DOI: https://doi.org/10.51922/2074-5044.2026.4.31

*М. Ю. Ревтович[1], Б. В. Кириленко[2], А. В. Воробей[1], С. А. Костюк[1], О. Г. Дыбов[1], О. С. Полуян[1]*

# КЛИНИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ E. FAECALIS, ENTEROBACTERIACEA И MMP-9 В ТОЛСТОЙ КИШКЕ ПОСЛЕ ЛИКВИДАЦИИ КОНЦЕВЫХ КОЛОСТОМ

*УО «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Беларусь[1]*
*УЗ «Минская областная клиническая больница», Минск, Беларусь[2]*

*Реконструктивно-восстановительная операция рассматривается колопроктологами и пациентами как конечный этап лечения после обструктивной резекции толстой кишки (ТК). Актуальность данной проблемы возрастает с каждым годом. Это обусловлено несколькими факторами: увеличением числа операций на ТК, требующих временной стомы, ростом выживаемости пациентов после лечения онкологических заболеваний, а также смещением фокуса современной медицины в сторону не только сохранения жизни, но и обеспечения ее высокого качества. В последние годы имеются данные о влиянии роли микробиоты толстой кишки на процесс ремоделирования ее стенки, что сказывается на успешности выполнения реконструктивно-восстановительной операции.*

***Ключевые слова:*** *закрытие концевой колостомы, несостоятельность толстокишечного анастомоза, E. faecalis, MMP-9, морфология стенки толстой кишки, экстрацеллюлярный матрикс*

*M. Y. Reutovich[1], B. V. Kirylenka[2], A. V. Varabei[1], S. A. Kostiuk[1], A. G. Dybau[1], O. S. Poluyan[1]*

# CLINICAL FEATURES OF E. FAECALIS AND ENTEROBACTERIACEAE AND MMP-9 IN THE COLON AFTER ELIMINATION OF END COLOSTOMAS

*«Belarusian State Medical University», Minsk, Belarus[1]*
*Minsk Regional Clinical Hospital, Minsk, Belarus[2]*

*Reconstructive restorative surgery is considered by coloproctologists and patients as the final stage of treatment following obstructive resection of the colon. The relevance of this issue increases every year. This is due to several factors: the growing number of colon surgeries that require a temporary stoma, improved survival rates of patients after cancer treatment, and a shift in the focus of modern medicine toward not only preserving life but also ensuring its high quality. In recent years, evidence has emerged regarding the role of the colonic microbiota in the process of intestinal wall remodeling, which affects the success of reconstructive restorative surgery.*

***Key words:*** *closure of end colostomy, colonic anastomotic leakage,* E. faecalis*, MMP-9, morphology of the colonic wall, extracellular matrix.*

Формирование концевой колостомы после резекции участка толстой кишки (далее – колостома) является одним из ключевых и нередко спасительных этапов хирургического лечения в большом спектре колоректальных заболеваний: рак, дивертикулярная болезнь ободочной кишки, воспалительные заболевания толстой кишки, а также травмы и некоторые врожденные аномалии. Согласно данным эпидемиологических исследований, частота формирования колостом в странах с развитой системой хирургической помощи остаётся стабильной и составляет в среднем 10–15 случаев на 100 000 населения в год [1]. В Соединенных Штатах Америки, по оценкам Объединенной ассоциации стомированных пациентов Америки (UOAA), от 750 тысяч до 1 миллиона человек проживает с уро- либо кишечной стомой (из которых примерно 55 % с колостомой) [2]. Ежегодно в стране выполняют 100 000–130 000 операций по формированию толстокишечной стомы. Наиболее частой её причиной является колоректальный рак, за которым следуют дивертикулярная болезнь ободочной кишки и необходимость в более проксимальном отведении кала наружу (спинальная травма, анальная инконтиненция) [3]. В странах Европы совокупное число стомированных пациентов – около 700 тысяч. [4]. В Китае около 1 миллиона людей

имеют кишечную стому, ежегодно их формируют примерно у 100 тысяч пациентов [5].

