

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
“VICTOR BABEȘ”, TIMIȘOARA
FACULTATEA DE MEDICINĂ GENERALĂ
Departamentul De CHIRURGIE ȘI ORTOPEDIE PEDIATRICĂ

HENRY IFEANYI OSAKWE



Rezumatul tezei de doctorat

**EFFECTUL SUPRAPOPULĂRII ȘI TRANSLOCĂRII
BACTERIILOR ÎN SINDROMUL DE INTESTIN SCURT**

Coordonator Științific

Prof. Dr. EUGEN SORIN BOIA

Timișoara

2018

Cuprins:

Lista de lucrări publicate.....	V
Lista de abrevieri.....	VI
Lista de figuri.....	VII
Tabele.....	VIII
Aprecieri.....	IX
INTRODUCERE.....	XI

PARTEA GENERALĂ –Conținutul

1. Suprapopularea și translocarea bacteriilor în sindrom de intestin scurt.....	1
1.1. Definiție.....	1
1.2. Cauze, incidențe și epidemiologie.....	2
1.3. Adaptarea intestinului.....	3
1.4. Patologie.....	4
1.5. Factorii imunologici antibacterieni.....	8
1.6. Factori nonimunologici antibacterieni.....	10
1.7. Mecanism de apărare al mucoasei.....	12
1.8. Dincolo de bariera mucoasei intestinale.....	14
1.9. Tratament medical.....	15
1.10. Tratament chirurgical.....	19
1.11. Transplantarea intestinului.....	20
1.12. Inginerie medicală a țesutului.....	21
1.13. Complicații.....	22
1.14. Prognoza.....	24

PARTEA SPECIALĂ –Contribuția noastră

1. Cercetare.....	26
1.1. Scopul și motivația studiului.....	26
1.2. Obiectivele științifice.....	35
1.3. Realizarea obiectivelor.....	36
1.4. Metode de management a pacienților.....	36
2. Materiale si metode.....	39
2.1. Protocol operator.....	44
2.2. Eutanasierea animalelor.....	46
2.3. Adunarea datelor.....	46
2.4. Etica.....	47
2.5. Dificultăți întâmpinate.....	48
2.6. Statistica.....	49
3. Rezultatele cercetări.....	50
4. Discuții.....	60
5. Concluzii.....	65
5.1. Îndeplinirea obiectivelor cercetării.....	65
5.2. Concluzii finale.....	66
5.3. Concluziile pe baza cazului raportat.....	67
5.4. Observațiile cercetărilor anterioare.....	68

6. Referințe.....	70
7. Anexe.....	I

Cuvinte Cheie: suprapopularea bacteriilor, translocarea bacteriilor, suprapopularea bacteriilor în intestinului scurt, sindrom de intestin scurt, rezecție intestinală extensivă, valvula ileocecală, insuficiența intestinală, nutriția parenterală totală, nutriția parenterală asociată cu bolile hepatice, unități de terapie intensive, nutriția enterală.

