

© Дзюбенко Н., Сташевська Н., Толстанова Г., Сергійчук Т., Акуленко І., Степанова Н., 2016

УДК: 5. 616.61-002.3-036.87: 615.281.9

ДЗЮБЕНКО Н.¹, СТАШЕВСЬКА Н.², ТОЛСТАНОВА Г.¹, СЕРГІЙЧУК Т.¹,
АКУЛЕНКО І.¹, СТЕПАНОВА Н.²

**КОЛОНІЗАЦІЯ ОКСАЛАТДЕГРАДУЮЧИМИ БАКТЕРІЯМИ ТОВСТОЇ КИШКИ
ХВОРИХ НА РЕЦИДИВУЮЧИЙ ПІЄЛОНЕФРИТ ТА ЇЇ ЗВ'ЯЗОК З ПРИЙОМОМ
АНТИБАКТЕРІАЛЬНИХ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ
(ПІЛОТНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ)**

*N. DZYUBENKO¹, N. STASHEVSKA², G. TOLSTANOVA¹, T. SERGIYCHUK¹,
I. AKULENKO¹, N. STEPANOVA²*

**COLON OXALATE-DEGRADING BACTERIA COLONIZATION IN PATIENTS WITH RECURRENT
PYELONEPHRITIS AND ITS RELATIONSHIP WITH ADMINISTRATION OF ANTIBIOTICS
(PILOT STUDY)**

¹Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
²ДУ «Інститут нефрології НАМН України»

¹Taras Shevchenko National University of Kyiv

²SI «Institute of Nephrology of the National Academy of Medical Sciences»

Ключові слова: оксалатдеградуєчі бактерії, колонізація, рецидивуючий пієлонефрит, антибактеріальні лікарські засоби.

Key words: oxalate-degrading bacteria, colonization, recurrent pyelonephritis, antibiotics.

Резюме. Антибактеріальне лікування і тривала антибактеріальна профілактика у пацієнтів з рецидивуючим пієлонефритом призводить до знищення оксалатдеградуєчих представників мікробіоти кишківника та збільшення добової екскреції оксалатів.

Метою роботи було дослідити рівень колонізації оксалатдеградуєчими бактеріями товстої кишки хворих на рецидивуючий пієлонефрит та її зв'язок з прийомом антибактеріальних лікарських засобів.

Пацієнти та методи. Пілотне обсерваційне одномоментне дослідження за участю 12 хворих на неускладнений пієлонефрит з рецидивуючим перебігом жіночої статі. Оксалатдеградуєчі бактерії виявляли шляхом висіву десятикратних розведень фекалій на високо елективні середовища, що містили оксалат натрію.

Результати. Бактеріологічний посів виявив оксалат деградуєчі бактерії у фекаліях 6 (50%) обстежених пацієнток. Кількість визначених оксалат деградуєчих бактерій коливалась від 2,0 до 7,0 Іг КУО/г фекалій та залежала від часу після закінчення останнього курсу антибіотикотерапії ($F = 4,6$; $P = 0,05$). Рівні колонізації оксалат деградуєчими бактеріями кишківника та добової екскреції оксалатів обстежених жінок мали помірний зворотній кореляційний зв'язок ($r = -0,6$; $P = 0,03$).

Висновки. Зниження кількості оксалатдеградуєчих бактерій через 3 місяці після закінчення антибіотикотерапії може бути причиною гіпероксалурії та розвитку рецидивів у пацієнтів з пієлонефритом. Подальші дослідження необхідні для підтвердження отриманих результатів.

Summary. Antibiotic therapy and long-term antibiotic prophylaxis affect the normal flora of the gastrointestinal tract in the patients with recurrent pyelonephritis. It may disturb the balance in oxalate-degrading bacteria in colon and induce hyperoxaluria.

The aim of this study was to investigate the level of colon oxalate-degrading bacteria colonization in patients with recurrent pyelonephritis and its association with administration of antibiotics.

Patients and methods. The pilot observational cross-sectional study, involving 12 patients with uncomplicated recurrent pyelonephritis, non-stone formers. Oxalate-degrading bacteria in feces were identified by bacteriological culture method in the sodium oxalate reach medium.

Results. Oxalate-degrading bacteria were detected in feces of 6 (50%) surveyed patients. The number of oxalate-degrading bacteria ranged from 2,0 to 7,0 Ig CFU / g in feces and depended on the time after the last administration of antibiotics ($F = 4,6$; $P = 0.05$). The levels of oxalate-degrading bacteria colonization and urinary oxalate excretion in surveyed women had a moderate inverse correlation ($\rho = -0,6$; $P = 0.03$).