Несмотря на свою неоспоримую клиническую значимость, наличие стомы радикально меняет качество жизни пациента, приводя к возникновению целого ряда медицинских, психологических и социальных проблем. С медицинской точки зрения, они сталкиваются с риском развития ряда осложнений. Их общая частота может достигать 50 % [6]. К наиболее частым можно отнести: парастомальные грыжи (41,5–88,20 %), стриктуры устья стомы (до 5 %), ее ретракцию (до 5 %) и эвагинацию (выпадение) (до 5 %), что требует повторных хирургических вмешательств; перистомальные дерматиты (до 5 %), приводящие к болевому синдрому и дискомфорту [7]. Подавляющее большинство пациентов рассматривают этап ликвидации стомы (реконструктивно-восстановительная операция (РВО)), как ключевой на пути к полному выздоровлению и возвращению к нормальной жизни [8]. Однако после закрытия колостом несостоятельность швов сформированных при этом толстокишечных анастомозов достигает 16 % [6]. Согласно данным литературы в патогенезе развития несостоятельности швов толстокишечных анастомозов (ТКА) отводится нарушениям процессов синтеза коллагена и ремоделирования внеклеточного матрикса, а также влиянию микробиоты толстой кишки. В частности, большая роль в развитии несостоятельности швов колоректальных анастомозов отводится семействам Enterococcus и Enterobacteriaceae (включая Escherichia coli, Enterobacter и Proteus) [9]. Активная колонизация данными микроорганизмами зоны шва сопровождается выработкой агрессивных токсинов и липополисахаридов, препятствует формированию полноценной соединительной ткани, провоцируя развитие несостоятельности швов сформированного соустья [9, 10].

**Цель исследования** – оценить взаимосвязь концентраций ДНК *Enterobacteriacea* и ДНК *Enterococcus faecalis* с уровнями нормализованной экспрессии гена MMP-9 в биоптатах тканей толстой кишки у пациентов после реконструктивно-восстановительных операций на толстой кишке.

## Материалы и методы

Проанализированы результаты хирургического лечения 14 пациентов с концевыми колостомами (3 с десцедостомами, 3 с транверзостомами, 8 с сигмостомами). Биологический материал забирался интраоперационно из области анастомоза «холодным скальпелем». Средняя длительность жизни со стомой составила 197,0 ± 110,8 дней (диапазон: 81–413 дней). Средний возраст пациентов в исследуемой группе – 53,3 ± 14,5 года (диапазон: 26–77 лет). У одного пациента (№ 14) имелись клинические признаки несостоятельности швов анастомоза (лейкоцитоз, аномальное повышение СРБ, перианастомотический абсцесс), которые разрешились консервативно после антибиотикотерапии.

Выделение ДНК из биологического материала проводили с использованием фенол-хлороформной экстракции (набор реагентов «TRIzol» («Invitrogen», США). Предварительно проводили этап гомогенизации образцов биологического материала с использованием гомогенизатора TissueLyser II (Qiagen) в течение 3 минут (частота 10/с).

Полученный препарат ДНК хранили при температуре не выше 4°С в течение суток. Оценку качества и количества выделенной ДНК оценивали спектрофотометрически по отношению между оптической плотностью при 260 и 280 нм. Концентрацию нуклеиновых кислот в растворе рассчитывали после измерения его оптической плотности при 260 нм по формуле (1):

$$C\ (мкг/мл) = A2600{,}020 \qquad (1)$$

где С (мкг/мл) – концентрация нуклеиновых кислот; А260 – величина оптической плотности при 260 нм.

Коэффициент экстинкции для двуцепочечной ДНК составлял 0,020 (мкг/мл), а одна единица оптической плотности при λ=260 нм примерно соответствовала концентрации двуцепочечной ДНК 50 мкг/мл.

Молекулярно-генетические исследования по выявлению ДНК условно-патогенной флоры аэробной этиологии семейства Enterobacteriacea и Enterococcus faecalis, проводили с использованием тест-системы «АмплиСенс® ФлороЦеноз / Аэробы-FL» (РФ). Детекцию результатов проводили в режиме реального времени с использованием программного обеспечения прибора «Rotor-Gene-6000» («Corbett research», Австралия). Для качественных исследований результаты интерпретировали на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с пороговой линией, установленной на уровне экспоненциального подъема кривой, что определяло наличие (или отсутствие) для искомой ДНК-мишени значения порогового цикла Ct в соответствующей графе таблицы результатов программного обеспечения прибора. При проведении количественных исследований определяли концентрации ДНК искомых возбудителей относительно входящих в состав тест-систем ДНК стандартов данных микроорганизмов.

