

НАО «Медицинский университет Караганды»

УДК 616-007.44-06:616.9-089

На правах рукописи

ОГИЗБАЕВА АЛИНА ВИТАЛИЕВНА

**Динамика маркеров бактериальной транслокации
кишечной микрофлоры, как предиктор инфекционно-воспалительных
осложнений в хирургии колоректального рака**

8D10100 – Медицина

Диссертация на соискание степени доктора философии (PhD)

Научный консультант:
доктор медицинских наук, профессор,
Тургунов Ермек Мейрамович

Зарубежный научный консультант:
доктор медицинских наук,
Азизов Илья Сулейманович
(Российская Федерация)

Республика Казахстан
Караганда, 2022

СОДЕРЖАНИЕ

Нормативные ссылки.....	4
Обозначения и сокращения.....	5
Введение.....	7
Основная часть.....	12
1 Обзор литературы.	12
1.1 Современное состояние проблемы колоректального рака	12
1.2 Феномен бактериальной транслокации из кишечника.....	15
1.3 Факторы, способствующие бактериальной транслокации из кишечника.....	16
1.3.1 Нарушения состава нормальной кишечной микрофлоры и избыточный бактериальный рост.....	17
1.3.2 Уменьшение выделения желчи.....	18
1.3.3 Нарушения иммунитета.	18
1.3.4 Циркуляторная гипоксия стенки кишечника и нарушение антиоксидантной защиты.....	19
1.3.5 Нарушение барьерной функции слизистой оболочки кишечника.....	20
1.4 Теорий возникновения бактериальной транслокации.....	22
1.5 Основные биомаркеры бактериальной транслокации.....	23
1.5.1 Прямые способы определения БТ.....	24
1.5.2 Косвенные методы определения БТ.....	26
2 Материалы и методы исследования.....	33
2.1 Дизайн исследования.....	33
2.2 Материал исследования.....	37
2.3 Методы исследования.....	40
2.3.1 Методика забора, транспортировки и хранения мезентериальных лимфатических узлов.....	40
2.3.2 Методика забора, транспортировки и хранения венозной крови.....	41
2.3.3 Детекция бактериальной транслокации.....	43
2.4 Статистические методы.....	49
3 Результаты детекции бактериальной транслокации в мезентериальных лимфатических узлах пациентов с колоректальным раком.....	52
3.1 Культура мезентериальных лимфатических узлов.....	52
3.2 Определение 16S rRNA в мезентериальных лимфатических узлах.....	54
3.2.1 Качественное определение наличия микроорганизмов в мезентериальных лимфатических узлах.....	54
3.2.2 Количественное определение наличия микроорганизмов в мезентериальных лимфатических узлах.....	55
4 Результаты детекции бактериальной транслокации в системном кровотоке у пациентов с колоректальным раком.....	62
4.1 Динамика уровня LPB в сыворотки крови до и на 3-и сутки после операции в исследуемых группах.....	62

4.2 Динамика уровня sCD14-ST в сыворотки крови до и на 3-и сутки после операции в исследуемых.....	68
4.3 Взаимосвязь между маркерами бактериальной транслокации в сыворотке крови и клинико-лабораторными показателями.....	76
4.4 Взаимосвязь между маркерами бактериальной транслокации в сыворотке крови и мезентериальных лимфатических узлах.....	78
5 Прогностическая значимость LBP и sCD14-ST в развитии инфекционно-воспалительных осложнений в хирургии колоректального рака.....	80
5.1 Результаты определения критических уровней LBP у пациентов с колоректальным раком.....	80
5.2 Результаты определения критических уровней sCD14-ST LBP у пациентов с колоректальным раком.....	82
5.3 Методика расчета риска развития неблагоприятных исходов оперативного вмешательства у пациентов с колоректальным раком.....	85
Заключение.....	89
Выводы.....	98
Практические рекомендации.....	100
Список использованных источников.....	101
Приложение А.....	117
Приложение Б.....	119
Приложение В.....	122
Приложение Г.....	126
Приложение Д.....	127
Приложение Е.....	129
Приложение Ж.....	131
Приложение И.....	133
Приложение К.....	135
Приложение Л.....	137
Приложение М.....	138

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

В настоящей диссертации использованы ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 7.32-2017. Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Отчет о научно-исследовательской работе. Структура и правила оформления.

ГОСТ 7.1-2003. Библиографическая запись. Библиографическое описание. Общие требования и правила составления.

Клинический протокол диагностики и лечения «Острая кишечная непроходимость», утвержденный протоколом заседания Экспертной комиссии по вопросам развития здравоохранения МЗ РК, протоколом № 60, от 29.03.2019 года.

Клинический протокол диагностики и лечения «Злокачественные новообразования ободочной кишки», утвержденный протоколом заседания Экспертной комиссии по вопросам развития здравоохранения МЗ РК, протоколом № 57, от 07.03.2019 года.

Клинический протокол диагностики и лечения «Злокачественные новообразования прямой кишки», утвержденный протоколом заседания Экспертной комиссии по вопросам развития здравоохранения МЗ РК, протоколом № 57, от 07.03.2019 года.

Решение Комитета по биоэтике НАО «Медицинского университета Караганды» (протокол № 6 от 23.12.2019 г. присвоенный номер №30).

Решение Локальной комиссии по биоэтике НАО «Медицинского университета Караганды» (протокол № 2 от 20.09.2022 г. присвоенный номер №2).

Приказ Министерства здравоохранения Республики Казахстан от 15 мая 2015 года №348 О внесении изменения в приказ Министерства здравоохранения Республики Казахстан от 12 ноября 2009 года №697 «Об утверждении Правил проведения медико-биологических экспериментов, доклинических (неклинических) и клинических исследований», а также с соблюдением принципов Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации (2013).

Приказ Министерства здравоохранения Республики Казахстан от 15 октября 2021 года № ҚР ДСМ-105, в редакции от 25.08.2022 № ҚР ДСМ-89 (вводится в действие с 23.11.2022). Об утверждении Санитарных правил "Санитарно-эпидемиологические требования к лабораториям, использующим потенциально опасные химические и биологические вещества".

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

- 16s rRNA (16s рРНК) – 16 subunit of ribosomal ribonucleic acid (субъединица 16 рибосомальной рибонуклеиновой кислоты)
- ARDS - Acute respiratory distress syndrome, острый респираторный дистресс синдром (ОРДС)
- CI (ДИ) – confidence interval (доверительный интервал)
- CLED - Cystine–lactose–electrolyte-deficient agar (бессолевой лактозный питательный агар с цистином)
- DAMPS - Danger-associated molecular patterns (молекулярный фрагмент, ассоциированный с повреждениями)
- E. coli – Esherichia coli (кишечная палочка)
- FiO₂ - fraction of inspired oxygen (фракция вдыхаемого кислорода, %)
- HRP - Horseradish peroxidase (пероксидаза хрена)
- I-FABP - intestinal fatty acidbinding protein (кишечный белок, связывающий жирные кислоты)
- IgA – Immunoglobulin A (иммуноглобулин А)
- IL (ИЛ) – Interleukin (интерлейкин)
- IFN- γ – Interferon gamma (интерферон гамма)
- L/M – lactulose/mannitol (соотношение лактулоза/манит)
- LBP–Lipopolysaccharide-binding protein (липополисахаридсвязывающий белок)
- LPS (ЛПС) – lipopolysaccharide (липополисахарид)
- M – mean (средняя величина, среднее значение)
- MODS - Multiple organ dysfunction syndrome (синдром полиорганной недостаточности)
- NaCl – натрия хлорид
- NO – nitrogen oxide (оксид азота)
- OR (ОШ) - odds ratio (отношение шансов)
- PAMPs - Pathogen-Associated Molecular Patterns (патоген-ассоциированные молекулярные структуры)
- mCD14 - membrane CD14
- pO₂ – парциальное давление кислорода в крови
- pH - pondus Hydrogenii (водородный показатель)
- PSEP – presepsin (пресепсин)
- Q25 – нижний квартиль
- Q75 – верхний квартиль
- RFU – relative fluorescence units (относительная единица флуоресценции)
- ROC - receiver operating characteristic (рабочая характеристика приёмника)
- sCD14-ST - soluble CD14 subtype (растворимый CD14, пресепсин)
- SIRS – systemic inflammatory response syndrome (синдром системной воспалительной реакции)
- SD – standard deviation (стандартное отклонение)
- SOFA - Sequential Organ Failure Assessment (шкала оценки полиорганной недостаточности)

ТМВ - tetramethylbenzidine (тетраметилбензидин)
Th - T-helper
TLR – TOLL-like receptor (TOLL-подобный рецептор)
TNF- α – Tumor necrosis factor alpha (фактор некроза опухоли альфа)
TNM - аббревиатура от tumor, nodus и metastasis (опухоль, лимфоузел, метастазы)
WSES - World Society of Emergency Surgery (Всемирное общество экстренной хирургии)
Zot - zonula occludens toxin
БТ – бактериальная транслокация
ВЭЖХ - высокоэффективная жидкостная хроматография
ДНК (DNA) – дезоксирибонуклеиновая кислота (deoxyribonucleic acid)
ЖКТ – желчно-кишечный тракт
ИФА – иммуноферментный анализ
КОЕ/мл – колониеобразующих единиц на миллилитр
КРР – колоректальный рак
мг/мл – миллиграмм на миллилитр
МЛУ – мезентеральные лимфоузлы
мм.рт.ст. – миллиметр ртутного столба
МНО – международное нормализованное отношение
НАО «МУК» - Некоммерческое Акционерное Общество «Медицинский Университет Караганды»
НИР - научно-исследовательская работа
нг/мл – нанограмм вещества в 1 мл плазмы или сыворотки крови
пг/мл – пикограмм вещества в 1 мл плазмы или сыворотки крови
ОКН – острая кишечная непроходимость
ОЦТиО – Областной центр травматологии и ортопедии
ПКТ (PCT) – прокальцитонин (procalcitonin)
ПТИ- протромбиновый индекс
ПЦР – полимеразная цепная реакция
СКС - синдрома кишечного стаза
СРБ – С-реактивный белок
УЗКО – Управление здравоохранения Карагандинской области
УЗИ – ультразвуковое исследование
ФГДС - фибронастродуоденоскопия
ЧД – частота дыханий
ЧСС – частота сердечных сокращений
ЦНС – центральная нервная система
ЭДТА К2 - 2-замещенная калиевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. Колоректальный рак (КРР) занимает третье место по распространенности среди всех диагностируемых злокачественных опухолей, занимая во всем мире 3 место по распространенности среди мужчин после рака легких и предстательной железы (10% от общего числа) и 2 место среди женщин после рака молочной железы (9,2% от общего числа) [1,2]. В Казахстане на 2020 год рак ободочной и прямой кишки в структуре онкозаболеваемости занимает 6-7 места [3]. Наиболее частым осложнением при КРР является острая кишечная непроходимость (ОКН), составляющая при этом около 80%-85% экстренных хирургических обращений по данной патологии [4-7]. Послеоперационная летальность при ОКН по разным источникам составляет от 5% до 32%, а в 23% случаев возникают осложнения [6,8,9].

Одним из грозных инфекционно-воспалительных осложнений является сепсис. Зачастую диагноз «сепсис» выставляется не всегда, так как нет конкретного очага инфекции, хотя есть признаки SIRS (systemic inflammatory response syndrome) и органные дисфункции. По данным разных авторов при ОКН, вызванной колоректальным раком, сепсис возникает от 1,7% до 10,5% случаев, а при доброкачественной ОКН от 3% до 10,29% [10-14].

Одним из главных компонентов развития сепсиса является бактериальная транслокация (БТ) кишечной микрофлоры [15]. На сегодняшний день есть несколько методов детекции БТ:

1. прямой - определение 16s rRNA (16 subunit of ribosomal ribonucleic acid) в мезентериальных (брыжеечных) лимфоузлах (МЛУ) или же культура МЛУ;
2. косвенные - выявление в сыворотке крови липополисахарид-связывающего белка (LPS-binding protein или LBP) и пресепсина (sCD14-ST).

Мезентериальные лимфатические узлы и сосуды, вероятно, являются наиболее важным путем распространения бактерий из кишечника в кровь и другие органы. В МЛУ происходит лимфодренаж из тонкой кишки, слепой кишки и проксимального отдела толстой кишки, и, поскольку МЛУ обычно стерильны, присутствие в них жизнеспособных бактерий является маркером повышенной проницаемости кишечного барьера и бактериальной транслокации [16,17].

LBP — это белок, синтезируемый гепатоцитами. Он играет важную роль в распознавании основного компонента наружной стенки бактерий — липополисахарида (ЛПС), сенсibiliзирует рецепторы макрофагов, моноцитов и нейтрофилов к ЛПС бактерий, тем самым активируя воспалительный сигнальный путь [18,19]. Ряд исследований показал, что LBP является надежным биомаркером микробной транслокации и развития сепсиса [20,21].

sCD14-ST является растворимым концевым фрагментом рецептора макрофагов CD14, обладает высоким сродством к ЛПС стенок грамотрицательных бактерий и пептидогликанам грамположительных бактерий

[22,23]. Пресепсин идентифицирован как биомаркер ранней фазы сепсиса и его уровень является прогностическим значимым фактором исходов у пациентов с сепсисом [24-26].

Анализ статей и обзоров в базах данных публикаций Pubmed, Scopus, Web of Science показал, что более 60% работ по БТ экспериментальные, а большая часть клинических исследований проведена у пациентов с ВИЧ-инфекцией и циррозом. Интерес к БТ растет из года в год, так же, как и к проблеме КРР и ОКН. Исследований по изучению LBP, sCD14-ST, как биомаркеров БТ у пациентов с КРР, корреляции маркеров транслокации в сыворотке крови с 16s rRNA в МЛУ и их роли в развитии SIRS и послеоперационных инфекционно-воспалительных осложнений, вызванных КРР, мы не встретили.

Научные гипотезы:

1. Особенности динамики уровня маркеров бактериальной транслокации кишечной микрофлоры являются предикторами развития SIRS, послеоперационных инфекционно-воспалительных осложнений, органических дисфункций и летального исхода у пациентов с колоректальным раком.

2. Уровень маркеров бактериальной транслокации кишечной микрофлоры зависит от распространенности и анатомо-морфологических характеристик опухоли кишечника, а также от наличия острой кишечной непроходимости у пациентов с колоректальным раком.

Цель исследования: определить значимость показателей LBP и sCD14-ST в качестве предикторов послеоперационных инфекционно-воспалительных осложнений у пациентов с колоректальным раком.

Задачи исследования:

1. Оценить эффективность микробиологического метода и модифицированного молекулярно-генетического метода детекции кишечной микрофлоры в брыжеечных лимфоузлах и определить корреляционную взаимосвязь между бактериальной транслокацией в мезентериальных лимфатических узлах и системном кровотоке у пациентов оперированных по поводу колоректального рака;

2. Сравнить уровень и динамику изменений биомаркеров бактериальной транслокации (LBP, sCD14-ST) в сыворотке крови в зависимости от клинико-морфологических характеристик колоректального рака;

3. Оценить уровни LBP и sCD14-ST у пациентов с колоректальным раком, в зависимости от наличия или отсутствия SIRS, послеоперационных инфекционно-воспалительных осложнений, органических дисфункций и летального исхода;

4. Определить пороговые значения LBP, sCD14-ST, как предикторов развития SIRS, послеоперационных инфекционно-воспалительных осложнений, органических дисфункций и летального исхода.

Научная новизна.

Разработана новая математическая модель количественного определения наличия микроорганизмов в мезентериальных лимфатических узлах с

использованием технологии real-time ПЦР (Свидетельства о внесении сведений в государственный реестр прав на объекты, охраняемые авторским правом №19250 от 8 июля 2021 года и № 22807 от 10 января 2022 года)

Впервые изучена динамика биомаркеров микробной транслокации (LBP и sCD14-ST) у пациентов, оперированных по поводу колоректального рака, и их значимость в развитии SIRS, послеоперационных инфекционно-воспалительных осложнений, органных дисфункций и летального исхода.

Впервые на основании установленных критических уровней LBP и sCD14-ST разработана и внедрена новая методика определения риска развития неблагоприятных исходов оперативного вмешательства у пациентов с колоректальным раком (Свидетельство о внесении сведений в государственный реестр прав на объекты, охраняемые авторским правом № 29343 от 11 октября 2022 года).

Практическая значимость результатов.

Разработанная методика молекулярно-генетической качественной и количественной детекции 16s rRNA в мезентериальных лимфатических узлах с использованием технологии real-time ПЦР позволяет определить микробную ДНК в широком диапазоне ее концентраций (КОЕ/мл от 10^2 до 10^8) и внедрена в научно-практическую деятельность ЛКП НИЦ НАО «МУК».

По установленным критическим значениям биомаркеров бактериальной транслокации разработана методика определения риска развития неблагоприятных исходов оперативного вмешательства у пациентов с колоректальным раком, которая внедрена в работу хирургических отделений 3-х стационаров г. Караганды.

Положения, выносимые на защиту.

1. В мезентериальных лимфатических узлах рост бактерий выявлен в 30,0%, спектр транслоцируемых микроорганизмов представлен родами *Escherichia* и *Klebsiella*. Молекулярно-генетическая детекция транслокации кишечной микрофлоры в МЛУ дала положительный результат только в 13,2%. Корреляционной взаимосвязи между наличием 16s rRNA в мезентериальных лимфатических узлах и маркерами бактериальной транслокации в сыворотке крови (LBP и sCD14-ST) не выявлено.

2. Уровень и динамика LBP и sCD14-ST значимо зависит от клинико-морфологических характеристик колоректального рака, в частности от степени инвазии опухоли в стенку кишечника и стадии опухолевого процесса, а также от наличия или отсутствия ОКН до операции.

3. У пациентов с колоректальным раком уровни LBP на 3-и сутки после операции при развитии неблагоприятных исходов значимо ниже, чем при нормальном послеоперационном течении: при наличии признаков SIRS в 1,3 раза ниже ($p=0,003$); с развившимися послеоперационными осложнениями в 1,2 раза ниже ($p=0,001$); при развитии органных дисфункций в 1,7 раз ниже ($p=0,0002$); у умерших пациентов в 1,3 раза ниже ($p=0,01$).

4. У пациентов с колоректальным раком уровни sCD14-ST на 3-и сутки после операции при развитии неблагоприятных исходов значимо выше, чем при

нормальном послеоперационном течении: у умерших пациентов в 2,4 раза выше ($p=0,009$), а при наличии органных дисфункций наблюдалось повышение уровня sCD14-ST в динамике на 30% от исходного, в то время как у пациентов без органных дисфункций он, наоборот, снизился на 18% ($p=0,014$).

5. Установленные критические значения LBP и sCD14-ST позволяют определить пациентов с риском развития неблагоприятного исхода хирургического лечения колоректального рака.

Внедрение в практику.

Методики качественного и количественного определения бактериальной ДНК в мезентериальных лимфатических узлах у пациентов с колоректальным раком, проведенные в рамках данного исследования, внедрены в список методик ЛКП НИЦ НАО «МУК» (приложение А).

Методика расчета риска развития неблагоприятных исходов оперативного вмешательства у пациентов с колоректальным раком внедрена в работу хирургических отделений «Областной клинической больницы», «Многопрофильной больницы №1 г. Караганды», «Многопрофильной больницы №3 г. Караганды» (приложение Б).

Личный вклад автора в исследование.

Автором разработаны СОПы по забору, транспортировке и хранению исследуемого материала, а также СОПы по методикам определения маркеров бактериальной транслокации в сыворотке крови и мезентериальных лимфатических узлах. Самостоятельно проведены сбор, обработка и анализ материала, систематизация и описание результатов исследования. Весь материал систематизирован, документирован и оформлен в виде диссертации лично автором.

Диссертант являлся ответственным исполнителем двух научно-исследовательских работ с финансированием по гранту МОН РК ИРН АР08956335 «Детекция биомаркеров бактериальной транслокации в ранней диагностике инфекционно-воспалительных осложнений у пациентов с кишечной непроходимостью опухолевого генеза» и ИРН АР09260597 «Прогностическая значимость маркеров бактериальной транслокации в качестве предикторов инфекционно-воспалительных осложнений при острой механической кишечной непроходимости».

Апробация работы.

Тема научно-исследовательской работы получила одобрение Комитета по биоэтике НАО «Медицинского университета Караганды» протокол № 6 от 23.12.2019 г. присвоенный номер №30, а также одобрение Локальной комиссии по биоэтике НАО «Медицинского университета Караганды» протокол № 2 от 20.09.2022 г. присвоенный номер №2 (приложение В).

Основные положения исследования доложены и обсуждены на: VIII Съезде онкологов и радиологов Казахстана с международным участием (Туркестан, Казахстан, 2021г.), VII Конгрессе хирургов Казахстана с международным участием «ХИРУРГИЯ: ВЧЕРА, СЕГОДНЯ, ЗАВТРА» посвященного 75-летию со дня основания национального научного центра

хирургии им. А.Н. Сызганова (Алматы, Казахстан, 2021 г.), 32nd European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases (Lisbon, Portugal, 2022), International Surgical Week ISW 2022 (Vienna, Austria, 2022), III Съезде хирургов Казахстана с международным участием «Актуальные вопросы хирургии и трансплантологии» (Алматы, Казахстан, 2022 г.), на расширенном заседании кафедры хирургических болезней (протокол №2 от 21.09.2022 г.).

Публикации.

По теме диссертации опубликовано 13 научных работ, из них: 3 публикации в научных изданиях Казахстана, рекомендованных Комитетом по контролю в сфере образования и науки; 2 публикации в международных научных изданиях, входящих в Q2 информационной базы данных Scopus (на момент публикации 54% и 58%); 5 тезисов в материалах международных и республиканских конференций; 3 свидетельства о внесении сведений в государственный реестр прав на объекты, охраняемые авторским правом.

Объем и структура диссертации.

Диссертация содержит 139 страниц машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, основной части (материалы и методы исследования, результаты исследования), заключения, 30 таблиц, 40 рисунков и списка использованных источников, включающего в себя 218 источников.

Данное исследование является фрагментом двух научно-исследовательских работ с финансированием по гранту МОН РК ИРН АР08956335 «Детекция биомаркеров бактериальной транслокации в ранней диагностике инфекционно-воспалительных осложнений у пациентов с кишечной непроходимостью опухолевого генеза» и ИРН АР09260597 «Прогностическая значимость маркеров бактериальной транслокации в качестве предикторов инфекционно-воспалительных осложнений при острой механической кишечной непроходимости».

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Современное состояние проблемы колоректального рака

Колоректальный рак (КРР) является третьим по распространенности злокачественным заболеванием [1,2]. По данным WSES (World Society of Emergency Surgery) ежегодно в мире регистрируется около 1,4 млн. новых случаев КРР, при этом число пациентов с запущенными формами (III-IV стадии) достигает 60%-70% [2, 27, 28]. В Казахстане в 2020 году рак ободочной и прямой кишки переместился с 5-6 на 6-7 места в структуре онкозаболеваемости [3]. КРР чаще подвержены люди старше 45 лет [29], при этом данный тип онкопатологии у мужчин в 1,2- 1,4 раза чаще диагностируют, чем у женщин [30].

В структуре причин смерти от рака КРР занимает 4 место в мире [1,31]. Продолжительность жизни пациентов с данной онкопатологией, а также результаты оперативного вмешательства напрямую зависят от распространенности онкопроцесса и вовлеченности в опухолевый процесс регионарных лимфоузлов. По мере распространения опухоли в толщу кишечной стенки увеличивается частота метастазирования в регионарные лимфоузлы и в отдаленные органы и ткани (чаще всего в печень) [32]. Так уровень 5-летней выживаемости при диагностировании на I стадии достигает 93,2%, на II стадии - 72,2%, на III стадии с вовлечением регионарных лимфатических узлов достигает 44,3%, и при наличии отдаленных метастазов (IV стадия) снижается до 8,1% [33].

Выделяют следующие формы опухолей толстого кишечника: аденокарцинома, слизистый (перстневидноклеточный) рак, солидный и скirroзный рак. Самой распространенной формой КРР является аденокарцинома (более чем в 80% всех случаев) [32,34]. Чаще опухоль поражает левые отделы кишечника: в 43% это прямая кишка, в 25% - сигмовидная, в 9% - поперечно-ободочная кишка, в 5% - нисходящие отделы ободочной кишки. В 18% случаев поражаются правые отделы толстой кишки [35].

В 2003 году Европейским союзом принято решение о необходимости проведения скрининговых мероприятий, направленных на раннюю диагностику КРР [36]. В рамках государственной программы «Саламатты Қазақстан» с 2011 года в Казахстане начат скрининг КРР. По результатам европейских исследований, при эффективном проведении скрининга и раннем выявлении КРР летальность снижается на 25%-30%. Следует отметить, что с начала внедрения колоректального скрининга в Казахстане, отмечается рост выявления пациентов с I-II стадиями КРР (56,1% в 2019 году и 50,4% в 2020 году) [3, 36, 37].

Несмотря на современные методы диагностики и лечения более 66% пациентов с КРР поступают экстренно в стационар, в связи с осложнениями, и в большинстве случаев они являются первыми симптомами заболевания [38-

40]. Около 30% urgentных хирургических обращений составляют пациенты с осложнениями КРР [41].

Осложнения КРР:

- obtурационная толстокишечная непроходимость;
- перфорация стенки кишечника (в области некроза опухоли или перфорация раздутой петли кишечника проксимальнее места обструкции опухолью);
- параканкротные гнойно-воспалительные осложнения (толстокишечные и параректальные свищи, абсцессы);
- кишечное кровотечение (более характерно для экзофитного роста опухоли);
- инвазия опухоли в соседние органы и ткани: забрюшинную клетчатку, мочевой пузырь, матку, тонкую кишку, и др. [29,42].

Самым частым осложнением КРР является острая кишечная непроходимость (ОКН), составляющая 80%-85% экстренных хирургических обращений по поводу данной онкопатологии [4-6,27]. Чаще ОКН характерна для опухолей левых отделов толстой кишки (до 70%), что в свою очередь связано с:

1. особенностями роста опухоли – эндофитный и циркулярный;
2. меньшим диаметром кишки данных отделов;
3. особенностями интрамурального лимфооттока;
4. высокой плотностью опухоли этих отделов [43].

Острая кишечная непроходимость (ОКН) на сегодняшний день остается одной из самых актуальных проблем urgentной хирургии. В структуре острой хирургической патологии брюшной полости ОКН составляет примерно 20% от общего количества больных [6]. Частота развития послеоперационных осложнений при данной патологии достигает 23%, а послеоперационная летальность по разным источникам составляет от 5% до 32% случаев [2,14,15, 44]. В большинстве случаев ОКН (около 60%) регистрируется тонкокишечная непроходимость, которая в 55%-75% вызвана спаечным процессом брюшной полости [45]. При этом 20%-30% пациентов требуется оперативное вмешательство для ее разрешения [46]. Толстокишечная непроходимость составляет около 35% всех случаев ОКН. В 60% толстокишечная непроходимость провоцируется раком толстого кишечника, в 30 % случаев дивертикулами, на оставшиеся 10% приходится карциноматоз, эндометриоз, воспалительные заболевания кишечника и др. [13,27].

Из-за медленного продвижения содержимого кишечника и развития синдрома кишечного стаза (СКС) повышается давление в просвете, что ведет к нарушению кровоснабжения в стенке и подлежащих слоях. Скопление каловых масс проксимальнее локализации опухоли усиливает процессы гниения и брожения, помимо жидкости в просвете кишечника, которая скапливается в результате нарушения всасывания веществ, начинает накапливаться и газ, вследствие чего петли кишечника еще больше расширяются и нарушение регионарного кровообращения кишечной стенки нарастает. Эти изменения

микроциркуляции приводят к ишемии стенки кишечника, гипоксии, активации перекисного окисления липидов, что в конечном итоге снижает барьерную функцию кишечной стенки.

У пациентов с толстокишечной непроходимостью Алекперов С.Ф. и соавт. [47,48], исследовали резецированные участки тонкой и ободочной кишок, и при гистологическом исследовании выявили воспалительные реакции во всех слоях кишечной стенки, а также значительное расширение лимфатических капилляров. При компенсированной ОКН наблюдались признаки дистрофии миоцитов с выраженной нейтрофильной инфильтрацией и изъязвлением стенки кишки в областях опухолевой обструкции, в участках выше уровня обтурации - нарушения микроциркуляции и интерстициальный отёк. Декомпенсированная ОКН характеризовалась участками деструкции стенки кишки не только в участках обтурации, но и в удаленных от опухоли местах, а нарушения микроциркуляции с интерстициальным отёком присутствовали и в тонком кишечнике. При этом при декомпенсированной ОКН отек кишечной стенки был менее выражен, что говорило о значительном нарушении проницаемости кишечного барьера. У пациентов с декомпенсированной и у некоторых пациентов субкомпенсированной ОКН наблюдалась бактериальная транслокация в брюшную полость, которую подтверждали бактериальными посевами выпота из брюшной полости.

Несмотря на повышение с годами эффективности диагностики и лечения КРР, на сегодняшний день остаются высокими показатели послеоперационных осложнений (46%-50% случаев) и летальности (до 25%-52% случаев). При urgentных операциях по поводу ОКН, вызванной раком толстого кишечника, как летальность, так и частота послеоперационных осложнений в 2-3 раза выше, чем при плановых операциях, а 5-летняя выживаемость после плановых операций в среднем на 20 % выше, чем после экстренных [38,41,49-51].

К послеоперационным осложнениям относят: нагноение раны, несостоятельность швов анастомоза, параколомические абсцессы и абсцессы брюшной полости, перитонит, эвентрация, парез кишечника, желудочно-кишечное кровотечение, пневмонии, тромбоэмболии легочной артерии и др. Многочисленные исследования выявили, что инфекционно-воспалительные осложнения являются одной из основных причин смерти пациентов с раком [52-54].

У всех пациентов после оперативного вмешательства запускается каскад иммунных реакций на «хирургическую травму» с выделением эндогенных провоспалительных медиаторов. Но у пациентов с ослабленным иммунитетом данные реакции могут перетечь в синдром системной воспалительной реакции (SIRS - Systemic Inflammatory Response Syndrome), который в последствие может вызвать полиорганную недостаточность и сепсис [55]. По данным разных авторов при ОКН, вызванной КРР, сепсис возникает от 1,7% до 10,5% случаев, а при доброкачественной ОКН от 3% до 10,29% [10-14].

В последнее время в патогенезе ОКН выделяют синдром энтеральной недостаточности, который является главной причиной эндогенной

интоксикации, приводящей к абдоминальному сепсису и полиорганной недостаточности. Эндогенная интоксикация присутствует при ОКН вне зависимости от давности заболевания и причины вызвавшей ОКН, при этом около 90% летальных исходов связано именно с эндогенной интоксикацией.

При ОКН выделяют такие основные изменения, как:

- нарушения водно-солевого баланса;
- циркуляторная гипоксия кишечной стенки;
- изменения состава кишечной микробиоты (кишечный дисбиоз) и избыточный бактериальный рост;
- нарушение антиоксидантной защиты;
- нарушение местного иммунитета;
- нарушение барьерной функции слизистой оболочки кишечника [56].

Все эти изменения приводят к возникновению «бактериальной транслокации», которая является главным компонентом развития инфекционно-воспалительных осложнений и сепсиса.

1.2 Феномен бактериальной транслокации из кишечника

Бактериальная транслокация — это проникновение кишечных бактерий через слизистую оболочку кишечника в обычно стерильные ткани и внутренние органы [57].

Кишечная микробиота играет важную роль в человеческом организме:

- участвует в развитии и дифференцировке кишечного эпителия;
- поддерживает целостность энтероцитов;
- производит некоторые ферменты, участвующие в пищеварении и выработке слизи;
- участвует в синтезе витаминов и усвоении минералов;
- поддерживает иммунологически сбалансированный воспалительный ответ и защищает кишечник от колонизации инвазивными патогенами [58,59].

Комменсальные бактерии, несмотря на их присутствие в кишечнике в чрезвычайно большом количестве, редко вызывают локальные или системные заболевания, т.к. одноклеточный эпителиальный слой слизистой оболочки кишечника предотвращает миграцию этих бактерий из кишечника. В течение многих лет исследователи задавались вопросом, как единственный слой кишечных эпителиальных клеток может предотвращать попадание микроорганизмов в системный кровоток [57]. Поэтому в конце XIX века ученые начали задумываться о теории сепсиса «кишечного генеза». Впервые возможная миграция микрофлоры из кишечника была описана Дюрвандингом в 1881 году, а сам термин «БТ» впервые введен в 1979 году R.D. Berg и A.W. Garlington. В одной из экспериментальных работ исследователи вводили обычным мышам и мышам-гнотобионтам через назогастральный зонд содержимое слепой кишки обычных мышей. Затем бактериологически исследовали мезентериальные лимфатические узлы (МЛУ), селезенку, печень и другие ткани обеих групп животных. При этом у обычных мышей бактерии не

высеялись ни в одном из биологических материалов, а у мышей-гнотобионтов в 65% МЛУ были выявлены жизнеспособные бактерии, из которых чаще всего встречалась *E. coli* (73%). Авторы сделали вывод, что нормальная кишечная микрофлора способствует защите от БТ. [60].

О'Boyle et al. в своей работе определили БТ путем бактериологического исследования МЛУ у 15 % исследованных (общее количество хирургических пациентов – 448), в 74% случаев выделялись именно кишечные бактерии. При этом у пациентов с выявленной БТ частота возникновения послеоперационного сепсиса была намного выше (45%), чем у пациентов с отрицательными культурами МЛУ (19%). Но, с другой стороны, у некоторых пациентов с БТ не было выявлено инфекционно-воспалительных осложнений, что позволило предположить, что БТ при нормальном функционировании иммунной системы может быть естественным состоянием [61].

О.В. Салато, Е.Г. Григорьев, Ю.М. Галеев в эксперименте с моделью странгуляционной кишечной непроходимости изучали БТ с применением бактерий *E.coli*, меченых технецием 99-м, при этом они выявили, что источником БТ является микробиота ущемленной петли, а также отдела выше уровня странгуляции. Бактериemia в порталный кровоток происходит в первые 6 часов после странгуляции, в последующем же происходит системная бактеремия, которая ассоциировалась с несостоятельностью печеночного барьера и появлением очагов радиоактивности в печени, почках, мочевом пузыре, мягких тканях [62-64].

Наиболее распространенные бактерии, участвующие в БТ, относятся к семейству Enterobacteriaceae (*Escherichia coli*, *Klebsiella spp* и др.), Enterococci и Streptococci spp. Тогда как виды анаэробных микроорганизмов редко встречаются при БТ [65].

Феномен бактериальной транслокации рассматривали как главный механизм возникновения эндотоксемии при различных патологиях: циррозе [66-68], ВИЧ-инфекции [69], панкреатите, [70], ожогах [71], трансплантации почек и почечных заболеваниях [72,73].

Таким образом, можно сказать, что интерес к проблеме бактериальной транслокации с каждым годом растет, увеличилось количество работ по выявлению бактериальной транслокации у людей, а также со временем определение БТ было дополнено и расширено в отношении кишечной проницаемости не только для самих бактерий, но и для антигенов или эндотоксинов из просвета кишечника в системный кровоток [74].

По определению А. Alexoroulou, бактериальная транслокация - это инвазия кишечных бактерий, бактериальных эндотоксинов (например, бактериального липополисахарида [LPS], пептидогликана, липопептида) из просвета кишечника в мезентериальные лимфатические узлы (МЛУ) и внекишечные участки [75].

1.3 Факторы, способствующие бактериальной транслокации из кишечника

На сегодняшний день есть несколько факторов, которые могут способствовать БТ из кишечника.

1.3.1 Нарушения состава нормальной кишечной микрофлоры и избыточный бактериальный рост

Микрофлора кишечника участвует в поддержании гомеостаза, играя важную роль в питании и энергетическом обмене [76], иммунной модуляции и защите [77,78]. В толстом кишечнике может содержаться до 10^{12} бактерий / мл.

Касательно нарушений со стороны нормальной микрофлоры кишечника можно выделить три аспекта, влияющих на БТ: разрушение микробного барьера, потеря колонизационной резистентности и нарушение обмена веществ [79,80].

Разрушение микробного барьера. Триллионы комменсальных микроорганизмов, обитающих в желудочно-кишечном тракте, могут конкурировать за участки адгезии с патогенными микроорганизмами, и составляют первую линию защиты от бактериальной транслокации [81]. По последним данным выяснилось, что у пациентов с различными заболеваниями (тяжелые травмы, ожоги, обширные оперативные вмешательства) изменен состав микрофлоры кишечника, он характеризуется снижением количества комменсалов и чрезмерным ростом оппортунистических протеобактерий, в том числе *Escherichia coli*, *Pseudomonas spp.*, *Klebsiella spp.*, *Clostridium difficile* и ванкомицин-резистентный энтерококк [82-87]. Дисбактериоз был связан с возникновением тяжелых осложнений при критических состояниях, включая сепсис, полиорганную недостаточность и даже смерть [88-90].

Нормальная кишечная флора играет решающую роль в противостоянии колонизации бактериальными патогенами, их чрезмерному росту и инвазии. Этот феномен назвали «колонизационная резистентность» [91]. Помимо конкуренции за питание и адгезию к эпителию, нормальная микробиота кишечника может косвенно бороться с проникновением патогенных микроорганизмов путем усиления иммунитета (иммуноопосредованная устойчивость к колонизации) [92,93]. На состав нормальной кишечной микробиоты влияют различные факторы: диета, желудочная и кишечная секреция, соли желчных кислот, лизоцим, секреторный IgA, антибактериальные препараты, эндотоксический шок, голодание, парентеральное питание, непроходимость кишечника и многое другое [94]. Все эти факторы могут приводить к дисбалансу микрофлоры и избыточному бактериальному росту, который в свою очередь способствует БТ, что было доказано на животных моделях [95,96] и на людях [11].

Микрофлора кишечника участвует в обмене липидов, углеводов, белков, при этом образуются метаболиты, которые могут быть полезными или токсичными для организма [97]. Молочная кислота, жирные кислоты бактериоцины, являются антимикробными факторами для патогенной флоры [98], а, например, образованные в результате метаболизма белков фенольные и серосодержащие соединения являются токсичными для эпителиальных клеток кишечника [99], вызывая увеличение параклеточной проницаемости путем

разрушения межклеточных плотных соединений [100]. При нарушении нормального состава микробиоты возможно увеличение продукции токсичных метаболитов, что приводит к нарушению кишечного эпителиального барьера и последующей БТ [101].

Van Praagh et al. [102] путем секвенирования 16s rRNA у пациентов после операций по поводу КРР, подтвердили, что несостоятельность анастомоза и возникшие воспалительные реакции были связаны с низким микробным разнообразием: уменьшением количества нормальной микрофлоры и чрезмерным ростом патогенных бактерий. Тем самым дисбактериоз кишечной микрофлоры может приводить к потере «колонизационной резистентности», нарушениям обмена веществ и нарушению барьерной функции кишечной стенки, что в результате увеличивает транслокацию патогенной флоры и эндотоксинов в мезентериальные лимфатические узлы и системный кровоток, вызывая SIRS [103].

1.3.2 Уменьшение выделения желчи

При механической желтухе уменьшение выделения желчи приводит к нарушению ретикулоэндотелиальной системы, нарушает активацию макрофагов, способствует избыточному бактериальному росту, а также приводит к архитектурным и функциональным изменениям слизистой оболочки кишечника. [104], тем самым увеличивая проницаемость кишечного барьера. В эксперименте доказали, что БТ чаще встречается у крыс, с лигированным желчным протоком, но БТ не наблюдалась у тех мышей, которым давали перорально желчь [105], или проводили билиарную декомпрессию [1062]. М.А. Kuzu et al. в исследовании на людях также предположили, что механическая желтуха может предрасполагать к БТ [107].

1.3.3 Нарушения иммунитета

Кишечник является важным органом иммунной системы, который содержит все типы белых кровяных клеток, участвующих как в врожденном, так и в адаптивном иммунном ответе. Врожденная иммунная система, как правило, не реагирует на большинство комменсальных микроорганизмов [108], в то же время она также может быстро реагировать на вторжение патогенов и предотвращать миграцию их из просвета кишечника в системный кровоток. Лимфоидная система кишечника является одной из крупнейших. Она состоит из Пейеровых бляшек, аппендикса, мезентериальных лимфатических узлов, собственной пластинки (*lamina propria*) и интраэпителиальных лимфоцитов [109]. Бокаловидные клетки, клетки Панета и энтероциты продуцируют вещества такие как муцин, лизоцим, секреторная фосфолипаза A2, кателицидины, дефензины. Они обладают антимикробной активностью и непосредственно нейтрализуют патогенные микробы в кишечнике [110]. Нормальная микрофлора кишечника и ее метаболиты (например, бутират) могут способствовать высвобождению муцина для поддержания слизистого барьера [111]. Микробиота кишечника играет важную роль в фенотипической дифференцировке некоторых лимфоцитов, также она модулирует выработку секреторного IgA [112], который ограничивает адгезию и инвазию патогенов в

эпителий кишечника. В эксперименте у мышей при дефиците кишечного муцина наблюдался избыточный бактериальный рост [113]. Снижение экспрессии α -дефензинов из-за уменьшения клеток Панета вызывает дисбиоз и избыточный бактериальный рост, приводившие к БТ [114]. Интраэпителиальные $\gamma\delta$ -Т-лимфоциты, являющиеся важной составной частью адаптивного иммунитета, секретируя цитокины и антимикробные молекулы, уменьшают БТ через слизистую кишечника [115]. В эксперименте у крыс с ожогами было доказано, что после уменьшения Т-клеток увеличилась БТ в МЛУ и системный кровоток [116]. Также у пациентов с сепсисом было обнаружено значительное снижение $\gamma\delta$ -Т-клеток в периферической крови, что было тесно связано с высокой смертностью, вызванной инфекционными осложнениями [117].

У иммунокомпетентных людей патогенные бактерии после прохождения слизистых и эпителиальных барьеров, в МЛУ распознаются и нейтрализуются макрофагами и дендритными клетками [118], при этом эти клетки не продуцируют провоспалительные цитокины и тем самым не индуцируют воспалительный ответ. Если же на этом этапе макрофагам не удастся обезвредить все патогены, то бактерии или их токсины попадают через систему портальной вены в печень, где нейтрализуются клетками Купфера. Поскольку тяжелобольных пациентов обычно сопровождают системный иммунодефицит или иммуносупрессия, врожденные и адаптивные иммунные механизмы не в состоянии уничтожить патогенные микроорганизмы, следовательно, нарушения иммунитета могут привести к повышенной БТ [119].

Иммунный ответ на бактерии и их метаболиты связан с повышением уровня провоспалительных цитокинов ($IL-6$ и -12 , фактор некроза опухоли $TNF-\alpha$, интерферон $IFN-\gamma$) и эффекторных молекул (NO) [120]. Они действуют на барьерную функцию кишечника, усугубляя нарушения целостности слизистой оболочки и иммунной системы, тем самым способствуя транслокации патогенных бактерий и бактериальных метаболитов и создавая механизм положительной обратной связи.

1.3.4 Циркуляторная гипоксия стенки кишечника и нарушение антиоксидантной защиты

В патогенезе ОКН, как говорилось выше, важную роль играет синдром энтеральной недостаточности, основной причиной развития которого является нарушение микроциркуляции, дальнейшая ишемия и гипоксия кишечной стенки, чередуемые с реперфузией. Это приводит к повреждению слизистой оболочки кишечника, и в первую очередь наиболее чувствительных к гипоксии ворсинок кишечника. Данные изменения активируют каскад иммунных реакций: активация системы комплемента, хемотаксису, миграции нейтрофилов, макрофагов, лимфоцитов в участки ишемии кишечника, что способствует усугублению нарушения микроциркуляции, нарастанию ишемии и гипоксии слизистой кишечника (1-й порочный цикл) [121].

Гипоперфузия, ишемия, последующая реперфузия приводит к окислительному стрессу, который способствует гибели энтероцитов,

нарушению межклеточных плотных соединений, увеличению проницаемости кишечной стенки. В результате повреждение слизистой оболочки кишечника, вредоносные биомолекулы DAMPS (Danger-associated molecular patterns) выделяются в брыжеечные лимфатические сосуды, затем переносятся в легкие и системный кровоток. Эти вещества распознаются клетками врожденного иммунитета (макрофагами, дендритными клетками), а также фибробластами, эпителиальными клетками, активируя синдром системного воспалительного ответа (SIRS) с последующей полиорганной дисфункцией, что в свою очередь снова усугубляет повреждения кишечного барьера кишечника (2-й порочный цикл) (рисунок 1) [122]. В результате данных порочных циклов все больше повреждается слизистая оболочка кишечника, приводя к усилению БТ, развитию септических осложнений и полиорганной недостаточности [123].

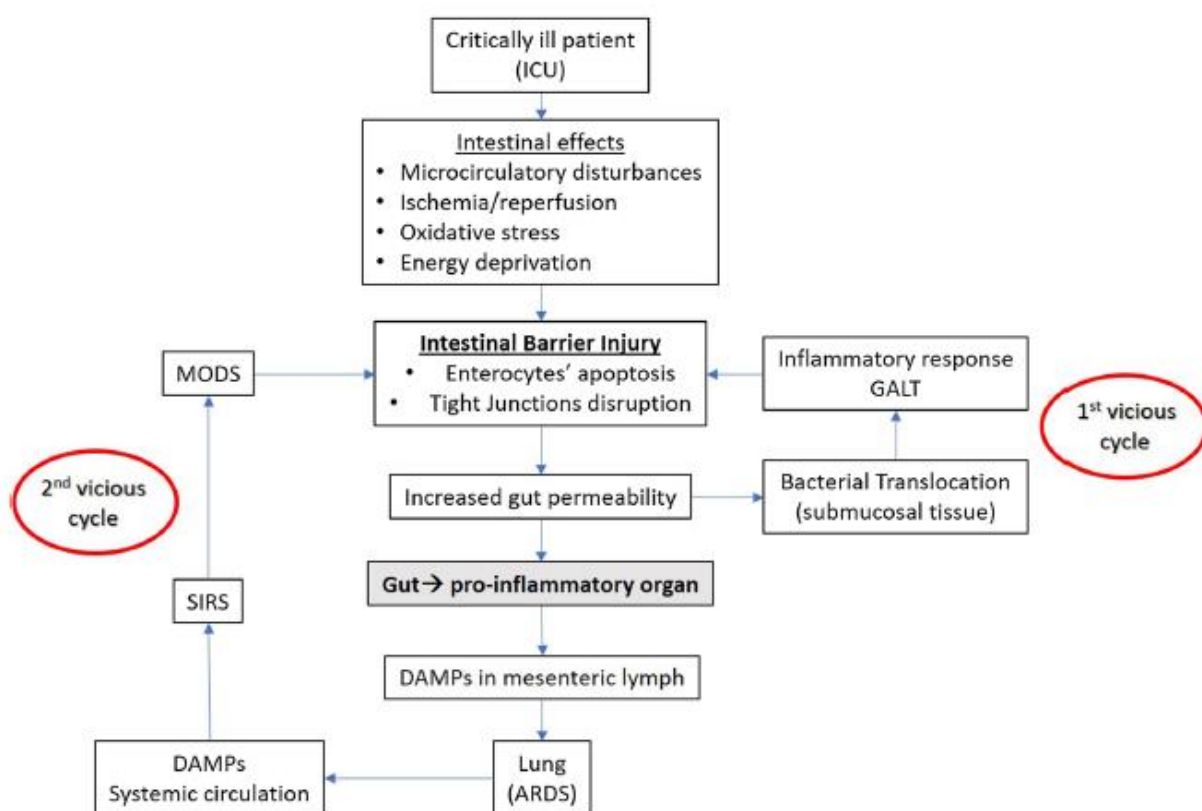


Рисунок 1 - Патологические аспекты «кишечного» сепсиса и полиорганной недостаточности (MODS) у пациентов в критическом состоянии [122]

1.3.5 Нарушение барьерной функции слизистой оболочки кишечника

Существуют четыре механизма, связанных с нарушением кишечного барьера: разрушение защитного слизистого слоя, снижение иммунитета слизистой оболочки, увеличение параклеточной проницаемости и нарушение целостности самих энтероцитов [124].