Conclusions. The significantly higher urinary oxalate excretion in women non stone-formers with recurrent pyelonephritis may be associated with the application of antibiotics and a subsequent decolonization of oxalate-degrading bacteria. These findings must be further confirmed in randomized study.

Степанова Наталя Михайлівна
nmstep@ukr.net

ВСТУП. Гіпероксалурія (екскреція оксалатів з сечею більше 45 мг за добу) [5, 17] вважається

основним фактором ризику формування оксалатно-кальцієвих конкрементів та часто асоціюється з рецидивуючою інфекцією сечової системи [11, 15]. Оксалат утворюється в організмі людини з комбінації харчових джерел та ендogenous синтезу аскорбінової кислоти й різних амінокислот [5]. У деградації оксалату важливу роль відіграє мікробіота кишківника, представники якої метаболізують близько 50% оксалату [3, 11, 12], відіграючи провідну роль у розщепленні оксалату до безпечних метаболітів [3, 10, 12]. Найбільш активним серед оксалатдеградуючих бактерій є *Oxalobacter formigenes* (*O. formigenes*) [3, 11, 12, 14, 18].

O. formigenes являє собою непатогенні, грамнегативні анаеробні бактерії, які колонізують товсту кишку і залежать від оксалату, як джерела енергії їх метаболізму [5, 12, 13]. Вважається, що відсутність *O. formigenes* у товстій кишці збільшує кишкову абсорбцію оксалату, що призводить до гіпероксалурії [4, 18].

За результатами незначної кількості клінічних досліджень, проведених у різних країнах світу, продемонстровано, що колонізація кишечника здорових людей *O. formigenes* коливається від 46% до 77% та на 70% зменшує ризик виникнення оксалатних каменів [3, 4, 10, 12]. Цей мікроорганізм був уперше виділений та описаний у 1980 році Еллісон зі співавторами, але до цих пір існують лише обмежені клінічні дані щодо поширеності *O. formigenes* та її ролі у розвитку гіпероксалурії та сечокам'яної хвороби (СКХ).

Декілька наукових повідомлень свідчать про істотне зниження *O. formigenes* за наявності синдрому мальабсорбції, полікістозної хвороби нирок [3, 13] та за частого застосування антибактеріальних лікарських засобів (ЛЗ) [4, 9]. Хворі на рецидивуючий пієлонефрит з лікувальною та/або профілактичною метою змушені тривало приймати антибіотики, які з одного боку, запобігають рецидиву, але з іншого – можуть перешкоджати колонізації оксалатдеградуючими бактеріями кишківника та призводити до розвитку гіпероксалурії [15, 16]. Дослідження, проведені співробітниками ДУ «Інститут нефрології НАМН України» демонструють значну поширеність гіпероксалурії (82,1%) у хворих на рецидивуючий пієлонефрит, яка має прямий кореляційний зв'язок з частотою рецидивів захворювання [6-8, 16].

Разом з тим, рівень колонізації оксалатдеградуючими бактеріями кишківника пацієнтів з рецидивуючим пієлонефритом та вплив антибактеріальних засобів на розвиток гіпероксалурії залишаються не вивченими.

МЕТОЮ роботи було дослідити рівень колонізації оксалатдеградуючими бактеріями товстої кишки хворих на рецидивуючий пієлонефрит та її зв'язок з прийомом антибактеріальних ЛЗ.

МАТЕРІАЛ ТА МЕТОДИ. Пілотне обсерваційне одномоментне дослідження за участю 12 хворих на неускладнений пієлонефрит з рецидивуючим перебігом жіночої статі, які знаходились на амбулаторному лікуванні у клініці ДУ «Інститут не-

фрології НАМН України». Вік пацієнток коливався від 22 до 50 років та у середньому складав 33,5 ± 9,6 років. Тривалість захворювання пацієнток була від півроку до 16 років (6,0 ± 4,1 років). Кількість рецидивів на рік у середньому становила 6,4 ± 1,9.

Критеріями включення пацієнток до дослідження були: наявність 3 та більше рецидивів захворювання на рік, застосування антибактеріальних ЛЗ впродовж 0-12 місяців перед отриманням фекального матеріалу.