## Результаты и обсуждение

При проведении молекулярно-генетических исследований были определены количественные уровни ДНК семейства *Enterobacteriacea* (рис. 1), составившие 73,94 (14,45/698,02) х $10^4$ ГЭ/мл, а также ДНК *Enterococcus faecalis* (рис. 2), составившие 2,57 (0,78/11,28) х $10^4$ ГЭ/мл (табл. 1).

Исходя из анализа полученных данных, нами было предложено распределение всех пациентов по подгруппам в зависимости от значений концентраций ДНК выявленных патогенов. При последующем статистическом анализе было установлено, что для 6 пациентов (подгруппа 1) значения концентраций ДНК *Enterobacteriacea* и ДНК *Enterococcus faecalis*

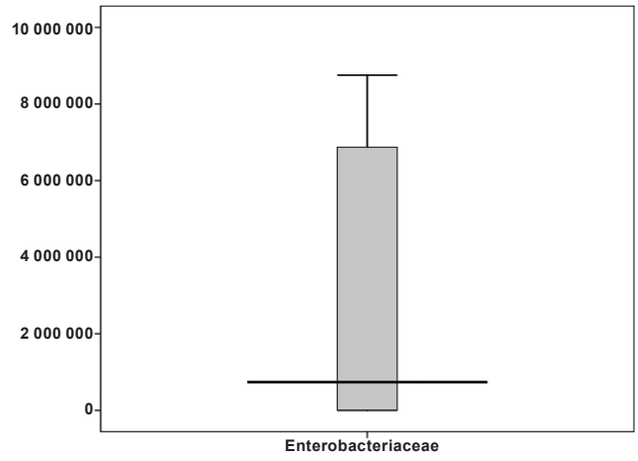



Рис. 1. Концентрации ДНК Enterobacteriacea в биоптатах тканей толстой кишки

Fig. 1. Enterobacteriaceae DNA concentrations in colon tissue biopsies




Рис. 2. Концентрации ДНК Enterococcus faecalis в биоптатах тканей толстой кишки

Fig. 2. Enterococcus faecalis DNA concentrations in colon tissue biopsies

*Таблица 1.* **Значения концентраций ДНК Enterobacteriacea и ДНК Enterococcus faecalis**

*Table 1.* **Enterobacteriaceae DNA and Enterococcus faecalis DNA concentration values**

| № п/п | Пол | Возраст | N дней стомирован | Концентрация ДНК *Enterobacteriacea*, ГЭ/мл | Концентрация ДНК *Enterococcus faecalis*, ГЭ/мл |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | м | 44 | 413 | $4{,}38 \times 10^6$ | $8{,}77 \times 10^3$ |
| 2 | м | 43 | 115 | $6{,}77 \times 10^6$ | $7{,}72 \times 10^3$ |
| 3 | ж | 55 | 81 | $4{,}90 \times 10^5$ | $2{,}72 \times 10^4$ |
| 4 | ж | 53 | 101 | $8{,}48 \times 10^6$ | $2{,}73 \times 10^3$ |
| 5 | м | 74 | 321 | $2{,}47 \times 10^3$ | $1{,}35 \times 10^5$ |
| 6 | ж | 73 | 195 | $4{,}07 \times 10^3$ | $1{,}06 \times 10^5$ |
| 7 | ж | 45 | 128 | $6{,}87 \times 10^6$ | $9{,}52 \times 10^3$ |
| 8 | ж | 26 | 153 | $8{,}75 \times 10^6$ | $7{,}78 \times 10^3$ |
| 9 | м | 62 | 274 | $5{,}75 \times 10^3$ | $1{,}45 \times 10^5$ |
| 10 | ж | 77 | 215 | $7{,}31 \times 10^6$ | $1{,}07 \times 10^3$ |
| 11 | ж | 57 | 390 | $2{,}96 \times 10^5$ | $5{,}79 \times 10^4$ |
| 12 | м | 53 | 157 | $4{,}66 \times 10^5$ | $3{,}58 \times 10^4$ |
| 13 | ж | 45 | 121 | $9{,}90 \times 10^5$ | $2{,}42 \times 10^4$ |
| 14 | м | 39 | 94 | $1{,}76 \times 10^3$ | $1{,}43 \times 10^5$ |