Introducere: Termenul de intestin scurt a fost descris de Rickam în 1967 ca intestin subțire rezidual de 75 cm la nou-născut, echivalent cu 30% a lungimii intestinului subțire normal la vârsta respectivă. La prematuri aceasta corespunde cu 30% din totalul lungimii intestinului calculate. Sindromul de intestin scurt este o stare de malabsorbție și maldigestie datorată pierderii unei suprafețe mari intestinale afectând funcția de absorbție. Malformații cum ar fi gastroschizis, volvulus, atrezia, enterocolita necrozantă, tumori intestinale etc., necesită uneori rezecție intestinală extensivă rezultând sindromul de intestin scurt. Înainte de introducerea nutriției parenterale în 1960 majoritatea pacienților decedau de malnutriții severe și deshidratare. Nutriția parenterală totală a reușit să schimbe evoluția pacienților cu această boală prin furnizarea suportului nutrițional pe durata adaptării intestinale. La ora actuală nutriția parenterală totală prin cateter central a devenit terapie de baza pentru supraviețuirea pacientului cu aceasta condiție cu rezultate favorabile în timp scurt. Provocarea noastră în ceea ce privește managerierea pacienților cu sindrom de intestin scurt constă în diverse probleme nutriționale datorate malabsorbției cauzate de reducerea suprafeței adaptative, în urma pierderi considerabile de intestin subțire, simptomele pacientului depinzând de capacitatea absorptivă și calitatea intestinului rezidual. Episoadele septice la pacienții cu sindrom de intestin scurt au fost cauzate de germenii enterici sugerând că translocarea bacteriană din intestinal rezidual joacă un rol esențial în declanșarea infecției. Rezultatele histopatologice în ceea ce privește bolile hepatice asociate cu nutriția parenterală sunt colestaza canaliculară și intracelulară, inflamații lobulare și portale, hiperplazie de macrofage, proliferarea canalului biliar și fibroză. Studiile pe animale ne arată că după rezecție extensivă de intestin bacteriile intestinale translochează la ficat prin vena portă și sistemului limfatic. Produsele bacteriilor inhibă transportul de acid biliar hepatocelular și activează macrofagele hepatice prin citadine. Când boala hepatică asociată nutriției parenterale devine ireversibilă singura opțiune rămasă este combinația transplantului hepatic și cel de intestin subțire. Mai multe dovezi ne arata acum că translocarea bacteriilor din intestinul pacientului cauzează o parte semnificativă a infecției. Translocarea bacteriilor are loc în nodulii limfatici ai șobolanilor studiați după rezecție extensivă intestinală, dar dacă procentajul de intestin rezecat e mai mic atunci translocarea bacteriană la organe distante (ficat, splina) este limitată. Nu am observat răspândirea sistemică a bacteriilor (hemocultură negativă) chiar dacă aceasta a fost descrisă în literatura medicală ca fiind posibilă. În studiul nostru am observat că metodele de decontaminare intestinală prin administrarea neomicinei nu au reușit să oprească suprapopularea bacteriană sau translocarea bacteriană. Studiul experimental pe animale dovedește că datorită rezecției, intestinul pierde funcția sa de barieră contra bacteriilor, facilitând translocarea bacteriană de la lumenul intestinal la noduli limfatici, ficat și splină măbind riscul de infecție sistemică. Există niște specii bacteriene mai mult sau mai puțin rezistente la antibioticele alese și cu predispoziție la producerea infecției. Studii ne arată că tratamentul

cu antibiotice chiar promovează translocarea bacteriană și crește posibilitatea formării fungice în lumenul intestinal. Altă alternativă în tratamentul infecției este tratamentul cu probiotice ele fiind bacterii apatogene ce au efect benefic în ecologia bacteriană a intestinului, necesare pentru prevenirea suprapopulării bacteriene. O serie de experimente dovedesc diminuarea translocării bacteriene prin folosirea de probiotice. Medicamentele ce scad timpul de tranzit intestinal și care favorizează secreția de salivă, acid gastric, pepsină, bilă și suc pancreatic pot diminua numărul bacteriilor intra-luminale. Mucusul intestinal previne aderarea bacteriilor patogene la enterocite, acesta fiind primul pas în translocarea bacteriană și în același timp protejează mucoasa intestinală de acțiunea acizilor și altor agenți nocivi, funcționând ca loc de ancorare pentru imunoglobuline secretorii. Diferite strategii de întărire a sistemului imun au fost adoptate. Acestea includ vaccinarea ce are ca rezultat producerea de anticorpi specifici, activarea nespecifică a macrofagelor, tratament cu nutrienți ai celulelor imunității (glutamina) și prin armarea sistemului imunitar cu microfloră intestinală (probiotice). Mai departe se mai adaugă IgA secretorii ce poate preveni translocarea bacteriană, nefiind încă complet elucidată contribuția acesteia. Multe dovezi ne sugerează că sistemul imun al gazdei este capabil să limiteze translocarea bacteriană pentru ca acesta să nu depășească ganglioni limfatici mezenterici. Exista trei factori ce promovează translocarea bacteriană în intestin: creșterea numărului de bacterii în intestin, funcția imună deficitară și creșterea permeabilității barierei mucoasei intestinale. Dacă toate sistemele de apărare intestinală se prăbușesc și bacteriile sau alte microorganisme reușesc să traverseze peretele intestinal, atunci intră în funcție ganglionii limfatici mezenterici ca sistem de sprijin ce scanează drenarea limfei. Ganglionii limfatici mezenterici au rol de a drena limfa și de eliminare a antigenilor. Niște bacterii totuși au adoptat strategii de camuflare cu scopul de a scăpa de recunoașterea sistemului imun (Listeria). Gradul la care alte bacterii pot folosi metode similare pentru supraviețuire nu este încă complet cunoscută. Când unul din mecanismele de asistare nu reușește să încetinească bacteriile, din cauza imunosupresiei sau din cauza numărului prea mare de microbi de procesat, atunci se instalează infecția sistemică. Translocarea bacteriană și complicațiile sale au fost dovedite la animal, totuși la om încă nu este complet elucidată. Devine din ce în ce mai acceptat faptul ca translocarea bacteriană este primul pas în patogeniza infecțiilor oportuniste cauzate de flora microbiană endogenă.