Критеріями виключення були: відмова хворої від участі у дослідженні, вагітність та період лактації, СКХ, ознаки обструкції сечової системи, зниження швидкості клубочкової фільтрації (ШКФ) <60 мл/хв., застосування антибактеріальної профілактики.

Протокол дослідження був схвалений локальною етичною комісією ДУ «Інститут нефрології НАМН України».

Кількість оксалатдеградуючих бактерій визначали методом бактеріологічного посіву 10-кратних розведень фекального біоптату на високоелективні середовища, які містили як єдине джерело вуглецю та енергії оксалат натрію.

Використовували середовища з наступним складом [2, 14].

Medium A (г/л, pH= 6,8): KH_2PO_4 – 0,25; K_2HPO_4 – 0,25; Trace metal solution – 20; Sodium acetate – 0,082; Resazurin – 0,001; Yeast extract – 0,5; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 1,0; Ammonium oxalate – 5,68; Na_2CO_3 – 4,0; Cysteine·HCl·H₂O – 0,33; $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ – 0,33; Agar – 22

Medium B (г/л): KH_2PO_4 – 0,25; K_2HPO_4 – 0,25; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,025; Trace metal solution – 20; Sodium acetate – 0,82; Resazurin – 0,001; Yeast extract – 1; Sodium oxalate – 10; Na_2CO_3 – 4,0; Cysteine·HCl·H₂O – 0,5

D-agar(г/л): KH_2PO_4 – 0,25; K_2HPO_4 – 0,25; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,025; Trace metal solution – 20; Sodium acetate – 0,82; Sodium oxalate – 2,7; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 1,0; Yeast extract – 1; Resazurin – 0,001; Agar – 15; Na_2CO_3 – 4,0; Cysteine·HCl·H₂O – 0,5

Trace metal solution: Trilon B (Na_2EDTA) – 5 мг; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 2 мг; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1мг; CoCl_2 – 0,2 мг; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 30 мкг; $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 20 мкг; Na_2MoO_4 – 30 мкг

Середовища з засіяним матеріалом культивували впродовж 10 – 14 діб при t 37°C за анаеробних умов (з використанням газ-пакетів GENbox anaer (bioMerieux)). Результати виражали у lg КУО/г фекалій.

Добову екскрецію оксалатів визначали ензиматичним методом з довжиною хвилі 590 нм.

Статистичну обробку результатів дослідження проводили за допомогою програми «MedCalc». Кореляційний зв'язок визначали за методом Спірмена (ρ). Вплив застосування антибактеріальних ЛЗ на рівень колонізації оксалатдеградуючими бактеріями визначали за допомогою однофакторного регресійного аналізу [1].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ. За результатами бактеріологічний посіву оксалатдеградуючі бактерії виявлені у фекаліях 6 (50 %) обстежених пацієнток, що повністю узгоджується з даними відомих досліджень у разі застосування методу ПЛР [4, 9]. Кількість визначених оксалатдеградуючих бактерій коливалась від 2,0 до 7,0 lg КУО/г фекалій та залежала від тривалості періоду після закінчення

останнього курсу антибіотикотерапії. Так, безпосередньо після закінчення прийому антибіотиків бактерії висівались у 2/3 (66 %) пацієнтів у кількості lg 2,0-7,0 КУО/г фекалій, через місяць після відміни антибіотиків – у 1/3 (33 %) жінок у кількості lg 2,0-5,0 КУО/г, через 3 місяці після відміни антибіотика оксалат деградуючі бактерії було визначено лише у 1 з 6 (16 %) пацієнток (табл. 1).

Таблиця 1

Кількість визначених оксалатдеградуючих мікроорганізмів залежно від терміну після відміни антибіотикотерапії

Термін після антибіотикотерапії (міс)	Пацієнти з виявленими м/о (%)	Оксалатдеградуючі бактерії (lg КУО/г)
0	66	2,0-7,0
1	33	2,0-5,0
≥3	16	2,0

Однофакторний регресійний аналіз продемонстрував залежність рівня колонізації оксалат деградуючими бактеріями товстої кишки обстежених жінок від часу останнього прийому антибіотиків: чим тривалішим був цей період, тим нижчим був вміст мікроорганізмів (рис. 1). Рівняння регресії: $y = 3,3390 + -0,3476 x$; коефіцієнт регресії – $3,4 \pm 0,78$; 95% ДІ – 1,65-5,02; $p = 0,0008$.