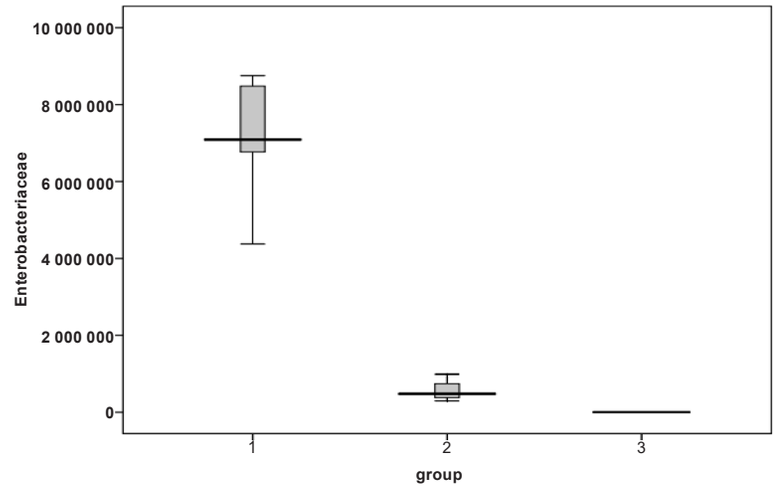



Рис. 3. Концентрации ДНК Enterobacteriacea в биоптатах тканей толстой кишки пациентов различных подгрупп

Fig.3. Enterobacteriaceae DNA concentrations in colon tissue biopsies from patients of different subgroups

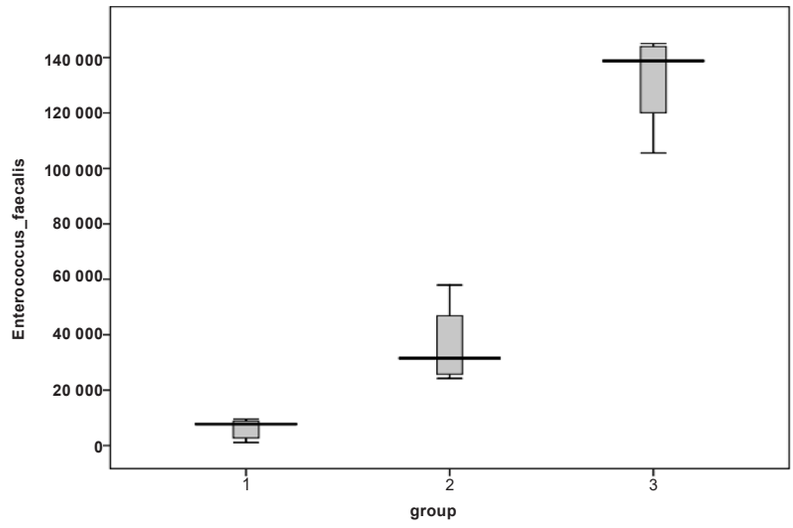



Рис. 4. Концентрации ДНК Enterococcus faecalis в биоптатах тканей толстой кишки пациентов различных подгрупп

Fig.4. Enterococcus faecalis DNA concentrations in colon tissue biopsies from patients of different subgroups

составили 7,09 (6,17/8,55) х $10^5$ и 7,75 (2,32/8,96) х $10^3$ ГЭ/мл соответственно, для 4 пациентов (подгруппа 2) – 4,78 (3,39/8,64) х $10^5$ и 3,15 (2,50/5,23) х х $10^4$ ГЭ/мл соответственно, и еще для 4 пациентов (подгруппа 3) – 3,27 (1,94/5,33) х $10^3$ и 1,39 (1,13/1,45) х $10^5$ и ГЭ/мл соответственно (рис. 3, 4). Следует отметить, что разделение пациентов на подгруппы носило условный характер и основывалось исключительно на установленных значениях концентраций ДНК исследуемых возбудителей.

На следующем этапе были проведены молекулярно-генетические исследования по определению уровней нормализованной экспрессии гена *MMP-9* (рис. 5) в биоптатах толстой кишки пациентов с ТКА, в целом в группе они составили 33,21 (19,53/74,56) %.

При использовании аналогичного подхода при разделении пациентов на подгруппы уровни нормализованной экспрессии гена *MMP-9* составили для подгруппы 1 – 19,10 (12,38/23,60) %, для подгруппы 2 – 37,02 (24,23/39,35) %, для подгруппы 3 – 84,07 (74,56/92,69) % соответственно (рис. 6).