Studiul de laborator

Noi am simulat sindromul de intestin scurt la șobolani pentru a putea înțelege mai bine ce se întâmplă de fapt la pacienții cu această boală. Am folosit șobolani pentru că sunt mai ieftini și se cresc mai ușor în laborator. Animalele au fost repartizate în patru grupe: A-D. Am studiat 24 de șobolani dintre care 2 șobolani au decedat în primele 24 de ore (din cauza hemoragiei postoperatorie), iar restul de 22 de șobolani au fost împărțiți în felul următor: 16 au fost operați și repartizați în grupele A, B, C și 6 șobolani în grupa D, nu au fost supuși intervenției chirurgicale.

Grupa A: patru șobolani cu rezecție intestinală de 60% fără rezecție de valvulă ileocecală. Patru șobolani cu rezecție intestinală de 60% și rezecție de valvulă ileocecală

Grupa B: trei șobolani cu rezecție de 70% fără rezecție de valvulă ileocecală . Trei șobolani cu rezecție de 70% și cu rezecție de valvulă ileocecală.

Grupa C: doi șobolani cu rezecție de 75% de intestin și rezecție de valvulă ileocecală

Grupa D: șase șobolani neoperați din care doi cu tratament de antagoniști de histamine H₂/inhibitor de pompă de proton. Doi șobolani cu tratament antibiotic/probiotic și doi șobolani pentru studiu de caz.

Obiectivele studiului

1. Determinarea într-un grup de animale de laborator (șobolani) indicatorilor predictibili de suprapopulare bacteriană în sindromul de intestin scurt, confirmați prin analiza rezultatelor cantitative din culturile din lichidul duodenal și conținutul cecal al șobolanului, precum și corelația dintre suprapopularea bacteriană și translocarea bacteriană.
2. Determinarea implicațiilor diferențelor anatomice și terapeutice cum ar fi prezența sau absența valvei ileocecale, tratamentul cu medicație inhibitoare a secreției de acid gastric sau cu medicație de decontaminarea a intestinelor în producerea suprapopulării bacteriene, ce duce apoi la translocare bacteriană.
3. Determinarea relației dintre funcția hepatică (transaminaze și bilirubină), starea de nutriție (albumina serică) și legătura cu suprapopularea bacteriană și translocarea bacteriană. Determinarea relației dintre suprapopularea bacteriană și atrofia vilozităților mucoasei intestinului subțire și distrugerea ei. Dacă excesul bacterian din lumenul intestinal cauzează deconjugarea acizilor biliari și dacă acizii biliari neconjugați în duoden au legătură cu suprapopularea bacteriană.
4. Determinarea dacă: folosirea antibioticelor empirice pentru decontaminarea intestinului pot scădea episoadele septică.
5. Dacă acidul clorhidric prin folosirea de inhibitor de pompa de proton și antagoniști ai histaminei H₂ contribuie la dezvoltarea peste măsură a bacteriilor.
6. Determinarea relației dintre cultura pozitivă din aspiratul duodenal, cultura pozitivă din conținutul cecal și riscul de translocare bacteriană la distanță.
7. Examinarea dovezilor că după rezecția masivă de intestin, adaptarea are loc la modelul experimental exact ca la om și îndreptarea atenției noastre asupra factorilor ce influențează această adaptare și a strategiilor pentru optimizarea procesului de adaptare.