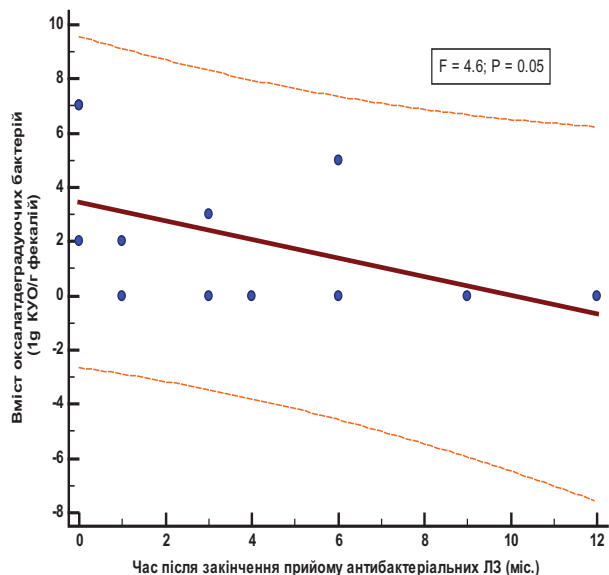


Рис. 1. Регресійна залежність рівня колонізації оксалатдеградуючими бактеріями товстої кишки хворих на рецидивуючий пієлонефрит від часу останнього прийому антибіотиків.

Крім того, нами було встановлено помірний зворотній кореляційний зв'язок між кількістю оксалатдеградуючих бактерій та рівнем добової екскреції оксалатів (рис. 2).

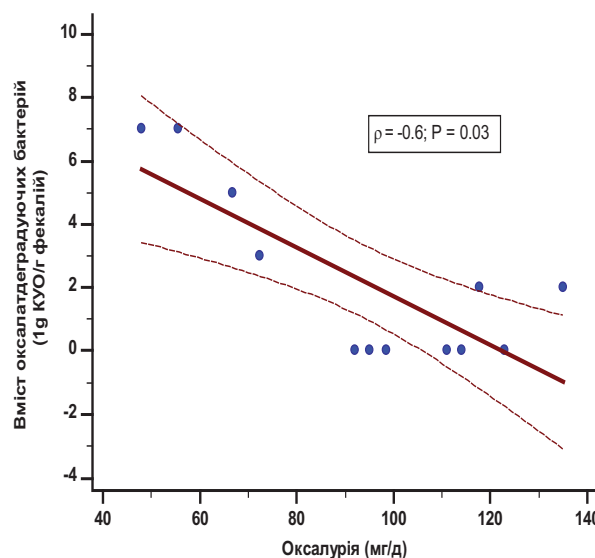


Рис. 2. Кореляційний зв'язок між рівнем колонізації оксалатдеградуючими бактеріями товстої кишки хворих на рецидивуючий пієлонефрит та оксалурією.

Отримані нами пілотні дані свідчать про перспективність визначення рівня оксалатдеградуючих бактерій у фекаліях пацієнтів на пієлонефрит, для оцінки ризику гіпероксалурії.

ВИСНОВКИ:

- 1) оксалатдеградуючі бактерії визначаються у 50 % хворих на рецидивуючий пієлонефрит; їх кількість коливається від 2,0 до 7,0 lg КУО/г фекалій та асоціюється з тривалістю періоду після закінчення останнього курсу антибіотикотерапії;
- 2) зниження кількості оксалатдеградуючих бактерій у термін понад 3 місяці після закінчення антибіотикотерапії може бути причиною гіпероксалурії та розвитку рецидивів у пацієнтів з пієлонефритом;

3) для підтвердження отриманих результатів необхідним є проведення проспективних рандомізованих досліджень за участю більшої кількості пацієнтів.

Робота виконана на кошти гранту Президента України для обдарованої молоді на 2016 рік.