Одним из ключевых параметров заживления толстокишечного соустья является восстановление механической прочности шва, которое, с молекулярной точки зрения зависит от синтеза коллагена и ремоделирования внеклеточного матрикса. Оба эти процесса способствуют улучшению послеоперационных результатов. Подслизистый слой стенки толстой кишки (ТК) является главной несущей структурой, отвечающей за механическую прочность анастомоза. Он содержит преимущественно коллаген и эластиновые волокна [11]. Основой экстрацеллюларного матрикса (ЭЦМ) является коллаген, который преимущественно представлен I и II типами (68 % и 20 % соответственно)

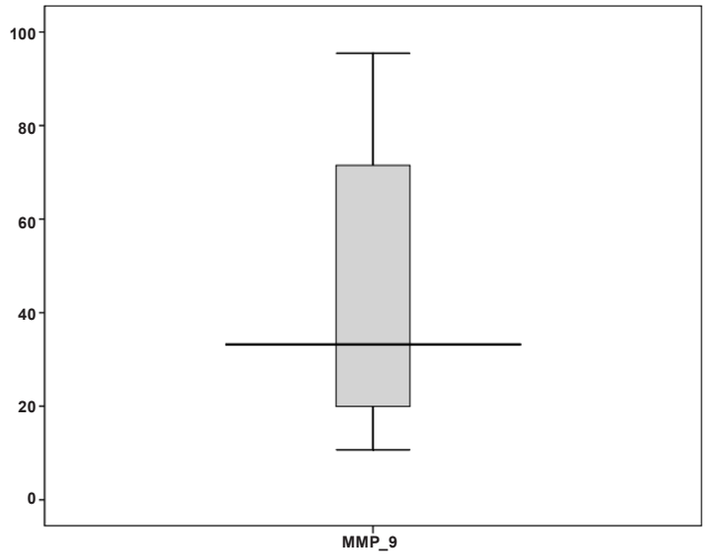



Рис. 5. Уровни нормализованной экспрессии гена MMP-9 в биоптатах тканей толстой кишки

Fig.5. MMP-9 normalized expression gene levels the in colon tissue biopsies

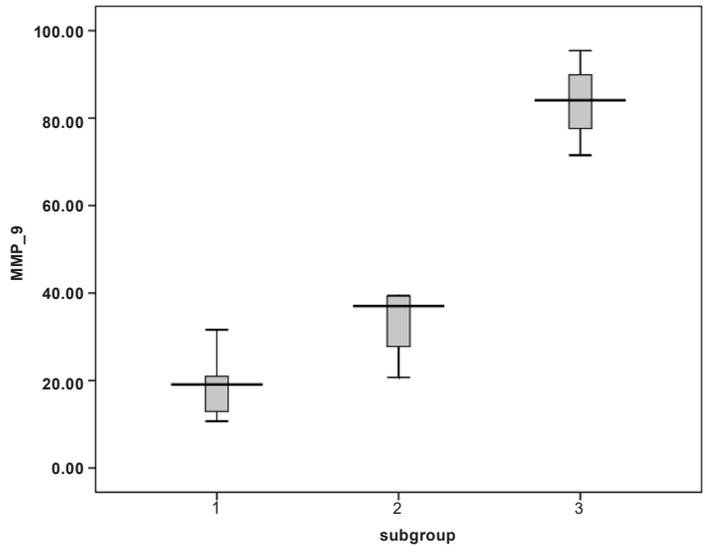



Рис. 6. Уровни нормализованной экспрессии гена MMP-9
в биоптатах тканей толстой кишки пациентов различных подгрупп

Fig.6. MMP-9 normalized expression gene levels the in colon tissue biopsies
from patients of different subgroups

*Таблица 2.* **Взаимосвязь концентраций ДНК Enterobacteriacae и E.faecalis с экспрессией гена MMP-9 в толстой кишке после ликвидации концевых колостом**

*Table 2.* **Relationship between Enterobacteriacae and E.faecalis DNA concentrations and MMP-9 gene expression in the colon after end colostomy removal**

| Подгруппа пациентов | Концентрация ДНК | | Уровень нормализованной экспрессии гена MMP-9 (%) |
|---|---|---|---|
| | Enterobacteriacae ($10^5$) | E.faecalis ($10^5$) | |
| 1 | $7{,}09 \times 10^5$ | $7{,}75 \times 10^3$ | 19,1 |
| 2 | $4{,}78 \times 10^5$ | $3{,}15 \times 10^4$ | 37,02 |
| 3 | $3{,}27 \times 10^3$ | $1{,}39 \times 10^5$ | 84,07 |