Rezultate

Suprapopularea bacteriana a fost dovedită în lichidul duodenal având o concentrație mai mare de 100.000 de unități per ml. Culturile din lichidul duodenal al șobolanilor înainte de intervenția chirurgicală au fost negative. Au fost prelevate biopsii din intestinul șobolanilor, ganglionii limfatici mezenterici, ficat și splină înainte de operație pentru a se compara cu biopsiile prelevate de la șobolani după efectuarea intervențiilor chirurgicale de scurtare a intestinului în diferite procente.

Șobolanii cu rezecție de 60% fără rezecție de valvă ileocecală au prezentat cultura pozitivă din aspiratul duodenal și din materii fecale pentru enterococ, 30 de zile postoperator. Rezultatul histopatologic arată o creștere în înălțimea vilozităților, adâncirea criptelor, îngroșarea diametrului intestinal (hiperplazia mucoasei și dilatarea intestinului), enterocite pseudostratificate imature și rare celule caliciforme (*Fig. 1*).

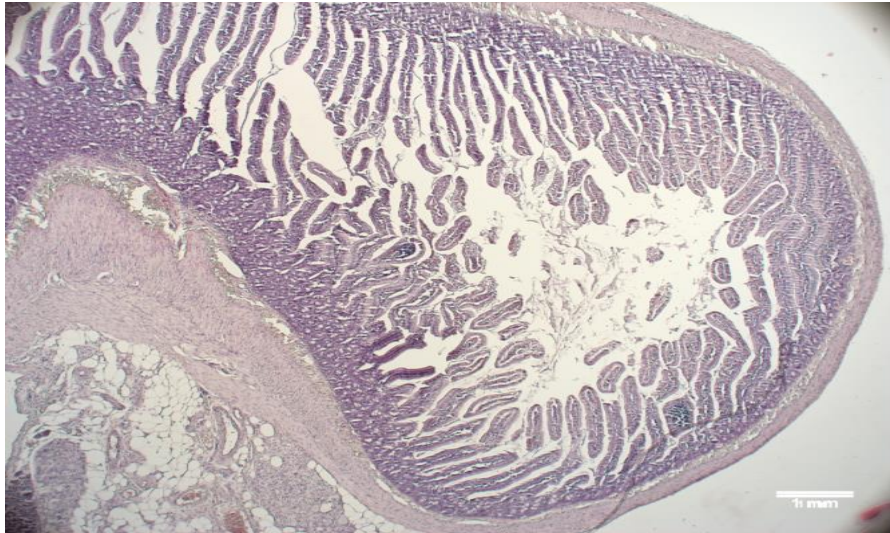


Fig. 1 Creștere în înălțime a vilozităților, adâncirea criptelor, îngroșarea diametrului intestinal (hiperplazia mucoasei și dilatarea intestinului), enterocite pseudostratificate imature și rare celule caliciforme.

Șobolanii cu rezecție intestinală de 60% și cu rezecție de valvă ileocecală au prezentat cultură din aspiratul duodenal și din materiile fecale pozitive pentru enterococ și klebsiella, 30 de zile postoperator. Rezultatul histopatologic arată o creștere în înălțimea vilozităților, adâncirea criptelor, îngroșarea diametrului intestinal (hiperplazia mucoasei și dilatarea intestinului), enterocite pseudostratificate imature, rare celule caliciforme și infiltrație limfoplasmocitară a mucoasei (Fig. 2).