Первая линия защиты от бактериальной инвазии — это слизистая оболочка кишечника, она содержит муцин и антимикробные пептиды. Слизь,

продуцируемая бокаловидными эпителиальными клетками кишечника, образует толстый непрерывный слой, который препятствует проникновению бактерий через кишечную стенку. Слизистые выделения богаты секреторным IgA, который нейтрализует токсины и микроорганизмы и предотвращает их адгезию и колонизацию [125]. Также Toll-подобные рецепторы на поверхности энтероцитов реагируют на патогены и активируют иммунную защиту. В нормальных условиях, как только патогены проходят через слизистые и эпителиальные барьеры, они подвергаются фагоцитозу макрофагами [126].

Эпителий слизистой оболочки кишечника представляет собой однослойный цилиндрический эпителий, который постоянно обновляется, в его состав входят столбчатые эпителиоциты с каемкой из микроворсинок, бокаловидные клетки, эндокриноциты, клетки Панета, недифференцированные клетки в основании крипт. В местах соединения между эпителиальными клетками в апикальной части находятся плотные соединения, а под ними располагаются соединения адгезивов [127]. Плотные соединения состоят в основном из белков, таких как клаудины и окклюдины, они удерживают эпителиальные клетки вместе и ограничивают проход ионов, молекул и клеток через параклеточное пространство [128]. R. J. Anand et al. в своей работе показали, что увеличение выделения оксида азота во время воспалительного ответа изменяет экспрессию белков плотного соединения, что приводит к увеличению проницаемости кишечной стенки [129].

БТ происходит через трансклеточный и параклеточный пути, которые могут происходить по отдельности или в комбинации.

1) Трансклеточный путь находится под контролем энтероцитарных каналов и мембранных насосов. Он включает в себя транспортировку веществ с использованием первичного и вторичного активного транспорта через апикальную и базолатеральную мембраны эпителиальных клеток кишечника [130].

2) Параклеточный путь проходит через плотные эпителиальные соединения, которые открываются и закрываются в ответ на различные стимулы, такие как состав потребляемой пищи, гуморальные или нейрональные сигналы, медиаторы воспаления, а также различные микробные агенты и их метаболиты. БТ параклеточным путем происходит из-за разрушения плотных соединений и зависит от осмоляльности просвета кишечника и прямого повреждения цитоскелета энтероцитов, состоящих из актиновых филаментов и микротрубочек (рисунок 2) [57].

Нарушения микроциркуляции слизистой оболочки кишечника приводят к гипоперфузии, отеку слизистой, ее ишемии, увеличению свободных кислородных радикалов, разрушающих цитоскелет слизистой оболочки, что способствует нарушению целостности кишечного барьера и последующей БТ [103,131-134].

При опухолях толстого кишечника нарушение кишечного барьера возникает в месте роста самой опухоли, т.к. опухоль вызывает дисплазию эпителия, и выше обструкции опухолью за счет нарушений микроциркуляции

стенки кишечника, ее ишемии и гипоксии. M. Schietroma et al. [134] у пациентов с КРР после резекции толстого кишечника подтвердили повышенную проницаемость стенки кишечника и значительный рост эндотоксемии уже в 1-ый послеоперационный день, что в последующем коррелировало с развитием сепсиса. В ряде работ исследователи выявили, что БТ в мезентериальные лимфатические узлы происходит у 65% больных с КРР, с преобладанием у пациентов с III и IV стадиями рака [135]. Сегодня ряд ученых считают, что БТ является пусковым механизмом для возникновения и усиления SIRS, который может привести к септическим осложнениям и полиорганной дисфункции и летальному исходу [15,122,124].

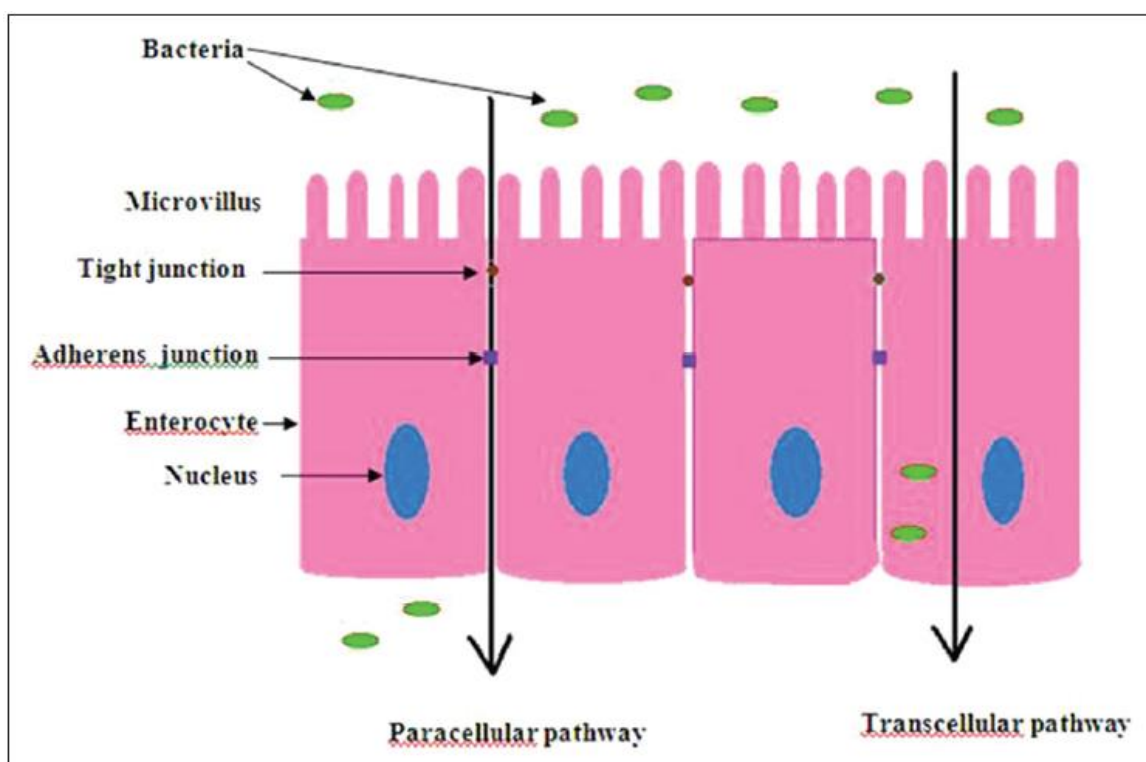


Рисунок 2 - Схематичное изображение прохождения бактерий через кишечный барьер трансклеточным (transcellular pathway) и параклеточным (paracellular pathway) путями. Bacteria – бактериальный агент, Microvillus – микроворсинки, Tight junction – плотные соединения, Adherens junction - соединение адгезивов, Enterocyte – энтероцит, Nucleus – ядро энтероцита [57]

1.4 Теории возникновения бактериальной транслокации

На сегодняшний день существует несколько теорий БТ и последующем возникновении SIRS и полиорганной недостаточности.

В 2007 году Clark и Coopersmith предложили новую парадигму, рассматривая трехстороннее сотрудничество между эпителием кишечника, иммунной системой и комменсальными бактериями. Все эти компоненты кишечника взаимодействуют между собой, и изменения одного из них влияют на остальные. При тяжелых заболеваниях происходят изменения всех трех

компонентов, и как защитные, так и патологические реакции в конце концов ведут к развитию SIRS и полиорганной недостаточности [124].

Теория «трех ударов». В 2002 году исследователь Deitch предложил модель «трех ударов», в которых первичное повреждение приводит к гипоперфузии кишечника (первый удар), в котором вырабатывается большое количество провоспалительных медиаторов. Последующая ишемия и реперфузия поврежденных участков кишечника усиливает воспалительный ответ и в большей степени способствует нарушению барьерной функции кишечника (второй удар). Бактерии или их эндотоксины проникают через поврежденный слизистый барьер, и еще больше усиливают иммунный ответ, который становится уже системным (третий удар), и в конечном счете приводит к SIRS и полиорганной недостаточности [136].

"Кишечно-лимфатическая" теория. У иммунокомпетентных людей иммунные клетки брыжеечных лимфатических узлов захватывают большинство транслоцирующихся бактерий и инактивируют их, но у тяжелобольных пациентов присутствует иммуносупрессия или иммунодефицит, поэтому выжившие бактерии или их компоненты (липополисахариды и пептидогликаны), а также цитокины и хемокины, вредоносные биомолекулы DAMPS, вырабатываемые кишечником, проходят через брыжеечные лимфатические узлы, и в конечном итоге через грудной проток попадают в системный кровоток. Легочная сосудистая сеть является первой, которая подвергается воздействию вышеперечисленных продуктов из МЛУ, вследствие чего могут активироваться альвеолярные макрофаги, индуцирующие воспалительный ответ в легочной ткани с развитием острого повреждения легких [137,138]. В эксперименте на крысах, свиньях и приматах было показано, что при травматическом и геморрагическом шоке повреждение легких может быть устранено путем перевязки лимфатического протока и блокирования попадания лимфы из МЛУ в системный кровоток [139]. Кроме того, в эксперименте инъекция лимфы из МЛУ от животных в критическом состоянии у здоровых мышей или крыс вызывали сепсис, острый респираторный дистресс синдром и полиорганную недостаточность [137,139]. Но при инъекции крови из портальной вены животных с шоком у здоровых животных данных реакций не наблюдалось, что ставит под сомнение теорию распространения БТ через систему портальной вены [140]. "Кишечно-лимфатическая" теория дала новый взгляд на патофизиологические аспекты SIRS, сепсиса и полиорганной недостаточности «кишечного» происхождения, данная теория ставит во главе нарушение кишечного барьера, последующую БТ, как первый шаг, который в конечном итоге приводит к тому, что кишечник становится основным провоспалительным органом, управляющим системным воспалительным ответом (рисунок 3) [122].

1.5 Основные биомаркеры бактериальной транслокации

Бактериальная транслокация может быть определена как прямыми, так и косвенными методами.

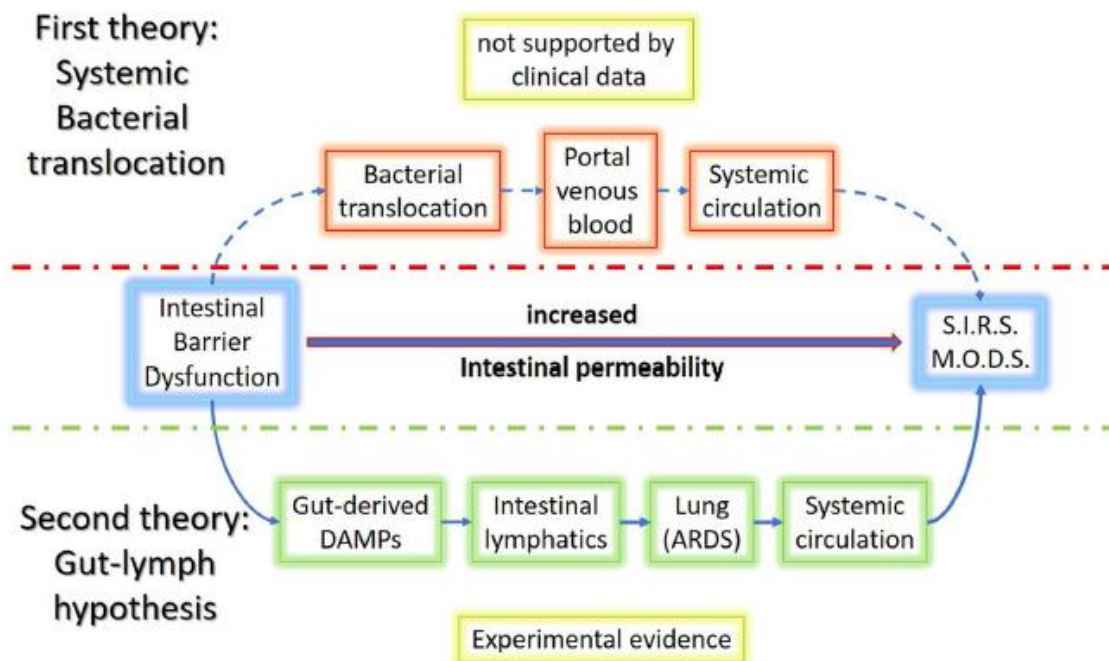


Рисунок 3 - Эволюция патогенетических теорий БТ, приводящей к сепсису и полиорганной недостаточности. Исходная теория связана с БТ через систему воротной вены в печень и затем системное кровообращение (не подтверждена клиническими данными). Современные патогенетические аспекты основаны на поддержке кишечно-лимфатической теории [122]

1.5.1 Прямые способы определения БТ

а) Микробиологическое исследование МЛУ

Наиболее надежный и достоверный метод - по микробиологическое исследование брыжеечных лимфатических узлов, так как в норме бактерии, прошедшие через кишечный барьер, должны инактивироваться макрофагами МЛУ, то есть должны быть стерильны. Для культивирования МЛУ лимфатический узел из брыжейки кишки иссекается при лапаротомии и гомогенизируется в стерильном физиологическом растворе. Затем гомогенат инокулируют, например, в колумбийский кровяной агар или агар цистин лактоза электролит дефицитный (CLED) для выделения аэробных культур, для анаэробных культур используют такие среды, как кровяной агар Уилкинса-Чалгрена с неомицином или колумбийский кровяной агар, и инкубируют при 37°C в течение 3-7 дней. Микроорганизмы из полученных культур идентифицируют стандартными микробиологическими тестами [61]. Но данная методика может проводиться только у пациентов, которым проводится оперативное вмешательство (лапаротомия), количество отобранных лимфоузлов ограничено, и эти лимфоузлы могут быть стерильны, тогда как в других брыжеечных лимфоузлах может происходить БТ. Также сама методика является трудоемкой и длительной, и не все микроорганизмы, которые транслоцируются в МЛУ, могут быть культивированы. [141]. В своем исследовании MacFie et al. проводили бактериологическое исследование МЛУ у 927 пациентов, перенесших лапаротомию, и продемонстрировали, что БТ

была выявлена у 14% пациентов [17]. O'Boyle с соавторами также проводил бактериологическое исследование МЛУ у 448 хирургических пациентов, и у 15,4% была идентифицирована БТ, при чем 77% культивированные микроорганизмы были типичными для местной кишечной флоры [61]. Данные исследования показали, что чаще всего транслоцируются бактерии семейства Enterobacteriaceae (в большей степени *E. coli*, в меньшей *Klebsiella* и *Shigella*), другие микроорганизмы встречались намного реже, и даже в единичных случаях (*Staphylococcus aureus*, Coagulase negative staphylococci, *Clostridium perfringens*, *Bacteroides fragilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Lactobacillus*).

б) Использование радиоактивно меченых бактерий

Diniz et al. оценивали транслокацию *E. coli*, меченного технецием 99-м, в МЛУ, печень, селезенку, легкое и сыворотку крыс, подвергавшихся брыжеечной ишемии в течение 45 минут путем окклюзии верхней брыжеечной артерии с последующей реперфузией [142]. Все органы крыс имели высокие уровни радиоактивности и позитивных культур, что указывает на то, что кишечная ишемия и реперфузия приводила к бактериальной транслокации. Также О.В. Салато, Е.Г. Григорьев, Ю.М. Галеев с помощью *E. coli*, меченной технецием 99-м, в экспериментах у крыс со странгуляционной кишечной непроходимостью определили очаги радиоактивности в печени, почках, мочевом пузыре, мягких тканях [62-64]. Но данная методика, с точки зрения этических норм, применима только в эксперименте.

в) Определение микробной 16s rRNA в МЛУ с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме «реального времени»

Ген 16s rRNA содержит гипервариабельные участки, уникальные для каждого микроорганизма, и «строгие» участки, общие для всех микроорганизмов. Поэтому существуют универсальные праймеры, которые связываются с известными общими генными последовательностями большинства бактерий. С помощью этих праймеров можно обнаружить большинство патогенных бактерий, и затем идентифицировать их путем последующего клонирования и секвенирования [143]. Schoeffel U. et al. в исследовании БТ у пациентов с аденокарциномой слепой кишки определили транслокацию бактерий обнаружением 16s rRNA в 30% лимфатических узлов (в 6 из 20 лимфоузлов 10 пациентов). Также они сравнили два метода детекции БТ (культуру МЛУ и определение 16s rRNA в МЛУ), данное исследование показало, что в брыжеечные лимфоузлы могут транслоцироваться одновременно несколько микроорганизмов, у одного пациента при отрицательной культуре МЛУ, были положительные ПЦР результаты. Это подтверждает, что не все микроорганизмы поддаются культивированию [144].

Сегодня определение 16s rRNA микробных сообществ человека было сосредоточено на изучении таких биоматериалов, как фекалии, оральные и вагинальные мазки, которые содержат относительно большое количество бактерий и небольшое количество человеческих клеток [145]. Важно отметить, что мезентериальные лимфатические узлы содержат меньшее количество бактерий, чем вышеперечисленные образцы. В работе Villette R. et al.

предложили протокол секвенирования гена 16s rRNA, оптимизированный для образцов с низкой концентрацией бактерий (low biomass biospecimens). Данные исследователи пришли к выводу, что анализ состава микробиоты образцов с низкой концентрацией бактерий является надежным для образцов, содержащих не менее 10^6 микроорганизмов [146].

На ПЦР диагностику тратится значительно меньшее количество времени, но данная методика не всегда доступна в повседневной практике клинициста, и как говорилось выше, МЛУ можно исследовать только у пациентов, которым будет проведена лапаротомия.

1.5.2 Косвенные методы определения БТ

1) Бактериологическое исследование крови (гемокультура).

Косвенным доказательством БТ является обнаружение кишечных бактерий в культурах крови. Во флаконы ВАСТЕС добавляют 10 мл исследуемой крови для культивирования аэробной и анаэробной флоры и инкубируют при 37°C в течение 5 дней. Все культуры крови с положительными результатами в дальнейшем инокулируют в колумбийский кровяной агар, шоколадный кровяной агар или среду CLED. Далее выделенные микроорганизмы идентифицируются стандартными бактериологическими тестами. Данный метод остается «золотым стандартом» диагностики системного распространения бактерий (сепсиса), но данная методика трудоемка и занимает достаточно длительное время (до 5 дней), и может дать ложноотрицательный результат (низкая чувствительность, некультивируемые бактерии, неправильный забор, хранение и транспортировка образца, малый объем образца крови, низкая обсемененность микроорганизмами) или ложноположительные результаты (контаминация) [147].

2) Обнаружение микробной ДНК в биологических жидкостях (кровь, асцитическая жидкость) с помощью ПЦР имеет более высокую чувствительность, чем бактериологические посеvy. Such et al. в исследовании обнаружили бактериальную ДНК в асцитической жидкости и сыворотке крови более чем у одной трети пациентов с циррозом печени и асцитом, при этом бактериологические посеvy были отрицательные [148]. Kane и соавторы обследовали хирургических пациентов в критическом состоянии (с множественными травмами, после обширных хирургических вмешательств и трансплантации органов) на предмет БТ и определяли в крови микробную ДНК, используя праймеры для амплификации генов *E. coli*, *Bacteroides fragilis* и 16S rRNA, универсальной для большинства грамположительных и грамотрицательных бактерий. У 64% пациентов в крови была обнаружена бактериальная ДНК, и только у 14% пациентов были положительные результаты бактериологических посеvов крови [149]. Время, необходимое для получения результата колеблется от 6 до 12 часов. Однако ПЦР-методы для обнаружения возбудителей в крови имеют некоторые ограничения, такие как отсутствие универсальности этих методов и возможность идентификации лишь ограниченного числа микробных видов. Также возможно ингибирование

реакции ПЦР факторами, присутствующими в цельной крови и небольшим количеством микроорганизмов в объеме пробы [147].

3) Зонулин в сыворотке крови. Зонулин является предшественником гаптоглобина-2. Гаптоглобины представляют собой белки реакции острой фазы, которые образуют комплекс с гемоглобином для предотвращения окислительного повреждения самого гемоглобина и окружающих тканей. Исследования в ходе разработки вакцины против холерного вибриона привели к открытию zonula occludens toxin (Zot) - энтеротоксина, который способен обратимо открывать внутриклеточные плотные соединения, путем полимеризации актина через протеинкиназу C. Zot и зонулин являются аналогами, поэтому последний начали использовать в качестве удобного метода для оценки проницаемости кишечника при различных клинических состояниях [150]. У людей сывороточный зонулин коррелировал с соотношением лактулоза / маннит в моче [151]. Но Ajamian с соавторами в 2019 году опубликовала работу, где определяли является ли сывороточный зонулин, измеренный с помощью современных коммерческих анализов, достоверным маркером дисфункции и целостности слизистого барьера кишечника. Авторы пришли к выводу, что пока методология анализа не будет улучшена, научное и медицинское сообщество должны проявлять осторожность при рассмотрении сывороточного зонулина как маркера дисфункции и повышенной проницаемости кишечного барьера [152].

4) Кишечный белок, связывающий жирные кислоты (intestinal fatty acidbinding protein, I-FABP). I-FABP — это цитозольный белок с молекулярной массой 14 кДа, специфичный для зрелых энтероцитов тонкой кишки. I-FABP играет роль во внутриклеточном транспорте жирных кислот во время абсорбции липидов [153]. Обычно I-FABP присутствует в цитоплазме энтероцитов и не обнаруживается в плазме или моче, то есть обнаружение его в плазме или моче указывает на разрушение мембраны энтероцитов. Повышение I-FABP в плазме более 100 пг/мл свидетельствует об острой мезентериальной ишемии и некрозе энтероцитов, при этом чувствительность составила 79,0%, а специфичность 91.3% [154-156]. Существуют доказательства того, что I-FABP очень чувствителен, так как его можно обнаружить на ранней стадии ишемии тонкой кишки, даже когда гистологические повреждения незначительны (рисунок 4) [157,158]. Несколько образцов для определения I-FABP в плазме можно исследовать одновременно с помощью ИФА, но процедура не автоматизирована и также занимает несколько часов.

5) Липополисахарид (ЛПС, LPS, эндотоксин) является основным компонентом наружной клеточной стенки грамотрицательных бактерий и является одним из первых биомаркеров БТ [158]. LPS имеет короткий период полураспада (2-3 часа) и зависит от многих факторов, включая концентрацию переносчиков LPS, липопротеинов высокой плотности, уровни TNF-α и другие иммуногенные и микробиологические параметры [159,160]. Это все не позволяет рассматривать LPS как надежный суррогатный маркер БТ.

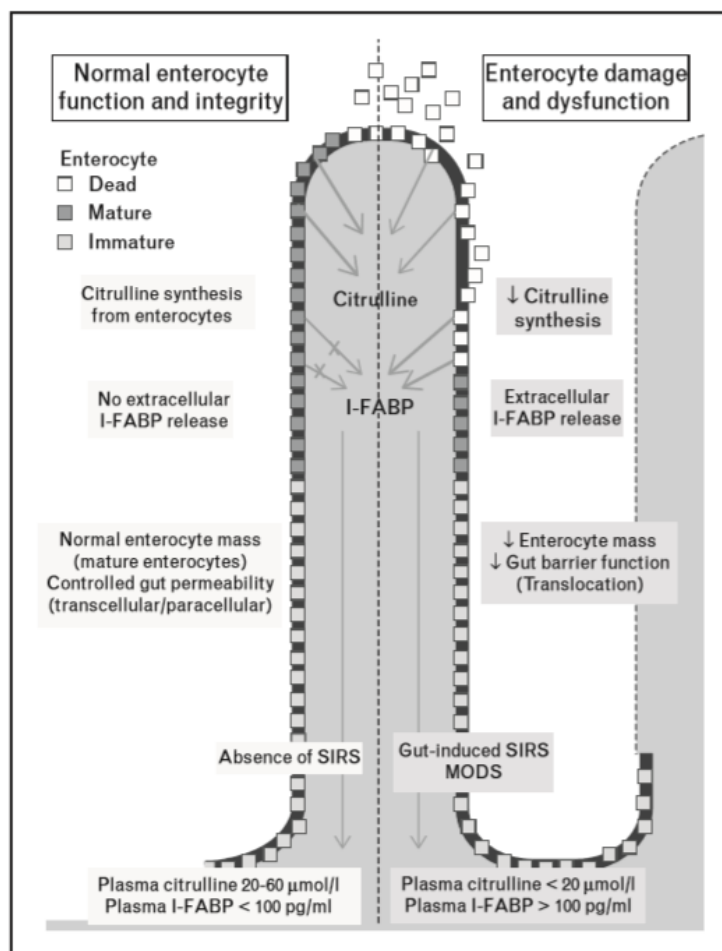


Рисунок 4 - Схематическое сравнение нормальной функции и целостности энтероцитов с повреждением и дисфункцией энтероцитов. В норме зрелые энтероциты выделяют цитруллин в портальную вену, тогда как I-FABP не выделяется в кровоток. Когда зрелые энтероциты повреждаются, происходит снижение выделения цитрулина, и I-FABP высвобождается в кровоток [158]

б) С-реактивный белок (СРБ) – первый описанный белок острой фазы, он является неспецифическим, чувствительным системным маркером воспаления, инфекции и повреждения ткани. Его период полураспада составляет около 19 часов. Основная роль СРБ заключается в регуляции острого воспаления путем активации системы комплемента и усиления адаптивного иммунного ответа [161]. СРБ продуцируется гепатоцитами [162], и поэтому его продукция может снижаться при прогрессирующей хронической печеночной недостаточности. Silvestre et al. [163], которые изучали пациентов с сепсисом и молниеносной печеночной недостаточностью, обнаружили, что СРБ значительно снизился, предполагая, что этот маркер не следует использовать в случаях тяжелой дисфункции печени. Sermoni и соавторы [164] обнаружили, что уровни СРБ были выше у пациентов с синдромом системного воспалительного ответа, инфекцией и алкогольным гепатитом. Ряд исследователей показал эффективность использования СРБ для ранней диагностики инфекционных осложнений у хирургических пациентов [165,166].

Определение СРБ является сравнительно дешевым методом, но неспецифичным для подтверждения БТ.

7) Прокальцитонин (ПКТ, РСТ) - является предшественником гормона кальцитонина, который вырабатывается в небольших количествах в нейроэндокринных клетках щитовидной железы, легких и желудочно-кишечного тракта [167], но в ответ на воспаление, бактериальную/грибковую инфекцию, сопровождающуюся повышением LPS и провоспалительных медиаторов TNF- α , интерлейкин-2 (IL-2) и IL-6, РСТ начинает продуцироваться во всех тканях организма [168]. Период его полураспада составляет 24-30 часов. У здоровых людей уровень РСТ в крови очень низок, обычно ниже 0,1 нг/мл. При вирусных инфекциях и воспалительных реакциях, концентрации РСТ увеличивается до 1,5 нг/мл, но при тяжелых бактериальных инфекциях и сепсисе может увеличиваться более чем в 100 раз [169]. Концентрация РСТ может увеличиваться после оперативных вмешательств, в основном после операций на кишечнике и сердце. Максимальные послеоперационные концентрации РСТ в плазме наблюдались в основном в первый день после операции и были выше у пациентов, у которых развились послеоперационные инфекционные осложнения [170]. Со времени первого доклада в 1993 году о роли РСТ в качестве маркера сепсиса, было проведено более 10 мета-анализов, на основании которых РСТ и СРБ были единственными маркерами, которые получили наибольшую степень рекомендации в качестве биомаркеров сепсиса. Также динамику изменений РСТ можно использовать для мониторинга антибиотикотерапии у пациентов с сепсисом [171]. Определение РСТ является относительно не затратным методом, но он не специфичен для БТ и чаще используется для дифференциального диагноза «стерильного» воспаления от инфекционного.

8) Липополисахарид-связывающий белок (lipopolysaccharide-binding protein, LBP) представляет собой белок острой фазы с молекулярной массой 60 кДа, вырабатываемый гепатоцитами в ответ на бактериемию и патоген-ассоциированные молекулярные структуры (Pathogen-Associated Molecular Patterns, PAMPs). Он специфически взаимодействует с липидом А бактериального LPS, затем комплекс LPS-LBP связывается с рецептором CD14 клеток миелоидного ряда и способствует каскаду воспалительного ответа [172] с выделением таких цитокинов, как TNF- α , IL-1, IL-6 и IL-12. Из-за его длительного периода полураспада (2-3 дня) уровни LBP в течение длительного времени обнаруживаются в сыворотке после бактериемии, и это является относительно надежным маркером для диагностики БТ. Повышенные уровни LBP были связаны с гемодинамической нестабильностью у пациентов с циррозом печени и предсказывают развитие инфекционных осложнений [173]. После приема антибиотика (норфлоксацина) уровни LBP нормализовались. Также было показано, что концентрация LBP в сыворотке крови связана с грамотрицательными, но не с грамположительными бактериями, поскольку уровень LBP был повышен только у пациентов с бактериальной ДНК грамотрицательных микроорганизмов [174]. Ряд исследований показал, что

LBP является надежным биомаркером микробной транслокации и развития сепсиса [20,21].

9) Пресепсин (soluble CD14, sCD14-ST). Рецепторы CD14 присутствуют в организме в 2х состояниях: связанные с мембраной макрофагов и моноцитов (mCD14) и растворимые (sCD14), циркулирующие в системном кровотоке. [175].

mCD-14 – мембранный гликопротеин, связывается с различными компонентами грамположительных и грамотрицательных бактерий через Toll-подобные рецепторы (TLR) [22,23]. Семейство Toll-подобных рецепторов включает трансмембранные рецепторы с внеклеточным доменом, богатым лейцином, который взаимодействует с соответствующими PAMPs [176]. Каждый TLR обнаруживает специфические PAMPs, для LPS - TLR-4, для бактериального липопротеина и пептидогликана - TLR-2, для неметирированной ДНК - TLR-9, для двухцепочечной РНК - TLR -3 и для одноцепочечная РНК - TLR -7 и -8 (рисунок 5) [177].

Итак, mCD-14 связывается через TLR с PAMPs и запускает провоспалительный сигнальный путь, в результате чего происходит выработка цитокинов (TNF, IL-1, IL-6 и IL-8) [178], фагоцитоз бактериальных патогенов, а mCD14 подвергается протеолизу посредством катепсина D с образованием растворимого sCD14-ST, который определяется в системном кровотоке (рисунок 6) [179-181]. sCD14-ST идентифицирован как биомаркер ранней фазы сепсиса, тяжестью протекания сепсиса и его уровень является прогностическим значимым фактором исходов у пациентов с сепсисом [24-26,181].

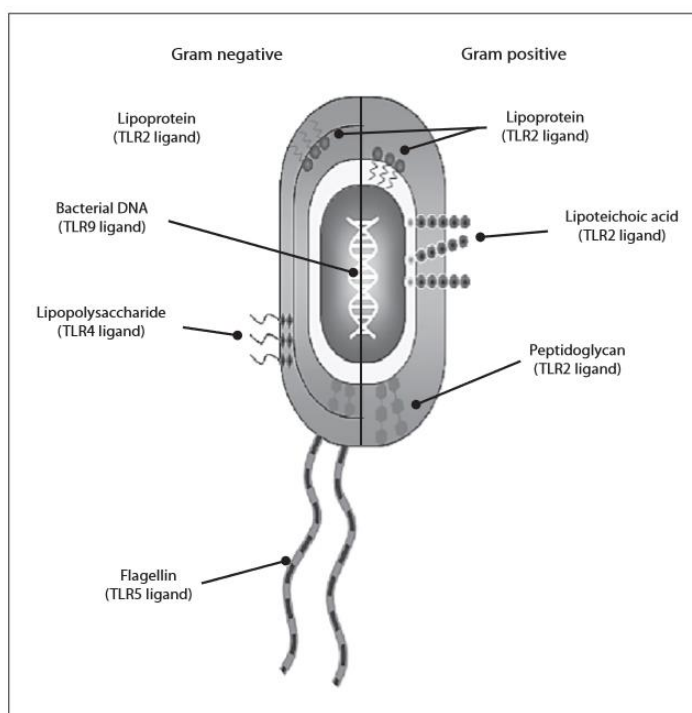


Рисунок 5 - Toll-подобные рецепторы взаимодействуют с соответствующими патоген-ассоциированными молекулярными структурами (PAMPs) бактерий [177]

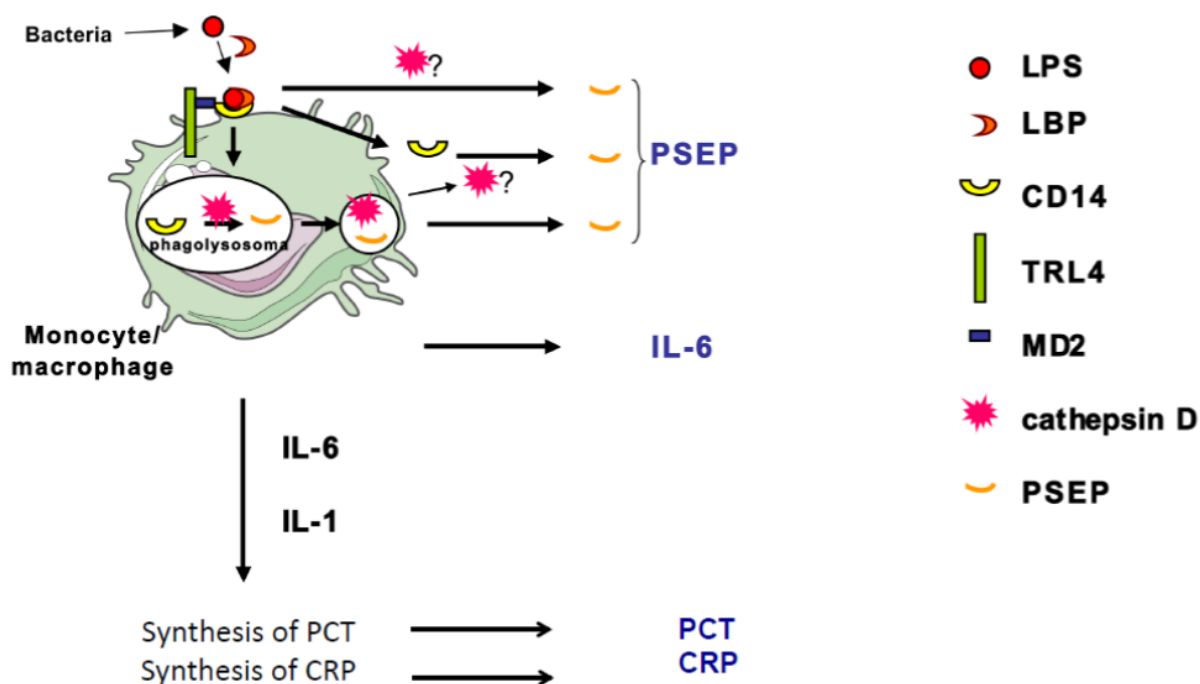


Рисунок 6 - Схематическое производство пресепсина. TLR: Toll-подобный рецептор; ЛПС: липополисахариды; LBP: LPS-связывающий белок; MD2: молекулярная динамика-2; PSEP: пресепсин [181]

На основании анализа статей и обзоров в базах данных публикаций Pubmed, Scopus, Web of Science можно утверждать, что интерес к феномену БТ растет из года в год, так же, как и к проблеме КРР и ОКН. В базе данных публикаций Scopus поиск по ключевым словам «bacterial translocation» выдает более 18 тысяч публикаций, первая из которых датируется 1947 годом, а за последние 5 лет опубликовано 4792 работы. По запросу «bacterial translocation AND colorectal cancer» обнаружено 150 публикаций, а по запросу «bacterial translocation AND bowel obstruction» обнаружено 84 публикации, около 66% из которых опубликованы за последние 10 лет, что отражает рост интереса исследователей к изучению транслокации бактерий при КРР и ОКН. По ключевым словам, «colorectal cancer AND bowel obstruction» за последние 5 лет найдено 314 работ. Начиная с 2015 года, наблюдается значительный рост работ по данной теме. По результатам поиска в вышеперечисленных базах данных публикаций, более 60% работ по БТ экспериментальные, а большая часть клинических исследований проведена у пациентов с ВИЧ-инфекцией и циррозом, в большинстве из них исследовалась достаточно маленькая выборка (менее 50 человек).

Транслокация кишечной микрофлоры исследуется научным коллективом НАО «Медицинский университет Караганды» под руководством Тургунова Е.М. длительный период, как в экспериментальных исследованиях, так и в клинических.

В экспериментальных исследованиях оценивались уровни биомаркеров бактериальной транслокации на моделях обтурационной и странгуляционной острой кишечной непроходимости у лабораторных крыс. При этом LBP максимально увеличивался в 1-ые сутки обтурационной кишечной непроходимости с умеренным снижением в динамике к 3-им суткам непроходимости, на 5-е сутки уровень LBP в группе с обтурационной кишечной непроходимостью был выше, чем в контрольной группе ($p=0,01$). Кроме того, между LBP и маркерами системной воспалительной реакции имеется прямая корреляция ($r_{sp}=0,434$, $p=0,000$) [182, 183]. Также экспериментальные исследования проводились по оценке повышения внутрибрюшного давления у лабораторных крыс. При этом была выявлена статистически значимое повышение sCD14-ST в сыворотке крови крыс при всех степенях внутрибрюшной гипертензии ($p<0,01$), что доказывает надежности данного маркера кишечной транслокации бактерий в системный кровоток [184].

В клинических исследованиях у 100 пациентов с острыми хирургическими заболеваниями органов брюшной полости (острая кишечная непроходимость, острый панкреатит и холецистит) оценивались уровни маркеров микробной транслокации. При этом была выявлена корреляция между уровнем sCD14-ST и повышенным внутрибрюшным давлением как до операции ($r=0,199$; $p=0,047$), так и через 24 часа после нее ($r=0,246$; $p=0,014$), также уровни sCD14-ST возрастали соответственно степени внутрибрюшной гипертензии, достигая максимальных значений при 4 степени последней. Длительное сохранение повышенного внутрибрюшного давления у пациентов с экстренной хирургической патологией способствует прогрессированию мультисистемной недостаточности и развитию абдоминального сепсиса [185].

Полученные результаты экспериментальных и клинических исследований стали основой для данного исследования по оценке динамики и прогностической значимости уровней маркеров бактериальной транслокации у пациентов с колоректальным раком.

Колоректальный рак, как и острая кишечная непроходимость, являются одними из актуальнейших проблем колопроктологии и экстренной абдоминальной хирургии. Заболеваемость КРР растет из года в год, несмотря на современные методы диагностики, проводимые скрининговые мероприятия, отмечается тенденция к росту выявления осложненных форм КРР. К сожалению, на сегодняшний день наблюдаются высокие уровни послеоперационных осложнений и летальности, которые не имеют тенденции к снижению. Феномен микробной транслокации при КРР и ОКН еще недостаточно изучен, как и связь БТ в развитии SIRS, септических осложнений и полиорганной недостаточности [186,187]. Эти нерешенные проблемы требуют дальнейшего углубленного изучения, в связи с чем, в целях ранней диагностики инфекционно-воспалительных осложнений целесообразно изучение таких маркеров БТ, как LBP и sCD14-ST, а также 16sRNA у пациентов с колоректальным раком.

1 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Дизайн исследования

Проведенное исследование по своему дизайну - проспективное простое сравнительное клиническое исследование. Дизайн исследования получил одобрение Комитета по биоэтике НАО «Медицинского университета Караганды» протокол № 6 от 23.12.2019 г. присвоенный номер №30, а также одобрение Локальной комиссии по биоэтике НАО «Медицинского университета Караганды» протокол № 2 от 20.09.2022 г. присвоенный номер №2 (приложение В). Исследование проводилось согласно принципам Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации (2013 г.) и согласно приказа Министра здравоохранения Республики Казахстан от 15 мая 2015 года №348 О внесении изменения в приказ Министра здравоохранения Республики Казахстан от 12 ноября 2009 года №697 «Об утверждении Правил проведения медико-биологических экспериментов, доклинических (неклинических) и клинических исследований». Данное исследование является фрагментом 2-х научно-исследовательских работ с финансированием по гранту МОН РК (ИРН AP08956335 и ИРН AP09260597) [188,189].

Исследование проводилось на базе четырех стационаров г. Караганды: «Областной клинической больницы», «Многопрофильной больницы им. профессора Х. Ж. Макажанова», «Многопрофильной больницы №1 г. Караганды», «Многопрофильной больницы №3 г. Караганды».¹

За период 2020-2021 гг. было обследовано 120 пациентов:

- группа 1 – 50 пациентов, оперированных по поводу колоректального рака без ОКН (КРР без ОКН, плановые операции);
- группа 2 – 40 пациентов, оперированных по поводу опухолевой ОКН, вызванной КРР;
- группа 3 – 30 пациентов, оперированных по поводу ОКН неопухолевого генеза (спаечная болезнь брюшной полости, заворот кишки, тромбоз мезентериальных сосудов, болезнь Крона). Данная группа введена, как контрольная, ввиду необходимости выявления влияния на бактериальную транслокацию самой острой кишечной непроходимости, без наличия опухолевого процесса в кишечнике.

Каждая группа в последующем разделялась на подгруппы в зависимости от наличия или отсутствия SIRS, послеоперационных инфекционно-воспалительных осложнений, органных дисфункций (по критериям SOFA - Sequential Organ Failure Assessment) и летального исхода.

Критерии включения: пациенты, которым проводится плановое оперативное вмешательство по поводу опухоли толстого кишечника, пациенты с обтурационной ОКН опухолевого и неопухолевого генеза старше 18 лет.

Критерии исключения: возраст младше 18 лет, беременные, пациенты с паралитической ОКН, пациенты с ВИЧ-инфекцией, циррозом печени, а также

¹ Автор и научные консультанты выражают благодарность проф. Шакееву К.Т., асс.проф. Матюшко Д.Н., асс.проф. Мугазову М.М., магистру медицины Жумакаеву А.М. за помощь в наборе биоматериала.

при наличии у пациента инфекционного процесса, обусловленного другой патологией.

Перед забором материала для исследования всем пациентам были разъяснены цели проводимого исследования, после согласия пациентов на участие в исследовании, ими было подписано информированное согласие.

Всем пациентам в условиях стационаров проводили клинические, инструментальные и лабораторные методы исследования согласно клиническим протоколам Министерства здравоохранения Республики Казахстан №60 «Острая кишечная непроходимость», №57 «Злокачественные новообразования ободочной и прямой кишки». При поступлении дежурным хирургом проводился объективный осмотр живота. Проведенные основные лабораторные исследования, согласно протоколу: общий анализ крови, общий анализ мочи, микрореакция, группа крови, резус-фактор, определение сахара в крови, АЛТ, АСТ, креатинина, остаточного азота мочевины, общего белка и фракций, амилазы крови, коагулограммы, ВИЧ. Из инструментальных исследований: ЭКГ, обзорная рентгенография органов грудной и брюшной полости. Дополнительно некоторым пациентам проводили рентгенконтрастное исследование желудочно-кишечного тракта, УЗИ органов брюшной полости, ФГДС, колоноскопию.

Для оценки возможной связи бактериальной транслокации со степенью клеточной дифференцировки и степенью инвазии опухоли в стенку кишки использовалась международная классификация стадий злокачественных новообразований TNM с группировкой по стадиям I-IV согласно последней 8-ой редакции классификации [190].

Критерий T (размеры первичной опухоли и степень ее инвазии в стенку кишки):

Tx – недостаточно данных для оценки первичной опухоли;

Tis – преинвазивный рак (интраэпителиальная инвазия или инвазия собственной пластинки слизистой оболочки);

T1 – опухоль распространяется в подслизистый слой стенки кишки;

T2 – опухоль распространяется на мышечный слой, без прорастания стенки кишки;

T3 – опухоль прорастает все слои стенки кишки с распространением в жировую клетчатку, без поражения соседних органов;

T4 – опухоль прорастает в окружающие органы и ткани или серозную оболочку;

T4a – прорастание висцеральной брюшины;

T4b – прорастание в другие органы и структуры.

Критерий N (наличие или отсутствие метастазов в регионарных лимфатических узлах):

NX – недостаточно данных для оценки регионарных лимфатических узлов;

N0 – поражения регионарных лимфатических узлов нет;

N1 – метастазы в 1-3 (включительно) регионарных лимфатических узлах;
 N1a – метастазы в 1 регионарном лимфатическом узле;
 N1b – 2-3 лимфатических узлах;
 N1c – диссеминаты в брыжейке без поражения регионарных лимфатических узлов;

N2 – метастазы в 4-х регионарных лимфатических узлах;

N2a – поражено 4-6 лимфатических узлов;

N2b – поражено 7 и более лимфатических узлов.

Критерий M (наличие или отсутствие отдаленных метастазов):

M0 – отдаленных метастазов нет;

M1 – наличие отдаленных метастазов;

M1a – наличие отдаленных метастазов в одном органе;

M1b – наличие отдаленных метастазов более чем в одном органе;

M1c – наличие отдаленных метастазов по брюшине с метастатическим поражением других органов или без.

Группировка по стадиям представлена в таблице 1.

Таблица 1 – Группировка колоректального рака по стадиям [190]

Стадия	T	N	M
0	is	0	0
I	1,2	0	0
II	3,4	0	0
IIA	3	0	0
IIB	4a	0	0
IIC	4b	0	0
III	Любая	1,2	0
IIIA	1,2	1	0
	1	2a	0
IIIB	1,2	2b	0
	2,3	2a	0
	3,4a	1	0
IIIC	4b	1,2	0
	4a	2a	0
	3,4a	2b	0
IV	Любая	Любая	1
IVa	Любая	Любая	1a
IVb	Любая	Любая	1b
IVc	Любая	Любая	1c

Критерий G – гистопатологическая оценка опухоли:
GX - степень дифференцировки оценить невозможно;
G1 – высокодифференцированная;
G2 – умереннодифференцированная;
G3 – низкодифференцированная;
G4 – недифференцированная.