и уникальным для кишечника V типом (12 %) [12]. Незрелый (молодой) коллаген в основном относится к III типу, который предназначен для образования временного каркаса в ранней фазе заживления (1–2 недели после травмы/операции – этап пролиферации). COL3A1 – ген кодирует α1-цепь коллагена III типа. При этом коллаген III типа особенно легко разрушается под действием ферментов металлопротеиназ. Зрелый коллаген, в свою очередь, имеет в своем составе, в основном коллаген I типа. Ген COL1A1 кодирует α1-цепь коллагена I типа. Структурно он формирует механически прочный рубец. На этапе ремоделирования, которое (начинается примерно с 14-го дня) постепенно повышается доля коллагена I, в то время как матриксные металлоопротеиназы (ММП) удаляют избыточный коллаген III. У пациентов с несостоятельностью анастомоза чаще наблюдается сниженное соотношение коллагена I/III в стенке кишки, что снижает прочность сформированного анастомоза [11]. Контроль за этим балансом, включая регуляцию ММП и поддержку синтеза I-го коллагена – важный путь повышения надёжности колоректальных анастомозов.

Большая роль в развитии несостоятельности швов колоректальных анастомозов отводится семейству Enterococcus. Эти микроорганизмы способны продуцировать коллагеназы и активировать матриксные металлопротеиназы (в частности, MMP-9), что приводит к деструкции внеклеточного матрикса, нарушению стабильности соединительной ткани, препятствуют формированию грануляционной ткани и снижают механическую прочность анастомоза. Подобные механизмы подтверждены в экспериментах на животных моделях [9]. В частности, ранее было установлено:

1. Enterococcus faecalis разрушает коллаген I с помощью собственных ферментов, прежде всего GelE (кодируется геном gelE). Это бактериальная желатиназа, обладающая коллагенолитической активностью. Она эффективно действует на повреждённые участки коллагеновых волокон, особенно после хирургической травмы или воспаления. В результате ее действия снижается механическая прочность анастомоза, появляются его микроразрывы, что, в свою очередь, запускает каскад воспаления, активацию MMP-9, и усиливает разрушение внеклеточного матрикса области анастомоза;

2. MMP-9 разрушает коллаген IV, один из ключевых компонентов базальной мембраны, посредством гидролиза его пептидных связей в тройной спирали. Результатом является потеря коллагеном IV своей сетчатой структуры. Базальная мембрана становится рыхлой, проницаемой и теряет механическую целостность;

3. У крыс с несостоятельностью толстокишечного анастомоза зарегистрирован значительно более высокий уровень MMP-9 в тканях на шестые послеоперационные сутки;

4. Активация MMP-9 была обусловлена ферментами E. faecalis – коллагеназой GelE и серин-протеазой SprE. Дефицит соответствующих генов снижал способность активировать MMP-9 и инициировать несостоятельность анастомоза. Более того, фармакологические ингибиторы MMP-9 также существенно снижали частоту несостоятельности анастомозов;

5. Стандартная системная антибиотикопрофилактика неэффективна против коллагеназоактивных штаммов и не предотвращает активацию MMP-9.

Семейство Enterobacteriaceae (включая Escherichia coli, Enterobacter и Proteus) также играет ключевую роль в микробной деструкции тканей и развитии несостоятельности толстокишечного анастомоза. Отдельные штаммы кишечной палочки продуцируют колибактин и цитотоксины, вызывающие повреждения ДНК клеток и угнетающие регенерацию тканей в зоне соустья. Протеолитическая активность энтеробактерий способствует разрушению фибринового матрикса и несостоятельности швов. Высвобождение липополисахаридов при гибели бактерий усиливает локальный некроз и системный эндотоксикоз [10].

На основании проведенных предварительных исследований нами установлены различающиеся уровни концентрации ДНК штаммов семейства Enterobacteriacea, Enterococcus faecalis и нормализованной экспрессии гена MMP-9 в биоптатах тканей толстой кишки 14 пациентов с ТКА. Выявлена корреляция между этими показателями. Полученные результаты подтверждают имеющиеся литературные данные, свидетельствующие об активации синтеза MMP-9 в присутствии *Enterococcus faecalis* в тканях толстой кишки, и указывают на потенциальную возможность использования уровня экспрессии MMP-9 и/или значений концентраций ДНК *Enterococcus faecalis* при прогнозировании развития несостоятельности ТКА после РВО у ранее стомированных пациентов. Для решения данной задачи необходим более детальный анализ по установлению закономерностей изменения экспрессии гена MMP-9 в зависимости от уровней концентраций ДНК условно-патогенных возбудителей семейства *Enterobacteriacea* и *Enterococcus faecalis,* что в последующем может быть использовано при разработке мероприятий по уменьшению их численности у пациентов при ликвидации концевых колостом.