ЛІТЕРАТУРА:

1. *Реброва О. Ю.* Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О. Ю. Реброва. – М. : Медиасфера, 2003. – 312 с.
2. *Argenzio R. A.* Intestinal Oxalate-Degrading Bacteria Reduce Oxalate Absorption and Toxicity in Guinea Pigs / R. A. Argenzio, J. A. Liacos, M. J. Allison. // American Institute of Nutrition. – 1988. – №118. – С. 788–792.
3. *Barnett C.* The presence of Oxalobacter formigenes in the microbiome of healthy young adults Barnett C., Nazzal L., Goldfarb D. S., Blaser M. J. // The Journal of urology. – 2016. – V. 195 (2). – P. 499-506.
4. Factors Related to Colonization with Oxalobacter formigenes in U.S. Adults / Kelly J. P., Curhan G. C., Cave D. R., [et al.] // Journal of Endourology. – 2011. – V. 25 (4). – P. 673-679.
5. Hyperoxaluria: a gut-kidney axis? / Robijn S., Hoppe B., Vervaet B. A., D'Haese P. C., Verhulst A. // Kidney Int. – 2011. – V. – 80. P. 1146–1158.
6. *Kolesnyk M.* Effect of hyperoxaluria on the progression of chronic kidney disease in women with recurrent uncomplicated pyelonephritis / M. Kolesnyk, N. Stepanova, L. Surzhko, N. Stashevska // Nephrology Dialysis Transplantation. – 2012. – Vol. 27 (Suppl 2). – P. 107.
7. *Kolesnyk M.* Hyperoxaluria associated with recurrent pyelonephritis in women (Electronic resource) / Kolesnyk M., Stepanova N., Stashevska N. // World Congress of Nephrology. – 2013. – Mode of access: http://www.abstracts2view.com/wcn/view.php?nu=WCN13L_1615
8. *Kolesnyk M.* Hyperoxaluria mediated renal injury in women with recurrent pyelonephritis / Kolesnyk M., Stepanova N., Driyanska V., Stashevska N., Kundin V. // Nephrology Dialysis Transplantation. – 2013. – V. 26 (Suppl.). – P. 114.
9. *Lange J. N.* Sensitivity of Human Strains of Oxalobacter formigenes to Commonly Prescribed Antibiotics / Lange J. N., Wood K. D., Wong H., [et al.] // Urology. – 2012. – V. 79 (6). – P. 1286-1289.
10. *Liebman M.* Probiotics and Other Key Determinants of Dietary Oxalate Absorption / Michael Liebman, Ismail A. Al-Wahsh // Adv. Nutr. – 2011. – V. 2 (3). – P. 254-260.
11. *Mogna L.* Screening of different probiotic strains for their in vitro ability to metabolise oxalates: any prospective use in humans? / Mogna L., Pane M., Nicola S., Raiteri E. // J Clin Gastroenterol. – 2014. – V. 48, Suppl 1. – P. 91-95.
12. *Nazzal L.* Enteric hyperoxaluria: an important cause of end-stage kidney disease / Nazzal L., Puri S., Goldfarb D. // Nephrol. Dial. Transplant. – 2016. – V. 31 (3). – P. 375-382.
13. *Sasikumar P.* Secretion of Biologically Active Heterologous Oxalate Decarboxylase (OxdC) in Lactobacillus plantarum WCFS1 Using Homologous Signal Peptides (Electronic resource) / Sasikumar P., Gomathi S., Anbazhagan K., Selvam G. S. // BioMed Research International. – 2013. – Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3732618/doi:10.1155/2013>
14. *Sidhu H.* Identification and Classification of Oxalobacter formigenes Strains by Using Oligonucleotide Probes and Primers / H. Sidhu, M. Allison, A. B. Peck. // Journal of Clinical Microbiology. – 1997. – №2. – С. 350–353.
15. *Silverman Jennifer A.* From Physiology to Pharmacy: Developments in the Pathogenesis and Treatment of Recurrent Urinary Tract Infections / Silverman Jennifer A., Schreiber Henry L., Hooton Thomas M. // Current Urology Reports – 2013. – V. 14. – P. 448-456.
16. *Stepanova N.* Hyperoxaluria in women with recurrent pyelonephritis associated with the deficit of Lactobacillus spp. in the gut and vaginal microbiota / Stepanova N., Kolesnyk M., Stashevska N. // European urology supplements. – 2015. – P. 50-51.
17. *Susan R. Marengo.* Oxalate in Renal Stone Disease: The Terminal Metabolite: Excretion of Oxalate. / Susan R. Marengo, Andrea M. P. // Nat Clin Pract Nephrol. – 2008. – V. 4 (7). – P. – 368-377.
18. *Torzewska A.* Oxalobacter formigenes--characteristics and role in development of calcium oxalate urolithiasis / Torzewska A. // Postepy Hig Med Dosw (Online). – 2013. – V. – 27 (67). – P. 1144-1153.

Надійшла до редакції 26.08.2016

Прийнята до друку 06.09.2016