Из проведенных лабораторных анализов согласно протоколу для постановки SIRS и оценке по шкале SOFA оценивались такие показатели, как уровень лейкоцитов с определением палочкоядерных нейтрофилов, тромбоцитов, общего билирубина, креатинина. Пациентам, находившимся в реанимационном отделении в тяжелом состоянии, определяли показатели газового состава крови (рO₂, индекс оксигенации). При развитии послеоперационных гнойно-воспалительных осложнений проводился бактериальный посев из брюшной полости или раны.

До оперативного вмешательства и на 3-е сутки после него мониторились признаки на предмет наличия SIRS (наличие 2-х и более признаков) [191]:

- температура тела ≥ 38 °C или ≤ 36 °C;
- частота сердечных сокращений (ЧСС) ≥ 90 /мин;
- частота дыхания (ЧД) ≥ 20 /мин;
- лейкоцитоз (лейкоциты $\geq 12 \cdot 10^9$ /л) или лейкопения (лейкоциты $\leq 4 \cdot 10^9$ /л), или смещение лейкоцитарной формулы влево.

Для определения органных дисфункций до операции и на 3-е сутки после нее тяжесть состояния оценивалась в баллах по шкале SOFA [192] (таблица 2).

Патогистологическое исследование биопсийного материала проводилось патологоанатомическими отделениями при каждом стационаре, где определялись гистологическая форма опухоли, степень клеточной дифференцировки, а также степень инвазии кишечной стенки.

Клинический диагноз выставлялся после проведенного оперативного вмешательства. Также оценивалось развитие послеоперационных инфекционно-воспалительных осложнений во всех группах. К ним относились: нагноение послеоперационной раны, абсцессы брюшной полости, перитонит, несостоятельность анастомоза и сепсис.

Для изучения концентрации LBP, sCD14-ST в сыворотке крови проводился забор венозной крови процедурными медицинскими сестрами хирургических отделений за час до оперативного вмешательства и через 72 часа после его проведения (3-и сутки). Проводились бактериологическое исследование и детекция микробной 16sRNA в мезентериальных лимфатических узлах макропрепарата резецированной кишки. Лабораторная часть исследования проводилась в ЛКП НИЦ НАО «МУК» (директор НИЦ – к.м.н. Ключев Д.А.).²

² Автор и научные консультанты выражают благодарность к.м.н. Ахмалудиновой Л.Л., магистру медицины Лавриненко А.В., PhD Кадыровой И.А., м.н.с. Авдиенко О.В.

Таблица 2 - Критерии оценки органных дисфункций по шкале SOFA

Система	Баллы				
	0	1	2	3	4
Дыхательная (pO_2/FiO_2 , мм.рт.ст.)	≥ 400	< 400	< 300	< 200 с респираторной поддержкой	< 100 с респираторной поддержкой
Коагуляция (тромбоциты, $\times 10^9/л$)	≥ 150	< 150	< 100	< 50	< 20
Печень (билирубин, мкмоль/л)	< 20	20-32	33-101	102-204	≥ 204
Сердечно- сосудистая	САД ≥ 70 мм.рт.ст.	САД < 70 мм.рт.ст.	Допамин < 5 или добутамин в любой дозировке	Допамин 5,1-15 или эпинефрин/ норэпинефрин $< 0,1$	Допамин > 15 или эпинефрин/ норэпинефрин $> 0,1$
Оценка центральной нервной системы (ЦНС) по шкале ком Глазго	15	13-14	10-12	6-9	< 6
Почки (креатинин, мкмоль/л)	< 110	110-170	171-299	300-440 либо диурез менее 500 мл/сут	> 400 либо диурез менее 200 мл/сут
Примечание - Дозы катехоламинов отображены в мкг/кг/мин, применяемые как минимум в течение 1 часа.					

2.2 Материалы исследования

Базовые характеристики пациентов представлены в таблице 3. Возраст пациентов варьировал от 21 до 94 лет. Несмотря на то, что возраст в группе неопухолевой ОКН был несколько ниже групп с КРР, статистически значимая разница между исследуемыми группами не была выявлена ($p=0,084$) (рисунок 7). Среди пациентов в группе опухолевой ОКН преобладали пациентки женского пола (65%), хотя статистических различий по полу между тремя группами не было выявлено ($p= 0,133$), как и не было выявлено отличий между группами по наличию или отсутствию сопутствующей патологии ($p= 0,732$).

Как видно из таблицы 3, признаки SIRS чаще возникали в группе опухолевой ОКН (52,5%), что было статистически значимым различием ($p=0,022$). Что касемо возникновения осложнений статистической разницы между группами выявлено не было ($p=0,558$). Несмотря на то, что органные дисфункции в группе опухолевой ОКН превышают таковые в 2 раза по сравнению группой КРР без ОКН, и в 3 раза по сравнению с группой неопухолевой ОКН, статистической разницы по точному критерию Фишера не было выявлено ($p=0,150$ и $p=0,107$, соответственно). Летальность в группе

опухолевой ОКН составила 20% тогда, когда в группе КРР без ОКН, она составила всего 2% ($p=0,006$).

Таблица 3 - Базовые характеристики исследуемых пациентов

Критерий/Группа		Опухоли кишечника без ОКН	Опухолевая ОКН	Неопухолевая ОКН	Статистические критерии и уровни значимости
Возраст Me (Q25-Q75)		66,5 (54,0-73,0)	67,5 (58,5-78)	59,5 (43,0-70,0)	$p=0,084$ $N=4,962$
Пол	М	56%	35%	50%	$p=0,133$ $\chi^2=4,030$
	Ж	44%	65%	50%	
Сопутствующая патология	-	16%	22,5%	20%	$p=0,732$ $\chi^2=0,624$
	+	84%	77,5%	80%	
SIRS	-	62%	47,5%	80%	$p=0,022$ $\chi^2=7,664$
	+	38%	52,5%	20%	
Осложнения	-	78%	72,5%	83,3%	$p=0,558$ $\chi^2=1,166$
	+	22%	27,5%	16,7%	
Органые дисфункции	-	90%	80%	93,3%	$p=0,150$ и $p=0,107$
	+	10%	20%	6,7%	
Летальность	-	98%	80%	93,3%	0,006
	+	2%	20%	6,7%	

Примечания
 1 В таблице указаны уровни значимости (p), а также значения статистических критериев для каждого сравнения: N – значение критерия Краскела-Уоллиса, χ^2 - значение хи-квадрат Пирсона;
 2 Для критерия «органные дисфункции» даны уровни значимости (p) при сравнении попарно группы опухолевой ОКН с оставшимися двумя группами;
 3 Для критерия «летальность» дан уровень значимости (p) при сравнении группы опухолевой ОКН с группой опухолей кишечника без ОКН.

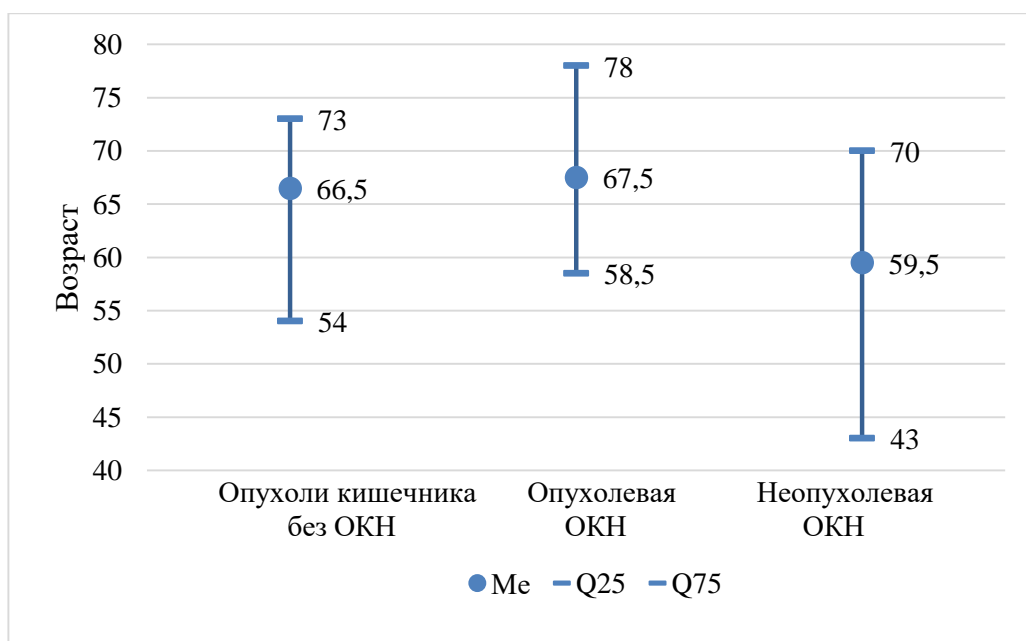


Рисунок 7 – Возрастные характеристики пациентов в исследуемых группах (Me - медиана, Q25-Q75 - нижний и верхний квартили)

В группе КРР без ОКН в структуре послеоперационных инфекционно-воспалительных осложнений преобладала несостоятельность анастомоза - 7 (63,6%). В группе опухолевой ОКН преобладали нагноение раны и сепсис в равной степени - по 4 (36,4%). В группе неопухолевой ОКН чаще возникали абсцессы брюшной полости - 3 (60%), а несостоятельность анастомоза не наблюдалось вовсе. У 8 пациентов было сочетание нескольких осложнений, в основном несостоятельность анастомоза с абсцессами брюшной полости и/или перитонитом. Из всех 120 пациентов сепсис развился у 7 (5,8%), при этом: в группе с опухолями кишечника без ОКН – 2 (4,0%), в группе опухолевой ОКН – 4 (10,0%) и в группе неопухолевой ОКН – 1 (3,3%).

В таблице 4 представлены характеристики пациентов с колоректальным раком в зависимости от стадии опухолевого процесса (I-IV), его локализации, степени инвазии опухоли в кишечную стенку (T1-T4) и степени клеточной дифференцировки (для двух групп: КРР осложненный и неосложненный ОКН).

Таблица 4 - Характеристики исследуемых пациентов с колоректальным раком в зависимости от стадии опухолевого процесса, его локализации, степени инвазии опухоли в кишечную стенку и степени клеточной дифференцировки согласно международной классификации TNM [190]

Критерий/Группа		Колоректальный рак				p-level
		КРР без ОКН		Опухолевая ОКН		
		abs	%	abs	%	
Стадия опухолевого процесса	I	8	16	1	2,5	p=0,003
	II	22	44	14	35	
	III	14	28	9	22,5	
	IV	6	12	16	40	
Локализация опухоли	Прямая кишка (C20)	10	20	5	12,5	p=0,237
	Ректо-сигмоидный отдел (C19)	6	12	4	10	
	Толстая кишка (C18):	34	68	31	77,5	
	Слепая кишка	5	10	3	7,5	
	Восходящая ободочная кишка	6	12	3	7,5	
	Печеночный угол ободочной кишки	2	4	2	5	
	Поперечно-ободочная кишка	0	0	4	10	
	Селезеночный угол ободочной кишки	1	2	2	5	
	Нисходящая ободочная кишка	2	4	0	0	
Сигмовидная кишка	18	36	17	42,5		
Степень инвазии опухоли в стенку кишки	T1	0	0	0	0	p=0,137
	T2	6	12	0	0	
	T3	9	18	14	35	
	T4	35	70	26	65	
Степень клеточной дифференцировки	Высокодифференцированная (G1)	13	26	12	30	p=0,109
	Умереннодифференцированная (G2)	24	48	13	32,5	
	Низкодифференцированная (G3)	11	22	15	37,5	
	Патоморфоз опухоли	2	4	0	0	
Примечание – abs – абсолютное количество пациентов; p-level - уровень значимости по точному критерию Фишера.						

В группе опухолевой ОКН доля пациентов с I стадией составила всего 2,5%, а доля пациентов с IV стадией – 40%, что явилось значительно большим показателем в сравнении с группой КРР без ОКН, где частота встречаемости I и IV стадий практически не отличалась – 16% и 12% ($p=0,003$). Данный факт может свидетельствовать о том, что у пациентов с опухолями кишечника I стадии развитие ОКН возникает реже, чем при дальнейшем прогрессировании и распространении опухолевого процесса.

По локализации опухолевого процесса в обеих группах преобладали поражения толстой (ободочной) кишки (68% и 77,5%, соответственно), в том числе поражения сигмовидной кишки (36% и 42,5% соответственно). Хотя в группе с опухолями кишечника без ОКН поражение прямой кишки встречалось чаще (20%), нежели при опухолевой ОКН (12,5%), статистически значимых различий по локализации опухоли между двумя группами не было выявлено ($p= 0,237$).

По степени инвазии опухоли в стенку кишки в обеих группах опухоль чаще прорастала в окружающие органы и ткани или серозную оболочку (T4) – 70% и 65% ($p=0,137$ по точному критерию Фишера).

Хотя в группе КРР без ОКН преобладали умереннодифференцированные аденокарциномы (48,0%), в группе опухолевой ОКН – низкодифференцированные (37,5%), по степени клеточной дифференцировки не было найдено статистических различий ($p= 0,109$).

2.3 Методы исследования

2.3.1 Методика забора, транспортировки и хранения мезентериальных лимфатических узлов

Забор, транспортировка и хранение мезентериальных лимфатических узлов (рисунок 8) для проведения молекулярно-генетического анализа проводился по разработанному СОП «Забор, транспортировка и хранение мезентериальных лимфатических узлов для исследования 16sRNA методом ПЦР» (приложение Г) [188,189].

Забор мезентериального лимфатического узла:

1. До проведения забора необходимо получить информированное согласие на проведение процедуры.
2. На пробирке написать Ф.И.О. пациента, дату забора материала.
3. Забор мезентериальных лимфоузлов в вакутейнер проводится в стерильных условиях хирургом во время оперативного вмешательства после резекции участка кишки из брыжейки макропрепарата
4. После вакутейнер с лимфатическим узлом необходимо наполнить стерильным физиологическим раствором.
5. Затем вакутейнеры поместить в штатив в холодильник ($+4^{\circ}\text{C}$ - $+8^{\circ}\text{C}$) до момента транспортировки (максимальным сроком до 12 часов).

Транспортировка биоматериала:

1. Транспортировка производится в специальном контейнере с охлаждающими элементами или в термосе со льдом при температуре $+2^{\circ}\text{C}$ -

+8⁰С в течение 6 часов. Пробирки при доставке должны располагаться строго вертикально.

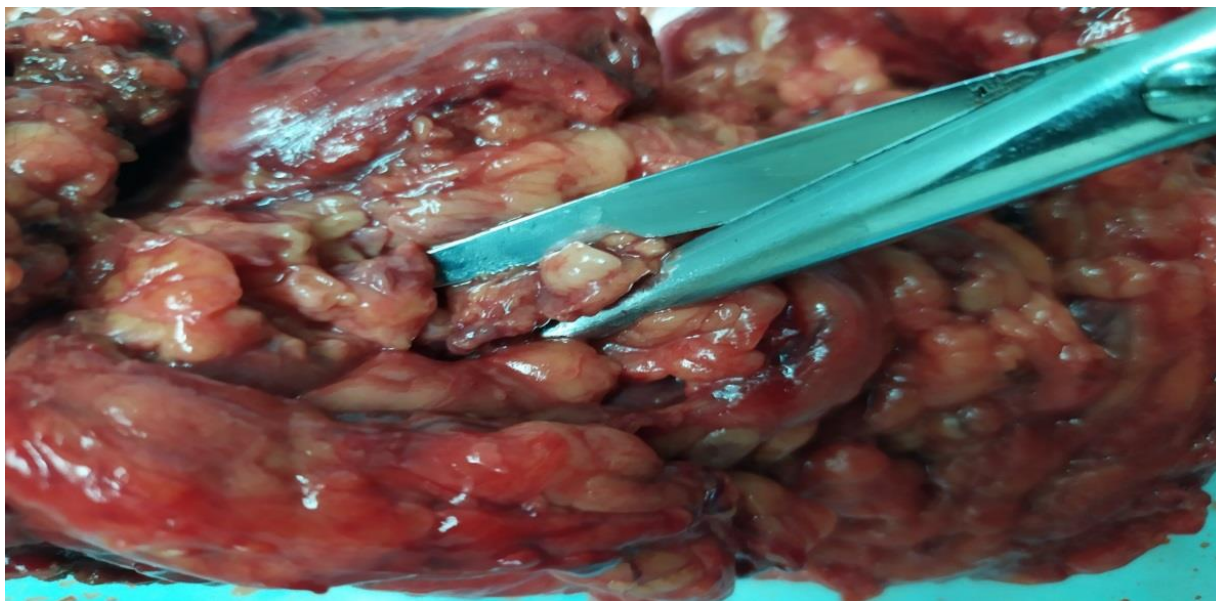


Рисунок 8 - Забор мезентериального лимфоузла

Хранение:

1. Из каждого доставленного образца в стерильных условиях в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл отделить 20 мг ткани для последующей экстракции ДНК. Материал (20 мг в микроцентрифужной пробирке и оставшийся материал в стерильном вакутейнере) до начала выделения ДНК хранить при температуре от -20⁰С до -80⁰С.

2. Необходимо избегать повторных циклов замораживания/оттаивания.

2.3.2 Методика забора, транспортировки и хранения венозной крови

Забор, транспортировка и хранение венозной крови для проведения иммуноферментного анализа проводился за час до оперативного вмешательства и через 72 часа после его проведения (3-и сутки) по разработанному СОП «Забор, транспортировка и хранение венозной крови для исследования LBP и sCD14-ST методом ИФА» (Приложение Д) [188,189]. Венозная кровь набиралась в вакутейнеры объемом 5 мл (пробирки с дозированным отрицательным давлением) с желтой крышкой для ИФА, содержащие активатор свертывания и гелевый разделитель сыворотки.

Забор крови:

1. Получить информированное согласие на проведение процедуры.
2. На пробирке написать Ф.И.О. пациента, дату забора крови.
3. Вымыть руки проточной водой с мылом, содержащим антисептик. Обработать кожу рук антисептиком на спиртовой основе согласно методическим рекомендациям по обработке рук сотрудников медицинских организаций РК, надеть стерильные перчатки.

4. Подложить под локоть пациенту клеенчатый валик, наложить резиновый жгут на 10 см выше места венепункции (не более чем на 1 минуту), предложить пациенту сжать кулак.
5. Пропальпировать вену, определить место венепункции.
6. Обработать перчатки проспиртованным шариком или раствором антисептика.
7. Последовательно обработать место венепункции двумя проспиртованными стерильными шариками. Движения неотрывные круговые «от центра к периферии». Диаметр обрабатываемой зоны 10 см первым шариком, затем непосредственно место пункции вторым шариком.
8. Зафиксировать вену большим пальцем левой руки, ввести иглу в вену срезом вверх, ослабить жгут и набрать в шприц 5 мл венозной крови.
9. Извлечь иглу, одновременно прижимая к месту венепункции сухой стерильный шарик до прекращения кровотечения. После образования сгустка наложить на место венепункции повязку либо бактерицидный пластырь
10. Заполнить пробирку до необходимого объема. Аккуратно перевернуть пробирку, равномерного перемешивания с наполнителем 5-6 раз.
11. Вакутейнеры с забранной кровью поместить в штатив в холодильник (+4⁰С - +8⁰С) до момента транспортировки (максимальным сроком до 1 суток) и дальнейшего центрифугирования.
12. Использованные шарики, иглы выбросить в коробку безопасной утилизации для медицинских отходов класса «Б» (КБУ).
13. Снять перчатки, выбросить их в КБУ для медицинских отходов класса «Б», вымыть руки проточной водой с мылом, содержащим антисептик. Провести обработку рук согласно методическим рекомендациям по обработке рук сотрудников медицинских организаций РК.

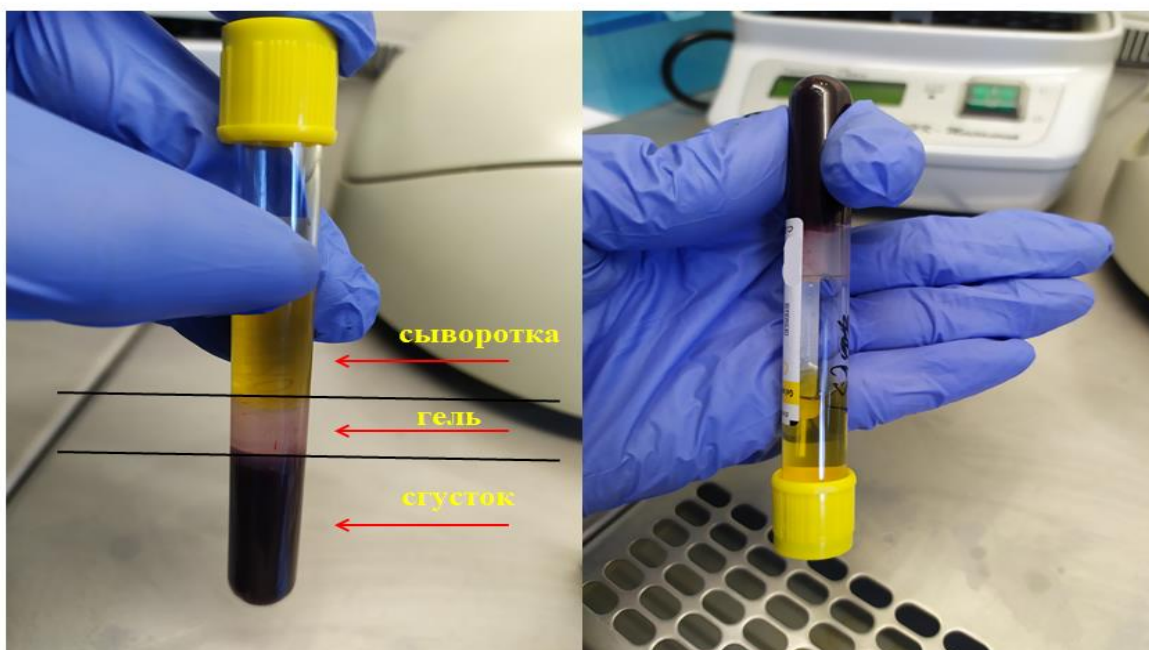


Рисунок 9 - Отцентрифугированный вакутейнер с биоматериалом для ИФА

Транспортировка биоматериала:

1. Транспортировка производится в специальном контейнере с охлаждающими элементами или в термосе со льдом при температуре +2°C - +8°C в течение 6 часов. Пробирки при доставке должны располагаться строго вертикально.

Хранение:

1. Доставленные образцы отцентрифугировать в течение 20 минут при 1000 g. Убедиться, что гель полностью разделяет сыворотку от сгустка, формируя плотный барьер (рисунок 9).

2. Полученную пробу свежеприготовленной сыворотки хранить при -20°C - -80°C, во избежание потери биологической активности и загрязнения.

3. Необходимо избегать повторных циклов замораживания/оттаивания.

4. Образцы, которые будут использоваться в течение 5 дней, возможно хранить при +4°C - +8°C).

2.3.3 Детекция бактериальной транслокации

а) Микробиологическое исследование микрофлоры мезентериальных лимфатических узлов

По литературным данным надежным и достоверным методом определения БТ является культура брыжеечных лимфатических узлов, в том числе как прямой маркер БТ [17,61]. Поэтому с целью возможности обнаружения жизнеспособных бактерий в МЛУ было проведено бактериологическое исследование 20 МЛУ пациентов, оперированных по поводу КРР (14 пациентов без ОКН, 6 с ОКН).

Забор МЛУ производился во время оперативного вмешательства оперирующими хирургами в стерильные пробирки без наполнителя с последующим добавлением стерильного физиологического раствора. После чего материал в течение 30 минут при температуре 22-25°C в герметично закрытом контейнере в соответствии с установленными МЗ РК правилами безопасности [193] доставлялся в Лабораторию коллективного пользования Научно-исследовательского центра НАО «Медицинском университете Караганды». При распаковке материала контейнер и пробирки обтирали дезинфицирующим раствором и ставили на металлический поднос. Далее полученный биологический материал промывался стерильным физиологическим раствором для предотвращения контаминации и культивировался в пробирках с триптиказо-соевым бульоном при температуре 37°C и времени инкубации – 24 часа (рисунок 10) [194]. На следующем этапе проводилось классическое бактериологическое исследование: высев с помощью калиброванной петли (10мкл) на плотную питательную среду - кровяной агар с 5%-ным содержанием бараньей крови. Посевы инкубировались при температуре 37°C и времени инкубации – 24 часа [61, 194, 195].

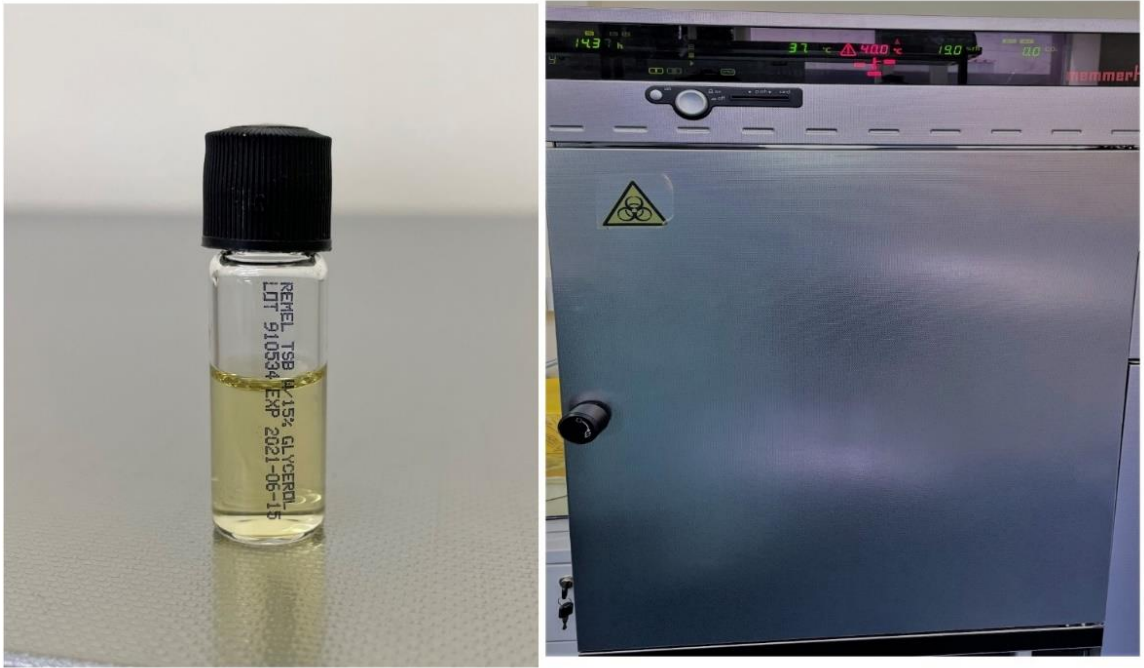


Рисунок 10 – Пробирка с триптиказо-соевым бульоном, помещаемая с исследуемым образцом в термостат для инкубирования биологических образцов при температуре 37⁰С



Рисунок 11 - Время пролетный масс спектрофотометр с матрично-ассоциированной лазерной десорбцией и ионизацией MALDI-TOF MS

Идентификация выделенной чистой культуры микроорганизмов проводилась с помощью метода пролетной масс-спектрофотометрии с матрично-ассоциированной лазерной десорбцией и ионизацией (MALDI-TOF MS) с использованием системы Microflex LT, а также программного обеспечения MALDI Biotyper Compass 4.1.80 (Bruker Daltonics, Германия) (рисунок 11). При масс-спектрометрии выделенную чистую культуру микроорганизмов наносили на стальную мишень с последующим высушиванием на воздухе. После чего добавлялось 2 мл насыщенного раствора альфа-циано-тетра-гидроксикоричной кислоты в 50% ацетонитриле и 2,5% трифторуксусной кислоте, после чего повторно подсушивали при комнатной температуре и помещали в масс-спектрометр [194,196]. Масс-спектры калибровались с использованием бактериального стандарта рибосомальных белков *E. coli*. Результаты выражались в виде оценочного коэффициента score в диапазоне от 0 до 3. Значение score >2,2 было использовано в качестве критерия надежной видовой идентификации.

б) Определение 16s rRNA в мезентериальных лимфатических узлах ПЦР-методом

По результатам ранее проведенных исследований методом ПЦР с помощью универсальных праймеров 16s rRNA можно обнаружить большинство бактерий, так как праймеры связываются с общими участками для большинства бактерий [143,144].

Исследование 16sRNA в мезентериальных лимфатических узлах проводилось на базе Лаборатории коллективного пользования Научно-исследовательского центра при НАО «Медицинском университете Караганды».

Материал исследования - мезентериальные лимфатические узлы макропрепарата резекцированной кишки пациентов исследуемых групп.

Молекулярно-генетическая детекция микроорганизмов в лимфатических узлах пациентов проводилась с помощью ПЦР в режиме реального времени на амплификаторе BIO-RAD CFX96 (рисунок 12).

Детекцию гена 16s rRNA ДНК проводили по разработанному СОП «Определение 16s rRNA в мезентериальных лимфатических узлах методом ПЦР» (приложение Е). Тотальная ДНК экстрагировалась из образцов МЛУ с помощью набора для экстракции ДНК «GeneJET Genomic DNA Purification Kit».

1. Качественное определение наличия микроорганизмов в МЛУ (приложение Ж).

Для имитации транслокации микроорганизмов в МЛУ, к полученным образцам лимфатических узлов (до 20 мг) добавлялась взвесь лабораторного авирулентного штамма *Escherichia coli* GFP 6 серотипа биотипа 1 (ATCC® 25922GFP™) с показателями КОЕ от 10^8 до 10^2 .



Рисунок 12 - Амплификатор BIO-RAD CFX96

На данном этапе образцы МЛЮ (до 20 мг) с добавленной взвесью бактерий с КОЕ от 10^8 до 10^2 , а также МЛЮ без добавления бактериальной взвеси, гомогенизировали для уменьшения времени лизиса и помещали в микроцентрифужные пробирки с добавлением 180 мкл Digestion Solution и 20 мкл раствора протеиназы К, тщательно встряхивая на вортексе. После инкубировали при 56°C пока ткани полностью не лизируются периодически встряхивая на вортексе (в среднем занимает до 4-х часов).

С целью разрушения РНК было добавлено 20 мкл раствора РНКазы А с дальнейшим инкубированием в течение 10 минут при комнатной температуре.

К полученной смеси добавлялось 200 мкл лизирующего раствора и 400 мкл 50% этанола. После каждого этапа образец тщательно перемешивался на вортексе. Приготовленную смесь переносили в специальные спин-колонки с пробиркой для сбора и центрифугировали в течение 1 мин при $6000 \times g$. После каждого центрифугирования спин-колонку помещали в новую пробирку для

сбора. Далее образцы подвергались отмывке 500 мкл промывочного буфера I и 500 мкл промывочного буфера II с центрифугированием после добавления каждого. Перед добавлением 200 мкл буфера для элюции спин-колонку помещали в стерильную микроцентрифужную пробирку с дальнейшим инкубированием в течение 2 мин при комнатной температуре и центрифугированием в течение 1 мин при 8000 x g.

Полученную ДНК сразу использовали для real-time ПЦР.

На следующем этапе для амплификации с выделенной ДНК готовилась реакционная смесь (количество и наименование компонентов указаны в таблице 5).

Таблица 5 - Компоненты реакционной смеси для этапа амплификации

Компонент	Необходимый объём
Безнуклеазная вода	18 мкл
Master Mix Maxima SYBR Green	25 мкл
Праймер U16SRT-F FACTCCTACGGGAGGCAGCAGT	1 мкл
Праймер U16SRT-R TATTACCGCGGCTGCTGGC	1 мкл
Тестируемый образец ДНК	5 мкл

В качестве отрицательного контроля использовали пробу, без содержания в ней бактериальной ДНК. В качестве положительного контроля использовали пробу с ДНК того же лабораторного авирулентного штамма *E. coli*.

Далее микроцентрифужные пробирки загружали в планшет амплификатора BIO-RAD CFX96 (рисунок 13).

Амплификация проводилась при следующих параметрах:

- денатурация при 95⁰С 10 минут;
- «отжиг» и элонгация – 40 циклов при 95⁰С по 15 секунд и при 62⁰С - 60 секунд.

Качественная детекция результатов проводилась по величине порогового цикла кривой амплификации. После амплификации также проводился анализ кривых плавления (melt curve) от 70⁰С до 90⁰С с шагом 0,4⁰С, который предназначен для установления различий в нуклеотидных последовательностях (определения специфичности полученного продукта амплификации – бактериальной ДНК) [188,189].

2. Для количественного определения наличия микроорганизмов в МЛУ (приложение II), предложено определить зависимость накопления продуктов амплификации от количества колониеобразующих единиц бактерий (КОЕ/мл). Была произведена калибровка на чистой культуре Escherichia coli GFP 6 серотипа биотипа 1 (ATCC® 25922GFP™) с показателями КОЕ от 10² до 10⁸, а также смеси *E.coli* с КОЕ/мл от 10² до 10⁸ с тканями МЛУ.

Первую группу составили образцы чистой культуры *E.coli* с КОЕ/мл 10^2 , 10^4 , 10^6 , 10^8 в физиологическом растворе (0,9% раствор NaCl) - по 5 образцов каждого из значений КОЕ, всего 20 образцов.



Рисунок 13 - Загрузка исследуемых проб в амплификатор BIO-RAD CFX96

Вторую группу составили образцы МЛУ со взвесью *E.coli* с КОЕ/мл 10^2 , 10^4 , 10^6 , 10^8 по 5 образцов каждого из значений КОЕ (подгруппы), всего 20 образцов.

Третью группу составили МЛУ 53-х пациентов с колоректальным раком с и без ОКН и МЛУ 5-и пациентов с неопухолевым ОКН.

Методики выделения ДНК из образцов и проведение ПЦР были такие же, как при качественном определении ДНК микроорганизмов.

в) ИФА для определения sCD14-ST и LBP в сыворотке крови

Согласно ранее проведенным исследованиям LBP был определен, как надежным биомаркер микробной транслокации и развития сепсиса [20,21], а sCD14-ST был идентифицирован как биомаркер ранней фазы сепсиса и его уровень является прогностическим значимым фактором исходов у пациентов с сепсисом [24-26].

Поэтому нами для детекции БТ путем обнаружения липополисахарид-связывающего белка (LPS-binding protein или LBP) и пресепсина (sCD14-ST) использованы следующие коммерческие наборы для человеческой крови с микропланшетами:

- ELISA Kit for Presepsin (sCD14-ST, Human),
- ELISA Kit for Lipopolysaccharide Binding Protein (LBP, Human).

Исследование LBP, sCD14-ST проводилось на базе Лаборатории коллективного пользования Научно-исследовательского центра при НАО «Медицинском университете Караганды».

Материал исследования - сыворотка крови пациентов исследуемых групп.

Методика определения маркеров в сыворотке крови проводилась согласно разработанному СОП «Описание методики определения sCD14-ST и LBP в сыворотке крови методом ИФА» (приложение К) [188,189]:

- во время оттаивания замороженных образцов сыворотки до комнатной температуры, готовили в микроцентрифужных пробирках в зависимости от концентрации (от 0 до 200 нг/мл) восемь разведений контрольного стандарта (прилагается в наборе) для калибровки результатов;

- только для определения уровней LBP сыворотку образцов разбавляли в 500 раз (10 мкл сыворотки и 490 мкл раствора PBS);

- перед работой с микропланшетом заполняли протокол, где распределяли каждый образец и стандарты по лункам, чтобы не перепутать результаты образцов;

- в лунки микропланшета, покрытые биотинилированными антителами, специфичными к исследуемым маркерам, помещали по 100 мкл образцов изучаемой сыворотки и в отдельные лунки по 100 мкл полученных разбавлений стандарта. Далее инкубировали 1 час при 37⁰С;

- затем удаляли всю жидкость без промывания, добавляли 100 мкл Detection reagent A (авидин, конъюгированный с пероксидазой хрена) и инкубировали 1 час при 37⁰С;

- после чего в ИФА-роботизированной системе Evolis от BioRad (рисунок 14) проводили трехкратную промывку лунок, далее добавляли 100 мкл Detection reagent B и инкубировали 30 мин при 37⁰С;

- после инкубации лунки снова промывали в системе Evolis (пятикратно) и добавляли 90 мкл раствора субстрата ТМВ (Substrate solution) и инкубировали 10-20 мин при 37⁰С, при этом только те лунки, которые содержат исследуемые маркеры, изменяли цвет в зависимости от концентрации маркера в сыворотке;

- после инкубации добавляли 50 мкл Stop Solution и изменившие свой цвет лунки, вновь меняли его на желтый (рисунок 15);

- данные изменения цвета измеряли в системе Evolis спектрофотометрически при длине волны 450 нм ± 10 нм, где концентрация маркеров в исследуемых образцах определялась путем сравнения оптической плотности образцов со стандартными калибровочными образцами.

Оценка результата проводится по истечении времени исследования, указанного в протоколах проведения анализа, с сохранением в виде файлов в памяти сервера роботизированной системы.

2.4 Статистические методы

Обработка полученных результатов статистическими методами проводилась с использованием программы STATISTICA v8.0. (StatSoft) с расчетом для каждого показателя биомаркеров среднего значения (M), медианы (Me), стандартного отклонения (SD) и межквартильного размаха (Q25-Q75).



Рисунок 14 - ИФА-роботизированная система Evolis от BioRad

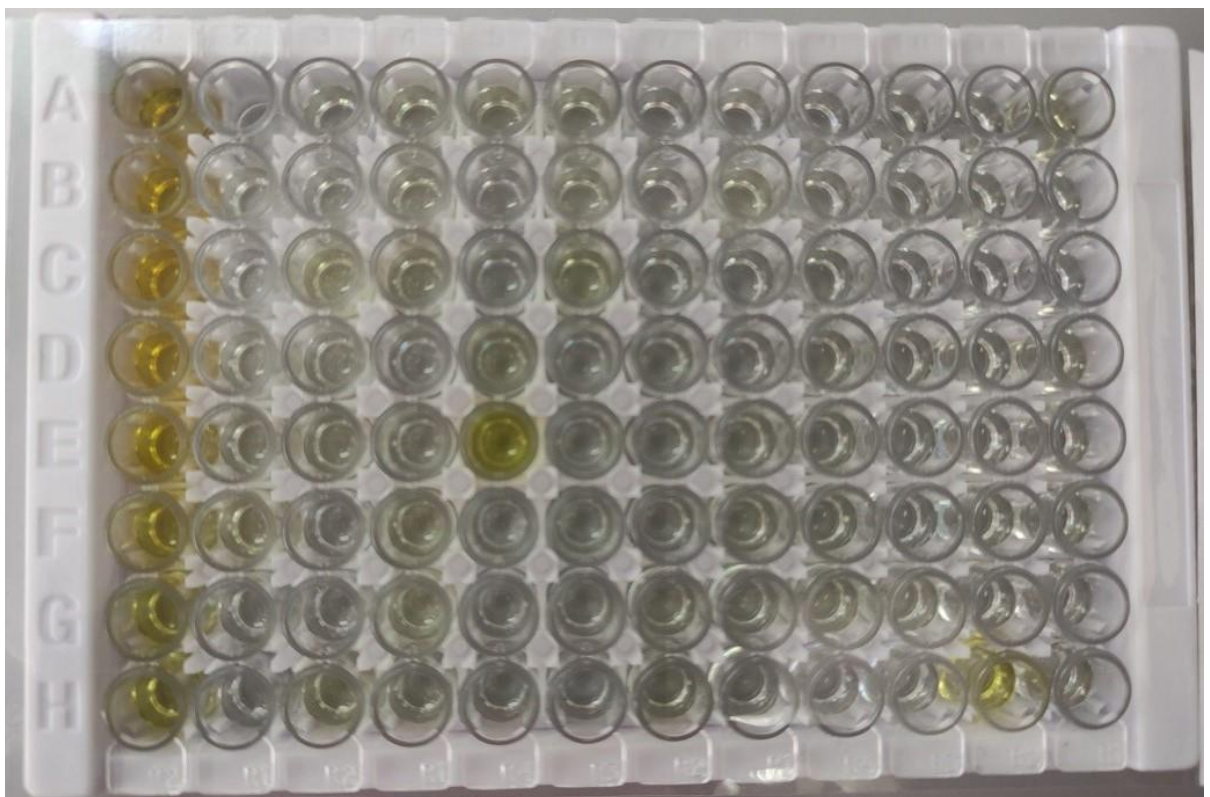


Рисунок 15 - Микропланшет для ИФА. Лунки, которые содержат исследуемые маркеры, изменяли цвет на желтый, интенсивность зависит от концентрации маркера в сыворотке

Проверка статистических гипотез для зависимых групп (между значениями маркеров до операции и после нее на 3-е сутки в каждой из групп) проводилась с помощью непараметрического Т-критерия Уилкоксона. Для независимых групп проверка статистических гипотез для количественных показателей осуществлялась с помощью непараметрических критериев Манна – Уитни (при сравнении 2-х групп) и Краскела-Уоллиса (для множественных сравнений), для качественных показателей использовался критерий хи-квадрат Пирсона и точный критерий Фишера. Для выявления корреляционной взаимосвязи рассчитан коэффициент корреляции Спирмена. Для определения оптимальных пороговых значений маркеров транслокации в программе MedCalc (MedCalc Software Ltd) построены ROC-кривые и определен J-индекс Юдена. Для анализа ПЦР амплификации и для построения сигмоидных кривых использовались пакеты qpcR и pcr в R statistics (v.3.6.3) [197]. При этом $\alpha=0,05$, $1-\beta=80\%$. Статистически значимыми считались результаты при $p < 0,05$.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ДЕТЕКЦИИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ТРАНСЛОКАЦИИ В МЕЗЕНТЕРИАЛЬНЫХ ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛАХ ПАЦИЕНТОВ С КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ

3.1 Культура мезентериальных лимфатических узлов

В результате микробиологического исследования мезентериальных лимфатических узлов в 6 из 20 МЛУ был обнаружен рост бактерий (30,0%) (рисунок 16).



Рисунок 16 – Рост бактерий на плотной питательной среде (кровяной агар с 5%-ным содержанием бараньей крови) после инкубации в течение 24 часов при температуре 37°C

Во всех 6-и случаях с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии были выявлены бактерии порядка *Enterobacterales*, среди которых преобладали микроорганизмы родов *Escherichia* – 5 образцов (83,3%) и *Klebsiella* - 1 образец (16,7%) (рисунки 17 и 18). O'Boyle et al. при микробиологическом исследовании МЛУ у 448 хирургических пациентов в 15,4% обнаружили БТ, при этом 77% культивированных микроорганизмов оказались типичными для кишечной флоры - бактерии семейства Enterobacteriaceae (в большей степени *E. coli*, в меньшей *Klebsiella* и *Shigella*) [61].

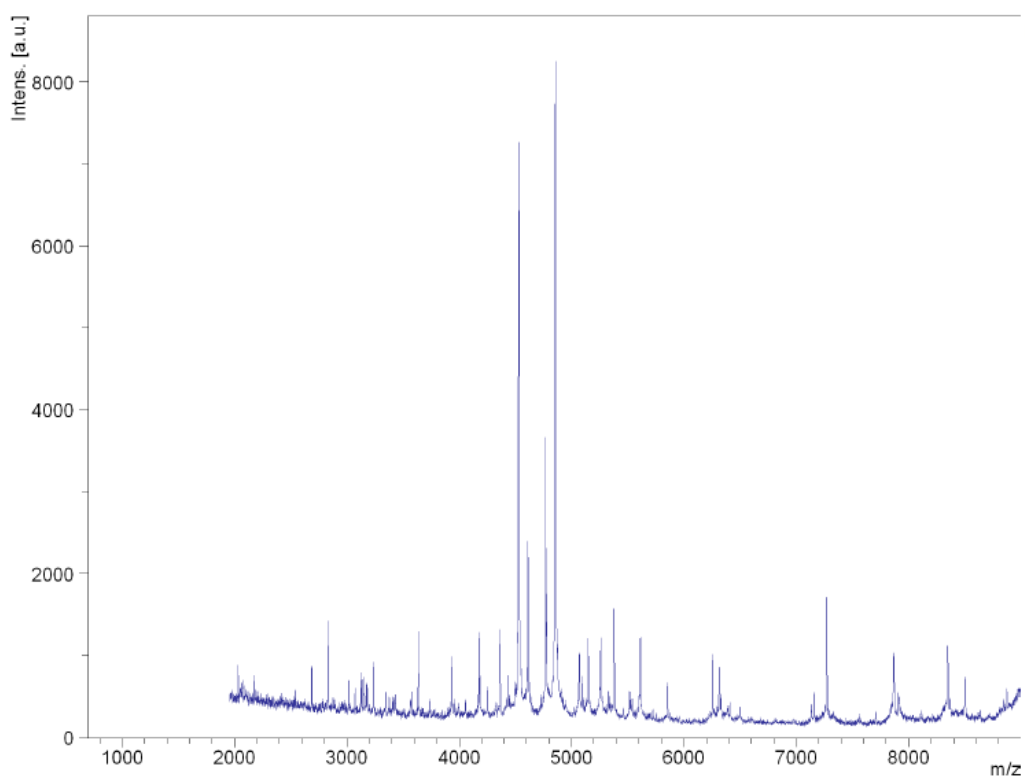


Рисунок 17 – Результаты MALDI-TOF MS, соответствующие детекции бактерий *Escherichia coli* (Intens. – интенсивность пика, m/z – отношение массы к заряду)

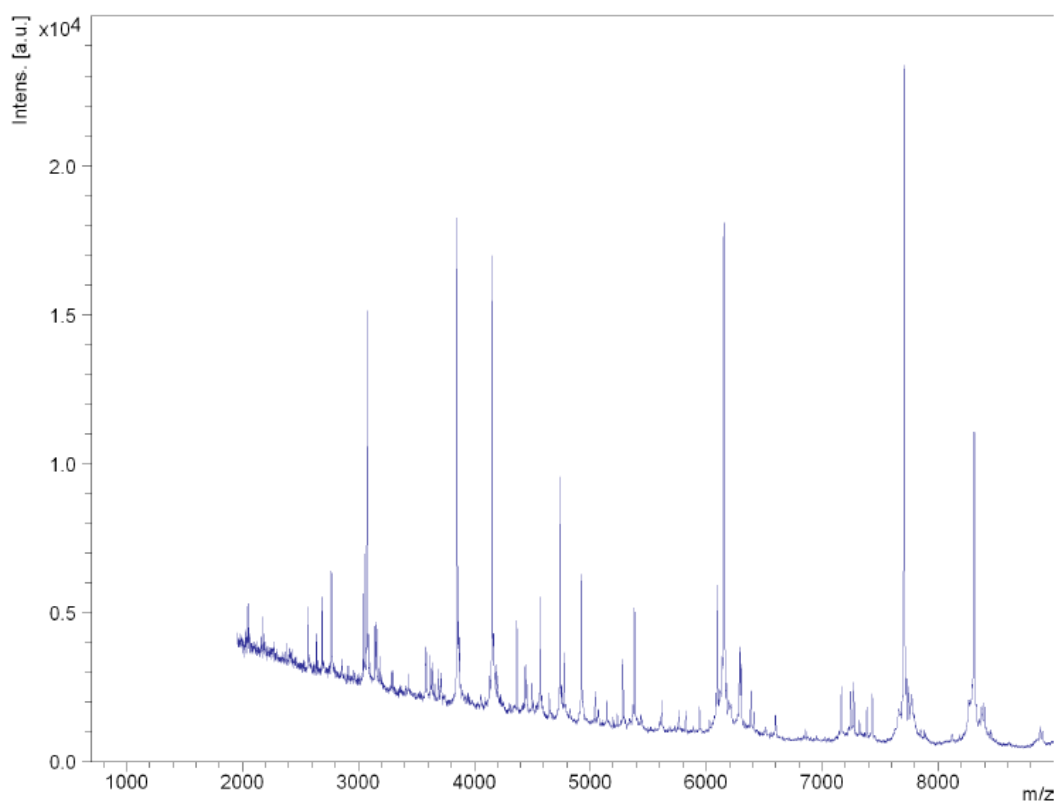


Рисунок 18 – Результаты MALDI-TOF MS, соответствующие детекции бактерий *Klebsiella* (Intens. – интенсивность пика, m/z – отношение массы к заряду)

Но так как культура МЛУ обнаруживает только жизнеспособные бактерии, и для обнаружения небольшого количества микроорганизмов в МЛУ необходимо усиливать рост бактерий с помощью триптиказо-соевого бульона, нами проведено ПЦР-исследование МЛУ на наличие бактериальной 16s rRNA.