**Литература/References**

1. *Claessens, I.* The Ostomy Life Study: the everyday challenges faced by people living with a stoma in a snapshot / I. Claessens, R. Probert, C. Tielemans [et al.] // Gastrointestinal Nursing. 2015. Vol. 13, № 5. P. 18–25. DOI: 10.12968/gasn.2015.13.5.18.

2. *Changes* in the quality of life of adults with an ostomy during the first year after surgery as part of the Best Practice Spotlight Organisation® Programme / B. Martín-Gil, N. Rivas-González, T. Santos-Boya [et al.] // International Wound Journal. 2023. Vol. 21, № 3. DOI: 10.1111/iwj.14456.

3. *Hedrick, T. L.* AGA Clinical Practice Update on Management of Ostomies: Commentary / T. L. Hedrick, A. Sherman,

S. Cohen-Mekelburg, J. Gaidos // Clinical Gastroenterology and Hepatology. 2023. Vol. 21, № 10. P. 2425–2430. DOI: 10.1016/j.cgh.2023.04.035.

4. *Life* with a stoma across five European countries–a cross-sectional study on long-term rectal cancer survivors / M. Krogsgaard, H. Ø. Kristensen, E. J. B. Furnée [et al.] // Supportive Care in Cancer. 2022. Vol. 30, № 12. P. 9931–9941. DOI: 10.1007/s00520–022–07293-y.

5. *Geng, Z.* Quality of Life in Chinese Persons Living With an Ostomy / Z. Geng, D. Howell, H. Xu, C. Yuan // Journal of Wound, Ostomy & Continence Nursing. 2017. Vol. 44, № 3. P. 249–256. DOI: 10.1097/WON.0000000000000323.

6. *Van de Wall*, B. J. M. Conventional and Laparoscopic Reversal of the Hartmann Procedure: a Review of Literature / B. J. M. Van de Wall, W. A. Draaisma, E. S. Schouten [et al.] // Journal of Gastrointestinal Surgery. 2009. Vol. 14, № 4. P. 743–752. DOI: org/10.1007/s11605–009–1084–3.

7. *Squire, S. E.* Summary for patients: European Hernia Society guidelines on prevention and treatment of parastomal hernias / S. E. Squire, S. A. Antoniou, F. E. Muysoms // Hernia. 2017. Vol. 22, № 1. P. 199–200. DOI: 10.1007/s10029–017–1692-x.

8. *Qualitative* exploration of home life experiences and care needs among elderly patients with temporary intestinal stomas / S. M. Wang, J. L. Jiang, R. Li [et al.] // World Journal of Gastroenterology. 2024. Vol. 30, № 22. P. 2893–2901. DOI: 10.3748/wjg.v30.i22.2893.

9. *Collagen* degradation and MMP9 activation by Enterococcus faecalis contribute to intestinal anastomotic leak / B. D. Shogan, N. Belogortseva, P. M. Luong [et al.] // Science Translational Medicine. 2015. Vol. 7, № 286. DOI: 10.1126/scitranslmed.3010658.

10. *Impact* of gut microbiota on colorectal anastomotic healing (Review) / Chen Y., Wu N., Yan X. [et al.] // Mol. Clin. Oncol. 2025. Vol. 22, № 6. Art. 52. DOI: 10.3892/mco.2025.2847

11. *Lundy, J.* A Primer on Wound Healing in Colorectal Surgery in the Age of Bioprosthetic Materials / J. Lundy // Clinics in Colon and Rectal Surgery. 2014. Vol. 27, № 4. P. 125–33. DOI: 10.1055/s-0034–1394086.].

12. *Collagen* content and types in the intestinal strictures of Crohn's disease / M. F. Graham, R. F. Diegelmann, C. O. Elson [et al.] // Gastroenterology. 1988. Vol. 94, № 2. P. 257–265. DOI: 10.1016/0016–5085(88)90411–8.

*Поступила 01.09.2026 г.*