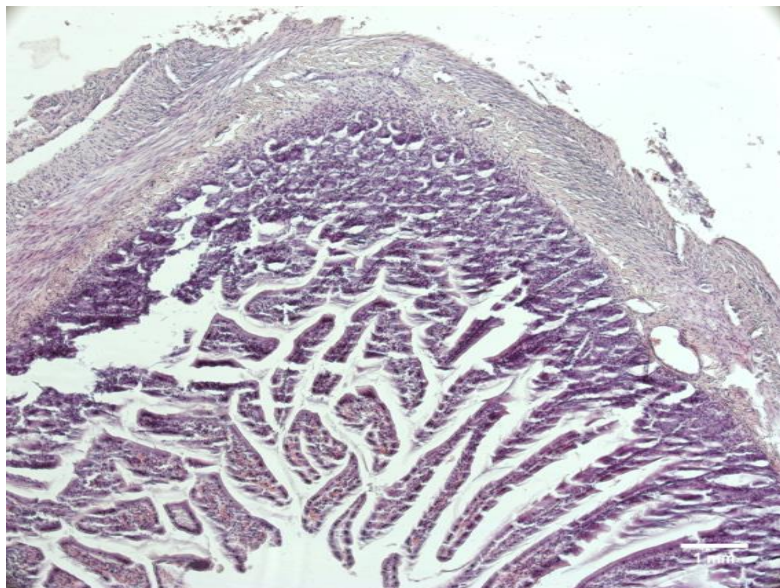


Fig. 2 Creștere în înălțimea vilozităților, adâncirea criptelor, îngroșarea diametrului intestinal (hiperplazia mucoasei și dilatarea intestinului), enterocite pseudostratificate imature, rare celule caliciforme și infiltrație limfoplasmocitară a mucoasei.

Șobolanii cu rezecție intestinală de 70% fără rezecție de valvă ileocecală au prezentat cultura din aspiratul duodenal și din materiile fecale pozitive pentru enterococ, 21 de zile postoperator. Rezultatul histopatologic arată atrofia vilozitară, lipsesc celulele caliciforme și detrusoare (Fig. 3).

[Type here]

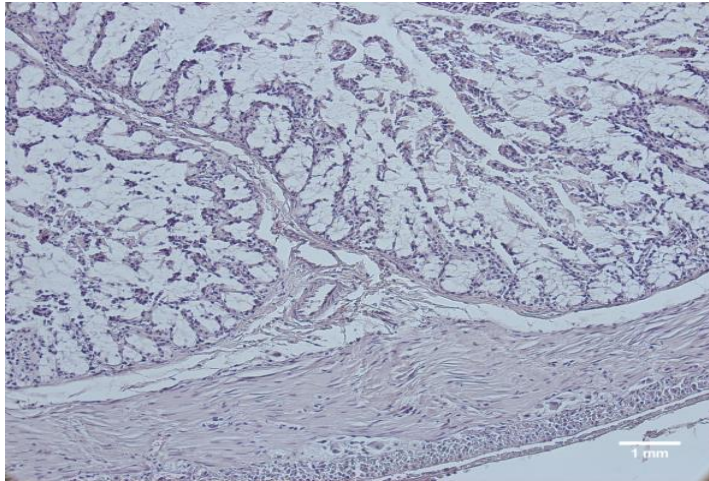


Fig. 3: Atrofia vilozitară, lipsa celulelor caliciforme si detrusoare.

Șobolanii cu rezecție intestinală de 70%, dar și cu rezecție de valvulă ileocecală au prezentat cultură pozitivă din aspiratul duodenal și din materiile fecale pentru enterococ și *E. coli* 21 de zile postoperator. Rezultatul histopatologic arată atrofia vilozitară crescută și niște celule caliciforme la baza vililor intestinali (Fig.4).

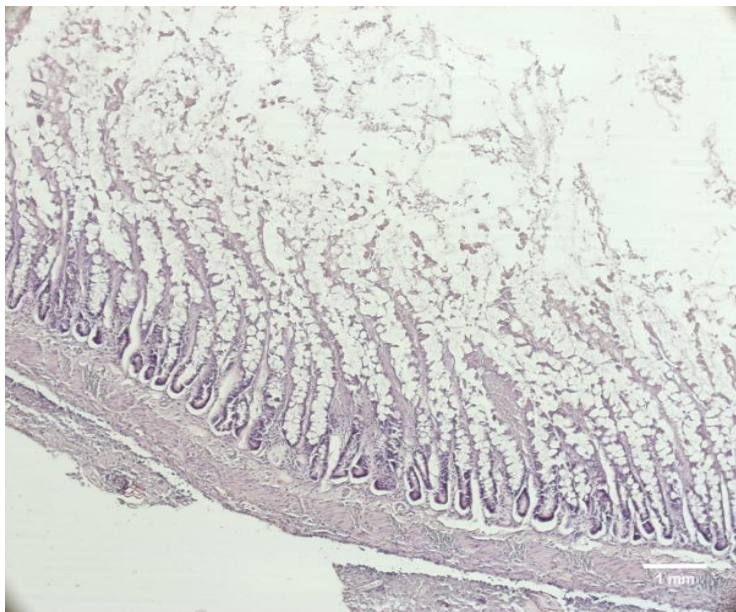


Fig.4: Atrofia vilozitară crescută cu niște celule caliciforme la baza vililor intestinali