3.2 Определение 16S rRNA в мезентериальных лимфатических узлах

3.2.1 Качественное определение наличия микроорганизмов в МЛУ

Оценка результатов качественного определения наличия бактериальной ДНК в МЛУ проводилась по величине порогового цикла кривой амплификации согласно разработанной методике «Детекция микроорганизмов в мезентериальных лимфатических узлах молекулярно-генетическим методом у пациентов с колоректальным раком» (свидетельство о внесении сведений в государственный реестр прав на объекты охраняемые авторским правом №19250 от 8 июля 2021г., приложение Ж) (рисунок 19).

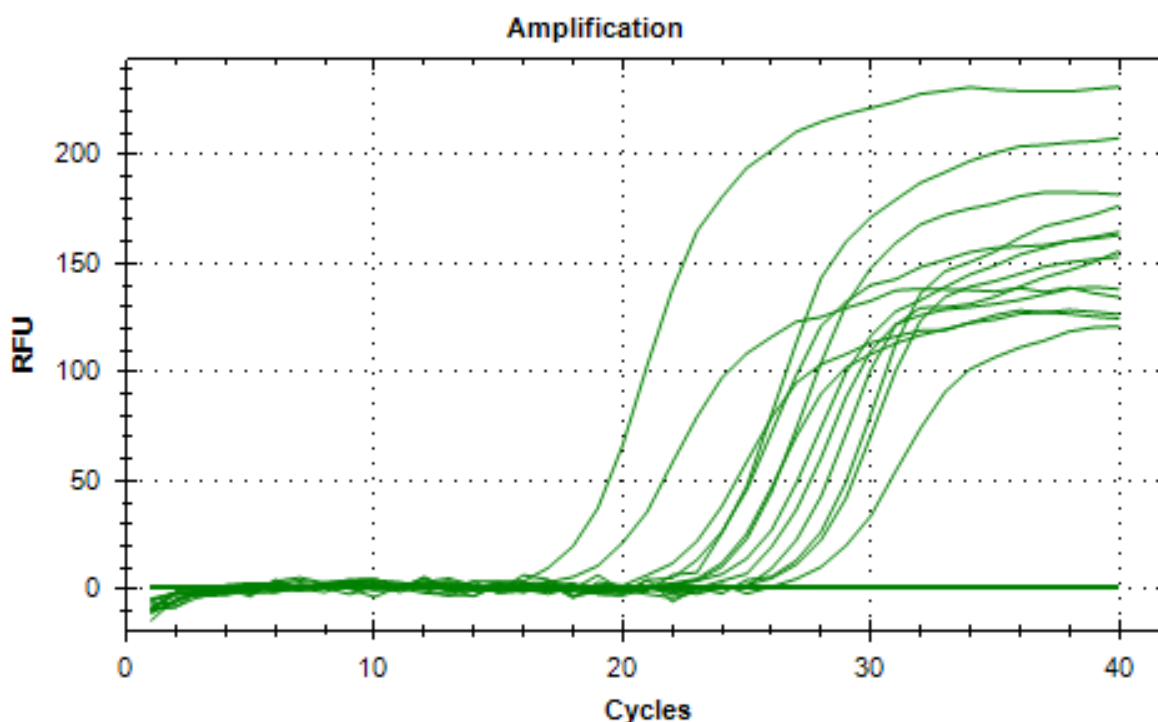


Рисунок 19 - Графики амплификации тестируемых образцов на этапе качественного определения наличия микроорганизмов в МЛУ (RFU - относительная единица флуоресценции, Cycles - циклы амплификации)

Повышение уровня флуоресценции наблюдалось на 18-29 циклах для КОЕ 10^8 - 10^2 соответственно. Кривые амплификации положительного контроля и образцов МЛУ отличаются, что скорее всего связано с присутствием ингибирующих амплификацию ДНК элементов, в отличие от чистой культуры, разведенной в физиологическом растворе. С целью определения накопления специфического продукта и дополнительного изучения ампликонов были

построены кривые плавления (melt curve) при ступенчатом изменении температуры (рисунок 20) [188,189].

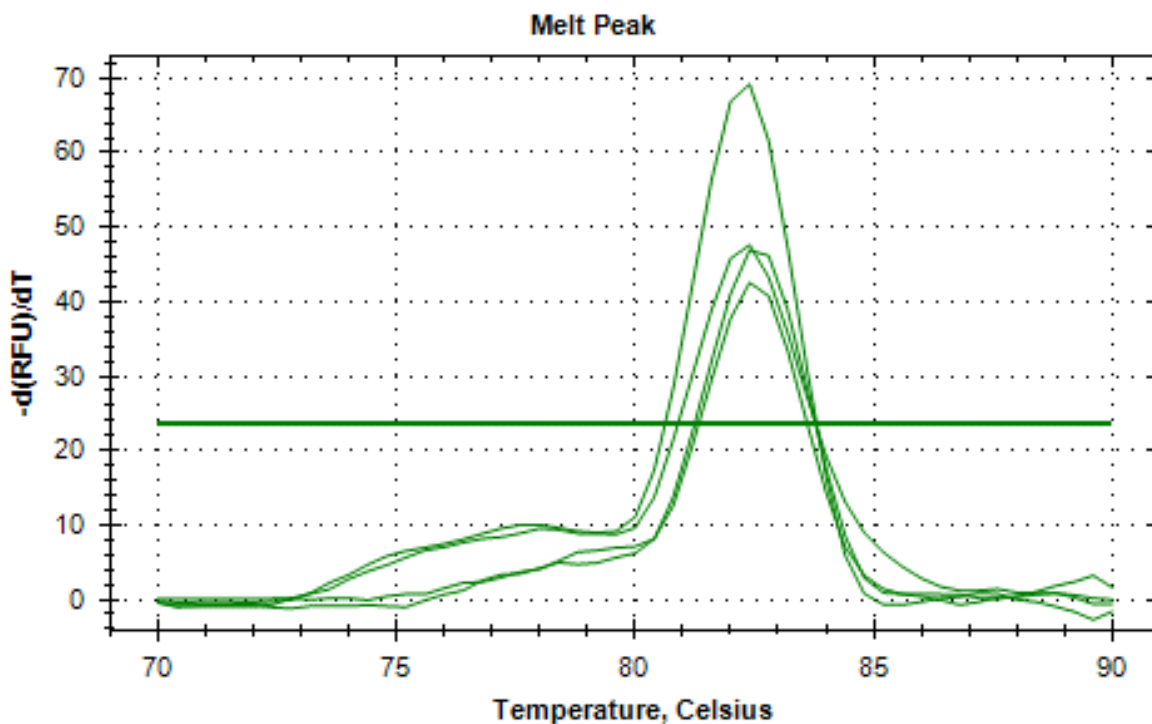


Рисунок 20 - Кривые плавления в тестируемых образцах в образцах *E. coli* тканями мезентериальных лимфатических узлов на этапе качественного определения наличия микроорганизмов в МЛЮ (Temperature, Celsius – температура в градусах Цельсия, $d(RFU)/dT$ - отрицательная скорость изменения относительной единицы флуоресценции при изменении температуры)

3.2.2 Количественное определение наличия микроорганизмов в МЛЮ

По разработанной методике «Количественное определение микроорганизмов в мезентериальных лимфатических узлах при колоректальном раке методом полимеразной цепной реакции» (свидетельство о внесении сведений в государственный реестр прав на объекты охраняемые авторским правом №22807 от 10 января 2022г., приложение И) после проведения ПЦР амплификации значения флуоресценции для трех групп были импортированы в среду R statistics (v.3.6.3) с целью анализа. Использовались пакеты qpcR и rsg для построения сигмоидных кривых (рисунок 21) [197].

На рисунке 22 представлена кривая стандартов ПЦР первой группы калибровки (взвесь *E. coli* в физиологическом растворе), на рисунке 23 второй группы калибровки (взвесь *E. coli* с тканями МЛЮ). На графиках заметно, что в соответствии с КОЕ/мл подъемы кривой амплификации первой группы отмечаются на более ранних циклах (8 цикл), чем во второй группе (12 цикл), что скорее всего связано с наличием ингибирующих амплификацию ДНК соединений, а также с неспецифическим связыванием праймеров с ДНК МЛЮ.

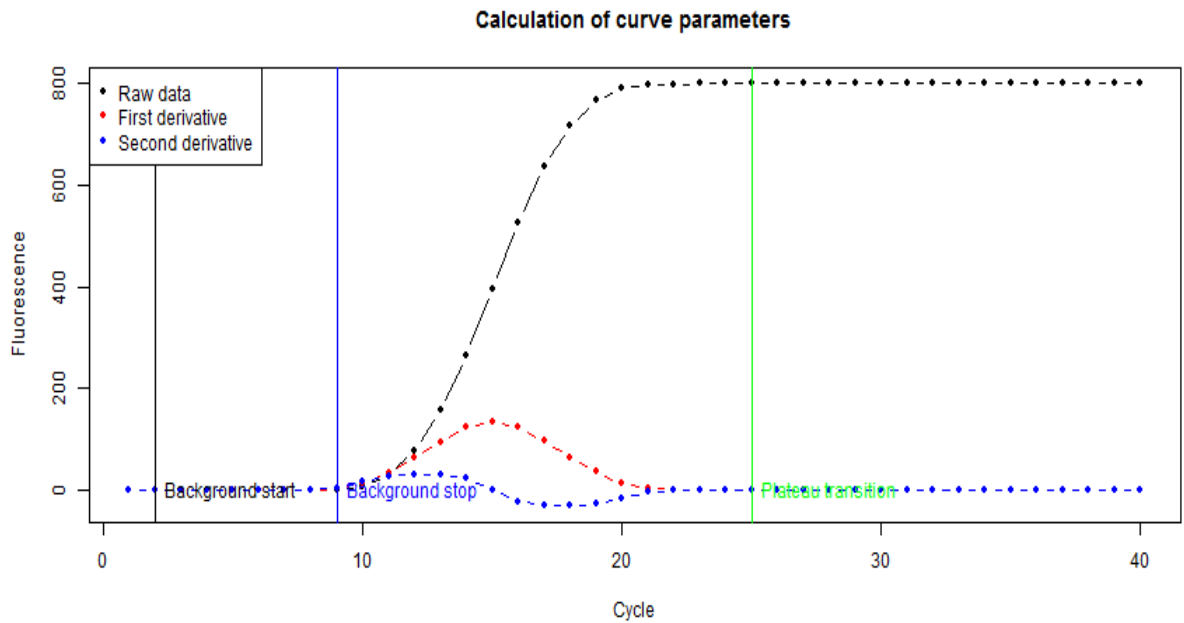


Рисунок 21 - График амплификации на основе сигмоидной модели с 4 параметрами и рассчитанные пороговые циклы на основе производной нелинейной модели, а также эффективность амплификации. (Первая производная – красная линия, вторая производная – синяя линия, график амплификации - черная линия)

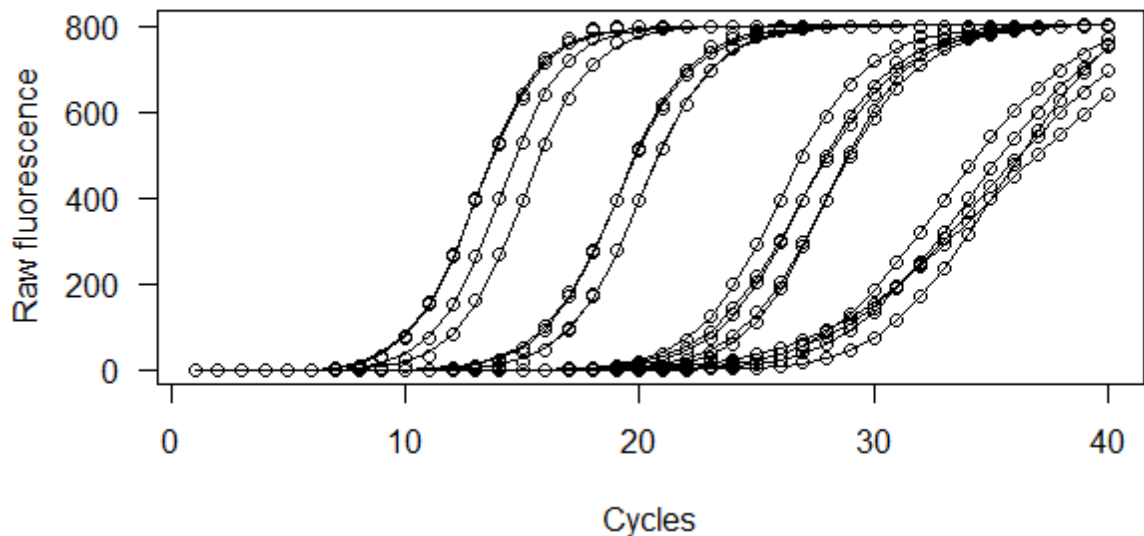


Рисунок 22 – Графики амплификации образцов *E. coli* с КОЕ/мл 10^2 , 10^4 , 10^6 , 10^8 в физиологическом растворе (Raw fluorescence - относительная единица флуоресценции, Cycles - циклы амплификации)

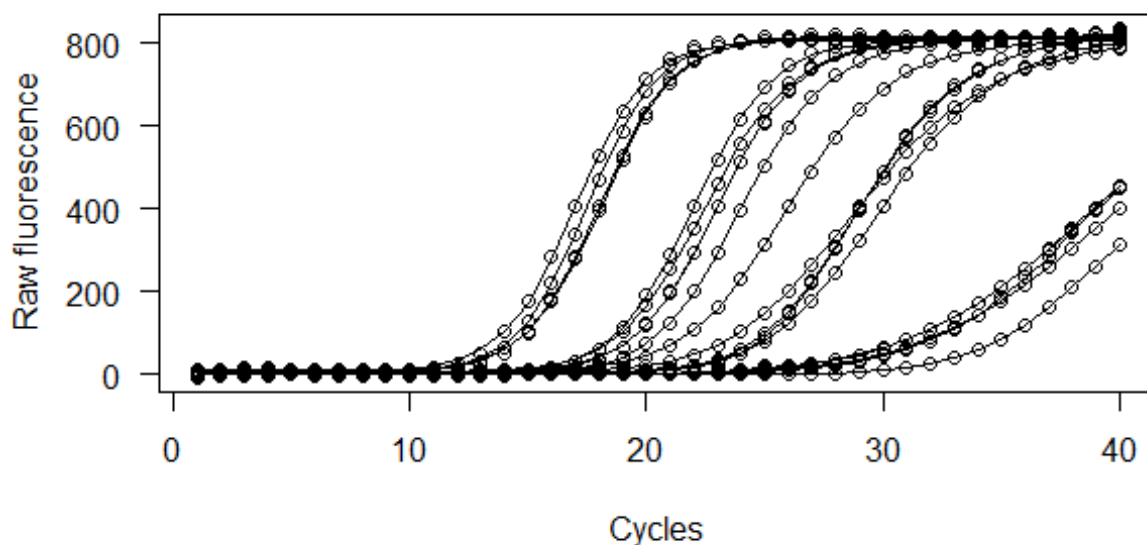


Рисунок 23 – Графики амплификации образцов *E. coli* с КОЕ/мл 10^2 , 10^4 , 10^6 , 10^8 с тканями мезентериальных лимфатических узлов (Raw fluorescence - относительная единица флуоресценции, Cycles - циклы амплификации)

После оценки графиков амплификации, используя данные средних значений пороговых циклов (Ct) первой и второй групп (таблицы 6) в подгруппах с различными КОЕ/мл (от 10^8 до 10^2 КОЕ/мл) были составлены графические кривые стандартов ПЦР. Для оценки зависимости логарифма КОЕ/мл бактерий от значения порогового цикла амплификации, т.е. для количественного определения содержания бактерий в МЛУ, разработана модель в виде уравнения (рисунки 24 и 25).

Таблица 6 – Данные о средних значениях пороговых циклов в первой и второй группах

Подгруппы, КОЕ/мл	Lg(КОЕ/мл)	M (Ct)	SD (Ct)
Группа <i>E. coli</i> с КОЕ/мл от 10^2, 10^4, 10^6, 10^8 в физиологическом растворе			
10^2	2	34,885	0,986
10^4	4	27,024	1,086
10^6	6	19,694	0,475
10^8	8	13,836	0,639
Группа <i>E. coli</i> с КОЕ/мл от 10^2, 10^4, 10^6, 10^8 совместно с тканью МЛУ			
10^2	2	39,235	0,87
10^4	4	29,002	0,89
10^6	6	23,211	1,11
10^8	8	17,899	1,3

Примечание - M (Ct) – среднее значение пороговых циклов; SD (Ct) – стандартное отклонение пороговых циклов; Lg – десятичный логарифм.

$$y = -3,6269x + 42,285$$

$$R^2 = 0,9871$$

Кривая стандартов ПЦР (*E. coli* с физ.раствором)

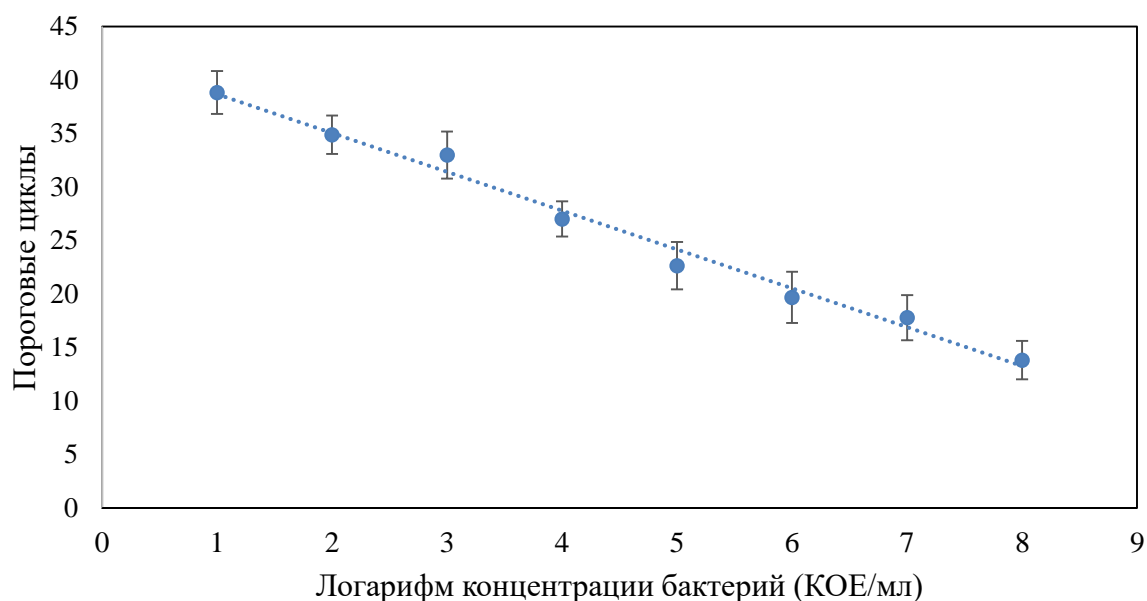


Рисунок 24 – Кривая стандартов ПЦР в группе *E. coli* с КОЕ/мл от 10^2 до 10^8 в физиологическом растворе ($y =$ – уравнение линейной регрессии согласно разработанной математической модели, R^2 - коэффициент детерминации)

$$y = -3,8835x + 46,394$$

$$R^2 = 0,9857$$

Кривая стандартов ПЦР (*E. coli*+МЛУ)

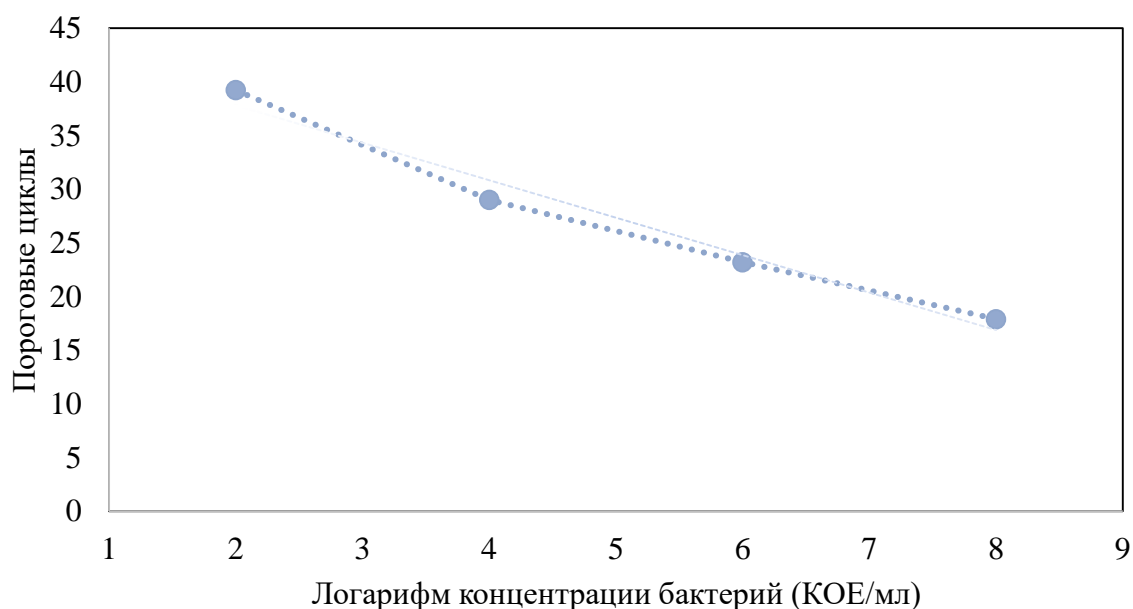


Рисунок 25 – Кривая стандартов ПЦР в группе *E. coli* с КОЕ/мл от 10^2 до 10^8 совместно с тканью мезентериальных лимфатических узлов ($y =$ – уравнение линейной регрессии согласно разработанной математической модели, R^2 - коэффициент детерминации)

Кривые амплификации, значения пороговых циклов и эффективность ПЦР взвеси чистой культуры *E. Coli* и МЛУ с добавлением *E. coli* отличаются, что связано с наличием ингибирующих амплификацию ДНК соединений и с неспецифическим связыванием праймеров с ДНК МЛУ. Большинство исследований по определению 16s rRNA бактерий было сосредоточено на изучении материалов, содержащих относительно большое количество микроорганизмов и небольшое количество человеческих клеток, это: фекалии, оральные и вагинальные мазки [145]. В то же время мезентериальные лимфатические узлы содержат достаточно низкую концентрацию микроорганизмов (low biomass biospecimens). Несколько исследователей сообщили, что при преобладании человеческой ДНК в образце праймеры 16s рРНК могут взаимодействовать с областью внутри митохондриальной ДНК человека, и она может быть амплифицирована этими праймерами [198,199].

Поэтому для изучения транслокации микроорганизмов в МЛУ (рисунок 25) нами была использована математическая модель второй группы калибровки (взвесь *E. coli* и МЛУ) [200,201]:

$$y = -3,8835x + 46,394.$$

В результате ПЦР-диагностики исследуемых образцов МЛУ у пациентов с неопухолевой ОКН ПЦР-результат был отрицательный во всех 5 случаях, тогда как у пациентов с КРР из 53 МЛУ в 7 лимфоузлах была найдена микробиологическая флора (рисунок 26).

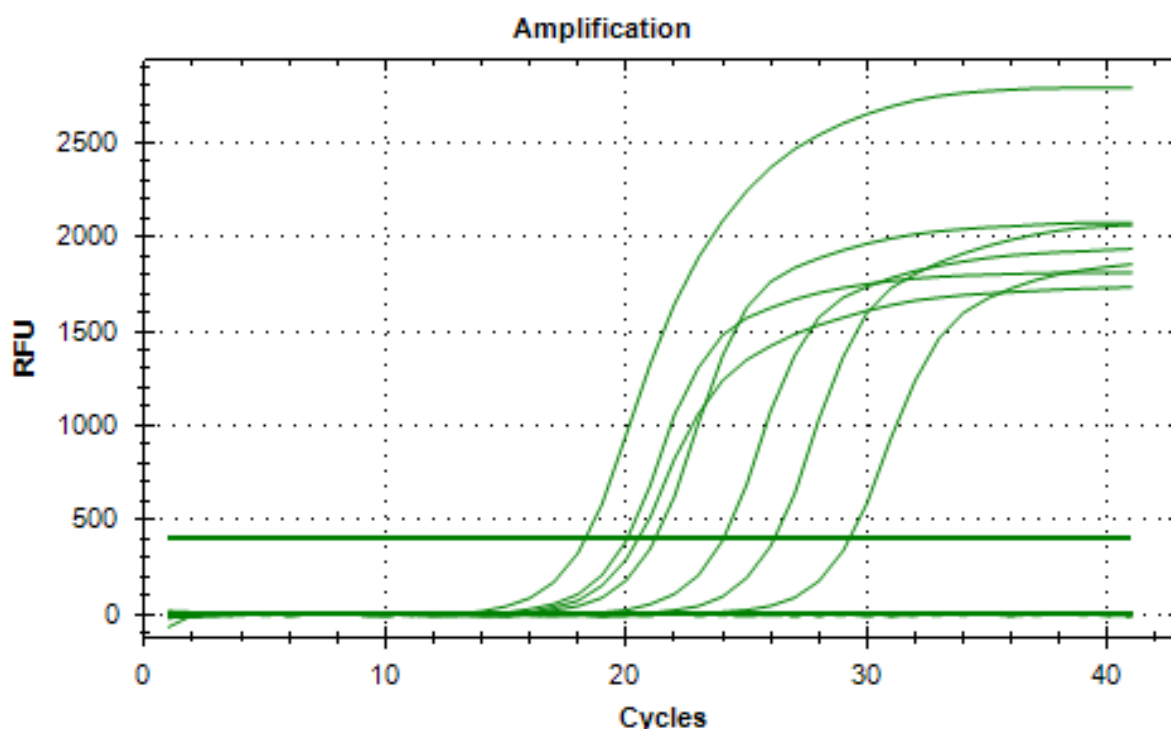


Рисунок 26 -Графики амплификации образцов МЛУ пациентов с КРР с положительным результатом ПЦР (RFU - относительная единица флуоресценции, Cycles - циклы амплификации)

С целью определения накопления специфического продукта (бактериальной ДНК) и дополнительного изучения ампликонов были построены кривые плавления при ступенчатом изменении температуры (от 70⁰С до 90⁰С с шагом 0,4⁰С). Использованные праймеры 16S rRNA специфичны для бактерий, поэтому стерильные лимфоузлы не показали пика на "melt curve". Согласно анализу "melt curve", о накоплении специфического продукта свидетельствует температура плавления от 78,8⁰С до 82,8⁰С (рисунок 27).

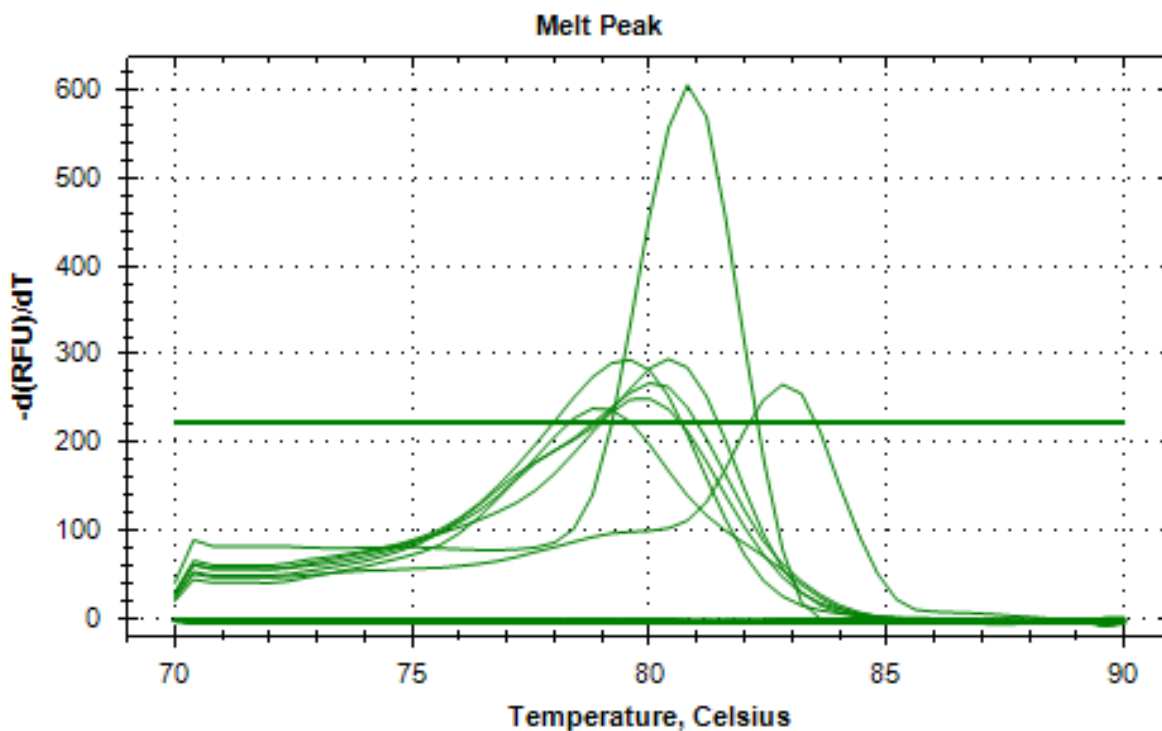


Рисунок 27 - Кривые плавления в образцах МЛУ пациентов с КРР с положительным результатом ПЦР (Temperature, Celsius – температура в градусах Цельсия, d(RFU)/dT - отрицательная скорость изменения относительной единицы флуоресценции при изменении температуры)

Температура плавления одного образца совпадала с кривыми для *E. coli* (82,8⁰С), в оставшихся образцах отмечалось наличие других видов микроорганизмов, так как ампликоны имели другие характеристики: другие температура плавления и RFU (относительная единица флуоресценции) (таблица 7, рисунок 27). Согласно разработанной математической модели, в МЛУ с положительным результатом ПЦР было рассчитано приблизительное содержание бактерий, оно составило от 10⁴ до 10⁷ КОЕ/мл.

Таблица 7 – Данные о значениях пороговых циклов амплификации и температуры плавления у образцов с положительным результатом ПЦР

№ исследуемого образца	Значение порогового цикла амплификации (Cq)	Температура плавления	Относительная единица флуоресценции (RFU)	КОЕ/мл, рассчитанное согласно математической модели
30	29,25	82,8	265,91	$\approx 10^4$
32	20,49	78,8	238,82	$\approx 10^7$
35	20,04	80,0	250,09	$\approx 10^7$
43	24,03	80,4	294,78	$\approx 10^6$
45	26,14	80,0	267,58	$\approx 10^5$
58	21,19	79,6	293,87	$\approx 10^6$
102	18,29	80,8	604,42	$\approx 10^7$

Таким образом, детекция 16s rRNA бактерий в МЛУ с помощью ПЦР-методики, как прямой метод исследования БТ, дал положительный результат всего в 13,2%, что связано с ограничением метода при низком уровне КОЕ микроорганизмов в мезентериальных лимфатических узлах. К тому же наличие микроорганизмов в МЛУ не всегда вызывает SIRS, инфекционно-воспалительные осложнения и органные дисфункции, так как бактерии могут быть инактивированы иммунными клетками МЛУ, не попадая в системный кровоток.

Для определения риска возникновения SIRS, инфекционно-воспалительных осложнений, органных дисфункций и летального исхода большее значение имеет бактериальная транслокация в системный кровоток и определение в нем соответствующих маркеров (LBP, sCD14-ST), чему посвящены следующие главы диссертации.

4 РЕЗУЛЬТАТЫ ДЕТЕКЦИИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ТРАНСЛОКАЦИИ В СИСТЕМНОМ КРОВОТОКЕ У ПАЦИЕНТОВ С КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ

4.1 Динамика уровня LBP в сыворотки крови до и на 3-и сутки после операции в исследуемых группах

В таблице 8 представлены статистические показатели уровня LBP до операции и на 3-и сутки после нее для каждой исследуемой группы.

Таблица 8 – Статистические показатели уровня LBP (нг/мл) в исследуемых группах

Группа / Маркер	Me	Q25-Q75	Z	p
КРР без ОКН				
LBP до операции (нг/мл)	971,4	816,9-1277,5	1,149	0,251
LBP на 3-и сутки после операции (нг/мл)	897,9	712,5-1220,9		
Опухолевая ОКН				
LBP до операции (нг/мл)	1164,4	826,4-1509,7	3,126	0,002
LBP на 3-и сутки после операции (нг/мл)	890,9	703,2-1213,7		
Неопухолевая ОКН				
LBP до операции (нг/мл)	1015,1	486,4-1543,3	0,339	0,734
LBP на 3-и сутки после операции (нг/мл)	1180,0	687,1-1392,3		
Примечание - Z- значение критерия Уилкоксона; p – уровень значимости; Me – медиана; Q25-Q75– нижний и верхний квартили.				

Различий в уровне LBP до операции и на 3-и сутки после нее между исследуемыми группами выявлено не было ($p=0,387$ и $p=0,692$, соответственно). По изменениям уровня LBP в динамике статистическая разница была выявлена только в группе опухолевой ОКН ($p=0,002$). В данной группе наблюдалось в 4 раза большее снижение уровня LBP в динамике, чем в группе КРР без ОКН, в то время как в группе неопухолевой ОКН в динамике LBP повысился. Данные отличия также подтвердились при сравнении изменений уровня LBP в динамике на 3-и сутки после операции от исходных значений ($H=6,388$, $p=0,041$, рисунок 28, таблица 9).

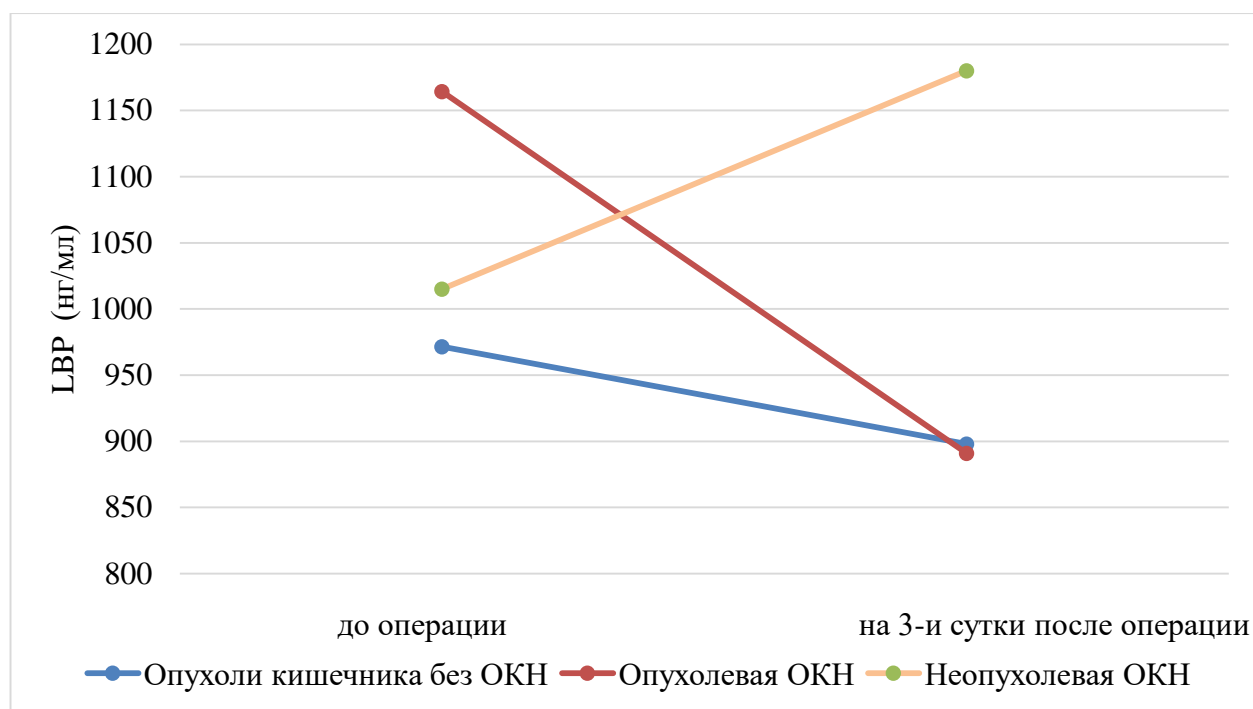


Рисунок 28 – Динамика уровня LBP (нг/мл) до оперативного вмешательства и на 3-и сутки после него в исследуемых группах

Таблица 9 – Статистические показатели изменений уровня LBP в динамике на 3-и сутки после операции в исследуемых группах (нг/мл)

Группа / Маркер	Me	Q25-Q75	H	p-level		
КРР без ОКН						
Разница LBP (3-и сутки - до операции) (нг/мл)	-55,3	-339,1-203,5	6,388	0,041		
Опухолевая ОКН						
Разница LBP (3-и сутки - до операции) (нг/мл)	-239,5	-444,9- -67,33				
Неопухолевая ОКН						
Разница LBP (3-и сутки - до операции) (нг/мл)	181,1	-336,6-351,0				
Примечание - H - значение критерия Краскела-Уоллиса; p – уровень значимости; Me – медиана; Q25-Q75 – нижний и верхний квартили.						

В группе КРР без ОКН обнаружено статистически значимое различие в уровне LBP на 3-и сутки после операции у пациентов с наличием/отсутствием органических дисфункций ($Z=2,442$, $p=0,015$). У пациентов с органическими дисфункциями в этой группе уровень LBP на 3-и сутки после операции был на 27% ниже, чем у пациентов без органических дисфункций (таблица 10). По наличию/отсутствию признаков SIRS, осложнений статистических различий найдено не было.

Таблица 10 - Статистические показатели уровня LBP до операции и на 3-и сутки после нее в группе KPP без ОКН

Признак		Me	Q25-Q75	Z	p-level
LBP до операции (нг/мл)					
SIRS	-	1056,4	915,7-1271,8	-1,189	0,234
	+	896,7	618,6-1458,3		
Осложнения	-	1056,4	816,9-1458,3	-1,417	0,156
	+	896,7	618,6-1111,7		
Органые дисфункции	-	1056,4	823,0-1390,5	1,795	0,073
	+	896,7	528,2-945,9		
Летальность	-	984,8	823,0-1277,5	-	-
	+	528,20 (1 пациент)	-		
LBP на 3-и сутки после операции (нг/мл)					
SIRS	-	945,9	712,5-1543,1	-1,389	0,165
	+	786,2	700,2-1034,4		
Осложнения	-	898,7	712,5-1407,4	-1,136	0,256
	+	773,9	700,2-1034,4		
Органые дисфункции	-	927,4	767,7-1271,8	2,442	0,015
	+	675,6	552,8-700,2		
Летальность	-	898,7	743,2-1220,9	-	-
	+	700,2 (1 пациент)	-		
Примечание - Z- значение критерия Манна-Уитни; p – уровень значимости; Me – медиана; Q25-Q75 – нижний и верхний квартили.					

В группе опухолевой ОКН уровень LBP на 3-и сутки у пациентов с SIRS был в 1,4 раза, с послеоперационными инфекционно-воспалительными осложнениями в 1,9 раза, с органными дисфункциями в 1,8 раза, с летальностью в 1,5 раза ниже, чем у пациентов с их отсутствием ($p=0,011$, $p=0,001$, $p=0,007$ и $p=0,018$, соответственно) (таблица 11, рисунок 29). По уровню LBP до операции статистических различий не было найдено.

Таблица 11 - Статистические показатели уровня LBP до операции и на 3-и сутки после нее в группе опухолевой ОКН

Признак		Me	Q25-Q75	Z	p-level
1		2	3	4	5
LBP до операции (нг/мл)					
SIRS	-	1244,1	905,8-1543,3	1,219	0,223
	+	1013,4	810,7-1392,3		
Осложнения	-	1241,3	866,0-1509,7	1,287	0,198
	+	945,8	730,9-1392,3		
Органые дисфункции	-	1207,8	845,38-1526,5	0,913	0,361
	+	979,6	776,4-1341,8		
Летальность	-	1207,8	845,4-1526,5	1,183	0,237
	+	979,6	596,3-1341,8		

Продолжение таблицы 11

1	2	3	4	5	
LBP на 3-и сутки после операции (нг/мл)					
SIRS	-	1074,8	847,6-1308,4	-2,546	0,011
	+	792,3	536,8-1062,5		
Осложнения	-	1074,8	838,7-1295,9	3,317	0,001
	+	566,5	528,2-812,0		
Органые дисфункции	-	1019,1	795,4-1266,3	2,689	0,007
	+	551,6	532,5-807,1		
Летальность	-	1019,1	789,2-1266,3	2,367	0,018
	+	679,4	532,5-817,0		

Примечание - Z- значение критерия Манна-Уитни; p – уровень значимости; Me – медиана; Q25-Q75 – нижний и верхний квартили.

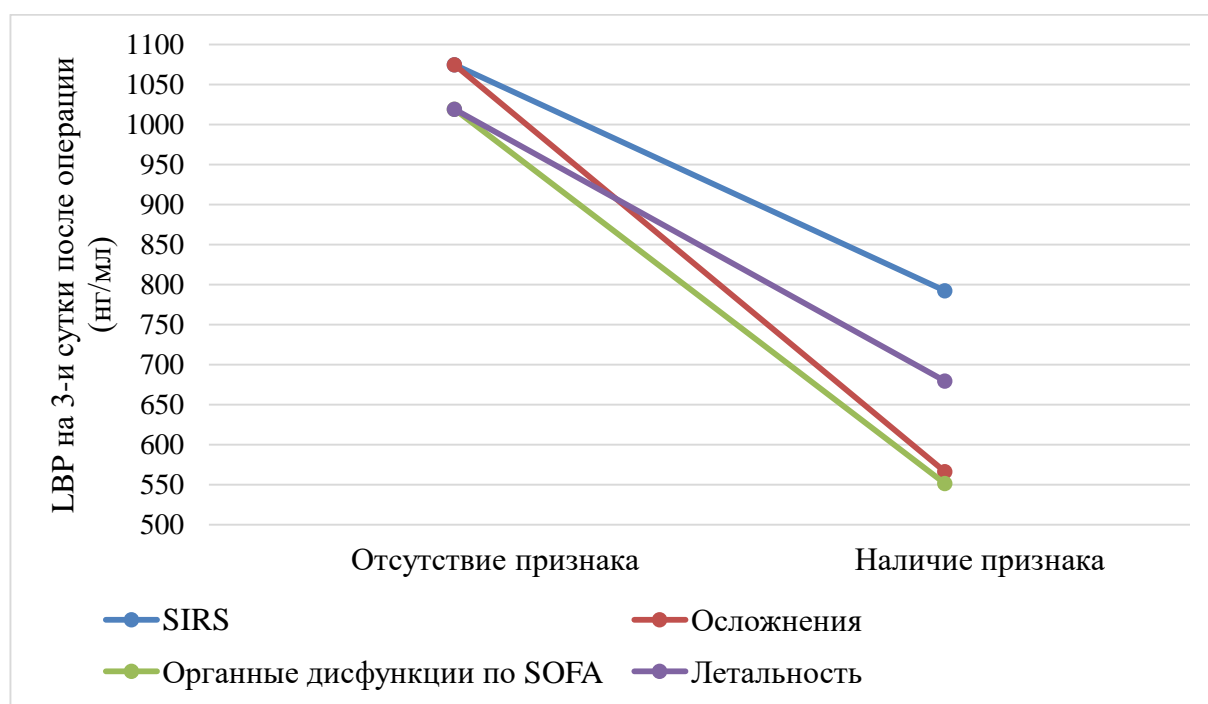


Рисунок 29 – Уровень LBP на 3-и сутки после операции в группе опухолевой ОКН у пациентов с наличием или отсутствием таких признаков, как: SIRS, послеоперационные инфекционно-воспалительные осложнения, органые дисфункции и летальность

В группе неопухолевой ОКН различий в уровне LBP как до операции, так и на 3-и сутки после нее в зависимости от наличия/отсутствия SIRS, послеоперационных инфекционно-воспалительных осложнений, органых дисфункций и летальности статистических различий не выявлено (таблица 12).

Oral S.M. et al. обнаружили, что у пациентов с сепсисом уровни LBP были повышены по сравнению с нормальными значениями, тем не менее у пациентов с менее повышенным уровнем LBP наблюдались значительно худшие результаты. Исследователи пришли к выводу, что пациенты с быстро прогрессирующим сепсисом не могут адекватно синтезировать LBP, тем самым, не успевая адекватно отреагировать на какую-либо системную

микробную инфекцию [202]. Также наличие низкого уровня эндотоксина (ЛПС) у пациентов с хроническим заболеванием приводит к постоянному состоянию вялотекущего воспаления, препятствующего нормальному процессу заживления, что может объяснить высокую частоту послеоперационных осложнений у пациентов с хроническими заболеваниями, в том числе у пациентов с КРР. У оперированных больных с КРР и опухолевой ОКН снижение уровня ЛВР возможно вследствие иммунодефицита и неспособности вырабатывать адекватный иммунный ответ на инфекционные стимулы, что может приводить к возникновению инфекционно-воспалительных осложнений, органических дисфункций, сепсису и даже летальному исходу [203-205].

