендациями по лечению больных с хроническими патологическими процессами в толстой кишке. Доказана необходимость при выделении микроорганизмов-оппортунистов у таких больных, кроме салофалька, назначать противомикробную химиотерапию с последующей биокоррекцией микробиологических нарушений.

**Ключевые слова:** дисбиоз, неспецифический язвенный колит, болезнь Крона, рак толстой кишки, *E.coli*, цитокины.

## ANNOTATION

**Tymkiv M. Z. Biological properties of *E.coli* isolated from patients with non-infectious diseases of the colon – Manuscript.**

Dissertation for a degree of candidate of medical sciences, speciality 03.00.07 – microbiology. – Vinnytsya National N.I. Pirogov Memorial Medical University Ministry of Health of Ukraine, Vinnytsya, 2016.

The thesis is devoted to the microbiological research of colon microbiocenosis, immunological status changes in patients with non-infectious diseases of the colon. Moderate dysbiosis of I compensated stage in patients with ulcerative colitis (UC) and I subcompensated stage in patients with Crohn's disease (CD) is established.

Hemolytic and *E.coli* with reduced biochemical activity the most often were sown

from patients with UC – (46,7±8,4)% ( $p<0,01$ ) and (40,0±8,3)% against (14,3±5,9)% and (22,9±7,1)% in the control. The highest quantitative indicators are set for the isolates from patients with colon cancer (CC).

Cultures of *Escherichia* isolated from patients with UC are carriers of resistance to tetracycline (89,3±6,0%), ofloxacin (71,4±5,0%) and ampicillin (67,9±9,0%). For persons with CD and CC similar resistance profile is set, but with a much smaller percentage of resistant strains. But among the cancer strains more resistant to chloramphenicol (23,1±8,4%) are found.

From patients with ulcerative colitis and CC *Escherichia* with adhesive properties are isolated, the indicators of which were higher than the control strains adhesion indicators. It was established that the attachment of "investigated" strains to the host cells was mediated by different types of adhesins, that were investigated while using models of various cells.

In the study of mannose resistant adhesion, it was found that blocking the first type pili when adding mannose reduced adhesion indicator in the control group to (51,0±0,2)% and in the group of cancer patients (72,7±0,3%).

EPEC was found in (32,1±9,0)% of patients with UC, 33,3±10,5% of patients with CD and 38,5±9,7% of patients with CC, that is higher than the control indicators (17,4±8,1) %. The percentage of enterotoxygenic *Escherichia* detection was (23,1±8,4)% – in cancer patients, (19,1±8,8)% - in patients with CD, (24,9±8,3)% – with UC, against 8,7±6,0% in the control group. In patients with CD and CC enteroinvasive *Escherichia* are found – (9,5±6,6)% and (7,7±5,3)% respectively.

Most of studied strains were characterized by plasmids content plurality. In the group of patients with CD and CC plasmids of large size classes (140-221 t.p.n. and > 221 t.p.n.) were isolated.

Lipopolysaccharide derived from cultures of *E.coli* isolated from patients with UC, CD and CC stimulated humoral immune response, as evidenced by the increase of splenic index and the number of cells producers of antibodies. The highest indicators of splenic index are established using LPS *E.coli* isolated from patients with CD (1,5±0,1), the number of antibody cells-producers (36,5±1,0), the lowest - when using LPS isolated from patients with CC (1,1±0,1 and 22,8±1,2 respectively).

The highest levels of induction of IL-8 and TNF- $\alpha$  are observed under the influence of LPS from patients with CD (347,2±22,5 pg/ml and 463,7±30,2 pg/ml). IL-10 the most active is produced under the action of LPS isolated from *Escherichia* in patients with UC - 75,6±6,2 pg/ml.

About attracting autoimmune reactions in the development of pathological processes indicate higher levels of induction of these interleukins and TNF- $\alpha$  LPS autostrains compared with the effect of intact *E.coli* endotoxins.

On the suppression of antitumor protection mechanisms show relatively low rates of IL-10 (19,0±1,3 pg/ml) induced by LPS *E.coli* isolated from patients with CC and TNF- $\alpha$  (250,7±30,2 pg/ml).

Thus, for antigenic and plasmid profiles of *E.coli* isolated from people with CD and activity of LPS induction of certain cytokines (IL-8, IL-10 and TNF- $\alpha$ ), microbiota at CD is mostly engaged in the processes connected with cancerogenesis of the colon than

at UC.

On the basis of the conducted analysis information materials with the recommendations for the treatment of patients with chronic inflammation processes of the colon are developed. The necessity in case of allocation of microorganisms-opportunists in these patients, except salofalk, to prescribe antimicrobial chemotherapy followed by microenvironmental interruptions correction is proved.

**Key words:** dysbiosis, ulcerative colitis, Crohn's disease, colon cancer, *E.coli*, cytokines.

### ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ЕПКП	–	ентеропатогенні кишкові палички
ІЛ	–	інтерлейкін
КПА	–	клітини-продуценти антитіл
КУО	–	колонієутворююча одиниця
ЛПС	–	ліпополісахарид
НВК	–	неспецифічний виразковий коліт
РК	–	рак товстої кишки
СПА	–	ступінь інтенсивності прилипання
ФНП	–	фактор некрозу пухлин
ХК	–	хвороба Крона







---

Підписано до друку 26.01.2016 р. Замовл. № 020.  
Формат 60x90 1/16 Ум. друк. арк. 0,8 Друк офсетний.  
Наклад 100 примірників.

---

Вінниця. Друкарня ВНМУ імені М.І. Пирогова, вул. Пирогова, 56.