Șobolanii cu rezecție intestinală de 75%, dar și cu rezecție de valvulă ileocecală au prezentat cultura din aspiratul duodenal pozitivă pentru enterococ, iar cea din conținutul cecal a fost pozitivă pentru enterococ și *E. coli*, 14 de zile postoperator. Rezultatul histopatologic arată atrofie intestinală și creșterea apoptozei (adică decesul celulelor programate), hiperplazie a mucoasei cu enterocite imature, lipsa celulelor caliciforme în zone de descuamarea epitelială amestecate cu hiperplazia a mucoasei și infiltrate leucocitare. Hipertrofie glandelor intestinale cu celule destrusoare asociată cu niște celule caliciforme

[Type here]

rotunde hipertrofiate, câteva arii de infiltrație leucocitară asociată cu numeroase celule detrusoare la lamina propria (Fig.5a și 5b).

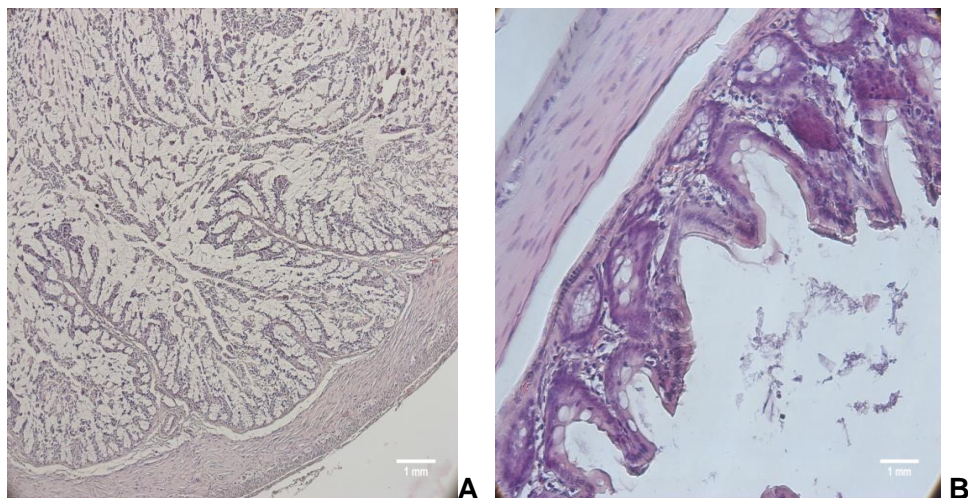


Fig 5: Atrofia intestinală și creșterea apoptozei, hiperplazia mucoasei cu enterocite imature, lipsa celulelor caliciforme; câteva zone de descuamarea a celulelor epiteliale amestecate cu hiperplazia mucoasei și infiltrații leucocitare. Hipertrofia glandelor intestinale cu celule destrusoare asociată cu niște celule caliciforme rotunde hipertrofiate, Niște arii de infiltrație leucocitară asociată cu numeroase celule detrusoare la lamina propria.

La șobolanii fără intervenției chirurgicale, dar cu tratament cu antagoniști a receptorilor de histamină H2/inhibitori de pompă de protoni și cu tratament zilnic de antibiotic/probiotic: culturile din aspiratul duodenal au fost pozitive pentru enterococ, iar cele din materiile fecale au fost negative pentru enterococ, E. col și salmonella. Rezultatul histopatologic la aceasta categorie de șobolani ne arata infiltrate inflamatorii limfoplasmocitare ale mucoasei cu număr redus de celule caliciforme și cu numeroase proliferări de enterocite (Fig. 6).