Таблица 12 - Статистические показатели уровня ЛВР до операции и на 3-и сутки после нее в группе неопухолевой ОКН

Признак		Me	Q25-Q75	Z	p-level
ЛВР до операции (нг/мл)					
SIRS	-	1040,3	433,6-1820,9	-0,778	0,437
	+	848,3	640,7-1081,0		
Осложнения	-	1023,8	486,5-1685,2	-0,529	0,597
	+	858,0	838,5-1081,0		
Органные дисфункции	-	1040,3	433,6-1614,2	0,749	0,454
	+	739,6	640,7-838,50		
Летальность	-	1031,6	433,6-1614,2	0,250	0,803
	+	931,1	838,5-1023,8		
ЛВР на 3-и сутки после операции (нг/мл)					
SIRS	-	1264,9	691,8-1408,3	-0,933	0,351
	+	766,6	612,9-1209,0		
Осложнения	-	1258,1	687,2-1392,3	-0,529	0,597
	+	780,0	753,1-1209,0		
Органные дисфункции	-	1180,0	691,8-1378,6	-0,083	0,934
	+	1037,7	612,9-1462,5		
Летальность	-	1180,0	654,7-1378,6	-0,166	0,868
	+	1074,8	687,2-1462,5		
Примечание - Z- значение критерия Манна-Уитни; p – уровень значимости; Me – медиана; Q25-Q75 – нижний и верхний квартили.					

В таблице 13 представлены данные по динамике уровня ЛВР в зависимости от стадии опухолевого процесса. В группе КРР без ОКН у пациентов с IV стадией опухолевого процесса уровень ЛВР в динамике снизился более чем в 12 раз по сравнению со II и III стадиями ($Z=-2,296$, $p=0,022$ и $Z=-2,310$, $p=0,021$, соответственно). В группе опухолевой ОКН, таких различий найдено не было: у пациентов с III и IV стадиями снижение ЛВР в динамике практически не отличалось.

Таблица 13 - Статистические показатели изменений уровня LBP в динамике на 3-и сутки после оперативного вмешательства у пациентов с КРР в зависимости от стадии опухолевого процесса (I-IV)

Группа/ Стадия	I	II	III	IV	Z	p-level
КРР без ОКН						
Me	-279,4	24,9	3,6	-304,7	-2,296 и -2,310	0,022 и 0,021
Q25-Q75	-420,7-46,8	-305,2-415,7	-258,0-171,9	-734,3- -187,8		
Опухолевая ОКН						
Me	-98,3 (1 пациент)	-239,5	-318,8	-253,1	-0,457 и -0,623	0,647 и 0,533
Q25-Q75		-282,5- -67,6	-553,5- - 202,6	-581,6-27,6		
Примечание - Z- значение критерия Манна-Уитни (проводилось сравнение II и III степеней с IV степенью попарно в каждой из исследуемых групп); p – уровень значимости; Me – медиана; Q25-Q75 – нижний и верхний квартили.						

В зависимости от степени клеточной дифференцировки опухоли и локализации опухолевого процесса не было найдено различий в динамике уровня LBP до и на 3-и сутки после операции. Однако в группе опухолевой ОКН с инвазией кишечной стенки T3-T4 уровень LBP в динамике снизился более чем в 5 раз, по сравнению с группой КРР без ОКН (Z=-2,109, p=0,035, таблица 14). У пациентов с опухолевой ОКН, помимо изменений в кишечной стенке вследствие наличия самой опухоли и непроходимости кишечника, происходит повышение внутрибрюшного давления. Можно предположить, что динамическое снижение уровня LBP у пациентов с опухолевой ОКН могло быть связано с нормализацией внутрибрюшного давления, устранением обструкции и удалением самой опухоли, что в совокупности и усиливало бактериальную транслокацию.

Таблица 14 - Статистические показатели изменений уровня LBP в динамике на 3-и сутки после операции у пациентов с КРР в зависимости от степени инвазии опухоли в стенку кишки (T1-T4)

Группа	Степень инвазии опухоли в стенку кишки	Me	Q25-Q75	Z	p-level
КРР без ОКН	T2	-236,9	-448,4-297,1	-2,109	0,035
	T3	17,0	-339,1-415,7		
	T4	-55,3	-307,1-152,6		
Опухолевая ОКН	T3	-215,0	-285,2-587,1		
	T4	-285,1	-553,5- -98,3		
Примечание - Z- значение критерия Манна-Уитни (сравнение проводилось между исследуемыми группами по степени инвазии T3 и T4.); p – уровень значимости; Me – медиана; Q25-Q75 – нижний и верхний квартили.					

4.2 Динамика уровня sCD14-ST в сыворотки крови до и на 3-и сутки после операции в исследуемых группах

В таблице 15 представлены статистические показатели уровня sCD14-ST до операции и на 3-и сутки после нее для каждой исследуемой группы.

Таблица 15 – Статистические показатели уровня sCD14-ST (пг/мл) в исследуемых группах

Группа / Маркер	Me	Q25-Q75	Z	p-level
КРР без ОКН				
sCD14-ST до операции (пг/мл)	245,7	167,9-403,4	0,980	0,327
sCD14-ST на 3-и сутки после операции (пг/мл)	227,6	163,5-419,8		
Опухолевая ОКН				
sCD14-ST до операции (пг/мл)	571,7	342,5-990,0	1,680	0,093
sCD14-ST на 3-и сутки после операции (пг/мл)	527,8	305,0-732,5		
Неопухолевая ОКН				
sCD14-ST до операции (пг/мл)	485,2	277,9-771,0	0,627	0,530
sCD14-ST на 3-и сутки после операции (пг/мл)	386,5	185,4-957,0		
Примечание - Z- значение критерия Уилкоксона; p – уровень значимости; Me – медиана; Q25-Q75 – нижний и верхний квартили.				

Сравнение уровня sCD14-ST в динамике до операции и на 3-и сутки после нее не дало статистической разницы ни в одной из исследуемых групп (таблица 15, рисунок 29).

Сравнивая уровень sCD14-ST между исследуемыми группами была выявлена статистическая разница как до операции, так и на 3-и сутки после нее ($H=21,548$, $p=0,0000$ и $H=17,667$, $p=0,0001$, соответственно). У пациентов с КРР без ОКН уровень sCD14-ST до операции был в 1,7 раза ниже и после оперативного вмешательства был в 2,3 раза ниже, в сравнении с группами ОКН (таблица 15, рисунок 30). Это говорит о том, что при возникновении острой кишечной непроходимости, уровень sCD14-ST в сыворотке крови повышается, что свидетельствует об усилении бактериальной транслокации.

Дополнительно, сравнивая между собой группы с опухолевой и неопухолевой ОКН, не было выявлено статистической разницы в уровне sCD14-ST как до, так и на 3-и сутки после операции ($Z=-1,1928$, $p=0,233$ и $Z=-0,7299$, $p=0,465$, соответственно). Данный результат говорит о том, что уровень sCD14-ST не зависит от генеза ОКН.

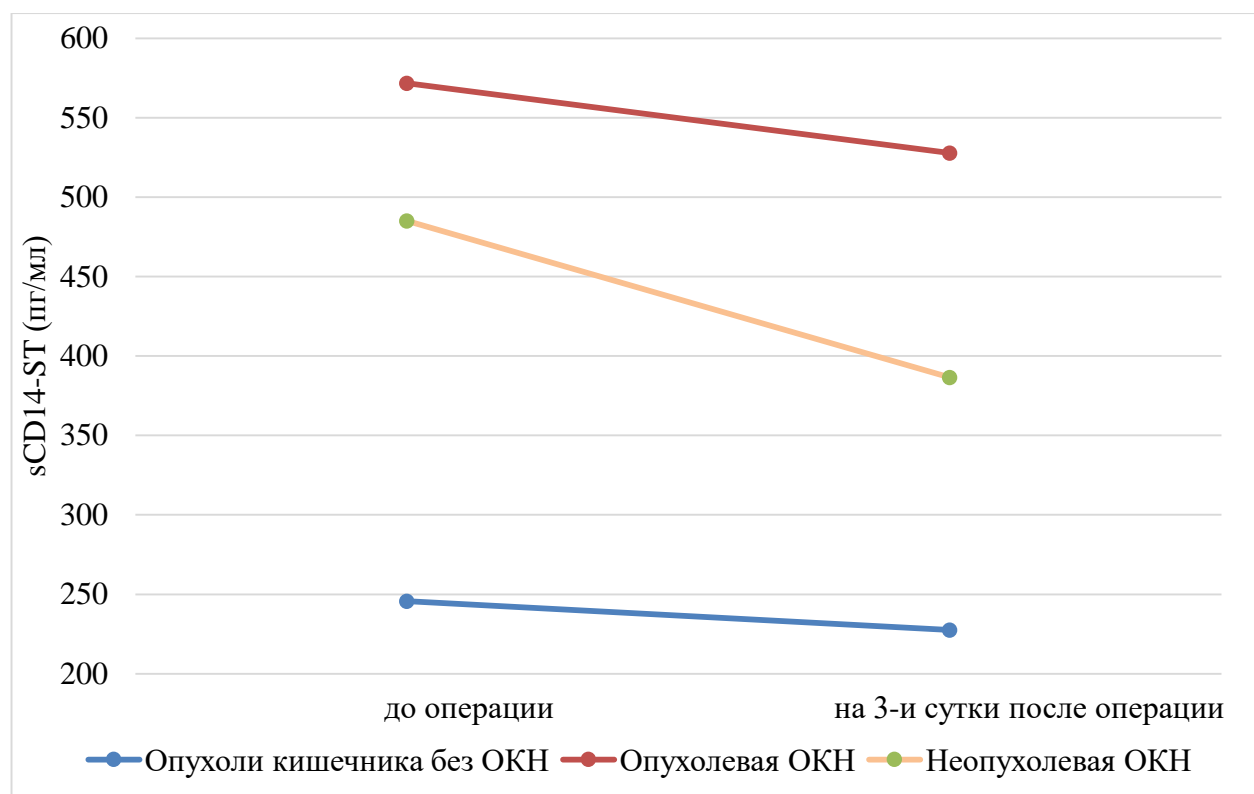


Рисунок 30 – Динамика изменений уровня sCD14-ST (пг/мл) до оперативного вмешательства и на 3-и сутки после него в исследуемых группах

В зависимости от развития SIRS, послеоперационных инфекционно-воспалительных осложнений, летальности статистических различий по уровню и динамике sCD14-ST выявлено не было (таблицы 16-18). В зависимости от наличия/отсутствия органных дисфункций значимое отличие было только в группе КРР без ОКН, где у пациентов с органными дисфункциями sCD14-ST в динамике увеличился на 12%, а у пациентов без органных дисфункций снизился на 7% ($Z=-1,989$, $p=0,047$, таблица 18).

Таблица 16 – Статистические показатели уровня sCD14-ST до операции в исследуемых группах (пг/мл) в зависимости от наличия или отсутствия SIRS, послеоперационных инфекционно-воспалительных осложнений, органных дисфункций, летальности

Группа	Признак		Me	Q25-Q75	Z	P-level
1	2		3	4	5	6
КРР без ОКН	SIRS	-	251,9	197,2-403,4	-0,700	0,484
		+	207,7	134,5-433,1		
	Осложнения	-	247,5	185,6-403,4	-0,644	0,519
		+	207,7	123,7-433,1		
	Органные дисфункции	-	247,5	167,9-403,4	0,792	0,428
		+	198,9	185,6-257,7		
	Летальность	-	243,8	167,9-385,5	-	-
		+	521,5 (1 пациент)	-		

Продолжение таблицы 16

1	2		3	4	5	6
Опухолевая ОКН	SIRS	-	554,3	278,4-990,0	-0,325	0,745
		+	586,9	344,7-990,0		
	Осложнения	-	565,7	344,7-990,0	0,045	0,964
		+	577,6	340,3-976,5		
	Органые дисфункции	-	598,3	311,5-1019,5	0,845	0,398
		+	431,9	358,0-608,1		
Летальность	-	598,3	311,5-1019,5	0,710	0,478	
	+	431,9	358,0-777,0			
Неопухолевая ОКН	SIRS	-	485,2	267,8-852,4	-0,207	0,836
		+	483,4	348,2-557,1		
	Осложнения	-	489,9	277,9-841,1	-0,306	0,760
		+	437,5	348,2-557,1		
	Органые дисфункции	-	485,2	267,8-806,0	0,166	0,868
		+	438,8	348,2-529,3		
Летальность	-	485,2	267,8-767,0	-0,915	0,360	
	+	3252,6	348,2-6157,0			

Примечание - Z- значение критерия Манна-Уитни; p – уровень значимости; Me – медиана; Q25-Q75– нижний и верхний квартили.

Таблица 17 – Статистические показатели уровня sCD14-ST на 3-и сутки после операции в исследуемых группах (пг/мл) в зависимости от наличия или отсутствия SIRS, послеоперационных инфекционно-воспалительных осложнений, органых дисфункций, летальности

Группа	Признак		Me	Q25-Q75	Z	p-level
1	2		3	4	5	6
КРР без ОКН	SIRS	-	215,2	163,5-419,8	0,610	0,542
		+	251,9	153,2-475,2		
	Осложнения	-	203,3	150,3-428,7	1,518	0,114
		+	277,9	225,4-366,8		
	Органые дисфункции	-	229,8	167,9-366,8	-0,226	0,821
		+	225,4	150,3-800,9		
Летальность	-	225,4	163,5-366,8	-	-	
	+	5251,6 (1 пациент)	-			
Опухолевая ОКН	SIRS	-	503,8	269,6-710,1	-0,176	0,860
		+	534,7	353,5-738,9		
	Осложнения	-	503,8	269,6-658,5	-0,772	0,440
		+	534,7	371,2-981,3		
	Органые дисфункции	-	501,6	253,2-756,0	-0,642	0,521
		+	596,6	448,9-732,5		
Летальность	-	501,6	253,2-718,2	-0,812	0,417	
	+	596,6	448,9-860,1			

Продолжение таблицы 17

1	2		3	4	5	6
Неопухолевая ОКН	SIRS	-	334,1	179,8-1016,4	0,311	0,756
		+	518,8	424,8-658,5		
	Осложнения	-	334,3	185,4-1075,7	-0,195	0,846
		+	459,6	424,8-578,0		
	Органые дисфункции	-	341,3	179,8-879,5	-0,998	0,318
		+	828,8	578,0-1079,5		
	Летальность	-	341,3	179,8-879,5	-1,413	0,158
		+	3752,3	578,0-6926,6		
Примечание - Z- значение критерия Манна-Уитни; p – уровень значимости; Me – медиана; Q25-Q75– нижний и верхний квартили.						

Таблица 18 – Статистические показатели изменения уровня sCD14-ST (пг/мл) в динамике на 3-и сутки после операции в зависимости от наличия или отсутствия SIRS, послеоперационных инфекционно-воспалительных осложнений, органых дисфункций, летальности

Группа	Признак		Me	Q25-Q75	Z	p-level
КРР без ОКН	SIRS	-	-39,8	-152,4-61,9	1,239	0,215
		+	-14,0	-90,6-179,3		
	Осложнения	-	-39,8	-141,4-35,3	1,733	0,083
		+	106,1	-66,3-197,2		
	Органые дисфункции	-	-39,8	-123,8-106,1	-1,989	0,047
		+	26,5	-7,0-543,2		
	Летальность	-	-35,3	-119,3-106,1	-	-
		+	4730,1 (1 пациент)	-		
Опухолевая ОКН	SIRS	-	-35,3	-248,3-98,7	0,122	0,903
		+	-35,4	-227,3-84,0		
	Осложнения	-	-44,2	-248,3-98,7	-0,288	0,774
		+	4,8	-182,7-75,1		
	Органые дисфункции	-	-55,3	-282,9-79,6	-1,555	0,120
		+	68,9	-10,1-185,3		
	Летальность	-	-55,3	-282,9-85,8	-1,353	0,176
		+	46,8	-23,2-179,0		
Неопухолева я ОКН	SIRS	-	20,9	-98,8-99,7	0,830	0,407
		+	225,4	-132,3-236,7		
	Осложнения	-	26,9	-92,5-129,8	0,195	0,846
		+	221,0	-132,3-229,8		
	Органые дисфункции	-	20,9	-118,7-138,0	-1,746	0,081
		+	390,0	229,8-550,2		
	Летальность	-	20,9	-118,7-138,0	-1,912	0,056
		+	499,7	229,8-769,6		
Примечание - Z- значение критерия Манна-Уитни; p – уровень значимости; Me – медиана; Q25-Q75 – нижний и верхний квартили.						

Сравнивая уровни sCD14-ST по наличию или отсутствию SIRS, послеоперационных инфекционно-воспалительных осложнений, органических дисфункций и летальности, было выявлено, что уровни sCD14-ST в группах с ОКН в среднем в 2 раза выше, чем в группе КРР без ОКН, что еще раз подтверждает, что генез ОКН не влияет на уровень sCD14-ST (таблица 19).

Таблица 19 – Сравнение уровней sCD14-ST в зависимости от наличия или отсутствия SIRS, послеоперационных инфекционно-воспалительных осложнений, органических дисфункций, летальности между исследуемыми группами

Признак/Группы сравнения	КРР без ОКН и опухолевая ОКН (p=/z=)		КРР и неопухолевая ОКН (p=/z=)		Опухолевая и неопухолевая ОКН (p=/z=)	
	sCD14-ST до операции	sCD14-ST на 3-и сутки после операции	sCD14-ST до операции	sCD14-ST на 3-и сутки после операции	sCD14-ST до операции	sCD14-ST на 3-и сутки после операции
SIRS-	0,003/-2,949	0,0004-3,568	0,017-2,393	0,050-1,960	0,406 0,832	0,533 0,624
SIRS+	0,003/-3,020	0,025-2,235	0,048-1,973	0,181 -1,336	0,382 0,875	0,930 0,087
Осложнения-	0,0002/-3,751	0,0001-3,851	0,009-2,621	0,015-2,422	0,259 1,128	0,735 0,338
Осложнения+	0,0278/-2,200	0,076 -1,774	0,079- 1,757	0,335 -0,964	0,462 0,736	0,396 0,850
Органические дисфункции-	0,00004/-4,119	0,00009-3,928	0,006-2,734	0,032-2,139	0,157 1,415	0,411 0,822
Органические дисфункции+	0,079/ -1,757	0,661 -0,439	0,121 -1,549	0,439 -0,775	0,794 -0,261	0,433 0,783
Летальность-	0,00001-4,343	0,0001-3,981	0,004 -2,875	0,025 -2,235	0,115 -1,578	0,394 -0,852
Летальность+	-	-	-	-	0,602 0,522	0,296 1,044

Примечание - Z – значение критерия Манна-Уитни; p-level – уровень значимости.

В общей когорте пациентов с КРР (КРР с и без ОКН) в зависимости от наличия/отсутствия летальности уровни sCD14-ST на 3-и сутки после операции был в 2,4 раза выше у умерших пациентов (Z= -2,630, p=0,009, рисунок 31), а у пациентов с органическими дисфункциями наблюдалось повышение уровня sCD14-ST в динамике на 30%, в то время как у пациентов без органических дисфункций sCD14-ST снизился на 18% (Z=-2,468, p=0,014, таблица 20).

Таблица 20 – Статистические показатели уровня sCD14-ST (пг/мл) до на 3-и сутки после операции и его динамика в зависимости от наличия или отсутствия SIRS, послеоперационных инфекционно-воспалительных осложнений, органических дисфункций, летальности у пациентов с КРР

Группа	Признак		Me	Q25-Q75	Z	p-level
sCD14-ST до операции (пг/мл)						
Пациенты с КРР	SIRS	-	309,4	203,3-554,3	-0,548	0,584
		+	376,1	203,3-728,8		
	Осложнения	-	360,2	205,5-614,2	0,014	0,989
		+	372,3	198,9-586,9		
	Органические дисфункции	-	344,7	207,7-618,6	0,339	0,735
		+	375,6	198,9-521,5		
	Летальность	-	318,2	198,9-609,7	-1,123	0,261
		+	459,6	375,6-577,6		
sCD14-ST на 3-и сутки после операции (пг/мл)						
Пациенты с КРР	SIRS	-	276,2	185,6-499,4	-1,169	0,242
		+	369,0	218,8-687,9		
	Осложнения	-	298,3	176,8-520,0	-1,714	0,087
		+	369,0	229,8-738,9		
	Органические дисфункции	-	282,8	188,3-503,8	-1,515	0,130
		+	534,7	225,4-738,9		
	Летальность	-	277,9	185,6-503,8	-2,630	0,009
		+	658,5	526,5-981,3		
Изменение уровня sCD14-ST (пг/мл) в динамике на 3-и сутки						
Пациенты с КРР	SIRS	-	-37,5	-170,3-75,2	-0,723	0,470
		+	-20,9	-153,3-110,9		
	Осложнения	-	-42,0	-188,1-79,6	-1,502	0,133
		+	28,7	-66,3-128,2		
	Органические дисфункции	-	-44,2	-188,0-84,0	-2,468	0,014
		+	62,7	-7,0-282,9		
	Летальность	-	-39,8	-182,7-87,6	-1,876	0,061
		+	62,7	4,8-282,9		
Примечание - Z- значение критерия Манна-Уитни; p – уровень значимости; Me – медиана; Q25-Q75– нижний и верхний квартили.						

В ряде исследований авторы обнаружили, что sCD14-ST обладает достоверной диагностической точностью при сепсисе, коррелировал с тяжестью сепсиса и изменениями показателей органических дисфункций, а также был предиктором исхода и риска смерти [20, 206-209]. Как и в предыдущих исследованиях, в данной работе уровни sCD14-ST были более высокие у пациентов с органическими дисфункциями и в динамике пресепсин в повышался у умерших пациентов.

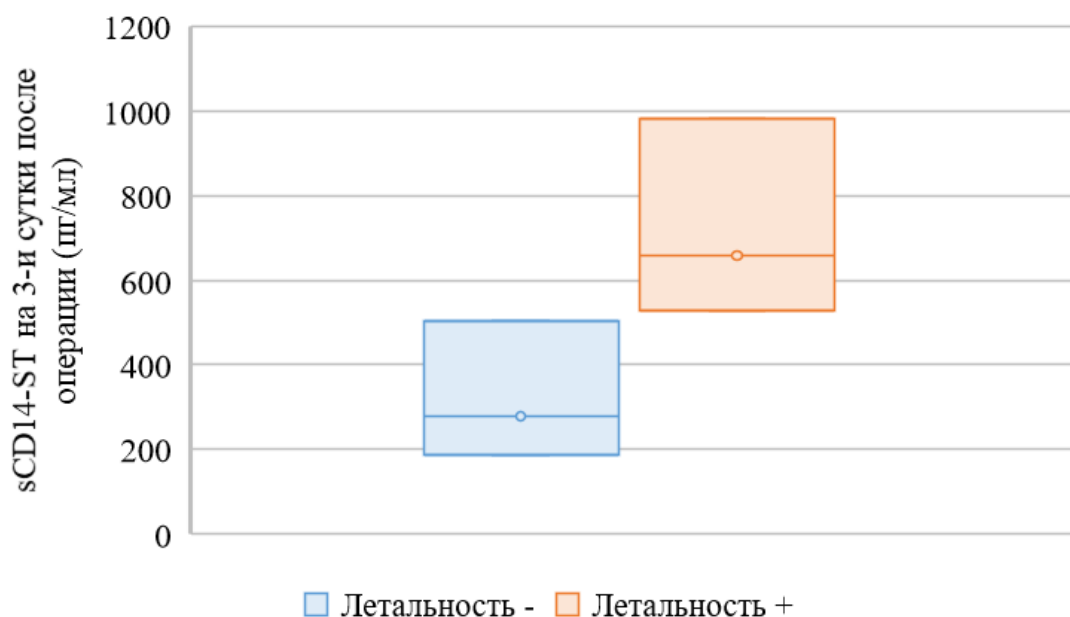


Рисунок 31 – Уровень sCD14-ST на 3-и сутки после операции (медиана+нижний и верхний квартили) в общей когорте пациентов с КРР в зависимости от наличия или отсутствия летальности

В группе опухолевой ОКН у пациентов с III и IV стадиями опухолевого процесса уровни sCD14-ST до оперативного вмешательства были в 2,1 раза выше и на 3-и сутки после операции в 1,8 раза выше, чем у пациентов с I и II стадиями ($p=0,049$ и $p=0,029$) (Таблица 21, рисунок 32).

Таблица 21 - Статистические показатели уровня sCD14-ST (пг/мл) до операции и на 3-и сутки после нее в группах КРР без ОКН и опухолевой ОКН в зависимости от стадии опухолевого процесса (I-IV)

Стадия	Me	Q25-Q75	Z	p-level
1	2	3	4	5
КРР без ОКН				
sCD14-ST (пг/мл) до операции				
I	340,8	205,5-440,7	-1,446	0,148
II	254,1	197,2-385,5		
III	225,4	123,7-457,2		
IV	176,8	161,4-247,5		
sCD14-ST (пг/мл) на 3-и сутки после операции				
I	247,5	209,3-353,8	0,396	0,692
II	218,8	152,4-419,8		
III	240,9	185,6-475,2		
IV	214,1	141,4-282,8		
Опухолевая ОКН				
sCD14-ST (пг/мл) до операции				
I	194,4 (1 пациент)	-	1,970	0,049
II	439,3	278,4-565,7		
III	636,6	577,6-1327,9		
IV	700,9	417,3-990,0		

Продолжение таблицы 21

1	2	3	4	5
sCD14-ST (пг/мл) на 3-и сутки после операции				
I	269,6 (1 пациент)	-	2,179	0,029
II	433,1	229,8-503,8		
III	600,7	371,2-1138,6		
IV	636,3	466,6-838,8		
Примечание - Z- значение критерия Манна-Уитни; p – уровень значимости; Me – медиана; Q25-Q75– нижний и верхний квартили.				

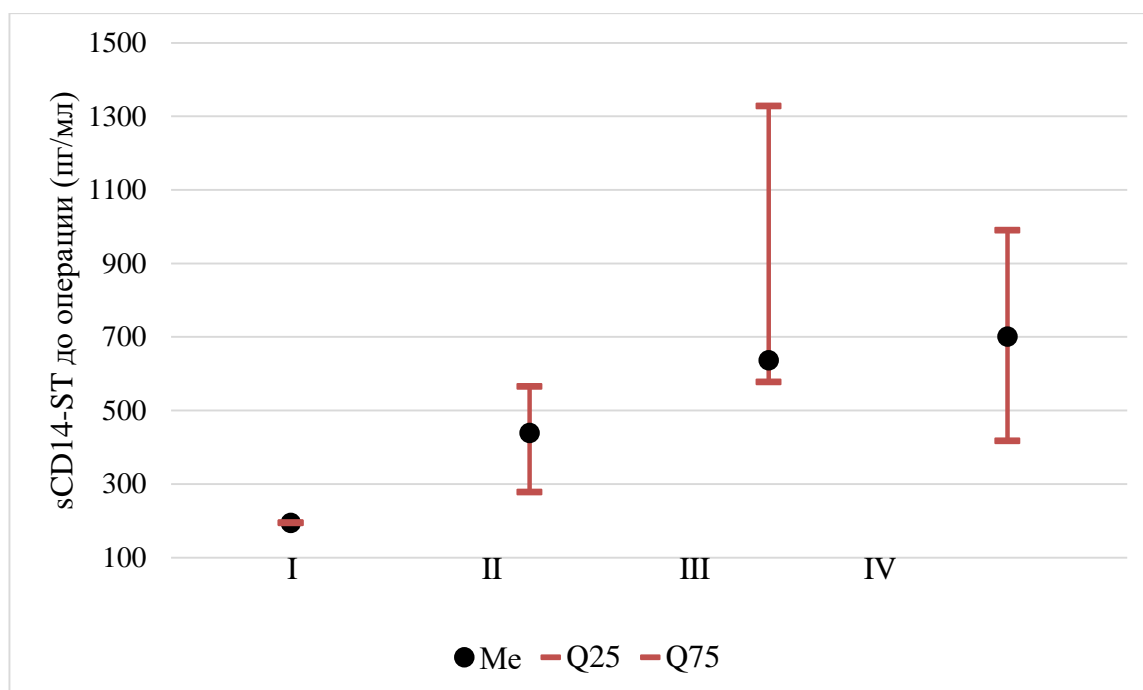


Рисунок 32 – Уровни sCD14-ST (пг/мл) до операции в группе опухолевой ОКН в зависимости от стадии опухолевого процесса I-IV (Me - медиана, Q25-Q75 - нижний и верхний квартили)

В зависимости от степени клеточной дифференцировки опухоли, степени инвазии опухоли в стенку кишки и локализации опухолевого процесса статистических различий в группах не было выявлено. Однако у пациентов с опухолевой ОКН с инвазией кишечной стенки T3-T4 уровни sCD14-ST до операции были в 2,4 раза выше и на 3-и сутки после операции в 2,1 раза выше, чем в группе КРР без ОКН ($Z=3,935$, $p=0,0001$ и $Z=3,767$, $p=0,0002$, соответственно, таблица 22). Исходя из чего, можно сказать, что при наличии острой кишечной непроходимости при КРР, помимо изменений кишечной стенки вследствие наличия опухоли и непроходимости кишечника, вероятнее всего происходит повышение внутрибрюшного давления, что в совокупности усиливает бактериальную транслокацию.

Таблица 22 - Статистические показатели уровня sCD14-ST до операции на 3-и сутки после нее в группах КРР без ОКН и опухолевой ОКН в зависимости от степени инвазии опухоли в стенку кишки (Т1-Т4)

Группа	Степень инвазии опухоли в стенку кишки	Me	Q25-Q75	Z	p-level
sCD14-ST (пг/мл) до операции					
КРР без ОКН	T2	409,3	185,6-448,3	3,935	0,0001
	T3	251,9	134,5-385,5		
	T4	243,1	197,2-376,6		
Опухолевая ОКН	T3	638,6	393,3-1312,2		
	T4	565,7	278,4-935,0		
sCD14-ST (пг/мл) на 3-и сутки после операции					
КРР без ОКН	T2	206,2	150,3-366,8	3,767	0,0002
	T3	277,9	197,2-340,7		
	T4	225,4	163,5-428,7		
Опухолевая ОКН	T3	535,8	353,5-726,2		
	T4	499,4	269,6-615,0		
Примечание - Z- значение критерия Манна-Уитни; p – уровень значимости; Me – медиана; Q25-Q75– нижний и верхний квартили.					

4.3 Взаимосвязь между маркерами бактериальной транслокации в сыворотке крови и клинико-лабораторными показателями

Для выявления корреляционной взаимосвязи между всеми исследуемыми показателями в общей когорте пациентов с КРР был рассчитан коэффициент корреляции Спирмена (таблица 23 в приложении Л).

Отмечалась слабая отрицательная корреляция уровня LBP на 3-и сутки после операции с развитием SIRS, послеоперационных осложнений, органических дисфункций и летальным исходом, также наблюдалась положительная слабая корреляция с уровнем sCD14-ST до оперативного вмешательства (рисунок 33). У уровня sCD14-ST до операции выявлена слабая положительная корреляция с уровнем LBP на 3-и сутки после операции, уровнем лейкоцитов и мочевины до операции, наличием/отсутствием ОКН при поступлении, а также слабая отрицательная связь с уровнем лимфоцитов до операции (рисунок 34). Так же отмечалась слабая положительная корреляция уровня sCD14-ST на 3-и сутки после оперативного вмешательства с развитием послеоперационных осложнений, органических дисфункций и летальным исходом, а также слабая отрицательная корреляция с уровнем лимфоцитов до операции, (рисунок 35).



Рисунок 33 – Корреляционные взаимосвязи уровня LBP до оперативного вмешательства



Рисунок 34– Корреляционные взаимосвязи уровня sCD14-ST до оперативного вмешательства



Рисунок 35 – Корреляционные взаимосвязи уровня sCD14-ST на 3-и сутки после оперативного вмешательства

4.4 Взаимосвязь между маркерами бактериальной транслокации в сыворотке крови и мезентериальных лимфатических узлах

Для выявления корреляционной взаимосвязи между sCD14-ST, LBP в сыворотке крови и 16s rRNA в мезентериальных лимфатических узлах был рассчитан коэффициент корреляции Спирмена. Корреляционной взаимосвязи между 16s rRNA в мезентериальных лимфатических узлах и маркерами бактериальной транслокации в сыворотке крови (LBP и sCD14-ST) не было выявлено (при уровне значимости $p > 0,05$, таблица 24).

Таблица 24 - Корреляционная взаимосвязь между sCD14-ST, LBP в сыворотке крови и 16s rRNA в мезентериальных лимфатических узлах

	Уровень LBP до операции	Уровень LBP на 3-и сутки после операции	Уровень sCD14-ST до операции	Уровень sCD14-ST на 3-и сутки после операции	Разница LBP на 3-и сутки после и до операции	Разница sCD14-ST на 3-и сутки после и до операции
16s rRNA -/+	-0,123	-0,096	-0,057	-0,065	0,065	-0,019

Полученные данные могут подтверждать тот факт, что наличие микроорганизмов в МЛУ не всегда вызывает системную воспалительную реакцию организма с выработкой биомаркеров микробной транслокации (LBP, sCD14-ST) в системный кровоток, что может подтверждать тот факт, что наличие микроорганизмов в МЛУ не всегда вызывает системную

воспалительную реакцию организма с выработкой биомаркеров микробной транслокации (LBP, sCD14-ST) в системный кровоток.

Уровень LBP и sCD14-ST до и на 3-и сутки после операции не зависит от локализации и степени клеточной дифференцировки опухоли, но зависит от степени инвазии опухоли в стенку кишки и стадии опухолевого процесса.

Поскольку значимых изменений в уровне и динамике изучаемых биомаркеров в группе неопухолевой ОКН не выявлено, это свидетельствует о том, что основной причиной, влияющей на бактериальную транслокацию у пациентов с колоректальным раком, является инвазия стенки кишки опухолью, тем не менее ОКН усугубляет бактериальную транслокацию при опухолях толстой кишки.

5 ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ LBP и sCD14-ST В РАЗВИТИИ ИНФЕКЦИОННО-ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ В ХИРУРГИИ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА

С учетом того, что генез ОКН не влиял на уровни маркеров в зависимости от развития SIRS, послеоперационных осложнений, органных дисфункций и летальности, для определения прогностической значимости LBP и sCD14-ST проанализирована общая когорта пациентов с КРР (с и без ОКН).

5.1 Результаты определения критических уровней LBP у пациентов с колоректальным раком

У пациентов с колоректальным раком уровни LBP на 3-и сутки после операции при развитии неблагоприятных исходов были значимо ниже, чем при нормальном послеоперационном течении: при наличии признаков SIRS в 1,3 раза ниже ($p=0,003$); с развившимися послеоперационными осложнениями в 1,2 раза ниже ($p=0,001$); при развитии органных дисфункций в 1,7 раз ниже ($p=0,0002$); у умерших пациентов в 1,3 раза ниже ($p=0,01$) (таблица 25).

Таблица 25 – Статистические показатели уровня LBP на 3-и сутки после операции у пациентов с КРР в зависимости от развития SIRS, послеоперационных осложнений, органных дисфункций и летальности

Признак		Me	Q25-Q75	Z	p-level
SIRS	-	991,9	792,3-1407,4	2,923	0,003
	+	792,3	611,1-1048,4		
Осложнения	-	950,8	778,4-1302,2	3,211	0,001
	+	770,8	552,8-927,4		
Органные дисфункции	-	945,9	773,9-1271,8	3,667	0,0002
	+	566,5	536,8-792,3		
Летальность	-	933,6	761,6-1236,7	2,589	0,01
	+	700,1	536,8-812,0		

Примечание - Z- значение критерия Манна-Уитни; p – уровень значимости; Me – медиана; Q25-Q75– нижний и верхний квартили.

Результаты анализа ROC-кривой уровня LBP на 3-и сутки после оперативного вмешательства для прогнозирования SIRS, послеоперационных инфекционно-воспалительных осложнений, органных дисфункций и летальности отображены в таблице 26 и показаны на рисунках 36 и 37. При значении LBP на 3-и сутки после операции $\leq 821,95$ нг/мл риск развития SIRS в 3,5 раза, послеоперационных осложнений в 5,2 раза, летального исхода в 12,9 раза выше, чем при его более высоком уровне (OR 3,5, CI 1,46-8,4; OR 5,2, CI 1,80-15,12; OR 12,9, CI 1,54-108,21, соответственно). А при значении LBP на 3-и сутки после операции $\leq 700,15$ нг/мл риск развития органных дисфункций в 13,5 раза выше, чем при его более высоком уровне (OR 13,5, CI 3,536-51,54).

Таблица 26 – Результаты ROC-анализа уровня LBP на 3-и сутки после оперативного вмешательства для прогнозирования SIRS, послеоперационных инфекционно-воспалительных осложнений, органных дисфункций и летальности у пациентов с КРР

	AUC (95% CI)	p-level	J-индекс Юдена	Оптимальное пороговое значение LBP	Чувствительность	Специфичность
SIRS	0,680 (0,573-0,774)	0,0015	0,3200	$\leq 821,95$	60	72
Осложнения	0,729 (0,625-0,817)	0,0001	0,4037	$\leq 821,95$	72,73	67,65
Органные дисфункции	0,819 (0,724-0,892)	0,0001	0,5495	$\leq 700,15$	69,23	85,71
Летальность	0,764 (0,663-0,847)	0,0003	0,5185	$\leq 821,95$	88,89	62,96

Примечание - AUC (95% CI) - площадь под ROC-кривой (95% ДИ – доверительный интервал); p-level – уровень значимости.

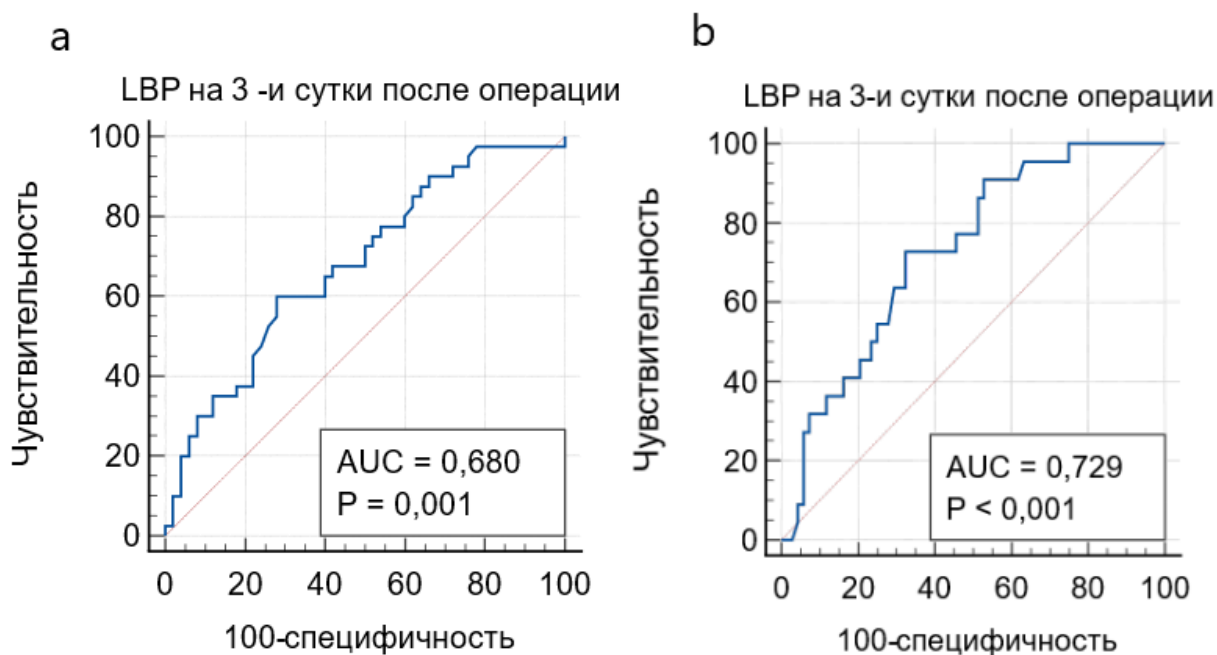


Рисунок 36 – ROC-кривые уровня LBP на 3-и сутки после оперативного вмешательства для прогнозирования SIRS (a) и послеоперационных инфекционно-воспалительных осложнений (b)

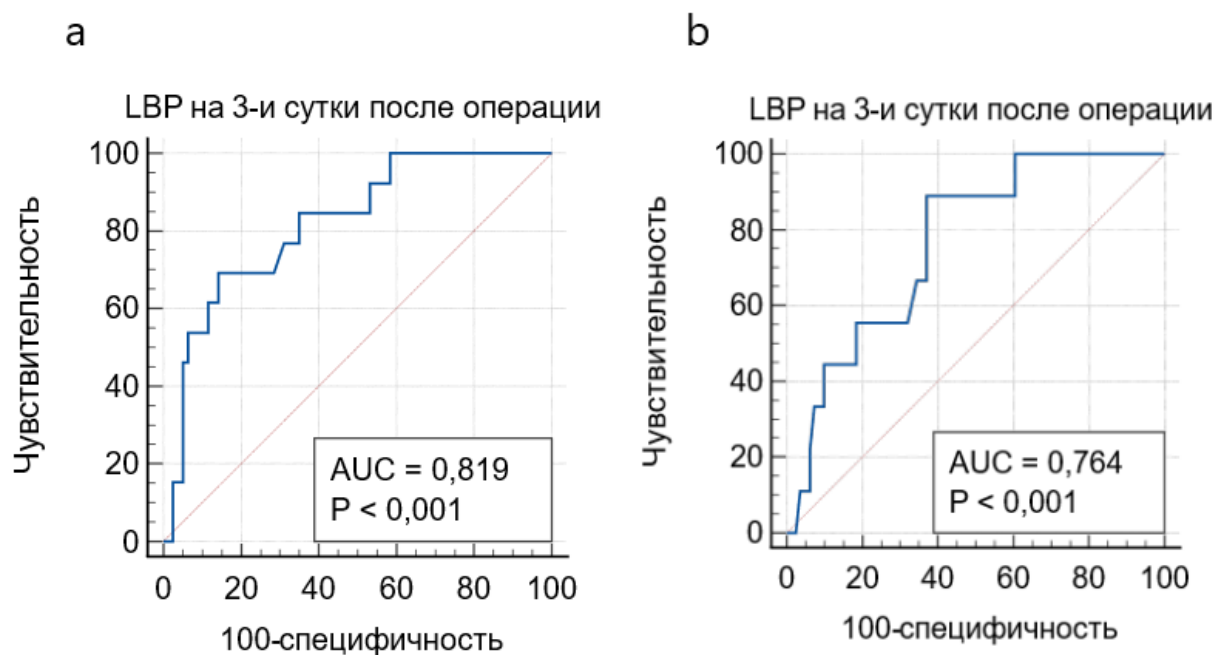


Рисунок 37 – ROC-кривые уровня LBP на 3-и сутки после оперативного вмешательства для прогнозирования органичных дисфункций (а) и летального исхода (б)

5.2 Результаты определения критических уровней sCD14-ST у пациентов с колоректальным раком

У пациентов с КРР с III и IV стадиями опухолевого процесса уровень sCD14-ST на 3-и сутки после операции был выше в 1,9 раз, а у умерших пациентов выше в 2,4 раза ($p=0,012$ и $p=0,009$, соответственно, таблица 27).

Таблица 27 – Статистические показатели уровня sCD14-ST на 3-и сутки после операции у пациентов с КРР в зависимости от стадии опухолевого процесса и летальности

Признак		Me	Q25-Q75	Z	p-level
Летальность	-	277,9	185,6-503,8	-2,630	0,009
	+	658,5	526,5-981,3		
Стадия опухолевого процесса	I	269,6	215,2-340,7	2,526	0,012
	II	246,6	165,0-456,1		
	III	428,7	188,3-624,5		
	IV	531,9	277,9-738,9		

Примечание - Z- значение критерия Манна-Уитни; p – уровень значимости; Me – медиана; Q25-Q75– нижний и верхний квартили.

Результаты анализа ROC-кривой уровня sCD14-ST на 3-и сутки после оперативного вмешательства для прогнозирования летального исхода и стадии опухолевого процесса отображены в таблице 28 и показаны на рисунке 38. При значении sCD14-ST на 3-и сутки после операции >520 пг/мл риск развития летального исхода в 12,3 раза выше, чем при его более низком уровне (OR 12,3,

CI 2,34-64,20). При III или IV стадии опухолевого процесса в 5,7 раз выше риск того, что уровень sCD14-ST на 3-и сутки после операции будет >503,8 пг/мл (OR 5,7, CI 2,01-16,09).

Таблица 28 – Результаты ROC-анализа уровня sCD14-ST на 3-и сутки после оперативного вмешательства для прогнозирования летального исхода, стадии опухолевого процесса у пациентов с КРР

	AUC (95% CI)	p-level	J-индекс Юдена	Оптимальное пороговое значение sCD14-ST	Чувствительность	Специфичность
Летальность	0,768 (0,667-0,851)	0,0069	0,5556	>520	77,78	77,78
Стадия опухолевого процесса	0,655 (0,547-0,752)	0,0084	0,333	>503,8	46,67	86,67

Примечание - AUC (95% CI) - площадь под ROC-кривой (95% ДИ – доверительный интервал); p-level – уровень значимости; стадии опухолевого процесса: I-II – 0, III-IV – 1.

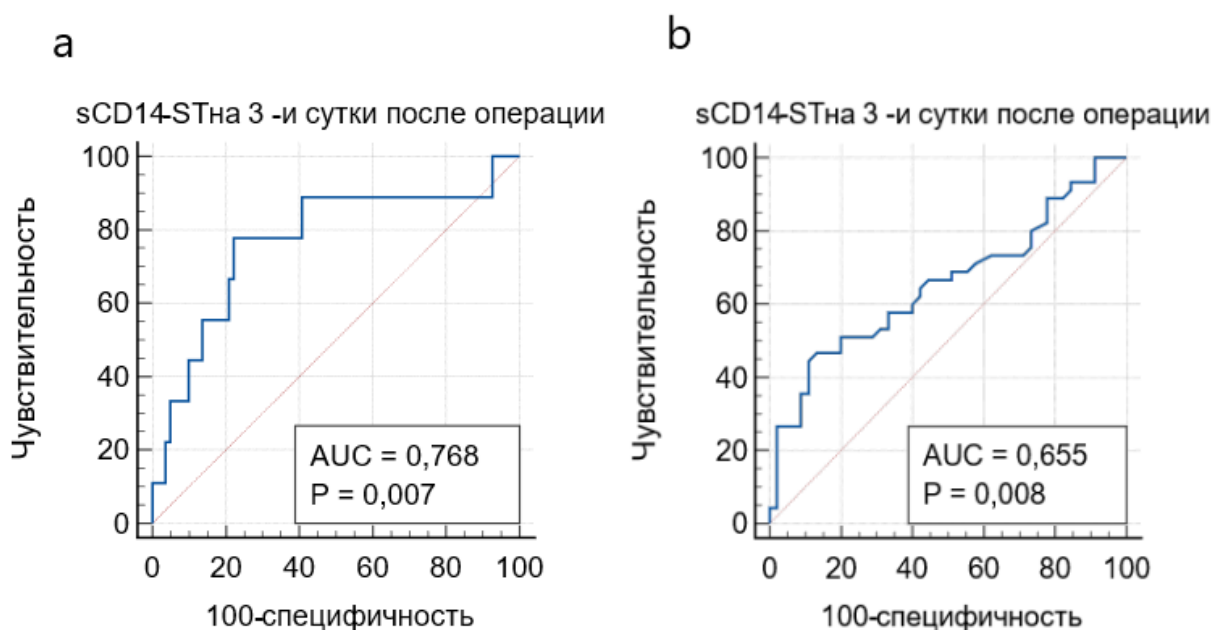


Рисунок 38 – ROC-кривые уровня sCD14-ST на 3-и сутки после оперативного вмешательства для прогнозирования летального исхода (а), стадии опухолевого процесса (b)

У пациентов с КРР при развитии органичных дисфункций уровень sCD14-ST на 3-и сутки после операции повысился в динамике на 30%, тогда как у пациентов без органичных дисфункций он, наоборот, имел тенденцию к снижению на 18% (p=0,009 таблица 29).

Таблица 29 – Статистические показатели изменений уровня sCD14-ST в динамике на 3-и сутки после операции у пациентов с КРР в зависимости от развития органных дисфункций.

Признак		Me	Q25-Q75	Z	p-level
Органные дисфункции	-	-44,2	-188,0-84,0	-2,468	0,014
	+	62,7	-7,0-282,9		
Примечание - Z- значение критерия Манна-Уитни; p – уровень значимости; Me – медиана; Q25-Q75– нижний и верхний квартили.					

Результаты анализа ROC-кривой разницы уровня sCD14-ST на 3-и сутки после и до оперативного вмешательства для прогнозирования органных дисфункций отображены в таблице 30 и показаны на рисунке 39. При повышении уровня sCD14-ST в динамике (на 3-и сутки после операции – до оперативного вмешательства) или его снижении не более 8,8 пг/мл риск развития органных дисфункций в 6,5 раза выше, чем при его снижении более 8,8 пг/мл (OR 6,5, CI 1,66-25,83).

При комбинации же нескольких показателей: при значении LBP на 3-и сутки после операции $\leq 700,15$ нг/мл и при повышении уровня sCD14-ST в динамике от исходного или его снижении в динамике не более 8,8 пг/мл риск развития органных дисфункций в 100,3 раза выше, чем при более высоком уровне LBP и снижении sCD14-ST в динамике больше чем на 8,8 пг/мл (OR 100,3, CI 9,1-1106,1).

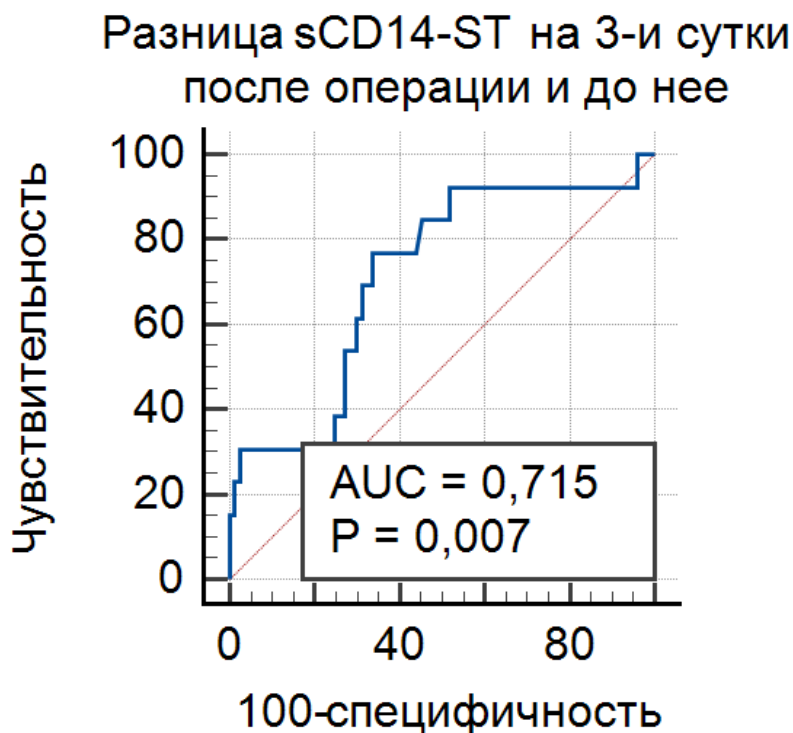


Рисунок 39 – ROC-кривые разницы уровня sCD14-ST на 3-и сутки после и до оперативного вмешательства для прогнозирования органных дисфункций

Таблица 30 – Результаты ROC-анализа уровня sCD14-ST на 3-и сутки после оперативного вмешательства для прогнозирования летального исхода, стадии опухолевого процесса у пациентов с КРР

	AUC (95% CI)	p-level	J-индекс Юдена	Оптимальное пороговое значение sCD14-ST	Чувствительность	Специфичность
Органная дисфункция	0,715 (0,610- 0,805)	0,0071	0,4316	>-8,8	76,92	66,23
Примечание - AUC (95% CI) - площадь под ROC-кривой (95% ДИ – доверительный интервал); p-level – уровень значимости.						

По результатам проведенного анализа у пациентов с колоректальным раком LBP можно использовать в качестве прогностического критерия развития SIRS, послеоперационных инфекционно-воспалительных осложнений, органной дисфункции и летального исхода, а sCD14-ST - в качестве прогностического критерия развития органной дисфункции и летального исхода.

5.3 Методика расчета риска развития неблагоприятных исходов оперативного вмешательства у пациентов с колоректальным раком

На основании полученных результатов разработана схема расчета риска развития неблагоприятных исходов оперативного вмешательства у пациентов с колоректальным раком (рисунок 40, приложение М).

При поступлении пациента с колоректальным раком в хирургический стационар за час до оперативного вмешательства, а также через 72 часа после операции (3-и сутки) проводится забор венозной крови в вакутейнер, содержащий активатор свертывания и гелевый разделитель сыворотки. Далее в сыворотке крови пациента с помощью ИФА определяются маркеры бактериальной транслокации – LBP (липополисахарид-связывающий белок) и sCD14-ST (пресепсин).

По результатам детекции маркеров LBP и sCD14-ST в сыворотке крови за час до оперативного вмешательства и через 72 часа после него (3-и сутки) возможно определение риска развития неблагоприятных исходов оперативного вмешательства у пациентов с колоректальным раком:

1. При значении LBP на 3-и сутки после операции <820 нг/мл риск развития:
 - SIRS в 3,5 раза выше,
 - послеоперационных осложнений в 5 раз выше,
 - летального исхода в 13 раз выше.
2. При значении sCD14-ST на 3-и сутки после операции >520 пг/мл риск развития летального исхода в 12 раз выше.
3. При значении LBP на 3-и сутки после операции <700 нг/мл риск развития органной дисфункции в 13,5 раза выше.
4. При повышении уровня sCD14-ST от исходного уровня до операции риск развития органной дисфункции в 6,5 раза выше.

5. При значении LBP на 3-и сутки после операции <700 нг/мл и при повышении уровня sCD14-ST от исходного уровня до операции риск развития органных дисфункций в 100 раз выше.

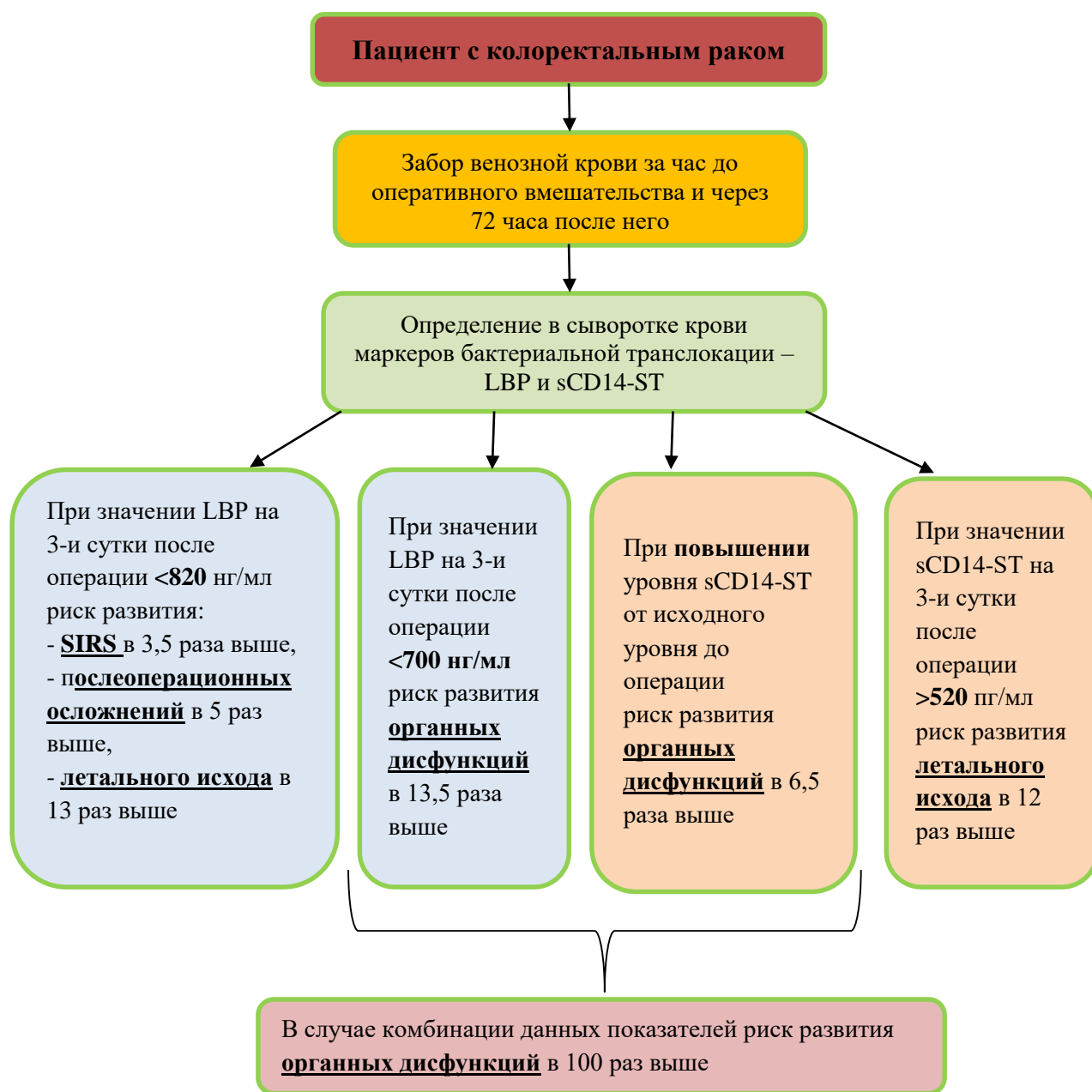


Рисунок 40 - Методика расчета риска развития неблагоприятных исходов оперативного вмешательства у пациентов с колоректальным раком

Данная методика внедрена в работу хирургических отделений «Областной клинической больницы», «Многопрофильной больницы №1 г. Караганды», «Многопрофильной больницы №3 г. Караганды» (приложение Б).

Клиническая эффективность предложенной методики может быть продемонстрирована на следующих клинических примерах.

Пример 1. Пациентка К., 72 лет, поступила с диагнозом: «Рак сигмовидной кишки, T2N0M0, стадия Ib», выполнено оперативное вмешательство в объеме: «Лапаротомия, резекция сигмовидной кишки по Гартману, санация и дренирование брюшной полости».

До оперативного вмешательства уровень LBP составил 896,7 нг/мл, sCD14-ST -198,9 пг/мл. На 3-и сутки после оперативного вмешательства уровень LBP составил - 552,75 нг/мл, sCD14-ST - 225,4 пг/мл. В динамике LBP снизился на 343,95 нг/мл, а sCD14-ST повысился на 26,5 пг/мл.

Согласно представленной методике расчета риска развития неблагоприятных исходов у данной пациентки был выше риск развития SIRS в 3,5 раза, послеоперационных осложнений в 5,2 раза, органных дисфункций в 13,5 раза, летального исхода в 12,9 раз.

В результате проспективного наблюдения у пациента развились следующие неблагоприятные исходы:

- SIRS (лейкоцитоз до $29,70 \cdot 10^9/\text{л}$, тахикардия до 120 ударов в минуту, тахипноэ до 26 в минуту);

- послеоперационные инфекционно-воспалительные осложнения (поддиафрагмальный абсцесс справа с прорывом в брюшную полость, разлитой гнойно-фибринозный перитонит, частичная недостаточность анастомоза, сепсис),

- органные дисфункции (тромбоцитопения до $80 \cdot 10^9/\text{л}$, снижение индекса оксигенации <400 , среднее артериальное давление менее 70 мм.рт.ст., повышение креатинина до 120,7 мкмоль/л).

Пример 2. Пациент П., 76 лет, поступил с диагнозом: «Рак печеночного угла толстой кишки T4N0M0, стадия Ib», выполнено оперативное вмешательство в объеме: «Лапаротомия, правосторонняя гемиколэктомия, инвагинационный илеотрансверзоанастомоз, санация и дренирование брюшной полости».

До оперативного вмешательства уровень LBP составил 958,1 нг/мл, sCD14-ST -300,5 пг/мл. На 3-и сутки после оперативного вмешательства уровень LBP составил - 945,85 нг/мл, sCD14-ST - 256,3 пг/мл. В динамике LBP снизился на 12,25 нг/мл, а sCD14-ST снизился на 44,2 пг/мл.

Согласно представленной методике расчета риска развития неблагоприятных исходов у данного пациента не было риска развития SIRS, послеоперационных осложнений, органных дисфункций или летального исхода. В результате проспективного наблюдения у пациента послеоперационный период протекал нормально:

- не было признаков SIRS (частота дыханий и сердцебиения в пределах нормальных значений, температура тела не повышалась выше 37°C , лейкоцитоз до $16,8 \cdot 10^9/\text{л}$);

- без инфекционно-воспалительных осложнений;

- без развития органных дисфункций (по критериям шкалы SOFA 0 баллов).

Таким образом установленные критические значения LBP и sCD14-ST позволяют определить пациентов с риском развития неблагоприятного исхода хирургического лечения колоректального рака.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Целью данного исследования было определение значимости маркеров бактериальной транслокации в качестве предикторов развития послеоперационных инфекционно-воспалительных осложнений у пациентов с колоректальным раком.

Несмотря на современные методы диагностики и лечения, у этой данной категории пациентов в послеоперационном периоде сохраняется высокий риск развития системно-воспалительной реакции (SIRS), и как следствие инфекционно-воспалительных осложнений (до 23% случаев), органических дисфункций и летальности (от 5% до 32% случаев) [1,2,3]. В данном исследовании участвовало 120 пациентов, разделенных на три группы: КРР без ОКН, опухолевая ОКН и неопухолевая ОКН. Последняя группа была введена, как контрольная, ввиду необходимости выявления влияния на бактериальную транслокацию самой острой кишечной непроходимости, без наличия опухолевого процесса в кишечнике. По полу, возрасту и сопутствующей патологии различий между группами не было.

По локализации опухолевого процесса в обеих группах преобладали поражения толстой (ободочной) кишки (68% и 77,5%, соответственно), в том числе поражения сигмовидной кишки (36% и 42,5% соответственно). Хотя в группе с опухолями кишечника без ОКН поражение прямой кишки встречалось чаще (20%), нежели при опухолевой ОКН (12,5%), статистически значимых различий по локализации опухоли между двумя группами не было выявлено ($p=0,237$).

По степени инвазии опухоли в стенку кишки в обеих группах опухоль чаще прорастала в окружающие органы и ткани или серозную оболочку (T4) – 70% и 65% ($p=0,137$). Хотя в группе КРР без ОКН преобладали умереннодифференцированные аденокарциномы (48%), в группе опухолевой ОКН – низкодифференцированные (37,5%), по степени клеточной дифференцировки не было найдено статистических различий ($p=0,109$).

В группе опухолевой ОКН доля пациентов с I стадией составила всего 2,5%, а доля пациентов с IV стадией – 40%, что явилось значительно большим показателем в сравнении с группой КРР без ОКН, где частота встречаемости I и IV стадий практически не отличалась – 16% и 12% ($p=0,003$). Данный факт может свидетельствовать о том, что у пациентов с опухолями кишечника I стадии развитие ОКН возникает реже, чем при дальнейшем прогрессировании и распространении опухолевого процесса.

Признаки SIRS чаще возникали у пациентов с опухолевой ОКН (52,5%, $p=0,022$). Статистических различий в развитии послеоперационных осложнений и органических дисфункций между группами не было выявлено. Инфекционно-воспалительные осложнения возникли у 22% пациентов в группе КРР без ОКН, у 27,5% пациентов в группе опухолевой ОКН и у 16,7% пациентов в группе неопухолевой ОКН ($p=0,558$). Органические дисфункции, оцененные, были у 10% пациентов в группе КРР без ОКН, у 20% пациентов в

группе опухолевой ОКН и у 6,7% пациентов в группе неопухолевой ОКН ($p=0,150$ и $p=0,107$). Летальность в группе с опухолевой ОКН составила 20% тогда, когда в группе КРР без ОКН, она составила всего 2%, а в группе неопухолевой ОКН 6,7% ($p=0,006$). Полученные статистические показатели подтверждают литературные данные [1,2,3] о том, что сегодня сохраняются высокие показатели осложнений и летальности у данной категории пациентов.

У пациентов с колоректальным раком повышается проницаемость слизистой оболочки кишечника из-за нарушения архитектуры кишечника злокачественной тканью. В то время как при острой кишечной непроходимости возникает гипоперфузия и ишемия кишечной стенки, при которой вырабатывается большое количество провоспалительных медиаторов. Активируется каскад иммунных реакций: активация системы комплемента, хемотаксис, миграция нейтрофилов, макрофагов, лимфоцитов в зоны ишемии кишечника. Эти реакции способствуют усугублению нарушений микроциркуляции, нарастанию ишемии и гипоксии слизистой оболочки кишечника. Гипоперфузия, ишемия и последующая реперфузия поврежденных участков кишечника усиливают воспалительную реакцию и приводят к окислительному стрессу. Происходит гибель энтероцитов, нарушение межклеточных плотных контактов, повышение проницаемости кишечной стенки и нарушение барьерной функции кишечника. Бактерии или их эндотоксины проникают через поврежденный слизистый барьер, где распознаются клетками врожденного иммунитета (макрофагами, дендритными клетками), фибробластами и эпителиальными клетками, что также усиливает иммунный ответ, который становится системным и может привести к сепсису и даже смерти [122,123].

Зачастую диагноз «сепсис» при ОКН выставляется не всегда, так как нет конкретного очага инфекции, хотя есть признаки SIRS и органые дисфункции. По данным разных авторов при ОКН, вызванной колоректальным раком, сепсис возникает от 1,7% до 10,5% случаев, а при доброкачественной ОКН от 3 до 10,29 % [4-8]. В данном исследовании сепсис развился у 7 пациентов (5,8% общей когорты) – у 2-х пациентов в группе КРР без ОКН, у 4-х в группе опухолевой ОКН и у 1 в группе неопухолевой ОКН.

Главным компонентом развития сепсиса на сегодня является бактериальная транслокация (БТ) [9]. На сегодняшний день большой интерес для ученых составляет поиск биомаркеров бактериальной транслокации, которые возможно использовать в качестве предикторов инфекционно-воспалительных осложнений. Сегодня наиболее актуальным является выявление в сыворотке крови липополисахарид-связывающего белка (LBP) и пресепсина (sCD14-ST), а также определение прямых маркеров бактериальной транслокации: культивирование мезентериальных лимфатических узлов и детекция в них 16s rRNA микроорганизмов ПЦР-методом.

Сегодня надежным и достоверным методом определения бактериальной транслокации остается микробиологическое исследование брыжеечных лимфатических узлов [17,61]. MacFie et al. проводили бактериологическое

исследование МЛУ у 927 пациентов, перенесших лапаротомию, из которых у 14% была выявлена БТ [17]. В исследовании О'Boyle при бактериологическом исследовании МЛУ у 15,4% из 448 хирургических пациентов была обнаружена БТ, при чем 77% культивированные микроорганизмы были типичными для местной кишечной флоры [61]. Данные исследования показали, что чаще всего транслоцируются бактерии семейства Enterobacteriaceae (в большей степени *E. coli*, в меньшей *Klebsiella* и *Shigella*).

В данном исследовании МЛУ культивировались в пробирках с триптиказо-соевым бульоном при температуре 37°C и времени инкубации – 24 часа, для увеличения количества жизнеспособных бактерий [194]. Далее проводилось классическое бактериологическое исследование: высеив с помощью калиброванной петли (10мкл) на плотную питательную среду - кровяной агар с 5%-ным содержанием бараньей крови. Посевы инкубировались при температуре 37°C и времени инкубации – 24 часа [61,194,195]. Идентификация выделенной чистой культуры микроорганизмов проводилась с помощью время пролетной масс спектрофотометрии с матрично-ассоциированной лазерной десорбцией и ионизацией (MALDI-TOF MS) с использованием системы Microflex LT, а также программного обеспечения MALDI Biotyper Compass 4.1.80 (Bruker Daltonics, Германия) [194,196]. Масс-спектры калибровались с использованием бактериального стандарта рибосомальных белков *E. coli*. Результаты выражались в виде оценочного коэффициента score в диапазоне от 0 до 3. Значение score >2,2 было использовано в качестве критерия надежной видовой идентификации.

В результате микробиологического исследования мезентериальных лимфатических узлов в 6 из 20 МЛУ был обнаружен рост бактерий (30,0%). Во всех 6-и случаях с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии, как и в вышеописанных исследованиях, были выявлены бактерии порядка *Enterobacteriales*, среди которых преобладали микроорганизмы родов *Escherichia* – 5 образцов (83,3%) и *Klebsiella* - 1 образец (16,7%). Но так как культура МЛУ обнаруживает только жизнеспособные бактерии, и для обнаружения небольшого количества микроорганизмов в МЛУ необходимо усиливать рост бактерий с помощью триптиказо-соевого бульона, нами проведено ПЦР-исследование МЛУ на наличие бактериальной 16s rRNA.

На сегодняшний день с помощью праймеров 16s rRNA можно обнаружить большинство микроорганизмов. [143]. Schoeffel U. et al. у пациентов с аденокарциномой слепой кишки (n=10) обнаружили 16s rRNA в 30 % лимфатических узлов (в 6 лимфоузлах из 20) [144]. В последнее время определение 16s rRNA микроорганизмов было сосредоточено на изучении биоматериалов, которые содержат относительно большое количество бактерий и небольшое количество человеческих клеток (фекалии, оральные и вагинальные мазки) [145]. Напротив же, мезентериальные лимфатические узлы содержат меньшее количество бактерий, чем вышеперечисленные образцы. Villette R. et al. предложили методику детекции 16s rRNA, оптимизированную для образцов с низкой концентрацией бактерий (low biomass biospecimens).

Авторы пришли к выводу, что анализ состава микробиоты образцов с низкой концентрацией бактерий является надежным для образцов, содержащих не менее 10^6 микроорганизмов [146].

В данном исследовании для имитации транслокации микроорганизмов в лимфатические узлы, к полученным образцам лимфатических узлов добавлялась взвесь лабораторного авирулентного штамма *Escherichia coli* GFP 6 серотипа биотипа 1 (ATCC® 25922GFP™) с показателями КОЕ от 10^8 до 10^2 . Исследовалось три группы образцов:

1 группа - образцы чистой культуры *E.coli* с КОЕ/мл 10^2 , 10^4 , 10^6 , 10^8 в физиологическом растворе (0,9% раствор NaCl) - по 5 образцов каждого из значений КОЕ, всего 20 образцов.

2 группа - образцы МЛУ со взвесью *E.coli* с КОЕ/мл 10^2 , 10^4 , 10^6 , 10^8 по 5 образцов каждого из значений КОЕ (подгруппы), всего 20 образцов.

3 группа - МЛУ 50 пациентов с опухолями кишечника без ОКН, 3-х пациентов с опухолевой ОКН и 5-и пациентов с неопухолевой ОКН.

Используя полученные данные средних значений пороговых циклов (Ct) 1-ой и 2-ой групп были составлены графические кривые стандартов ПЦР и для оценки зависимости логарифма КОЕ/мл бактерий от значения порогового цикла амплификации разработана модель в виде уравнения. Кривые амплификации, значения пороговых циклов и эффективность ПЦР в первых двух группах отличались, что вероятно связано с наличием ингибирующих амплификацию 16s rRNA соединений, а также с неспецифическим связыванием праймеров с ДНК МЛУ, в отличие от чистой культуры бактерий. Несколько исследователей сообщили, что при преобладании человеческой ДНК в образце праймеры 16s rRNA могут взаимодействовать с областью внутри митохондриальной ДНК человека, и она может быть амплифицирована этими праймерами [198,199]. Поэтому для изучения транслокации микроорганизмов в МЛУ (3-я группа) нами была использована математическая модель 2-ой группы калибровки (взвесь *E.Coli* и МЛУ): $y = -3,8835x + 46,394$.

Использованные в данном исследовании праймеры 16S rRNA специфичны для бактерий, поэтому стерильные лимфоузлы не показали пика на "melt curve". У пациентов с неопухолевой ОКН результаты были отрицательные, но в 7 лимфоузлах из 53 пациентов с КРР была найдена микробиологическая флора. Температура плавления одного образца совпадала с кривыми для *E. coli* ($82,8^\circ\text{C}$), в оставшихся образцах отмечалось наличие других видов микроорганизмов, так как ампликоны имели другие характеристики: другие температура плавления и RFU (относительная единица флуоресценции). Согласно разработанной математической модели, в МЛУ с положительным результатом ПЦР было рассчитано приблизительное содержание бактерий, оно составило от 10^4 до 10^7 КОЕ/мл.

Детекция ПЦР-методикой 16s rRNA бактерий в МЛУ как прямой метод исследования БТ дал положительный результат всего в 13,2%, что связано с ограничением метода при низкой уровне КОЕ микроорганизмов в мезентериальных лимфатических узлах. К тому же наличие микроорганизмов в

МЛУ не всегда вызывает SIRS, инфекционно-воспалительные осложнения и органые дисфункции, так как бактерии могут быть инактивированы иммунными клетками МЛУ, не попадая в системный кровоток. Поэтому для определения риска возникновения SIRS, инфекционно-воспалительных осложнений, органых дисфункций и летального исхода большее значение имеет бактериальная транслокация в системный кровоток и определение в нем соответствующих маркеров (LBP, sCD14-ST).

По литературным данным уровень LBP из-за его длительного периода полураспада (2-3 дня) в течение длительного времени обнаруживается в сыворотке после бактериемии, и поэтому он является относительно надежным маркером для диагностики БТ [21]. В исследовании Mierzchala M. et al. оценивали LBP у больных с сепсисом и септическим шоком, при этом уровень LBP в сыворотке крови был значительно выше у пациентов с SIRS, сепсисом и септическим шоком по сравнению с группой здоровых людей [210]. В исследовании Oral S.M. уровни LBP оценивались у пациентов с тяжелым сепсисом, при этом авторы также обнаружили, что значения LBP были повышены у пациентов с сепсисом по сравнению с нормальными значениями, тем не менее, по сравнению с предыдущим исследованием, у пациентов с менее повышенным уровнем LBP наблюдались значительно худшие результаты. Авторы пришли к выводу, что пациенты с быстро прогрессирующим сепсисом не могут адекватно синтезировать LBP, тем самым, не успевая адекватно отреагировать на какую-либо системную микробную инфекцию [202].

Ранее у пациентов с КРР и ОКН детально не изучался LBP в сыворотке крови в динамике, а также в зависимости от возникновения SIRS и инфекционно-воспалительных осложнений.

В данном исследовании различий в уровне LBP до операции и на 3-и сутки после нее между исследуемыми группами выявлено не было ($p=0,387$ и $p=0,692$, соответственно). В группе опухолевой ОКН наблюдалось в 4 раза большее снижение уровня LBP в динамике по сравнению с остальными группами ($p=0,002$).

В группе КРР без ОКН у пациентов с IV стадией опухолевого процесса уровень LBP в динамике снизился более чем в 12 раз по сравнению со II и III стадиями ($p=0,022$ и $p=0,021$, соответственно). В зависимости от степени клеточной дифференцировки опухоли и локализации опухолевого процесса не было найдено различий в динамике уровня LBP до и на 3-и сутки после операции. Однако в группе опухолевой ОКН с инвазией кишечной стенки T3-T4 уровень LBP в динамике снизился более чем в 5 раз, по сравнению с группой КРР без ОКН ($p=0,035$). У пациентов с опухолевой ОКН, помимо изменений кишечной стенки вследствие наличия опухоли и непроходимости кишечника, происходит повышение внутрибрюшного давления, что усиливает БТ. Можно предположить, что динамическое снижение уровня LBP могло быть связано с нормализацией внутрибрюшного давления, устранением обструкции и удалением самой опухоли, что в совокупности и усиливало БТ.

В группе неопухолевой ОКН различий в уровне LBP как до операции, так и на 3-и сутки после нее в зависимости от наличия/отсутствия SIRS, послеоперационных инфекционно-воспалительных осложнений, органных дисфункций и летальности статистических различий не выявлено.

У пациентов с колоректальным раком уровни LBP на 3-и сутки после операции при развитии неблагоприятных исходов были значительно ниже, чем при нормальном послеоперационном течении: при наличии признаков SIRS в 1,3 раза ниже ($p=0,003$); с развившимися послеоперационными осложнениями в 1,2 раза ниже ($p=0,001$); при развитии органных дисфункций в 1,7 раз ниже ($p=0,0002$); у умерших пациентов в 1,3 раза ниже ($p=0,01$). В данном исследовании впервые установлено, что при значении LBP на 3-и сутки после операции $\leq 821,95$ нг/мл риск развития SIRS в 3,5 раза, послеоперационных осложнений в 5,2 раза, летального исхода в 12,9 раза выше (OR 3,5, CI 1,46-8,4; OR 5,2, CI 1,80-15,12; OR 12,9, CI 1,54-108,21, соответственно). А при значении LBP на 3-и сутки после операции $\leq 700,15$ нг/мл риск развития органных дисфункций в 13,5 раза выше (OR 13,5, CI 3,536-51,54).

Также у пациентов с КРР отмечалась слабая отрицательная корреляция уровня LBP на 3-и сутки после операции с развитием SIRS (-0,277), послеоперационных осложнений (-0,304), органных дисфункций (-0,317) и летальным исходом (-0,232), также наблюдалась положительная слабая корреляция с уровнем sCD14-ST до оперативного вмешательства (0,279).

Как и в предыдущих исследованиях, уровень LBP у пациентов с КРР имел тенденцию к снижению на 3-й день после операции. Однако в данном исследовании достоверно худшие результаты (SIRS, послеоперационными инфекционно-воспалительными осложнениями, органные дисфункции и летальность) наблюдались у пациентов с более низким уровнем LBP на 3-и сутки и более значительным его снижением в динамике. Это противоречит предыдущим исследованиям, за исключением исследования Opal S.M. Согласно предыдущим исследованиям, уровень LBP должен повышаться при SIRS и возникновении инфекционно-воспалительных осложнений. Однако в результате данного исследования было показано, что пациенты с более низким уровнем LBP на 3-й день после операции и с более выраженным снижением уровня LBP более склонны к развитию SIRS, инфекционно-воспалительных осложнений, органных дисфункций и летальности [203-205]. Стоит отметить, что в нескольких исследованиях у пациентов с сепсисом и септическим шоком было доказано, что LBP представляет собой важную часть системы противомикробной защиты и его более высокие концентрации в острой фазе воспаления могут ингибировать связывание липополисахарида (ЛПС) с моноцитами в плазме крови, тем самым снижая выработку цитокинов. [211,212]. В экспериментальном исследовании на мышах, при внутрибрюшинном введении LBP ингибировал опосредованное ЛПС высвобождение цитокинов и предотвращал печеночную недостаточность, что привело к значительному снижению уровня смертности у с бактериемией [213]. Авторы сделали вывод, что мыши с дефицитом LBP значительно более

восприимчивы к внутрибрюшинной инфекции *Salmonella*, и что высокие концентрации LBP оказывают защитное действие против ЛПС и бактериальной инфекции и могут представлять собой физиологический механизм защиты от инфекции. Также наличие низкого уровня эндотоксина (ЛПС) у пациентов с хроническим заболеванием приводит к постоянному состоянию вялотекущего воспаления, препятствующего нормальному процессу заживления, что может объяснить высокую частоту послеоперационных осложнений у пациентов с хроническими заболеваниями, в том числе у пациентов с КРР. У оперированных больных с опухолями кишечника и опухолевой ОКН снижение уровня LBP возможно вследствие иммунодефицита и неспособности вырабатывать адекватный иммунный ответ на инфекционные стимулы, что может приводить к возникновению инфекционно-воспалительных осложнений, органических дисфункций, сепсису и даже летальному исходу [204,205].

Что касается sCD14-ST, несколько исследований показали, что существуют значительные различия в уровнях sCD14-ST у пациентов с SIRS и сепсисом, также в работе Giunco S. et al. [214] sCD14-ST изучался как маркер бактериальной транслокации у пожилых пациентов с КРР. Они обнаружили, что высокие уровни sCD14-ST коррелируют с более высоким процентом активированных клеток CD8 у пациентов с рецидивом или прогрессированием заболевания. Авторы связывали повреждение слизистой оболочки кишечника с высвобождением микробных продуктов, запускающих иммунную и провоспалительные реакции, которые негативно влияют на исход заболевания. Vodnik T. et al. [206] и Juroš G.F. et al. [207] обнаружили, что sCD14-ST обладает достоверной диагностической точностью при сепсисе, в их исследованиях уровень пресепсина у больных с сепсисом был значительно выше, чем у пациентов без него. В исследовании Carpio R. et al. [208] было показано, что sCD14-ST является точным диагностическим маркером для дифференциальной диагностики SIRS и сепсиса, а также предиктором исхода и риска смерти. Кроме того, Zhang J. et al. [209] в метаанализе определили sCD14-ST как эффективный биомаркер сепсиса. Среди 11 включенных исследований порог sCD14-ST варьировался от 317 до 729 пг/мл, чувствительность — от 0,70 до 1,00, а специфичность — от 0,62 до 0,93. В исследовании Endo S. et al. уровень sCD14-ST также коррелировал с тяжестью сепсиса и изменениями показателей SOFA [20], помимо этого, в исследовании Takahashi G. et al. было показано прогностическая значимость пресепсина в отношении 28-дневной смертности [215].

В данном исследовании сравнение уровня sCD14-ST в динамике до операции и на 3-и сутки после нее не дало статистической разницы ни в одной из исследуемых групп. Но у пациентов с КРР без ОКН уровень sCD14-ST до операции был в 1,7 раза ниже и после оперативного вмешательства был в 2,3 раза ниже в сравнении с группами с ОКН ($p = 0,0000$ и $p = 0,0001$, соответственно). Это говорит о том, что при возникновении острой кишечной непроходимости, уровень sCD14-ST в сыворотке крови повышается, что свидетельствует об усилении бактериальной транслокации [216-218].

Дополнительно, сравнивая между собой группы с опухолевой и неопухолевой ОКН не было выявлено статистической разницы в уровне sCD14-ST как до, так и на 3-и сутки после операции ($p=0,233$ и $p=0,465$, соответственно). Данный результат говорит о том, что уровень sCD14-ST не зависит от генеза ОКН.

В зависимости от степени клеточной дифференцировки опухоли и локализации опухолевого процесса статистических различий не было выявлено. В группе опухолевой ОКН у пациентов с III и IV стадиями опухолевого процесса уровни sCD14-ST до оперативного вмешательства были в 2,1 раза выше и на 3-и сутки после операции в 1,8 раза выше, чем у пациентов с I и II стадиями ($p=0,049$ и $p=0,029$, соответственно). У пациентов с опухолевой ОКН с инвазией кишечной стенки T3-T4 уровни sCD14-ST до операции были в 2,4 раза выше и на 3-и сутки после операции в 2,1 раза выше, чем в группе КРР без ОКН ($p=0,0001$ и $p=0,0002$, соответственно). Исходя из чего, можно сказать, что при наличии острой кишечной непроходимости при КРР, помимо изменений кишечной стенки вследствие наличия опухоли и непроходимости кишечника, вероятнее всего происходит повышение внутрибрюшного давления, что в совокупности усиливает бактериальную транслокацию.

В данной работе статистических различий по уровню sCD14-ST отдельно в каждой изучаемой группе в зависимости от развития SIRS, послеоперационных инфекционно-воспалительных осложнений и летальности выявлено не было. У умерших пациентов с КРР (с и без ОКН) уровни sCD14-ST на 3-и сутки после операции были в 2,4 раза выше ($p=0,009$), а у пациентов с органными дисфункциями наблюдалось повышение уровня sCD14-ST в динамике на 30%, в то время как у пациентов без органных дисфункций sCD14-ST снизился на 18% ($p=0,014$). Полученные данные подтверждают результаты предыдущих исследований, что уровень пресепсина выше у пациентов с органными дисфункциями и летальным исходом.

У уровня sCD14-ST до операции выявлена слабая положительная корреляция с уровнем лейкоцитов и мочевины до операции (0,274 и 0,328), наличием/отсутствием ОКН при поступлении (0,279), а также слабая отрицательная связь с уровнем лимфоцитов до операции (-0,270). Так же отмечалась слабая положительная корреляция уровня sCD14-ST на 3-и сутки после оперативного вмешательства с развитием послеоперационных осложнений (0,227), органных дисфункций (0,274) и летальным исходом (0,379), а также слабая отрицательная корреляция с уровнем лимфоцитов до операции (-0,267).

В данном исследовании выявлено, что при значении sCD14-ST на 3-и сутки после операции >520 пг/мл риск развития летального исхода выше в 12,3 раза (OR 12,3, CI 2,34-64,20). К тому же при III или IV стадии опухолевого процесса в 5,7 раз выше риск того, что уровень sCD14-ST на 3-и сутки после операции будет $>503,8$ пг/мл (OR 5,7, CI 2,01-16,09). А при повышении уровня sCD14-ST на 3-и сутки после операции или его снижении не более 8,8 пг/мл риск развития органных дисфункций в 6,5 раз выше, чем при его большем снижении (OR 6,5, CI 1,66-25,83).

Корреляционной взаимосвязи между 16s rRNA в мезентериальных лимфатических узлах и маркерами бактериальной транслокации в сыворотке крови (LBP и sCD14-ST) не было выявлено ($p > 0,05$). Полученные данные могут подтверждать тот факт, что наличие микроорганизмов в МЛУ не всегда вызывает системную воспалительную реакцию организма с выработкой биомаркеров микробной транслокации (LBP, sCD14-ST) в системный кровоток.

Поскольку значимых изменений в уровне и динамике изучаемых биомаркеров в группе неопухолевой ОКН не выявлено, это свидетельствует о том, что основной причиной, влияющей на бактериальную транслокацию у пациентов с колоректальным раком, является инвазия стенки кишки опухолью, тем не менее ОКН усугубляет бактериальную транслокацию при опухолях толстой кишки.

Разработанный дизайн исследования и использованные современные иммунологические и молекулярно-генетические методы и примененные позволили полностью решить поставленную цель исследования - определить значимость показателей LBP и sCD14-ST в качестве предикторов послеоперационных инфекционно-воспалительных осложнений у пациентов с колоректальным раком.

У пациентов с колоректальным раком LBP можно использовать в качестве прогностического критерия развития SIRS, послеоперационных инфекционно-воспалительных осложнений, органных дисфункций и летального исхода, а sCD14-ST - в качестве прогностического критерия развития органных дисфункций и летального исхода. Разработанная методика качественного и количественного определения 16s rRNA в мезентериальных лимфатических узлах позволяет определить бактериальную ДНК в широком диапазоне ее концентраций (КОЕ/мл от 10^2 до 10^8).

ВЫВОДЫ

1. При микробиологическом исследовании рост бактерий в мезентериальных лимфатических узлах выявлен в 30,0%, при этом преобладали микроорганизмы родов *Escherichia* (83,3%) и *Klebsiella* (16,7%). Детекция транслокации кишечной микрофлоры в МЛУ с помощью ПЦР-диагностики 16s rRNA дала положительный результат в 13,2%, что связано с ограничением метода при низком уровне КОЕ бактерий. Корреляционной взаимосвязи между наличием 16s rRNA в мезентериальных лимфатических узлах и маркерами бактериальной транслокации в сыворотке крови (LBP и sCD14-ST) не было выявлено ($p > 0,05$), что свидетельствует о том, что наличие микроорганизмов в МЛУ не всегда вызывает системную воспалительную реакцию организма с выработкой биомаркеров микробной транслокации (LBP, sCD14-ST) в системный кровоток.

2. Уровень и динамика LBP и sCD14-ST зависит от клинико-морфологических характеристик колоректального рака:

2.1. В группе опухолевой ОКН наблюдалось в 4 раза большее снижение уровня LBP в динамике, чем в группе КРР без ОКН ($p = 0,002$). У пациентов с КРР без ОКН уровень sCD14-ST до операции был в 1,7 раз ниже и после оперативного вмешательства был в 2,3 раза ниже, в сравнении с группой опухолей ОКН ($p = 0,0000$ и $p = 0,0001$, соответственно). Значимых изменений в уровне и динамике изучаемых биомаркеров в группе неопухолевой ОКН не выявлено. Данный факт свидетельствует о том, что основной причиной, влияющей на бактериальную транслокацию, является опухолевая инвазия стенки толстой кишки.

2.2. Уровень LBP и sCD14-ST до и на 3-и сутки после операции не зависит от локализации и степени клеточной дифференцировки опухоли. В то же время при инвазии опухоли кишечной стенки на уровне Т3-Т4 если КРР осложняется ОКН, уровень LBP в динамике снижается более чем в 5 раз, а уровни sCD14-ST до операции в 2,4 раза и на 3-и сутки после операции в 2,1 раза более высокие, чем у пациентов с КРР без ОКН ($p = 0,035$, $p = 0,0001$ и $p = 0,0002$, соответственно).

2.3. В группе КРР без ОКН у пациентов с IV стадией опухолевого процесса уровень LBP в динамике снижается более чем в 12 раз ($p = 0,022$ и $p = 0,021$, соответственно). В группе опухолевой ОКН у пациентов с III и IV стадиями опухолевого процесса уровни sCD14-ST до операции были в 2,1 раза и на 3-и сутки после оперативного вмешательства в 1,8 раза выше, чем у пациентов с I и II стадиями ($p = 0,049$ и $p = 0,029$).

3. У пациентов с колоректальным раком уровни LBP на 3-и сутки после операции при развитии неблагоприятных исходов значимо ниже, чем при нормальном послеоперационном течении: при наличии признаков SIRS в 1,3 раза ниже ($p = 0,003$); с развившимися послеоперационными осложнениями в 1,2 раза ниже ($p = 0,001$); при развитии органных дисфункций в 1,7 раз ниже ($p = 0,0002$); у умерших пациентов в 1,3 раза ниже ($p = 0,01$).

4. У пациентов с колоректальным раком уровни sCD14-ST на 3-и сутки после операции при развитии неблагоприятных исходов значимо выше, чем при нормальном послеоперационном течении: у умерших пациентов в 2,4 раза выше ($p=0,009$), а при наличии органных дисфункций наблюдалось повышение уровня sCD14-ST в динамике на 30% от исходного, в то время как у пациентов без органных дисфункций он, наоборот, снизился на 18% ($p=0,014$).

5. С помощью ROC-анализа установлены критические значения биомаркеров бактериальной транслокации при неблагоприятном течении послеоперационного периода у пациентов с КРР:

5.1. При значении LBP на 3-и сутки после операции $\leq 821,95$ нг/мл выше риск развития SIRS в 3,5 раза, послеоперационных осложнений в 5,2 раза, летального исхода в 12,9 раза (OR 3,5, CI 1,46-8,4; OR 5,2, CI 1,80-15,12; OR 12,9, CI 1,54-108,21, соответственно), а при значении LBP на 3-и сутки после операции $\leq 700,15$ нг/мл риск развития органных дисфункций выше в 13,5 раза.

5.2. При значении sCD14-ST на 3-и сутки после операции > 520 пг/мл в 12,3 раза выше риск развития летального исхода (OR 12,3, CI 2,34-64,20), а при повышении уровня sCD14-ST на 3-и сутки после операции от исходного риск развития органных дисфункций выше в 6,5 раза (OR 6,5, CI 1,66-25,83).

5.3. При значении LBP на 3-и сутки после операции $\leq 700,15$ нг/мл в сочетании с повышением уровня sCD14-ST в динамике от исходного риск развития органных дисфункций в 100,3 раза выше (OR 100,3, CI 9,1-1106,1).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Разработанная методика молекулярно-генетической качественной и количественной детекции 16s rRNA в мезентериальных лимфатических узлах с использованием технологии real-time ПЦР позволяет определить микробную ДНК в широком диапазоне ее концентраций (КОЕ/мл от 10^2 до 10^8) и внедрена в научно-практическую деятельность ЛКП НИЦ НАО «МУК».

2. По установленным критическим значениям биомаркеров бактериальной транслокации разработана методика определения риска развития неблагоприятных исходов оперативного вмешательства у пациентов с колоректальным раком, которая внедрена в работу хирургических отделений 3-х стационаров г. Караганды.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Arnold M., Sierra M.S., Laversanne M. et al. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality // *Gut*. – 2017. – V. 66(4). – P. 683–691.
- 2 Pisano M., Zorcolo L., Merli C. et al. 2017 WSES guidelines on colon and rectal cancer emergencies: obstruction and perforation // *World Journal of Emergency Surgery*. – 2018. – V. 13(1). – P. 36.
- 3 Показатели онкологической службы Республики Казахстан за 2020 год: статистические и аналитические материалы / Под редакцией Д.Р. Кайдаровой / Душимова З.Д., О.В. Шатковская, Б.Т. Онгарбаев, Г.Т. Сейсенбаева, А.Е. Ажмагамбетова, А.Ж. Жылкайдарова, И.К. Лаврентьева, М.С. Саги. – Алматы: АО «КазНИИОиР», 2021. – 366 с.
- 4 Щаева С.Н. Эффективность хирургического лечения больных с urgentными осложнениями колоректального рака // *Анналы хирургии*. – 2016. – Т. 21 (4). – С. 240–247.
- 5 Barnett A., Cedar A., Siddiqui F. et al. Colorectal cancer emergencies // *J Gastrointest Cancer*. – 2013. – V. 44(2). – P. 132–142
- 6 Gore R.M., Silvers R.I., Thakrar K.H. et al. Bowel obstruction // *Radiol Clin N Am*. – 2015. - V. 53(6). – P. 1225–40.
- 7 Catena F., De Simone B., Coccolini F. et al. Bowel obstruction: a narrative review for all physicians // *World J Emerg Surg*. – 2019. – V. 14. – P. 20.
- 8 Taylor M.R., Lalani N. Adult small bowel obstruction // *Acad Emerg Med*. – 2013. – V. 20. – P. 528–544.
- 9 Roses R. E., Folkert I. W., Krouse R. S. Malignant Bowel Obstruction // *Surgical Oncology Clinics of North America*. - 2018. – V. 27(4). – P. 705-715.
- 10 Shwaartz C., Fields A. C., Prigoff J. G. et al. Should patients with obstructing colorectal cancer have proximal diversion? // *The American Journal of Surgery*. – 2017. – V. 213(4). – P. 742–747.
- 11 Chiu H.-C., Lin Y.-C., Hsieh H.-M. et al. The impact of complications on prolonged length of hospital stay after resection in colorectal cancer: A retrospective study of Taiwanese patients // *Journal of International Medical Research*. – 2017. – V. 45(2). – P. 691–705.
- 12 Simillis C., Kalakouti E., Afxentiou T. et al. Primary Tumor Resection in Patients with Incurable Localized or Metastatic Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis // *World J Surg*. – 2019. – V. 43(7). – P. 1829-1840.
- 13 Wancata L. M., Abdelsatta, Z. M., Suwanabol P. A. et al. Outcomes After Surgery for Benign and Malignant Small Bowel Obstruction // *Journal of Gastrointestinal Surgery*. – 2016. – V. 21(2). – P. 363–371.
- 14 Mellor K., Hind D., Lee M. J. A systematic review of outcomes reported in small bowel obstruction research // *Journal of Surgical Research*. – 2018. – V. 229. – P. 41–50.
- 15 Stubljär D. Effective Strategies for Diagnosis of Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) due to Bacterial Infection in Surgical Patients // *Infection Disorder Drug Targets*. – 2015. – V. 15(1). – P. 53- 56.