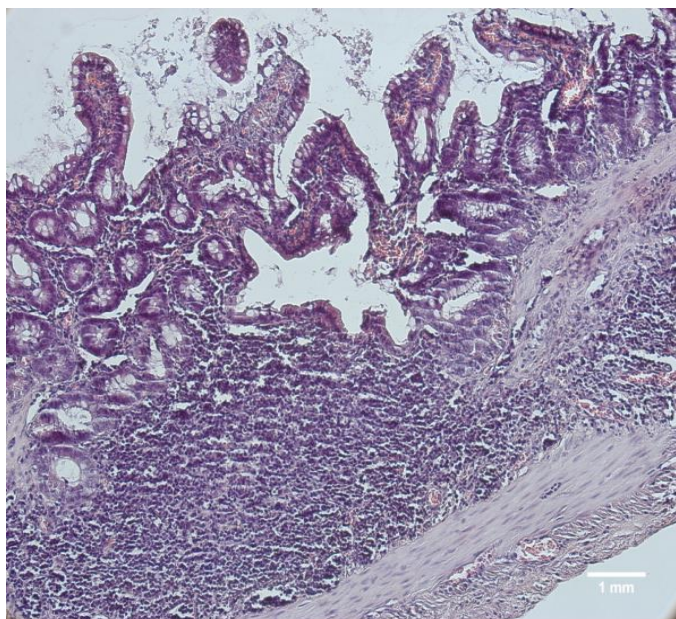


Fig. 6: Infiltrate inflamatorii limfoplasmocitare ale mucoasei cu număr redus de celule caliciforme și cu numeroase proliferări ale enterocitelor.

Rezultatul histopatologic al șobolanilor tratați cu antibiotic/probiotic arată infiltrate inflamatorii moderate ale mucoasei și hipertrofie vilozitară, dilatație glandulară și atrofie a enterocitelor (*Fig. 7*).



Fig 7: Infiltrare inflamatorie moderată a mucoasei și hipertrofie vilozitară, dilatație glandulară și atrofie a enterocitelor.

Șobolanii de studiu de caz: Cultura din aspiratele duodenale au fost negative pentru bacterii, iar rezultatul histopatologic ne arată vilozități intestinale fără atrofie și fără hipertrofie a enterocitelor (*Fig. 8*).

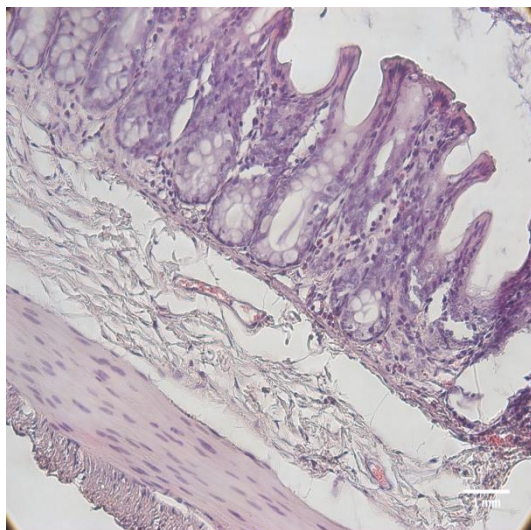


Fig. 8: Vilozități intestinale fără atrofii și fără hipertrofie a enterocitelor

Culturile bacteriologice (lichid duodenal, conținut cecal, noduli limfatici mezenterici, splină și ficat), examenul histopatologic și testele de laborator arată în mod clar o formă mai ușoară de suprapopulare bacteriană în sindromul de intestin scurt și de translocare bacteriană la șobolanii cu o rezecție mai mică de intestin comparativ cu cei care suferă o rezecție extensivă. Cu cât e mai mică porțiunea de intestin restant, cu atât sunt mai mici șansele de supraviețuire a subiectului. Concentrația bacteriană în probele analizate a fost mai mare la șobolanii la care s-a făcut rezecția valvei ileo-