- 16 Tsujimoto H., Ono S., Mochizuki H. Role of Translocation of Pathogen-Associated Molecular Patterns in Sepsis // *Digestive Surgery*. – 2009. – V. 26(2). – P. 100–109.
- 17 MacFie J., Reddy B.S., Gatt M. et al. Bacterial translocation studied in 927 patients over 13 years // *Br J Surg*. – 2006. – V. 93. – P. 87–93.
- 18 Fang L., Xu Z., Wang G. S. Directed evolution of an LBP/ CD14 inhibitory peptide and its anti-endotoxin activity // *PLoS One*. - 2014. – V. 9(7). - e101406.
- 19 Stehle J. R., Leng X., Kitzman D. W. et al. Lipopolysaccharide-Binding Protein, a Surrogate Marker of Microbial Translocation, Is Associated With Physical Function in Healthy Older Adults // *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*. – 2012. – V. 67(11). – P. 1212–1218.
- 20 Kell D. B., Pretorius E. On the translocation of bacteria and their lipopolysaccharides between blood and peripheral locations in chronic, inflammatory diseases: the central roles of LPS and LPS-induced cell death // *Integrative Biology*. – 2015. - V. 7(11). – P. 1339–1377.
- 21 Mierzchala M., Krzystek-Korpacka M., Gamian A., Durek G. Quantitative indices of dynamics in concentrations of lipopolysaccharide-binding protein (LBP) as prognostic factors in severe sepsis/septic shock patients — Comparison with CRP and procalcitonin // *Clinical Biochemistry*. – 2011. – V. 44(5-6). – P. 357–363.
- 22 Mussap M., Noto A., Fravega M., Fanos V. Soluble CD14 subtype presepsin (sCD14-ST) and lipopolysaccharide binding protein (LBP) in neonatal sepsis: new clinical and analytical perspectives for two old biomarkers // *J Matern Fetal Neonatal Med*. – 2011. – V. 24(2). – P. 12–14.
- 23 van Maldeghem I., Nusman C.M., Visser D.H. Soluble CD14 subtype (sCD14-ST) as biomarker in neonatal early-onset sepsis and late-onset sepsis: a systematic review and meta-analysis // *BMC Immunology*. - 2019. – V. 20(17). - doi: 10.1186/s12865-019-0298-8.
- 24 Hosomi S., Yamagami H., Itani S. et al. Sepsis Markers Soluble IL-2 Receptor and Soluble CD14 Subtype as Potential Biomarkers for Complete Mucosal Healing in Patients With Inflammatory Bowel Disease // *J Crohns Colitis*. – 2018. – V. 12(1). – P. 87-95.
- 25 Masson S., Caironi P., Fanizza C. et al. Circulating presepsin (soluble CD14 subtype) as a marker of host response in patients with severe sepsis or septic shock: data from the multicenter, randomized ALBIOS trial // *Intensive Care Med*. – 2015. – V. 41(1). – P. 12-20.
- 26 Endo S., Suzuki Y., Takahashi G. et al. Presepsin as a powerful monitoring tool for the prognosis and treatment of sepsis: A multicenter prospective study // *Journal of Infection and Chemotherapy*. – 2014. – V. 20(1). – P. 30–34.
- 27 Frago R., Ramirez E., Millan M. et al. Current management of acute malignant large bowel obstruction: a systematic review // *Am J Surg*. – 2014. – V. 207(1). – P. 27–38.

- 28 Денисенко В.Л., Гаин Ю.М. Осложнения колоректального рака: проблемы и перспективы // *Новости Хирургии*. - 2011. - Т. 19, №1. - С. 103-111.
- 29 Животовский А.С., Кутихин А.Г. Эпидемиология колоректального рака: обзор факторов риска // *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. - 2013. - Т. 1(86). - С. 58-64.
- 30 Турбекова М.Н., Камхен В.Б. Региональные особенности эпидемиологии колоректального рака в Казахстане // *Международный журнал экспериментального образования*. - 2015. - Т. 11 - С. 52-53.
- 31 Torre L.A., Siegel R.L., Ward E.M., Jemal A. Global cancer incidence and mortality rates and trends — an update // *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* - 2016. - V. 25(1). - P. 16–27.
- 32 Щаева С.Н., Нарезкин Д. В., Соловьев В. И. Анализ гистологического строения, типов роста и характера метастазирования осложненного колоректального рака // *Онкологическая колопроктология*. - 2016. - Т. 6(1). - С. 14–21.
- 33 Беляев А. М. Возможности нестандартных подходов к лечению острой толстокишечной непроходимости // *Достижения и перспективы лечения и реабилитации в колопроктологии: материалы науч.-практ. конф.* - СПб.: Аграф+, 2007. - С. 63-64.
- 34 Шелыгин Ю.А. Справочник по колопроктологии. / Под ред. Ю.А. Шелыгина, Л.А. Благодарного. - М.: Литтерра, 2014. - С. 229–267.
- 35 Киселев А.Ю. Диагностика и хирургическое лечение острой обтурационной кишечной непроходимости: автореф. канд. мед. наук: 14.01.17 – Владивосток: ГОУВПО "ВГМУ", 2011. - 23 с.
- 36 Нуршабаева А.Е., Даулеткалиева Ж.А. Анализ охвата населения скрининговыми исследованиями по раннему выявлению колоректального рака // *Астана медициналық журналы*. - 2018. - Т. 4(98). - С. 154-159.
- 37 Абдуллаев М.Ш., Нургазиев К.Ш., Жылкайдарова А.Ж., Мансурова А.Б. Эпидемиологические аспекты колоректального рака в Казахстане // *Новости хирургии*. - 2017. - Т. 25, № 4. - С. 394-403.
- 38 Шевченко Ю.Л., Стойко Ю.М., Левчук А.Л. и др. Сочетание осложненных форм рака толстой кишки: клиника, диагностика, хирургическая тактика // *Вестник экспериментальной и клинической хирургии*. - 2011. - Т. 4(4). - С. 641–646.
- 39 Kam M.H., Tang C.L., Chan E. et al. Systematic review of intraoperative colonic irrigation vs manual decompression in obstructed left-sided colorectal emergencies // *Int J Colorectal Dis.* - 2009. -V. 24(9). - P. 1031–1037.
- 40 Состояние онкологической помощи населению России в 2018 году / Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. - М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2019. - 236 с.

- 41 Zielinski M.D., Merchea A., Heller S.F., You Y.N. Emergency management of perforated colon cancers: how aggressive should we be? // *J Gastrointest Surg.* – 2011. – V. 15(12). – P. 2232–2238.
- 42 Rudra K.M., Charles A.M. Surgical management of obstructed and perforated colorectal cancer: still debating and unresolved issues // *Colorectal Cancer.* – 2013. – V. 2(6). – P. 573–584.
- 43 Кузьмин-Крутецкий М. И. Возможности эндоскопии в диагностике и лечении толстокишечной непроходимости опухолевого генеза // *Новости колопроктологии.* – 2010. – Т. 3. – С. 73-76.
- 44 Матюхин В.В. Диагностика и лечение синдрома эндогенной интоксикации при острой обтурационной тонкокишечной непроходимости: автореф. канд. мед. наук: 14.01.17 – Волгоград: ГБОУВПО "ВолгГМУ", 2013. – 22 с. – Инв. № 005051618.
- 45 Ten Broek R.P.G., Issa Y., van Santbrink E.J. et al. Burden of adhesions in abdominal and pelvic surgery: systematic review and met-analysis // *BMJ.* – 2013. – V. 347. - f5588.
- 46 Ten Broek R.P.G., Krielen P., Di Saverio S. et al. Bologna guidelines for diagnosis and management of adhesive small bowel obstruction (ASBO): 2017 update of the evidence-based guidelines from the world society of emergency surgery ASBO working group // *World Journal of Emergency Surgery.* 2018. - V. 13(1). – P. 24.
- 47 Алекперов С. Ф. Обтурационная опухолевая толстокишечная непроходимость: клиника, диагностика, лечение: автореф. докт. мед. наук: 005059073 – М., 2013. – 47 с.
- 48 Ачкасов Е.Е., Алекперов С.Ф., Мельников П.В. и др. Гистопатоморфологическис изменения кишечника при обтурационной опухолевой толстокишечной непроходимости // *Биомедицина.* – 2012. – Т. 4. – С. 117-127.
- 49 Webster P.J., Aldoori J., Burke D.A. Optimal management of malignant left-sided large bowel obstruction: do international guidelines agree? // *World Journal of Emergency Surgery.* – 2019. – V. 14(1). – P. 23.
- 50 Morris E.J.A., Taylor E.F., Thomas J.D. et al. Thirtyday postoperative mortality after colorectal cancer surgery in England // *Gut.* – 2011. – V. 60. – P. 806–813.
- 51 Sperry J., Cohen M. J. Acute Obstruction // *Surgical Clinics of North America.* – 2014. – V. 94(1). – P. 77–96.
- 52 Zembower T.R. Epidemiology of infections in cancer patients // *Cancer Treat.Res.* – 2014. – V. 161. – P. 43–89.
- 53 Galloway-Peña, J., Brumlow, C., Shelburne, S. Impact of the Microbiota on Bacterial Infections during Cancer Treatment // *Trends in Microbiology.* – 2017. – V. 25(12). – P. 992–1004.
- 54 Мишин А.С. Лечение колоректального рака, осложненного острой непроходимостью // *Вестник ТГУ.* – 2012. – Т. 17, №.2. – С. 645-648.

- 55 Sears C.L., Garrett W.S. Microbes, microbiota, and colon cancer // *Cell Host Microbe*. – 2014. – V. 15(3). – P. 317–328.
- 56 Курилов В.П. Энтеральная недостаточность при острой кишечной непроходимости в раннем послеоперационном периоде: автореф. канд. мед. наук: 14.01.17 - М.: ГБОУВПО «Первый МГМУ», 2011. - 27 с. – Инв. №4856127.
- 57 Vaishnavi C. Translocation of gut flora and its role in sepsis // *Indian Journal of Medical Microbiology*. – 2013. – V. 31(4). – P. 334-342.
- 58 Papoff P., Ceccarelli G., d’Ettorre G. et al. Gut microbial translocation in critically ill children and effects of supplementation with pre- and probiotics // *Int J Microbiol*. - 2012. – V. 2012. – P. 1-8.
- 59 Singhi S.C., Baranwal A. Probiotic use in the critically ill // *Indian J Pediatr*. - 2008. – V. 75. – P. 621-627.
- 60 Berg R.D., Garlington A.W. Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in a gnotobiotic mouse model // *Infect Immun*. - 1979. – V. 23. – P. 403-411.
- 61 O’Boyle C.J., MacFie J., Mitchell C.J. et al. Microbiology of bacterial translocation in humans // *Gut*. – 1998. – V. 42. – P. 29-35.
- 62 Салато О.В., Попов М.В., Галеев Ю.М. Патофизиологические механизмы бактериального эндотоксикоза при странгуляционной кишечной непроходимости // *Бюллетень ВСНЦ СО РАМН*. – 2010. – Т. 5. – С. 192-196.
- 63 Григорьев Е.Г., Галеев Ю.М., Попов М.В. и др. Механизмы формирования абдоминального сепсиса при перитоните и странгуляционной кишечной непроходимости // *Бюллетень СО РАМН*. – 2012. – Т. 32, №1. – С. 47-56.
- 64 Галеев Ю.М. Методы ядерной медицины в изучении патогенеза бактериальной транслокации абдоминального происхождения: автореф. докт. мед. наук: 14.01.13 – Томск, 2012. – 51 с. – Инв. №005007341.
- 65 Wells C.L. Colonization and translocation of intestinal bacterial flora // *Transplant Proc*. – 1996. – V. 28 – P. 2653-2656.
- 66 Lata J., Stiburek O., Kopacova M. Spontaneous bacterial peritonitis: a severe complication of liver cirrhosis // *World J. Gastroenterol*. – 2009. – V. 15(44). – P. 5505-5510.
- 67 Жаркова М.С. Бактериальная транслокация в патогенезе инфекционных осложнений у больных циррозом печени: автореф. докт. мед. наук: 14.01.28 – М.: ГБОУВПО «Первый МГМУ», 2012. – 25 с. – Инв. №005054957.
- 68 Масленников Р.В. Бактериальная транслокация как причина системной воспалительной реакции при циррозе печени: дис. ... канд. мед. наук: 4.01.28 – М.: ГБОУВПО «Первый МГМУ», 2018. – 133 с.
- 69 Kramski M., Gaeguta A. J., Lichtfusset G. F. et al. Novel Sensitive Real-Time PCR for Quantification of Bacterial 16S rRNA Genes in Plasma of HIV-Infected Patients as a Marker for Microbial Translocation // *J Clin Microbiol*. – 2011. – V. 49(10). - P. 3691-3693.

- 70 Li Q., Wang C., Tang C. et al. Identification and Characterization of Blood and Neutrophil-Associated Microbiomes in Patients with Severe Acute Pancreatitis Using Next-Generation Sequencing // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. – 2018. – V. 8. – P. 5.
- 71 Magnotti L.J., Deitch E.A. Burns, bacterial translocation, gut barrier function, and failure // *J Burn Care Rehabil*. – 2005. –V. 26(5). – P. 383-391.
- 72 Carron C., Pais de Barros J.-P., Gaiffe E. et al. End-Stage Renal Disease-Associated Gut Bacterial Translocation: Evolution and Impact on Chronic Inflammation and Acute Rejection After Renal Transplantation // *Frontiers in Immunology*. – 2019. – V. 10. – P. 1630.
- 73 Wang F., Jiang H., Shi K. et al. Gut bacterial translocation is associated with microinflammation in end-stage renal disease patients // *Nephrology*. - 2012. – V. 17(8). –P. 733–738.
- 74 Chowdry S.M., Vaishnavi C. Spontaneous bacterial peritonitis. In: Vaishnavi C., editor. *Infections of the Gastrointestinal System*. - New Delhi, London, Philadelphia, Panama: Publishers Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd. - 2013. - P. 532-542.
- 75 Alexopoulou A., Agiasotelli D., Vasilieva L.E., Dourakis S.P. Bacterial translocation markers in liver cirrhosis // *Ann Gastroenterol*. – 2017. – V. 30(5). – P. 486–497.
- 76 Tremaroli V., Backhed F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism // *Nature*. – 2012. – V. 489. – P. 242–249.
- 77 Kaiko G.E., Stappenbeck T.S. Host–microbe interactions shaping the gastrointestinal environment // *Trends Immunol*. – 2014. – V. 35. – P. 538–548.
- 78 Kamada N., Chen G.Y., Inohara N. Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota // *Nat Immunol*. – 2013. – V. 14. – P. 685–690.
- 79 Andersen K., Kesper M.S., Marschner J.A. et al. Intestinal dysbiosis, barrier dysfunction, and bacterial translocation account for CKD–related systemic inflammation // *JAm Soci Nephrol*. – 2016. – V. 28. - P. 76.
- 80 Alverdy J.C., Krezalek M.A. Collapse of the microbiome, emergence of the pathobiome, and the immunopathology of sepsis // *Crit Care Med*. – 2017. – V. 45. – P. 337–347.
- 81 Natividad J.M., Verdu E.F. Modulation of intestinal barrier by intestinal microbiota: pathological and therapeutic implications // *Pharmacol Res*. – 2013. – V. 69. - P. 42–51.
- 82 McDonald D., Ackermann G., Khailova L. et al. Extreme dysbiosis Provisional 40 / 54 of the microbiome in critical illness // *mSphere*. - 2016. – V. 1. - e00199–16.
- 83 Ojima M., Motooka D., Shimizu K. et al. Metagenomic analysis reveals dynamic changes of whole gut microbiota in the acute phase of intensive care unit patient // *Dig Dis Sci*. – 2016. – V. 61. – P. 1628–1634.
- 84 Lankelma J.M., van Vught L.A., Belzer C. et al. Critically ill patients demonstrate large interpersonal variation in intestinal microbiota dysregulation: a pilot study // *Intensive Care Med*. – 2017. – V. 43. – P. 59–68.

- 85 Freedberg D.E., Zhou M.J., Cohen M.E. et al. Pathogen colonization of the gastrointestinal microbiome at intensive care unit admission and risk for subsequent death or infection // *Intensive Care Med.* – 2018. – V. 44. – P. 1203–1211.
- 86 Howard B.M., Kornblith L.Z., Christie S.A. et al. Characterizing the gut microbiome in trauma: significant changes in microbial diversity occur early after severe injury // *Trauma Surg Acute Care Open.* – 2017. - V. 2. - e000108.
- 87 Wang X., Yang J., Tian F. et al. Gut microbiota trajectory in patients with severe burn: A time series study // *J Crit Care.* – 2017. – V. 42. – P. 310–316.
- 88 Dickson R.P. The microbiome and critical illness // *Lancet Respir Med.* – 2016. – V. 4. – P. 59–72.
- 89 Klingensmith N.J., Coopersmith C.M. The gut as the motor of multiple organ dysfunction in critical illness// *Crit Care Clin.* – 2016. – V. 32. – P. 203–212.
- 90 Haak B.W., Wiersinga W.J. The role of the gut microbiota in sepsis // *Lancet Gastroenterol Hepatol.* – 2017. – V. 2. – P. 135–143.
- 91 Buffie C.G., Pamer E.G. Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens // *Nat Rev Immunol.* – 2013. – V. 13. – P. 790–801.
- 92 Diehl G.E., Longman R.S., Zhang J.X. et al. Microbiota restricts trafficking of bacteria to mesenteric lymph nodes by CX3CR1hi cells // *Nature.* – 2013. – V. 494. – P. 116–120.
- 93 Farache J., Koren I., Milo I. et al. Luminal bacteria recruit CD103+ dendritic cells into the intestinal epithelium to sample bacterial antigens for presentation // *Immunity.* - 2013. – V. 38. – P. 581–595.
- 94 Meng M., Klingensmith N.J., Coopersmith C.M. New insights into the gut as the driver of critical illness and organ failure // *Curr Opin Crit Care.* – 2017. – V. 23(2). – P. 143-148.
- 95 Kabaroudis A., Papaziogas B., Koutelidakis I. et al. Disruption of the small-intestine mucosal barrier after intestinal occlusion: a study with light and electron microscopy // *J Invest Surg.* - 2003. – V. 16(1). - P. 23–28.
- 96 Samel S., Keese M., Kleczka M. et al. Microscopy of bacterial translocation during small bowel obstruction and ischemia in vivo—a new animal model // *BMC Surg.* - 2002. – V. 2. – P. 6–13.
- 97 Kamada N., Kim Y.G., Sham H.P. et al. Regulated virulence controls the ability of a pathogen to compete with the gut microbiota // *Science.* – 2012. – V. 336. – P. 1325–1329.
- 98 de Sablet T., Chassard C., Bernalier-Donadille A. et al. Human microbiota-secreted factors inhibit Shiga toxin synthesis by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 // *Infect Immun.* – 2009. – V. 77. – P. 783–790.
- 99 Hamer H.M., De Preter V., Windey K., Verbeke K. Functional analysis of colonic bacterial metabolism: relevant to health? // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* – 2012. - V. 302. - G1–9.
- 100 McCall I.C., Betanzos A., Weber D.A. et al. Effects of phenol on barrier function of a human intestinal epithelial cell line correlate with altered tight junction protein localization // *Toxicol Appl Pharmacol.* 2009. – V. 241. – P. 61–70.

- 101 Cox L.M., Yamanishi S., Sohn J. et al. Altering the intestinal microbiota during a critical developmental window has lasting metabolic consequences // *Cell.* – 2014. – V. 158. – P. 705–721.
- 102 Van Praagh J.B., de Go_u M.C., Bakker I.S. et al. Mucus microbiome of anastomotic tissue during surgery has predictive value for colorectal anastomotic leakage // *Ann. Surg.* – 2019. – V. 269. – P. 911–916.
- 103 Brennan C.A., Garrett W.S. Gut microbiota, inflammation, and colorectal cancer // *Annu Rev Microbiol.* – 2016. – V. 70. – P. 395–411.
- 104 Assimakopoulos S.F., Vagianos C.E., Patsoukis N. et al. Evidence for intestinal oxidative stress in obstructive jaundice-induced gut barrier dysfunction in rats // *Acta Physiol Scand.* – 2004. – V. 180. – P. 177-185.
- 105 Cakmakci M., Tirnaksiz B., Hayran M. et al. Effects of obstructive jaundice and external biliary diversion on bacterial translocation in rats // *Eur J Surg.* - 1996. – V. 162(7). – P. 567–571.
- 106 Parks R.W., Clements W.D., Smye M.G. et al. Intestinal barrier dysfunction in clinical and experimental obstructive jaundice and its reversal by internal biliary drainage // *Br J Surg.* – 1996. – V. 83(10). – P. 1345– 1349.
- 107 Kuzu M.A., Kale T.I., Col C. et al. Obstructive jaundice promotes bacterial translocation in humans // *Hepatogastroenterology.* - 1999. – V. 46(28). – P. 2159–2164.
- 108 Thaiss C.A., Zmora N., Levy M., Elinav E. The microbiome and innate immunity // *Nature.* – 2016. – V. 535. – P. 65–74.
- 109 Cummings J.H., Antoine J.M., Azpiroz F. et al. PASSCLAIM—gut health and immunity // *Eur J Nutr.* – 2004. – V. 43(2). – P. 118–173.
- 110 Johansson M.E., Hansson G.C. Immunological aspects of intestinal mucus and mucins // *Nat Rev Immunol.* – 2016. – V. 16. – P. 639–649.
- 111 McGuckin M.A., Lindén S.K., Sutton P., Florin T.H. Mucin dynamics and enteric pathogens // *Nat Rev Microbiol.* – 2011. – V. 9. – P. 265–278.
- 112 Pabst O., Cerovic V., Hornef M. Secretory IgA in the coordination of establishment and maintenance of the microbiota // *Trends Immunol.* – 2016. – V. 37. – P. 287–296.
- 113 Bergstrom K.S., Kisson-Singh V., Gibson D.L. et al. Muc2 protects against lethal infectious colitis by disassociating pathogenic and commensal bacteria from the colonic mucosa // *PLoS Pathog.* – 2010. – V. 6. - e1000902.
- 114 Teltschik Z., Wiest R., Beisner J. et al. Intestinal bacterial translocation in rats with cirrhosis is related to compromised Paneth cell antimicrobial host defense // *Hepatology.* – 2012. - V. 55. – P. 1154–1163.
- 115 Holtmeier W., Kabelitz D. Gammadelta T cells link innate and adaptive immune responses // *Chem Immunol Allergy.* – 2005. –V. 86. – P. 151–183.
- 116 Choudhry M.A., Fazal N., Goto M. et al. Gut-associated lymphoid T cell suppression enhances bacterial translocation in alcohol and burn injury // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* – 2002. – V. 282. – P. 937–947.

- 117 Andreu-Ballester J.C., Tormo-Calandín C., Garcia-Ballesteros C. et al. Association of $\gamma\delta$ T cells with disease severity and mortality in septic patients // *Clin Vaccine Immunol.* – 2013. – V. 20. – P. 738–746.
- 118 Levy M., Kolodziejczyk A.A., Thaiss C.A., Elinav E. Dysbiosis and the immune system // *Nat Rev Immunol.* – 2017. – V. 17. – P. 219-232.
- 119 van der Poll T., van de Veerdonk F.L., Scicluna B.P., Netea M.G. The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets // *Nat Rev Immunol.* – 2017. – V. 17. – P. 407–420.
- 120 Francés R., Muñoz C., Zapater P. et al. Bacterial DNA activates cell mediated immune response and nitric oxide overproduction in peritoneal macrophages from patients with cirrhosis and ascites // *Gut.* – 2004. – V. 53. - P. 860-864.
- 121 Подопригора Г.И., Кафарская Л.И., Байнов Н.А., Шкопоров А.Н. Бактериальная транслокация из кишечника: микробиологические, иммунологические и патофизиологические аспекты // *Вестник Российской академии медицинских наук.* – 2015. – Т. 70 № 6. – С. 640-650.
- 122 Assimakopoulos S. F., Triantos C., Thomopoulos K. et al. Gut-origin sepsis in the critically ill patient: pathophysiology and treatment // *Infection.* – 2018. – V. 46(6). – P. 751-760.
- 123 Wang F., Li Q., Wang C., Tang C., Li J. Dynamic alteration of the colonic microbiota in intestinal ischemia–reperfusion injury // *PLoS One.* – 2012. – V. 7. -e42027.
- 124 Clark J.A., Coopersmith C.M. Intestinal crosstalk: a new paradigm for understanding the gut as the ‘motor’ of critical illness // *Shock Augusta Ga.* - 2007. - V. 28. – P. 384–393.
- 125 Zapater P., Francés R., González-Navajas J.M. et al. Serum and ascitic fluid bacterial DNA: a new independent prognostic factor in noninfected patients with cirrhosis // *Hepatology.* – 2008. – V. 48. – P. 1924-1931.
- 126 Weber B., Saurer L., Mueller C. Intestinal macrophages: differentiation and involvement in intestinal immunopathologies // *Semin Immunopathol.* – 2009. – V. 31(2). – P. 171-184.
- 127 Arrieta M.C., Bistritz L., Meddings J.B. Alterations in intestinal permeability // *Gut.* – 2006. – V. 55. – P. 1512-1520.
- 128 Assimakopoulos S.F., Papageorgiou I., Charonis A. Enterocytes tight junctions: from molecules to diseases // *World J Gastrointest Pathophysiol.* - 2011. – V. 2. –P. 123–137.
- 129 Anand R. J., Leaphart C. L., Mollen K. P., Hackam D. J. The role of the intestinal barrier in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis // *Shock.* – 2007. – V. 27(2). – P. 124–133.
- 130 MacFie J. Current status of bacterial translocation as a cause of surgical sepsis // *Br Med Bull.* - 2004. – V. 71. – P. 1-11.
- 131 Wiest R., Rath H.C. Bacterial translocation in the gut // *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* – 2003. – V. 17. – P. 397-425.

- 132 Steinberg S.M. Bacterial translocation. What it is and what it is not // *Am J Surg.* - 2003. – V. 186. – P. 301-305.
- 133 Baumgart D.C., Dignass A.U. Intestinal barrier function // *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* – 2002. – V. 5. – P. 685-694.
- 134 Schietroma M., Pessia B., Colozzi S. et al. Septic complications after resection for middle or low rectal cancer: role of gut barrier function and inflammatory serum markers // *Digestive Surgery.* - 2017. – V. 34(6). – P. 507–517.
- 135 Takesue Y., Kakehashi M., Ohge H. et al. Bacterial translocation: not a clinically relevant phenomenon in colorectal cancer // *World Journal of Surgery.* – 2005. – V. 29(2). – P. 198–202.
- 136 Deitch E.A. Bacterial translocation or lymphatic drainage of toxic products from the gut: what is important in human beings? // *Surgery.* - 2002. – V. 131(3). – P. 241–244.
- 137 Deitch E.A., Xu D., Kaise V.L. Role of the gut in the development of injury- and shock induced SIRS and MODS: the gut-lymph hypothesis, a review// *Front Biosci.* – 2006. – V. 11. – P. 520–528.
- 138 Deitch E.A. Role of the gut lymphatic system in multiple organ failure // *Curr Opin Crit Care.* – 2001. – V. 7(2). – P. 92–98.
- 139 Senthil M., Brown M., Xu D.Z. et al. Gut-lymph hypothesis of systemic inflammatory response syndrome/multiple-organ dysfunction syndrome: validating studies in a porcine model // *J Trauma.* - 2006. – V. 60(5). - P. 958–965.
- 140 Magnotti L.J., Upperman J.S., Xu D.Z. et al. Gut-derived mesenteric lymph but not portal blood increases endothelial cell permeability and promotes lung injury after hemorrhagic shock // *Ann Surg.* – 1998. – V. 228. – P. 518–527.
- 141 Oliver J.D. The viable but nonculturable state in bacteria // *J Microbiol.* – 2005. – V. 43. – P. 93–100.
- 142 Diniz S.O., Barbosa A.J., Araújo I.D. et al. Assessment of bacterial translocation in obstructive jaundice using Tc-99m Escherichia coli // *Braz Arch Biol Tech.* - 2005. – V. 48. - P. 45-49.
- 143 Ames N. J., Ranucci A., Moriyama B., Wallen G. R. The Human Microbiome and Understanding the 16S rRNA Gene in Translational Nursing Science // *Nursing Research.* – 2017. – V. 66(2). – P. 184–197.
- 144 Schoeffel U., Pelz K., Häring R. U. et al. Inflammatory consequences of the translocation of bacteria and endotoxin to mesenteric lymph nodes // *The American Journal of Surgery.* – 2000. – V. 180(1). – P. 65-72.
- 145 Kau A.L., Ahern P.P., Griffin N.W. et al. Human nutrition, the gut microbiome and the immune system // *Nature.* – 2011. – V.474. – P.327–336.
- 146 Villette R., Autaa G., Hind S. et al. Refinement of 16S rRNA gene analysis for low biomass biospecimens // *Scientific Reports.* – 2021. – V. 11(1). doi:10.1038/s41598-021-90226-2.
- 147 Marchel H., M.Wróblewska. Bloodstream infections – etiology and current microbiological diagnostics // *Polish Annals of Medicine.* – 2022. – V. 29(1). – P. 83-87.

- 148 Such J., France R., Munoz C. et al. Detection and identification of bacterial DNA in patients with cirrhosis and culture-negative, nonneutrocytic ascites // *Hepatology*. – 2002. – V. 36. – P. 135-141.
- 149 Kane T.D., Alexander J.W., Johannigman J.A. The detection of microbial DNA in the blood: A sensitive method for diagnosing bacteremia and/or bacterial translocation in surgical patients // *Ann Surg*. – 1998. – V. 227. – P. 1-9.
- 150 Fasano A. Intestinal permeability and its regulation by zonulin: diagnostic and therapeutic implications // *Clin Gastroenterol Hepatol*. – 2012. – V. 10. – P. 1096-1100.
- 151 Duerksen D., Wilhelm-Boyles C., Parry D.M. Intestinal permeability in long-term follow-up of patients with celiac disease on a gluten-free diet // *Dig Dis Sci*. – 2005. – V. 50. – P. 785-790.
- 152 Ajamian M., Steer D., Rosella G., Gibson P.R. Serum zonulin as a marker of intestinal mucosal barrier function: May not be what it seems // *PLoS ONE*. – 2019. – V. 14(1). - e0210728.
- 153 Buttet M., Traynard V., Tran T.T.T. et al. From fatty-acid sensing to chylomicron synthesis: role of intestinal lipid-binding proteins // *Biochimie*. – 2014. – V. 96. – P. 37-47.
- 154 Kanda T., Tsukahara A., Ueki K. et al. Diagnosis of ischemic small bowel disease by measurement of serum intestinal fatty acid-binding protein in patients with acute abdomen: a multicenter, observer-blinded validation study // *J Gastroenterol*. – 2011. – V. 46. – P. 492-500.
- 155 Matsumoto S., Sekine K., Funaoka H. et al. Diagnostic performance of plasma biomarkers in patients with acute intestinal ischaemia // *Br J Surg*. – 2014. – V. 101. – P. 232-238.
- 156 Guzel M., Sozuer E.M., Salt O. et al. The value of the serum I-FABP level for diagnosing acute mesenteric ischemia // *Surg Today*. – 2013. - V. 44. – P. 2072-2076.
- 157 Schellekens D.H.S.M., Grootjans J., Dello S.A.W.G. et al. Plasma intestinal fatty acid-binding protein levels correlate with morphologic epithelial intestinal damage in a human translational ischemia-reperfusion model // *J Clin Gastroenterol*. – 2013. – V. 48. – P. 253-260.
- 158 Piton G., Capellier G. Biomarkers of gut barrier failure in the ICU // *Curr Opin Crit Care*. – 2016. – V. 22(2). – P. 152-60.
- 159 Opal S.M. The clinical relevance of endotoxin in human sepsis: a critical analysis // *J Endotoxin Res*. – 2002. – V. 8. – P. 473-476.
- 160 Munford R.S. Detoxifying endotoxin: time, place and person // *J Endotoxin Res*. – 2005. – V. 11. – P. 69-84.
- 161 Marnell L., Mold C., Du Clos T.W. C-reactive protein: Ligands, receptors and role in inflammation // *Clin Immunol*. – 2005. – V. 117. – P. 104-111.
- 162 Park W.B., Lee K.D., Lee C.S. et al. Production of C-reactive protein in *Escherichia coli*-infected patients with liver dysfunction due to liver cirrhosis // *Diagn Microbiol Infect Dis*. – 2005. – V. 51. – P. 227-230.

- 163 Silvestre J.P., Coelho L.M., Póvoa P.M. Impact of fulminant hepatic failure in C-reactive protein? // *J Crit Care.* – 2010. – V. 25. – P. 7-12.
- 164 Cervoni J.P., Thévenot T., Weil D., et al. C-reactive protein predicts short-term mortality in patients with cirrhosis // *J Hepatol.* – 2012. – V. 56. – P. 1299-1304.
- 165 Ortega-Deballon P., Radais F., Facy O., et al. C-reactive protein is an early predictor of septic complications after elective colorectal surgery // *World Journal of Surgery.* – 2010. – V. 34(4). – P. 808–814.
- 166 Boersema G.S.A., Wu Z., Menon A.G., Kleinrensink G.J. et al. Systemic Inflammatory Cytokines Predict the Infectious Complications but Not Prolonged Postoperative Ileus after Colorectal Surgery // *Mediators of Inflammation.* – 2018. – V. 2018. – P. 1–9.
- 167 Becker K.L., Snider R., Nylen E.S. Procalcitonin in sepsis and systemic inflammation: A harmful biomarker and a therapeutic target // *Br J Pharmacol.* – 2010. – V. 159. – P. 253–264.
- 168 Dahaba A.A., Metzler H. Procalcitonin's role in the sepsis cascade. Is procalcitonin a sepsis marker or mediator? // *Minerva Anesthesiol.* – 2009. – V. 75. – P. 447–452.
- 169 Memar M. Y., Varshochi M., Shokouhi B. et al. Procalcitonin: The marker of pediatric bacterial infection // *Biomedicine & Pharmacotherapy.* – 2017. – V. 96. – P. 936–943.
- 170 Povsic M.K., Ihan A., Beovic B. Post-Operative Infection Is an Independent Risk Factor for Worse Long-Term Survival after Colorectal Cancer Surgery // *Surgical infections.* – 2016. – V. 17(6). – P. 700-712.
- 171 Lippi G., Montagnana M., Balboni F. et al. Academy of Emergency Medicine and Care-Society of Clinical Biochemistry and Clinical Molecular Biology consensus recommendations for clinical use of sepsis biomarkers in the emergency department // *Emerg Care J.* – 2017. – V. 13. – P. 6877.
- 172 Finlay B.B., Hancock R.E. Can innate immunity be enhanced to treat microbial infections? // *Nat Rev Microbiol.* – 2004. – V. 2. – P. 497-504.
- 173 Albillos A., de-la-Hera A., Alvarez-Mon M. Serum lipopolysaccharide-binding protein prediction of severe bacterial infection in cirrhotic patients with ascites // *Lancet.* – 2004. – V. 363. – P. 1608-1610.
- 174 González-Navajas J.M., Bellot P., Francés R. et al. Presence of bacterial-DNA in cirrhosis identifies a subgroup of patients with marked inflammatory response not related to endotoxin // *J Hepatol.* – 2008. – V. 48. – P. 61-67.
- 175 Shozushima T., Takahashi G., Matsumoto N. et al. Usefulness of presepsin (sCD14-ST) measurements as a marker for the diagnosis and severity of sepsis that satisfied diagnostic criteria of systemic inflammatory response syndrome // *Journal Infectious Chemotherapy.* – 2011. – V. 17(6). – P. 764-769.
- 176 Akira S., Takeda K., Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity // *Nat Immunol.* – 2001. – V. 2. – P. 675– 680.

- 177 Aderem A., Ulevitch R.J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response // *Nature*. – 2000. – V. 406. – P. 782–787.
- 178 Yaegashi Y., Shirakawa K., Sato N. et al. Evaluation of a newly identified soluble CD14 subtype as a marker for sepsis // *Journal of infection and chemotherapy*. – 2005. – V. 11(5). – P. 234-238.
- 179 Pavcnik-Arnol M., Hojker S., Derganc M. Lipopolysaccharide-binding protein, lipopolysaccharide, and soluble CD14 in sepsis of critically ill neonates and children // *Intensive Care Med*. – 2007. –V. 33. –P. 1025-1032.
- 180 Chenevier-Gobeaux C., Borderie D., Weiss N. et al. Presepsin (sCD14-ST), an innate immune response marker in sepsis // *Clinica Chimica Acta*. – 2015. – V. 450. – P. 97–103.
- 181 Palmiere C., Mussap M., Bardy D. et al. Diagnostic value of soluble CD14 subtype (sCD14-ST) presepsin for the postmortem diagnosis of sepsis-related fatalities // *International journal of legal medicine*. – 2013. – V. 127(4). – P.7 99-780.
- 182 Amanova D.E., Koishibayev Zh.M., Akhmaltdinova L.L., Matyushko D.N., Turgunov E.M. The dynamics of levels of lipopolysaccharide-binding protein and procalcitonin during the experimental acute intestinal obstruction. – *Medical News of North Caucasus*. – 2019. – V. 14 (1). – P. 145-148.
- 183 Ivachyov P., Amanova D., Akhmaltdinova L., Koishibayev Z., Turgunov E. Comparison of dynamics of level of procalcitonin, lipopolysaccharide binding protein and interleukin-6 in blood serum of experimental animals at strangulated and obturative intestinal obstruction. - *Georgian medical news*. – 2020. – V. 303. – P. 173-177.
- 184 Тургунов Е. М., Матюшко Д. Н., Злотник А., Калиева Д. К., Трошин В. В. Влияние интраабдоминальной гипертензии на циркуляцию грамотрицательной флоры в крови. – 2016. - *Медицина и экология*. – Т. 1. – С. 72-75.
- 185 Mugazov M., Turgunov Ye., Kaliyeva D., Matyushko D., Koishibayev Zh., Omertayeva D., Nurbekov A., Koishibayeva L., Alibekov A. The role of presepsin in patients with acute surgical diseases. - *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*. - 2019. – V. 7(8). – P. 1282-1286.
- 186 Огизбаева А.В., Нурбеков А.А., Тургунов Е.М. Колоректальный рак, осложненный острой кишечной непроходимостью (обзор литературы) / *Астана медициналық журналы*. – 2020. – Т. 2(104). – С. 109-117.
- 187 Ogizbayeva A., Turgunov Ye. Bacterial translocation in colorectal cancer patients// *Journal of clinical medicine of Kazakhstan*. – 2021. – V. 18. – Issue 3. - P. 8-13. doi: 10.23950/jcmk/10926.
- 188 Промежуточный отчет о научно-исследовательской работе от 18.11.2020 г. рег. № 0120PK00245 «Детекция биомаркеров бактериальной транслокации в ранней диагностике инфекционно-воспалительных осложнений у пациентов с кишечной непроходимостью опухолевого генеза». - ИРН AP08956335. – URL: https://www.ncste.kz/assets/report_files/2020/AP08956335-OT-20/ru_64378_1063588_1605798916.docx / (дата обращения 11.11.2022).

189 Заключительный отчет о научно-исследовательской работе от 25.10.2021 г. рег. № 0120PK00245 «Детекция биомаркеров бактериальной транслокации в ранней диагностике инфекционно-воспалительных осложнений у пациентов с кишечной непроходимостью опухолевого генеза». - ИРН AP08956335. – URL: https://www.ncste.kz/assets/report_files/2021/AP08956335-OT-21/ru_66026_1177199_1635221033.docx / (дата обращения 11.11.2022).

190 TNM: Классификация злокачественных опухолей. / Под ред. Дж.Д. Брайерли и др.; пер. с англ. и научн. ред. Е.А. Дубовой, К.А. Павлова. 2-е изд. на русском языке. — М.: Логосфера, 2018. — 344 с.: 14,0 см.

191 Bone R. C., Balk R. A., Cerra F. B. et al. Definitions for Sepsis and Organ Failure and Guidelines for the Use of Innovative Therapies in Sepsis // *Chest*. – 1991. – V. 101(6). – P. 1644–1655.

192 Singer M., Deutschman C.S., Seymour C.W. et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3) // *JAMA*. – 2016. – V. 315(8). – P. 801.

193 Приказ Министра здравоохранения Республики Казахстан от 15 октября 2021 года № ҚР ДСМ-105, в редакции от 25.08.2022 № ҚР ДСМ-89 (вводится в действие с 23.11.2022). Об утверждении Санитарных правил "Санитарно-эпидемиологические требования к лабораториям, использующим потенциально опасные химические и биологические вещества". – Глава 4 пункт 68. - URL: <https://adilet.zan.kz/rus/docs/V2100024809> / (дата обращения 11.11.2022).

194 Vega-Magaña N., Delgado-Rizo V., García-Benavides L. et al. Bacterial Translocation Is Linked to Increased Intestinal IFN- γ , IL-4, IL-17, and mucin-2 in Cholestatic Rats // *Annals of Hepatology*. – 2018. – V. 17(2). – P. 318–329.

195 Азизов И.С. Основы клинической микробиологии. Учебное пособие. – Караганда, 2005. – 280 с.

196 Van Herendael B.H., Bruynseels P., Bensaid M. et al. Validation of a modified algorithm for the identification of yeast isolates using matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* – 2012. – V. 31(5). – P. 841-849.

197 Ritz C., Spiess A.-N. qpcR: an R package for sigmoidal model selection in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis // *Bioinformatics* - 2008. – V. 24(13). - P. 1549–1551.

198 Walker S.P., Barrett M., Hogan G. et al. Non-specific amplification of human DNA is a major challenge for 16S rRNA gene sequence analysis // *Scientific Reports*. – 2020. - V. 10 (1). - doi: 10.1038/s41598-020-73403-7.

199 Earl J.P., Adappa N.D., Krol J. et al. Species-level bacterial community profiling of the healthy sinonasal microbiome using Pacific Biosciences sequencing of full-length 16S rRNA genes // *Microbiome*. – 2018. - V. 6(1). – N. 190. - doi: 10.1186/s40168-018-0569-2.

200 Ogizbayeva A., Turgunov Ye., Kadyrova I. et al. The 16s ribosomal ribonucleic acid microorganisms' detection in mesenteric lymph nodes by a

polymerase chain reaction in view of colorectal cancer // Journal of clinical medicine of Kazakhstan. – 2022. – V. 19(2). – P. 38-42. - doi: 10.23950/jcmk/11937.

201 Огизбаева А.В., Кадырова И.А., Тургунов Е.М. и др. Количественное определение ДНК бактерий в мезентериальных лимфатических узлах при колоректальном раке методом полимеразной цепной реакции. III Съезд хирургов Казахстана с международным участием «Актуальные вопросы хирургии и трансплантологии», г. Алматы (2-3 сентября 2022 г.) // Вестник хирургии Казахстана. – 2022. - Спец. выпуск №1. - С. 185-186.

202 Opal S.M., Scannon P.J., Vincent J.-L. et al. Relationship between plasma levels of lipopolysaccharide (LPS) and LPS-binding protein in patients with severe sepsis and septic shock //The Journal of Infectious Diseases. - 1999. – V. 180. – P. 1584-1589.

203 Turgunov Ye., Ogizbayeva A., Akhmaltdinova L., Shakeyev K. Lipopolysaccharide-binding protein as a risk factor for development of infectious and inflammatory postsurgical complications in colorectal cancer patients // Contemporary Oncology/Współczesna Onkologia (Pozn). – 2021. – V. 25 (3). – P. 198-203. - doi: 10.5114/wo.2021.110051.

204 Шакеев К.Т., Кабилдина Н.А., Огизбаева А.В. и др. Динамика липополисахарид-связывающего белка (LBP) у оперированных пациентов с колоректальным раком. VIII Съезд онкологов и радиологов Казахстана с международным участием, г. Туркестан, (14-16 октября 2021г.). // Онкология и радиология Казахстана. – Спец. выпуск. – 2021. - С. 108.

205 Ogizbayeva A., Turgunov Ye., Mugazov M., Azizov I. Lipopolysaccharide-binding protein as a risk factor for development of infectious complications in operated colorectal cancer patients. International Surgical Week ISW 2022, Vienna, Austria, 15-18 August 2022. // Abstract Volume ISW 2022. - Number: PE087.

206 Vodnik T., Kaljevic G., Tadic T., Majkic-Singh N. Presepsin (sCD14-ST) in preoperative diagnosis of abdominal sepsis // Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. – 2013. – V. 51. – P. 2053-2062.

207 Juroš G.F., Nikić M.T., Šarić S.D. et al. Contribution of presepsin, procalcitonin and C-reactive protein to the SOFA score in early sepsis diagnosis in emergency abdominal surgical patients // Signa Vitae. – 2019. -V. 15. -P. 38-45.

208 Carpio R., Zapata J., Spanuth E., Hess G. Utility of presepsin (sCD14-ST) as a diagnostic and prognostic marker of sepsis in the emergency department // Clinica Chimica Acta. – 2015. -V. 450. -P. 169-175.

209 Zhang J., Hu Z.D., Song J., Shao J. Diagnostic value of presepsin for sepsis: a systematic review and meta-analysis // Medicine (Baltimore). – 2015. -V. 94. - e2158.

210 Mierzchala M., Krzystek-Korpacka M., Gamian A., Durek G. Quantitative indices of dynamics in concentrations of lipopolysaccharide-binding protein (LBP) as prognostic factors in severe sepsis/septic shock patients – comparison with CRP and procalcitonin // Clin Biochem. - 2011. – V. 44. – P.357-363.

211 Zweigner J., Gramm H. J., Singer O. C. et al. High concentrations of lipopolysaccharidebinding protein in serum of patients with severe sepsis or septic shock inhibit the lipopolysaccharide response in human monocytes, // *Blood*. – 2001. -V. 98. – P. 3800–3808.

212 Kitchens R. L., Thompson P. A. Impact of sepsis-induced changes in plasma on LPS interactions with monocytes and plasma lipoproteins: roles of soluble CD14, LBP, and acute phase lipoproteins // *Journal of Endotoxin Research*. – 2003. – V. 9(2). -P. 113–118.

213 Lamping N., Dettmer R., Schröder N.W. et al. LPS-binding protein protects mice from septic shock caused by LPS or gram-negative bacteria // *Journal of Clinical Investigation*. – 1998. – V. 101(10). – P. 2065–2071.

214 Giunco S., Petrara M.R., Bergamo F. et al. Immune senescence and immune activation in elderly colorectal cancer patients // *Aging (Albany NY)*. – 2019. – V. 11. – P. 3864-3875.

215 Takahashi G., Shibata S., Ishikura H. et al. Presepsin in the prognosis of infectious diseases and diagnosis of infectious disseminated intravascular coagulation // *European Journal of Anaesthesiology*. – 2015. – V. 32(3). – P. 199–206.

216 Огизбаева А.В., Савазова К.С., Шакеев К.Т., Тургунов Е.М. Динамика пресепсина (sCD14) у оперированных пациентов с колоректальным раком. VII Конгресс хирургов Казахстана с международным участием «ХИРУРГИЯ: ВЧЕРА, СЕГОДНЯ, ЗАВТРА» посвященного 75-летию со дня основания национального научного центра хирургии им. А.Н. Сызганова, г. Алматы (30 сентября - 1 октября 2021 г.) // *Вестник хирургии Казахстана*. – 2021. - Спец. выпуск №1. - С. 175-176.

217 Ogizbayeva A., Turgunov Ye., Avdiyenko O. et al. sCD14-ST (presepsin) as a risk factor for the development of post-operative infection complications in colorectal cancer patients. // 32nd European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, Lisbon, Portugal, 23 – 26 April 2022. - Poster Session PS056 - 8с. Surgical site infection. - Presentation Number: P1686. – Abstract Number: 00482.

218 Shakeyev K., Turgunov Ye., Ogizbayeva A. et al. Presepsin (sCD14-ST) as a risk factor for the development of infectious and inflammatory complications in operated colorectal cancer patients // *Annals of Coloproctology*. - 2022 Apr 4. – URL: <https://doi.org/10.3393/ac.2022.00115.0016> / (дата обращения 11.11.2022).

Приложение А

Акты внедрения результатов научно-исследовательской работы



«УТВЕРЖДАЮ»

И.о. председателя правления – Ректор,
Проректор по стратегическому развитию,
науке и международному сотрудничеству
Турмухамбетова А.А.
_____ 2021 г.

Акт внедрения результатов научно-исследовательской работы № 1 Научно-исследовательский центр НАО «Медицинский университет Караганды»

Наименование предложения: методика детекции микроорганизмов в мезентериальных лимфатических узлах молекулярно-генетическим методом у пациентов с колоректальным раком.

Работа включена: в перечень методик ЛКП НИЦ НАО «МУК».

Форма внедрения: метод для научных исследований.

Ответственный за внедрение и исполнители: Тургунов Е.М., Огизбаева А.В., Кадырова И.А., Шакеев К.Т., Колесниченко С.И. Работа выполнена в рамках проекта Комитета науки МОН РК AP08956335 «Детекция биомаркеров бактериальной транслокации в ранней диагностике инфекционно-воспалительных осложнений у пациентов с кишечной непроходимостью опухолевого генеза».

Эффективность внедрения: научно-исследовательская.

Предложения и замечания учреждения, осуществляющего внедрения

Сроки внедрения: январь-сентябрь 2021 г.

Председатель комиссии:
директор НИЦ НАО «МУК»,
к.м.н., асс. профессор

Клюев Д.А.

Члены ответственные за внедрение:
профессор кафедры
хирургических болезней НАО «МУК»

Тургунов Е.М.

PhD докторант НАО «МУК»

Огизбаева А.В.

с.н.с. Лаборатории коллективного
пользования НИЦ НАО «МУК», PhD

Кадырова И.А.

профессор кафедры
хирургических болезней НАО «МУК»

Шакеев К.Т.

м.н.с. Лаборатории коллективного
пользования НИЦ НАО «МУК»

Колесниченко С.И.



«УТВЕРЖДАЮ»

И.о. председателя правления – Ректор,
проректор по стратегическому развитию,
науче и международному сотрудничеству
Турмухамбетова А.А.
_____ 2022 г.

**Акт
внедрения результатов
научно-исследовательской работы № 3**
Научно-исследовательский центр
НАО «Медицинский университет Караганды»

Наименование предложения: методика количественного определения микроорганизмов в мезентериальных лимфатических узлах при колоректальном раке методом полимеразной цепной реакции

Работа включена: в перечень методик ЛКП НИЦ НАО «МУК».

Форма внедрения: метод для научных исследований.

Ответственный за внедрение и исполнители: Огизбаева А.В., Кадырова И.А., Тургунов Е.М., Шакеев К.Т., Мугазов М.М. Работа выполнена в рамках проекта Комитета науки МОН РК АР09260597 «Прогностическая значимость маркеров бактериальной транслокации в качестве предикторов инфекционно-воспалительных осложнений при острой механической кишечной непроходимости».

Эффективность внедрения: научно-исследовательская.


Предложения и замечания учреждения, осуществляющего внедрения

Сроки внедрения: май-июль 2022г.


Председатель комиссии:
директор НИЦ НАО «МУК»,
к.м.н., асс. профессор

 Клюев Д.А.


Члены ответственные за внедрение:
профессор кафедры
хирургических болезней НАО «МУК»

 Тургунов Е.М.

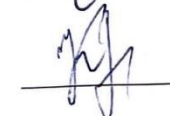
ассистент кафедры скорой медицинской
помощи, анестезиологии и реаниматологии
НАО «МУК»

 Огизбаева А.В.

с.н.с. Лаборатории коллективного
пользования НИЦ НАО «МУК», PhD

 Кадырова И.А.

профессор кафедры
хирургических болезней НАО «МУК»

 Шакеев К.Т.

ассистент кафедры скорой медицинской
помощи, анестезиологии и реаниматологии
НАО «МУК», PhD

 Мугазов М.М.

Приложение Б

Акты внедрения результатов научно-исследовательской работы в хирургические отделения стационаров г. Караганды

«УТВЕРЖАЮ»
Директор
«Областная клиническая больница» г.
к.м.н., в.д.м.н.
«12» _____ 2022 г.



АКТ ВНЕДРЕНИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЫ

«Областная клиническая больница» г. Караганды
(наименование учреждения, где внедряется работа)

Наименование предложения: Методика расчета риска развития неблагоприятных исходов оперативного вмешательства у пациентов с колоректальным раком

Работа выполнена в рамках проекта Комитета науки МОН РК AP09260597 «Прогностическая значимость маркеров бактериальной транслокации в качестве предикторов инфекционно-воспалительных осложнений при острой механической кишечной непроходимости».

(республиканского, областного планов внедрения, планов внедрения научно-исследовательских, учебных институтов: внедрена в инициативном порядке; заимствована из методических рекомендаций, журнальных статей, диссертации, монографии - указать)

Форма внедрения: внедрение методики расчета риска развития неблагоприятных исходов оперативного вмешательства у пациентов с колоректальным раком путем определения в сыворотке крови маркеров бактериальной транслокации (LBP и sCD14-ST).

(внедрение метода, способа, аппарата в лечебно-профилактическом учреждении лекции, семинары, подготовке на рабочем месте и прочее - указать)

Ответственный за внедрение и исполнители: Тургунов Е.М., Огизбаева А.В., Нурбеков А.А., Мугазов М.М., Асамиданова С.Г.

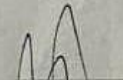
Эффективность внедрения: Применение методики расчета риска развития неблагоприятных исходов оперативного вмешательства у пациентов с колоректальным раком позволит определить пациентов с высоким риском развития послеоперационных осложнений и летального исхода.

(лечебно-диагностическая, экономическая, социальная - указать конкретно)


Предложения, замечания учреждения, осуществляющего внедрение: рекомендуется более широкое применение данной методики.

Сроки внедрения: 2022 год


Председатель комиссии:
Начальник хирургической службы, д.м.н.

 Цхай Б. В.


Члены, ответственные за внедрение:
профессор кафедры хирургических
болезней НАО МУК, д.м.н.

 Тургунов Е.М.

Ассистент кафедры СМП,
анестезиологии и реаниматологии НАО МУК

 Огизбаева А.В.


Зав. отделения колопроктологии,
д.м.н., профессор

 Нурбеков А.А.

Ассоциированный профессор кафедры СМП,
анестезиологии и реаниматологии НАО МУК, PhD

 Мугазов М.М.

PhD докторант НАО МУК

 Асамиданова С.Г.



**АКТ
ВНЕДРЕНИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЫ**

**КГП «Многопрофильная больница №1» г. Караганды
(наименование учреждения, где внедряется работа)**

Наименование предложения: Методика расчета риска развития неблагоприятных исходов оперативного вмешательства у пациентов с колоректальным раком
Работа выполнена в рамках проекта Комитета науки МОН РК АР09260597 «Прогностическая значимость маркеров бактериальной транслокации в качестве предикторов инфекционно-воспалительных осложнений при острой механической кишечной непроходимости».
(республиканского, областного планов внедрения, планов внедрения научно-исследовательских, учебных институтов: внедрена в инициативном порядке; заимствована из методических рекомендаций, журнальных статей, диссертации, монографии - указать)

Форма внедрения: внедрение методики расчета риска развития неблагоприятных исходов оперативного вмешательства у пациентов с колоректальным раком путем определения в сыворотке крови маркеров бактериальной транслокации (LBP и sCD14-ST).
(внедрение метода, способа, аппарата в лечебно-профилактическом учреждении лекции, семинары, подготовке на рабочем месте и прочее - указать)

Ответственный за внедрение и исполнители: Тургунов Е.М., Огизбаева А.В., Аманова Д.Е., Айтпенов Т.Б., Мусаев А.Э.
Эффективность внедрения: Применение методики расчета риска развития неблагоприятных исходов оперативного вмешательства у пациентов с колоректальным раком позволит определить пациентов с высоким риском развития послеоперационных осложнений и летального исхода.
(лечебно-диагностическая, экономическая, социальная - указать конкретно)


Предложения, замечания учреждения, осуществляющего внедрение: рекомендуется более широкое применение данной методики.

Сроки внедрения: 2022 год

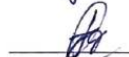
Председатель комиссии:
Заместитель директора, PhD

 Матюшко Д.Н.

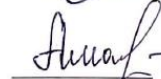
Члены, ответственные за внедрение:
профессор кафедры хирургических
болезней НАО МУК, д.м.н.

 Тургунов Е.М.

Ассистент кафедры СМП,
анестезиологии и реаниматологии НАО МУК

 Огизбаева А.В.

Ассоциированный профессор кафедры
хирургических болезней НАО МУК, PhD

 Аманова Д.Е.

Зав. отделения анестезиологии и
реанимации

 Айтпенов Т.Б.

Зав. отделения хирургии

 Мусаев А.Э.



АКТ
ВНЕДРЕНИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЫ
КГП на ПХВ «Многопрофильная больница №3» г. Караганды
(наименование учреждения, где внедряется работа)

Наименование предложения: Методика расчета риска развития неблагоприятных исходов оперативного вмешательства у пациентов с колоректальным раком
Работа выполнена в рамках проекта Комитета науки МОН РК АР09260597 «Прогностическая значимость маркеров бактериальной транслокации в качестве предикторов инфекционно-воспалительных осложнений при острой механической кишечной непроходимости».
(республиканского, областного планов внедрения, планов внедрения научно-исследовательских, учебных институтов: внедрена в инициативном порядке; заимствована из методических рекомендаций, журнальных статей, диссертации, монографии - указать)

Форма внедрения: внедрение методики расчета риска развития неблагоприятных исходов оперативного вмешательства у пациентов с колоректальным раком путем определения в сыворотке крови маркеров бактериальной транслокации (LBP и sCD14-ST).
(внедрение метода, способа, аппарата в лечебно-профилактическом учреждении лекции, семинары, подготовке на рабочем месте и прочее - указать)


Ответственный за внедрение и исполнители: Тургунов Е.М., Огизбаева А.В., Жумакаев Ас.М.

Эффективность внедрения: Применение методики расчета риска развития неблагоприятных исходов оперативного вмешательства у пациентов с колоректальным раком позволит определить пациентов с высоким риском развития послеоперационных осложнений и летального исхода.
(лечебно-диагностическая, экономическая, социальная - указать конкретно)


Предложения, замечания учреждения, осуществляющего внедрение: рекомендуется более широкое применение данной методики.

Сроки внедрения: 2022 год


Председатель комиссии:
профессор кафедры хирургических
болезней НАО МУК, д.м.н.

 Шакеев К.Т.

Члены, ответственные за внедрение:
профессор кафедры хирургических
болезней НАО МУК, д.м.н.

 Тургунов Е.М.

Ассистент кафедры СМП,
анестезиологии и реаниматологии НАО МУК

 Огизбаева А.В.

Зав. отделения абдоминальной хирургии и
онкохирургии, магистр медицины

 Жумакаев Ас.М.

Приложение В

Решение Комитета по Биоэтике НАО «МУК»

Решение Комитета по биоэтике НАО «Медицинского университета Караганды»

Заседание № 6
Протокол № 6

Дата (Д/М/Г) 23.12.2019г.
Присвоенный номер 30

Название протокола: «Прогностическая значимость маркеров бактериальной транслокации в качестве предикторов инфекционно-воспалительных осложнений при острой механической кишечной непроходимости».					
Основной исследователь:	Огизбаева Алина Виталиевна				
Институт:	НАО МУК				
Рассмотренные элементы	<input checked="" type="checkbox"/> Приложены <input type="checkbox"/> Не приложены				
Повторное рассмотрение <input type="checkbox"/> да <input checked="" type="checkbox"/> Нет	Дата предыдущего рассмотрения:				
Решение:	<input checked="" type="checkbox"/> Разрешено (Р) <input type="checkbox"/> Разрешено с рекомендациями (Рек) <input type="checkbox"/> Повторная заявка (ПЗ) <input type="checkbox"/> Не разрешено (НР)				
№.	Голосование членов КБЭ	решение			
		Р	Рек	ПЗ	НР
1.	Молотов-Лучанский В.Б.	✓			
2.	Мациевская Л.Л.	✓			
3.	Куаныш Ж.М.	✓			
4.	Бадыров Р.М.				
5.	Бакирова Р.Е.	✓			
6.	Битнер Е.С.	✓			
7.	Блок О.Г.	✓			
8.	Вистерничан О.А.	✓			
9.	Калиева Ш.С.	✓			
10.	Касапиди Д.И.	✓			
11.	Омаркулов Б.К.	✓			
12.	Понамарева О.А.	✓			
13.	Сорокина М.А.	✓			
14.	Тулеева С.Т.	✓			
15.	Никифорова С.А.	✓			

Примечание: Р - Разрешено; Рек - Разрешено с рекомендациями;
ПЗ - Повторная заявка; НР - Не разрешено

Подпись:

.....
Председатель: **Д.М.И., профессор**
Молотов-Лучанский В.Б.

Дата: **23.12.2019г.**

.....
Ответственный секретарь
Куаныш Ж.М.

**ҚЕАҚ «Қарағанды медициналық университеті»
Биоэтика бойынша комитеттің шешімі**

Отырыс № 6

Мерзімі (К/А/Ж) 23.12.2019ж.

Хаттама № 6

Тағайындалған нөмір 30

Хаттаманың атауы: «Прогностическая значимость маркеров бактериальной транслокации в качестве предикторов инфекционно-воспалительных осложнений при острой механической кишечной непроходимости»

Негізгі зерттеуші: Оғызбаева Алина Виталиевна

Институт: ҚЕАҚ ҚМУ

Каралған элементтер Тіркелген Тіркелмеген

Қайта каралуы иә жоқ

Алдыңғы қараудың мерзімі:

Шешімі: Рұқсат етілді (Р) Ұсыныстармен рұқсат етілді (Ұсын.) Қайта өтініш (ҚӨ) Рұқсат етілмеді (РЕ)

№.	БЭК мүшелерінің дауысы	Шешімі			
		Р	Ұсын.	ҚӨ	РЕ
1.	Молотов-Лучанский В.Б.	✓			
2.	Мациевская Л.Л.	✓			
3.	Куаныш Ж.М.	✓			
4.	Бадыров Р.М.				
5.	Бакирова Р.Е.	✓			
6.	Битнер Е.С.	✓			
7.	Блок О.Г.	✓			
8.	Вистерничан О.А.	✓			
9.	Калиева Ш.С.	✓			
10.	Касапиди Д.И.	✓			
11.	Омаркулов Б.К.	✓			
12.	Понамарева О.А.	✓			
13.	Сорокина М.А.	✓			
14.	Тулентаева С.Т.	✓			
15.	Никифорова С.А.	✓			

Ескерту: Р – Рұқсат етілді; Ұсын. – Ұсыныстармен рұқсат етілді;
ҚӨ – Қайта өтініш; РЕ – Рұқсат етілмеді

Қолтаңбасы:
Төраға В.Б. Молотов-Лучанский, профессор



Жауапты хатшы:
Куаныш Ж.М.

Мерзімі: 23.12.2019 ж.



ЛОКАЛЬНАЯ КОМИССИЯ ПО БИОЭТИКЕ
НАО «МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ КАРАГАНДЫ»

100000, Караганды қаласы, Гоголь көшесі, 40
тел.: +7 (7212) 50-39-30 (1744)
E-mail: lkbnaomuk@gmail.com

100000, город Караганда, улица Гоголь, 40
тел.: +7 (7212) 50-39-30 (1744)
E-mail: lkbnaomuk@gmail.com

Письмо-заключение ЛКБ НАО МУК
по заявке А.В. Огизбаевой
(присвоенный № 2 от 05. 09 .2022 г.)

Выписка из протокола № 2
Заседания Локальной Комиссии по биоэтике
при Медицинском университете Караганды
от 20 сентября 2022 года

г. Караганда, НАО «Медицинский университет Караганды»

Председатель заседания: Вистерничан Ольга Александровна.

Повестка заседания

5.1. Рассмотрение первичной заявки на проведение исследования по протоколу «Динамика маркеров бактериальной транслокации кишечной микрофлоры как предиктор инфекционно-воспалительных осложнений в хирургии колоректального рака».

Спонсор исследования – финансирование по гранту МОН РК ИРН АР08956335 «Детекция биомаркеров бактериальной транслокации в ранней диагностике инфекционно-воспалительных осложнений у пациентов с кишечной непроходимостью опухолевого генеза» и ИРН АР09260597 «Прогностическая значимость маркеров бактериальной транслокации в качестве предикторов инфекционно-воспалительных осложнений при острой механической кишечной непроходимости».

Заявитель – А.В. Огизбаева, докторант 8D110100 «Медицина»

Слушали: Заключение эксперта по этической экспертизе касательно предоставленных документов.

Для рассмотрения представлены следующие документы:

1. Заявка на поправку к протоколу исследования, 2 копии.
2. Заявление на рассмотрение поправок к протоколу исследования - Сопроводительное письмо;
3. Протокол исследования, версия 2.0 от 5 сентября 2022 года, на русском языке;
4. Декларация о конфликте интересов главного исследователя.

Заключение

Одобрить проведение исследования по протоколу «Динамика маркеров бактериальной транслокации кишечной микрофлоры как предиктор инфекционно-воспалительных осложнений в хирургии колоректального рака».

Главный исследователь: Огизбаева Алина Виталиевна
Докторант 8D110100 «Медицина», НАО «МУК»

Со-исследователь(ли):

1. Тургунов Ермек Мейрамович – д.м.н., профессор НАО «МУК»
2. Азизов Илья Сулейманович – д.м.н. руководитель лабораторной службы НИИ антимикробной химиотерапии ФГБОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет»

Представлять промежуточные отчеты каждые 12 месяцев с момента начала исследования, а также заключительный отчет после завершения исследования.

Спонсор исследования - *финансирование по гранту МОН РК ИРН AP08956335 «Детекция биомаркеров бактериальной транслокации в ранней диагностике инфекционно-воспалительных осложнений у пациентов с кишечной непроходимостью опухолевого генеза» и ИРН AP09260597 «Прогностическая значимость маркеров бактериальной транслокации в качестве предикторов инфекционно-воспалительных осложнений при острой механической кишечной непроходимости».*

Заявитель – Огизбаева Алина Виталиевна.

Председатель


Дата: 20.09.2022 г.




О. А. Вистерничан

Приложение Г

Стандартная операционная процедура забора, транспортировки и хранения мезентериальных лимфатических узлов для ПЦР

УТВЕРЖДЕНО
 ЗАСЕДАНИЕМ КОМИТЕТА
 ПО БИОЭТИКЕ НАО «МУК»
 ПРОТОКОЛ № 4/10.11.2020
Викторишина О.А.




СТАНДАРТ ОПЕРАЦИОННОЙ ПРОЦЕДУРЫ
 «Забор, транспортировка и хранение мезентериальных лимфатических узлов для исследования 16sRNA методом ПЦР»


Цель: Забор, транспортировка и хранение мезентериальных лимфатических узлов у пациентов для исследования 16sRNA методом ПЦР.


Ресурсы	Алгоритм действий
<ul style="list-style-type: none"> - медицинские перчатки; - стерильные вакутейнеры объемом 9 мл (пробирки с белой крышкой без наполнителя); - штативы пластиковые или металлические для размещения пробирок с образцами биологического материала; - контейнер с охлаждающими элементами или термос со льдом; - холодильные камеры с температурным режимом от -20°C до -80°C. 	<p>Забор мезентериального лимфатического узла:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. До проведения забора необходимо получить информированное согласие на проведение процедуры. 2. На пробирке написать Ф.И.О. пациента, дату забора материала. 3. Забор мезентериальных лимфоузлов в вакутейнер проводится в стерильных условиях хирургом во время оперативного вмешательства после резекции участка кишки из брыжейки макропрепарата 4. После вакутейнер с лимфатическим узлом необходимо заполнить стерильным физиологическим раствором. 5. Затем вакутейнеры поместить в штатив в холодильник ($+4^{\circ}\text{C}$ - $+8^{\circ}\text{C}$) до момента транспортировки (максимальным сроком до 12 часов). <p>Транспортировка биоматериала:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Транспортировка производится в специальном контейнере с охлаждающими элементами или в термосе со льдом при температуре $+2^{\circ}\text{C}$ - $+8^{\circ}\text{C}$ в течение 6 часов. Пробирки при доставке должны располагаться строго вертикально. <p>Хранение:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Из каждого доставленного образца в стерильных условиях в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл отделить 20 мг ткани для последующей экстракции ДНК. Материал (20 мг в микроцентрифужной пробирке и оставшийся материал в стерильном вакутейнере) до начала выделения ДНК
	<p>хранить при температуре от -20°C до -80°C.</p> <ol style="list-style-type: none"> 2. Необходимо избегать повторных циклов замораживания / оттаивания.

Приложение Д

Стандартная операционная процедура забора, транспортировки и хранения венозной крови для ИФА

УТВЕРЖДЕНО
ЗАСЕДАНИЕМ КОМИТЕТА
ПО БИОЭТИКЕ НАО «МУК»
ПРОТОКОЛ №8, от 11.01.2020
Викторина


СТАНДАРТ ОПЕРАЦИОННОЙ ПРОЦЕДУРЫ
«Забор, транспортировка и хранение венозной крови для исследования LBP и sCD14-ST методом ИФА»



Цель: Забор, транспортировка и хранение венозной крови у пациентов для исследования LBP и sCD14-ST методом ИФА.

Ресурсы	Алгоритм действий
<ul style="list-style-type: none"> - медицинские перчатки; - медицинский жгут; - шприцы одноразовые (объемом 5 мл); - вакутейнеры объемом 5 мл (пробирки с желтой крышкой с дозированным отрицательным давлением, содержащие активатор свертывания и гелевый разделитель сыворотки); - штативы пластиковые или металлические для размещения пробирок с образцами биологического материала; - раствор этилового спирта 70%; - шарики стерильные; - бинт нестерильный - бактерицидный пластырь; - контейнер с охлаждающими элементами или термос со льдом; - центрифуга с бакет-ротором (ротор с качающимися стаканами) - холодильные камеры с температурным режимом от -20⁰ С до -80⁰ С. 	<p>Забор крови:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Получить информированное согласие на проведение процедуры. 2. На пробирке написать Ф.И.О. пациента, дату забора крови. 3. Вымыть руки проточной водой с мылом, содержащим антисептик. Обработать кожу рук антисептиком на спиртовой основе согласно методическим рекомендациям по обработке рук сотрудников медицинских организаций РК, надеть стерильные перчатки. 4. Подложить под локоть пациенту клеенчатый валик, наложить резиновый жгут на 10 см выше места венепункции (не более чем на 1 минуту), предложить пациенту сжать кулак. 5. Пропальпировать вену, определить место венепункции. 6. Обработать перчатки проспиртованным шариком или раствором антисептика. 7. Последовательно обработать место венепункции двумя проспиртованными стерильными шариками. Движения неотрывные круговые «от центра к периферии». Диаметр обрабатываемой зоны 10 см первым шариком, затем непосредственно место пункции вторым шариком. 8. Зафиксировать вену большим пальцем левой руки, ввести иглу в вену срезом вверх, ослабить жгут и набрать в шприц 5 мл венозной крови. 9. Извлечь иглу, одновременно прижимая к месту венепункции сухой стерильный шарик

до прекращения кровотечения. После образования сгустка наложить на место венепункции повязку либо бактерицидный пластырь

10. Заполнить пробирку до необходимого объема. Аккуратно перевернуть пробирку, равномерного перемешивания с наполнителем 5-6 раз.
11. Вакутейнеры с забранной кровью поместить в штатив в холодильник (+4°C - +8°C) до момента транспортировки (максимальным сроком до 1 суток) и дальнейшего центрифугирования.
12. И использованные шарики, иглы выбросить в коробку безопасной утилизации для медицинских отходов класса «Б» (КБУ).
13. Снять перчатки, выбросить их в КБУ для медицинских отходов класса «Б», вымыть руки проточной водой с мылом, содержащим антисептик. Провести обработку рук согласно методическим рекомендациям по обработке рук сотрудников медицинских организаций РК.

Транспортировка биоматериала:

1. Транспортировка производится в специальном контейнере с охлаждающими элементами или в термосе со льдом при температуре +2 - +8⁰ С в течение 6 часов. Пробирки при доставке должны располагаться строго вертикально.

Хранение:

1. Доставленные образцы отцентрифугировать в течение 20 минут при 1000 g. Убедиться, что гель полностью разделяет сыворотку от сгустка, формируя плотный барьер.
2. Полученную пробу свежеприготовленной сыворотки хранить при -20⁰ С - -80⁰ С, во избежание потери биологической активности и загрязнения.
3. Необходимо избегать повторных циклов замораживания / оттаивания.
4. Образцы, которые будут использоваться в течение 5 дней, возможно хранить при +4⁰ С).


Приложение Е

Стандартная операционная процедура определения маркеров бактериальной транслокации в мезентериальных лимфатических узлах

УТВЕРЖДЕНО
ЗАСЕДАНИЕМ КОМИТЕТА
ПО БИОЭТИКЕ НАО «МУК»
ПРОТОКОЛ № 16

присвоенный номер 48
15.03.2015



 СТАНДАРТ ОПЕРАЦИОННОЙ ПРОЦЕДУРЫ «Определение 16s rRNA в мезентериальных лимфатических узлах методом ПЦР»	
Цель: Описание методики определения 16s rRNA в мезентериальных лимфатических узлах методом ПЦР.	
Ресурсы	Алгоритм действий
<ul style="list-style-type: none"> - медицинские перчатки; - антисептик; - бокс микробиологической безопасности БМБ-II-"Ламинар-С" Neoteric; - наконечники для пипеток; - механические дозаторы/пипетки ; - микроцентрифужные пробирки; - термостат; - вихревой миксер LP Vortex Mixer; - Центрифуга Eppendorf MiniSpin для микропробирок; - Набор для выделения геномной ДНК GeneJET Genomic DNA Purification Kit; - Master Mix Maxima SYBR Green 2X; - Праймеры 16S RNA U16SRT-F и U16SRT-R; - амплификатор BIO-RAD CFX96. 	Этап экстракции ДНК (набор GeneJET Genomic DNA Purification Kit) 1. 20 мг брыжеечных лимфоузлов нарезают на мелкие кусочки для уменьшения времени лизиса и помещали в микроцентрифужные пробирки с добавлением 180 мкл Digestion Solution и 20 мкл раствора Протеиназы К, тщательно встряхивают на Vortex и инкубируют при 56 ° С, пока ткани полностью не лизируются, периодически встряхивая на Vortex (в среднем занимает до 3-4-х часов). 2. Далее добавляют 20 мкл раствора РНКазы А, перемешают на Vortex и инкубируют в течение 10 минут при комнатной температуре. 3. Добавляют 200 мкл лизирующего раствора, перемешивают на Vortex до получения однородной смеси, после чего добавляют 400 мкл 50% этанола и снова перемешивают на Vortex . 4. Приготовленную смесь переносят в специальные спин-колонки с пробиркой для сбора и центрифугируют в течение 1 мин при 6000 x g. После помещают спин-колонку в новую пробирку для сбора. 5. Добавляют 500 мкл промывочного буфера I и центрифугируют в течение 1 мин при 8000 x g. После помещают спин-колонку в новую пробирку для сбора. 6. Добавляют 500 мкл промывочного буфера II центрифугируют в течение 3 мин

	<p>на максимальной скорости ($\geq 12000 \times g$). После помещают спин-колонку в стерильную микроцентрифужную пробирку.</p> <p>7. Добавляют 200 мкл буфера для элюции, инкубируют в течение 2 мин при комнатной температуре и центрифугируют в течение 1 мин при $8000 \times g$.</p> <p>8. Спин-колонку выбрасывают, а полученную ДНК либо сразу используют для этапа амплификации, либо хранят при -20°C.</p> <p>Этап амплификации</p> <p>1. К 4 мкл выделенной ДНК добавляют 10 мкл Master Mix Maxima SYBR Green, по 1 мкл каждого праймера (U16SRT-F и U16SRT-R) и 4 мкл H_2O.</p> <p>2. В качестве отрицательного контроля используют пробу, без содержания в ней бактериальной ДНК (10 мкл Master Mix Maxima SYBR Green, по 1 мкл каждого праймера и 8 мкл H_2O).</p> <p>3. В качестве положительного контроля используют пробу с ДНК E.coli заранее выделенной из чистой культуры (4 мкл ДНК E.coli, 10 мкл Master Mix Maxima SYBR Green, по 1 мкл каждого праймера и 4 мкл H_2O).</p> <p>4. Далее микроцентрифужные пробирки загружали в планшет амплификатора BIO-RAD CFX96. Амплификация проводилась при следующих параметрах: денатурация при 95°C 10 минут; «отжиг» и элонгация – 40 циклов при 95°C по 15 секунд и при 62°C по 60 секунд.</p> <p>5. Результаты оценивали на кривой амплификации по начальной температуре элонгации и на каком цикле она возникла, а также по пиковому подъему на кривой плавления.</p>
--	---

Приложение Ж

Свидетельство о внесении сведений в государственный реестр прав на объекты,
охраняемые авторским правом №19250

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ

РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

СВИДЕТЕЛЬСТВО
О ВНЕСЕНИИ СВЕДЕНИЙ В ГОСУДАРСТВЕННЫЙ РЕЕСТР
ПРАВ НА ОБЪЕКТЫ, ОХРАНЯЕМЫЕ АВТОРСКИМ ПРАВОМ
№ 19250 от «8» июля 2021 года

Фамилия, имя, отчество, (если оно указано в документе, удостоверяющем личность) автора (ов):
**ОГИЗБАЕВА АЛИНА ВИТАЛЬЕВНА, КАДЫРОВА ПРИНА АДильЕВНА, ТУРГУНОВ ЕРМЕК
МЕЙРАМОВИЧ, ШАКЕЕВ КАЙРАТ ТАНАБАЕВИЧ, КОЛЕСНИЧЕНКО СВЕТЛАНА ИГОРЕВНА,
САВАЗОВА КАРИНА САНХУОВНА**

Вид объекта авторского права: **произведение науки**

Название объекта: **Детекция микроорганизмов в мезентериальных лимфатических узлах молекулярно-
генетическим методом у пациентов с колоректальным раком**

Дата создания объекта: **04.07.2021**



Құраст. тілшісі: <http://www.kazpatent.kz/> сайттың
"Авторлық құқық" бөлімінде тексеруге болады. <https://copyright.kazpatent.kz>
Подлинность документа возможно проверить на сайте [kazpatent.kz](https://copyright.kazpatent.kz)
в разделе «Авторское право» <https://copyright.kazpatent.kz>

Подписано ЭЦП

Абулкаиров Н.А.

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ



РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

АВТОРЛЫҚ ҚҰҚЫҚПЕН ҚОРҒАЛАТЫН ОБЪЕКТІЛЕРГЕ ҚҰҚЫҚТАРДЫҢ
МЕМЛЕКЕТТІК ТІЗІЛІМГЕ МӘЛІМЕТТЕРДІ ЕНГІЗУ ТУРАЛЫ

КУӘЛІК

2021 жылғы «8» шілде № 19250

Автордың (лардың) жөні, аты, әкесінің аты (егер ол жеке басын куәландыратын құжатта көрсетілсе):
ОГИЗБАЕВА А.ЛИНА ВИТАЛИЕВНА, КАДЫРОВА ИРИНА АДІЛЬЕВНА, ТУРГУНОВ ЕРМЕК
МЕЙРАМОВИЧ, ШАКЕЕВ ҚАЙРАТ ТАНАБАЕВИЧ, КОЛЕСНИЧЕНКО СВЕТЛАНА ИГОРЕВНА,
САВАЗОВА КАРИНА САНХУОВНА

Авторлық құқық объектісі: ҒЫЛЫМИ ТУЫНДЫ

Объектінің атауы: Детекция микроорганизмов в мезентериальных лимфатических узлах молекулярно-генетическим методом у пациентов с колоректальным раком

Объектіні жасаған күні: 04.07.2021



Құжат түпнұсқалығын <http://www.kazpatent.kz/ru> сайтының
"Авторлық құқық" бөлімінде тексеруге болады. <https://copyright.kazpatent.kz>

Подлинность документа возможно проверить на сайте [kazpatent.kz](http://www.kazpatent.kz)
в разделе «Авторское право» <https://copyright.kazpatent.kz>

ЭЦҚ қол қойылды

Абулкаиров Н.А.

Приложение И

Свидетельство о внесении сведений в государственный реестр прав на объекты,
охраняемые авторским правом №22807

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ

РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

СВИДЕТЕЛЬСТВО
О ВНЕСЕНИИ СВЕДЕНИЙ В ГОСУДАРСТВЕННЫЙ РЕЕСТР
ПРАВ НА ОБЪЕКТЫ, ОХРАНЯЕМЫЕ АВТОРСКИМ ПРАВОМ
№ 22807 от «10» января 2022 года

Фамилия, имя, отчество, (если оно указано в документе, удостоверяющем личность) автора (ов):
ОГИЗБАЕВА АЛИНА ВИТАЛЬЕВНА, КАЛЫРОВА ПРИНА АЛИЛЬЕВНА, ТУРГУНОВ ЕРМЕК
МЕЙРАМОВИЧ, ШАКЕЕВ КАЙРАТ ТАНАБАЕВИЧ, КОЛЕСНИЧЕНКО СВЕЛАНА ИГОРЕВНА,
МУТАЗОВ МИРАС МУТАЗОВИЧ

Вид объекта авторского права: **произведение науки**

Название объекта: **Количественное определение микроорганизмов в мезентериальных лимфатических узлах при колоректальном раке методом полимеразной цепной реакции**

Дата создания объекта: **04.01.2022**





Құжат тұлғасыналығын <http://www.kazpatent.kz/ru> сайтының
"Авторлық құқық" бөлімінде тексеруге болады. <https://copyright.kazpatent.kz>

Подлинность документа возможно проверить на сайте kazpatent.kz
в разделе «Авторское право» <https://copyright.kazpatent.kz>

Подписано ЭЦП

Е. Куантыров

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ



РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

**АВТОРЛЫҚ ҚҰҚЫҚПЕН ҚОРҒАЛАТЫН ОБЪЕКТІЛЕРГЕ ҚҰҚЫҚТАРДЫҢ
МЕМЛЕКЕТТІК ТІЗІЛІМГЕ МӘЛІМЕТТЕРДІ ЕНГІЗУ ТУРАЛЫ**

КУӘЛІК

2022 жылғы «10» қаңтар № 22807

Автордың (лардың) жөні, аты, әкесінің аты (егер ол жеке басын куәландыратын құжатта көрсетілсе):

**ОГИЗБАЕВА А.ЛИНА ВИТА.ЛІЕВНА, ҚАЛЫРОВА ПРИНА АДІЛЬЕВНА, ТУРГУНОВ ЕРМЕК
МЕЙРАМОВИЧ, ШАКЕЕВ КАЙРАТ ТАНАБАЕВИЧ, КОЛЕСНИЧЕНКО СВЕТАНА ИГОРЕВНА,
МУТАЗОВ МИРАС МУТАЗОВИЧ**

Авторлық құқық объектісі: **ҒЫЛЫМИ ТУЫНДЫ**

Объектінің атауы: **Количественное определение микроорганизмов в мезентериальных лимфатических узлах при колоректальном раке методом полимеразной цепной реакции**

Объектіні жасаған күні: **04.01.2022**



Құжат түпнұсқасын <http://www.kazpatent.kz/ru> сайтының
"Авторлық құқық" бөлімінде тексеруге болады <https://copyright.kazpatent.kz>

Подлинность документа возможно проверить на сайте kazpatent.kz
в разделе «Авторское право» <https://copyright.kazpatent.kz>

ЭЦҚ қол қойылды

Е. Куантыров

Приложение К

Стандартная операционная процедура определения маркеров бактериальной транслокации в сыворотке крови

УТВЕРЖДЕНО

ЗАСЕДАНИЕМ КОМИТЕТА
ПО БИОЭТИКЕ НАО «МУК»

ПРОТОКОЛ № 16

присвоенной номер 48

15.03.20



СТАНДАРТ ОПЕРАЦИОННОЙ ПРОЦЕДУРЫ «Определение sCD14-ST и LBP в сыворотке крови методом ИФА»

Цель: Описание методики определения sCD14-ST и LBP в сыворотке крови методом ИФА.

Ресурсы

- медицинские перчатки;
- антисептик;
- штативы для пробирок с забраным биоматериалом;
- наконечники для пипеток
- механические дозаторы/пипетки (8-ми канальные)
- микроцентрифужные пробирки
- шейкер-инкубатор для 4 микропланшетов ST-3L SkyLine
- ИФА-роботизированная система Evolis от BioRad
- коммерческие наборы от ELISA Kit for Presepsin (sCD14-ST, Human) и for Lipopolysaccharide Binding Protein (LBP, Human) с микропланшетами

Алгоритм действий

1. Во время оттаивания замороженных образцов сыворотки до комнатной температуры, готовят в микроцентрифужных пробирках в зависимости от концентрации (от 0 до 200 нг/мл) восемь разведений контрольного стандарта (прилагается в наборе) для калибровки результатов.
2. Только для определения уровней LBP сыворотку образцов разбавляют в 500 раз (10 мкл сыворотки и 490 мкл раствора PBS)
3. Перед работой с микропланшетом заполняют протокол, где распределяют каждый образец и стандарты по лункам, чтобы не перепутать результаты образцов.
4. В лунки микропланшета, покрытые биотинилированными антителами, специфичными к исследуемым маркерам, помещают по 100 мкл образцов изучаемой сыворотки и в отдельные лунки по 100 мкл полученных разбавлений стандарта. Далее инкубируют 1 час при 37°C.
5. Затем удаляют всю жидкость без промывания, добавляют 100 мкл Detection reagent A (авидин, конъюгированный с пероксидазой хрена) и инкубируют 1 час при 37°C.
6. После чего в ИФА-роботизированной системе Evolis от BioRad проводят трехкратную промывку лунок, далее добавляют 100 мкл Detection reagent B

	<p>и инкубируют 30 мин при 37⁰С.</p> <p>7. После инкубации лунки снова промывают в системе Evolis (пятикратно) и добавляют 90 мкл раствора субстрата ТМВ (Substrate solution) и инкубируют 10-20 мин при 37⁰С, при этом только те лунки, которые содержат исследуемые маркеры, изменяют цвет (синий) в зависимости от концентрации маркера в сыворотке.</p> <p>8. После инкубации добавляют 50 мкл Stop Solution и изменившие свой цвет лунки, вновь меняют его на желтый.</p> <p>9. Данные изменения цвета измеряют в системе Evolis спектрофотометрически при длине волны 450 нм ± 10 нм, где концентрация маркеров в исследуемых образцах определялась путем сравнения оптической плотности образцов со стандартными калибровочными образцами.</p>
--	---

Приложение Л

Таблица 23 - Корреляционная матрица исследуемых показателей

	ОКН -/+	Стадия I-IV	Осложнения -/+	SIRS -/+	Органые дисфункции -/+	Летальный исход -/+	LBP до операции	LBP на 3-и сутки	sCD14-ST до операции	sCD14- ST на 3-и сутки	Разница LBP	Разница sCD14- ST	Лейкоциты до операции	Лимфоциты до операции	Мочевина до операции
ОКН-/+	1,000	0,332	0,064	0,145	0,141	0,298	0,135	-0,095	0,297	0,172	-0,215	-0,086	0,327	-0,393	0,258
Стадия I-IV		1,000	0,157	0,122	0,152	0,240	0,213	-0,014	0,097	0,177	-0,235	0,080	0,118	-0,080	0,087
Осложнения -/+			1,000	0,636	0,502	0,500	-0,168	-0,304	0,031	0,227	-0,054	0,177	0,018	-0,240	0,133
SIRS -/+				1,000	0,396	0,373	-0,154	-0,277	0,046	0,162	-0,047	0,108	0,275	-0,305	0,180
Органые дисфункции -/+					1,000	0,706	-0,179	-0,317	-0,035	0,274	-0,052	0,273	0,013	-0,096	0,297
Летальный исход-/+						1,000	-0,123	-0,232	0,078	0,379	-0,047	0,274	0,093	-0,205	0,184
LBP до операции							1,000	0,495	0,212	0,204	-0,728	-0,019	-0,057	0,153	-0,013
LBP на 3-и сутки								1,000	0,279	0,135	0,307	-0,070	-0,009	0,157	-0,007
sCD14-ST до операции									1,000	0,581	-0,027	-0,530	0,274	-0,270	0,328
sCD14-ST на 3-и сутки										1,000	-0,061	0,644	0,199	-0,267	0,220
Разница LBP											1,000	-0,033	0,053	-0,048	0,014
Разница sCd14-ST												1,000	-0,042	-0,040	-0,017
Лейкоциты до операции													1,000	-0,726	0,344
Лимфоциты до операции														1,000	-0,327
Мочевина на 3-и сутки															1,000

Примечание - Жирным шрифтом выделены статистически значимые корреляции, при которых уровень значимости $p < 0,05$.

Приложение М
Свидетельство о внесении сведений в государственный реестр прав на объекты,
охраняемые авторским правом № 29343

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ

РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

СВИДЕТЕЛЬСТВО
О ВНЕСЕНИИ СВЕДЕНИЙ В ГОСУДАРСТВЕННЫЙ РЕЕСТР
ПРАВ НА ОБЪЕКТЫ, ОХРАНЯЕМЫЕ АВТОРСКИМ ПРАВОМ
№ 29343 от «11» октября 2022 года

Фамилия, имя, отчество, (если оно указано в документе, удостоверяющем личность) автора (ов):
ОГИЗБАЕВА АЛИНА ВИТАЛИЕВНА, Тургунов Еркем Мейрамович, Авдijenко Ольга Вячеславовна,
Мугазов Мирас Мугазович, Асамиданова Софиго Гиевна, Комаров Тимофей Васильевич

Вид объекта авторского права: произведение науки

Название объекта: Методика расчета риска развития неблагоприятных исходов оперативного
вмешательства у пациентов с колоректальным раком

Дата создания объекта: 08.10.2022

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ АРНАУЛЫҚ ПАТЕНТ АГЕНДІГІ
ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ АРНАУЛЫҚ ПАТЕНТ АГЕНДІГІ
ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ АРНАУЛЫҚ ПАТЕНТ АГЕНДІГІ



Құжат түпнұсқасын <http://www.kazpatent.kz/ru> сайтының
"Авторлық құқық" бөлімінде тексеруге болады. <https://copyright.kazpatent.kz>
Подлинность документа возможно проверить на сайте kazpatent.kz
в разделе «Авторское право» <https://copyright.kazpatent.kz>

Подписано ЭЦП

Е. Оспанов

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ



РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

**АВТОРЛЫҚ ҚҰҚЫҚПЕН ҚОРҒАЛАТЫН ОБЪЕКТІЛЕРГЕ ҚҰҚЫҚТАРДЫҢ
МЕМЛЕКЕТТІК ТІЗІЛІМГЕ МӘЛІМЕТТЕРДІ ЕНГІЗУ ТУРАЛЫ**

КУӘЛІК

2022 жылғы «11» қазан № 29343

Автордың (лардың) жөні, аты, әкесінің аты (егер ол жеке басын куәландыратын құжатта көрсетілсе):
**ОГИЗБАЕВА АЛИНА ВИТАЛИЕВНА, Тургунов Ермек Мейрамович, Авдиенко Ольга Вячеславовна,
Мугазов Мирас Мугазович, Асамиданова Софико Гиевна, Комаров Тимофей Васильевич**

Авторлық құқық объектісі: **ғылыми туынды**

Объектінің атауы: **Методика расчета риска развития неблагоприятных исходов оперативного
вмешательства у пациентов с колоректальным раком**

Объектіні жасаған күні: **08.10.2022**



Құжат түпнұсқасын <http://www.kazpatent.kz/ru> сайтының
"Авторлық құқық" Бөлімінде тексеруге болады <https://copyright.kazpatent.kz>

Подлинность документа возможно проверить на сайте kazpatent.kz
в разделе «Авторское право» <https://copyright.kazpatent.kz>

ЭЦҚ қол қойылды

Е. Оспанов