cecale. Prezența sau absența valvei ileocecale a ajutat la determinare adaptării subiectului. Procentul rezecției intestinale a influențat gradul de suprapopulare bacteriană și consecutiv al translocării bacteriene. Motivul nu a fost studiat mai departe, dar modelul este susținut de rezultatele altor experimente. Cu cât este mai mică lungimea de intestin rezecată, cu atât sunt mai mici șansele de translocare bacteriană la organe îndepărtate. Șobolani care au primit doar tratament cu probiotic/antibiotic au avut forme mai ușoare de suprapopulare bacteriană, fără translocare bacteriană comparativ cu șobolani care au primit doar tratament cu inhibitori de pompă de protoni/antagoniști de histamină 2 pentru că inhibiția cronică a secreției acide gastrice crește numărul bacteriilor gastrice. În cazul rezecției intestinale extensive la oameni trebuie luate măsuri extreme pentru a prezerva cât mai mult intestin sănătos posibil pentru că fiecare unitate păstrată este esențială supraviețuirii. Corelația statistică între procentul de enterococ din aspiratul duodenal și bacteriile conținutului cecal a fost $R=0,81$. Însă, corelația între enterococul din aspiratul duodenal și bacteriile conținutului cecal la șobolani fără rezecția valvei ileocecale comparativ cu șobolani cu rezecția valvei ileo-cecale a fost $R=0,57$. Toate acestea au fost semnificative statistic (corelațiile au fost analizate cu testul de corelație Pearson).

Concluzii

1. Noi am demonstrat că lungimea intestinului restant după rezecție extensivă la șobolani a influențat evoluția post-operatorie a subiecților cu sindrom de intestin scurt.
2. Noi am dovedit că rezecția extensivă de intestin la șobolani a declanșat un lanț de reacții ce au condus la suprapopulare bacteriană, transformări morfologice anormale a mucoasei intestinale, schimbări funcționale și translocare bacteriană în organe la distanță.
3. Noi nu am găsit diseminare sistemică a bacteriilor după rezecție importantă de intestin sau endotoxine translocate din intestin (cu număr mare de bacterii gram negative) în sânge fără o hemocultură pozitivă.
4. După rezecții intestinale extensive translocarea bacteriană în nodulii limfatici mezenterici a fost evidențiată la 100% din șobolani studiați, dar translocare bacteriană în organe la distanță (splină, ficat) nu a avut loc la șobolani cu rezecție de intestin mai mică și cu valvulă ileo-cecală păstrată.
5. Bazat pe rezultatele acestei teze este dificil de concluzionat cât de vitale sunt implicațiile translocării bacteriene pentru sănătatea individului. Poate fi văzut ca o condiție patologică fără alte efecte secundare serioase la un subiect altfel sănătos și imunocompetent. Dar, acesta este o situație rară la un organism cu translocare bacteriană, de cele mai multe ori aceasta fiind o consecință a unei patologii coexistente cum ar fi sindromul de intestin scurt.
6. Absența valvei ileo-cecale, tratamentul cu blocanți ai secreției acide gastrice și medicație de decontaminare au fost semnificativ asociate cu suprapopulare bacteriană în sindromul de intestin scurt și consecutiv cu translocarea bacteriană.
7. S-a evidențiat o relație semnificativă între pozitivarea culturilor din aspiratul duodenal și cele din conținutul cecal și riscul asociat de translocare bacteriană în organele la distanță.
8. Patologia hepatică asociată a fost marcată în studiul nostru de prezența

colestazei progresive, inflamației portale și lobulare, hiperplaziei macrofagelor, proliferării și fibrozării ductelor biliare. Numărul excesiv de bacterii în lumenul intestinal a cauzat deconjugarea sărurilor de acizi biliari care a condus la steatoree, progresia graduală a acestei situații către insuficiență hepatică a garantat eutanasia animalelor.

9. Malnutriția ca urmare a rezecției extensive de intestin a constituit un alt factor de agravare care scăzând aciditatea gastrică și funcția imună a organismului, expunând gazda la suprapopulare bacteriană.
10. Bariera mucoasei intestinale și microorganismele intestinale sunt într-o continuă luptă intrinsecă ce predispune subiectul la translocare bacteriană.
11. Strategiile pentru creșterea adaptării din studiul de față rămân eluzive în ciuda abundenței datelor experimentale.
12. Acest studiu permite o mai bună predicție a evoluției și progresiei sindromului de intestin scurt, lucru care ar putea ajuta la o mai bună direcționare a managementului provocărilor ce apar.