



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **52994** (13) **U**  
(51) МПК (2009)  
G01N 33/50МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ**ОПИС**  
**ДО ПАТЕНТУ**  
**НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**видається під  
відповідальність  
власника  
патенту**(54) СПОСІБ ОЦІНКИ СТАНУ МІКРОБІОЦЕНОЗУ КИШЕЧНИКА У ДІТЕЙ З ГОСТРОЮ ЛІМФОБЛАСТНОЮ ЛЕЙКЕМІЄЮ, ЯКІ ПЕРЕБУВАЮТЬ У РАННІХ ТЕРМІНАХ ДОВГОТРИВАЛОЇ РЕМІСІЇ**

1

2

(21) u201000968

(22) 01.02.2010

(24) 27.09.2010

(46) 27.09.2010, Бюл. № 18, 2010 р.

(72) ДУБЕЙ ЛЕОНІД ЯРОСЛАВОВИЧ, СЕМЕНЮК ОЛЕКСАНДР ОЛЕКСАНДРОВИЧ, ДУБЕЙ НАТАЛІЯ ВАСИЛІВНА, ДОРОШ ОЛЬГА ІГОРІВНА

(73) ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ПАТОЛОГІЇ КРОВІ ТА ТРАНСФУЗІЙНОЇ МЕДИЦИНИ АМН УКРАЇНИ", ДУБЕЙ ЛЕОНІД ЯРОСЛАВОВИЧ, СЕМЕНЮК ОЛЕКСАНДР ОЛЕКСАНДРОВИЧ, ДУБЕЙ НАТАЛІЯ ВАСИЛІВНА, ДОРОШ ОЛЬГА ІГОРІВНА

(57) Спосіб оцінки стану мікробіоценозу кишечника у дітей з гострою лімфобластною лейкемією, що перебувають у ранніх термінах довготривалої ремісії, який **відрізняється** тим, що для підвищення точності діагностики початкових порушень балансу мікрофлори кишечника та індивідуалізації лікувальної тактики як найбільш інформативні додаткові мікробіологічні показники визначають спеціальні індекси: коефіцієнт відношення біфідобактерій до кишкової палички, коефіцієнт відношення лактобактерій до кишкової палички та коефіцієнт збалансованості мікрофлори.

Корисна модель належить до медицини, а саме до дитячої гематології, і може бути використана для оцінки стану мікробіоценозу кишечника у дітей з гострою лімфобластною лейкемією, які перебувають у ранніх термінах довготривалої ремісії.

Гостра лімфобластна лейкемія (ГЛЛ) займає провідне місце у структурі онкологічних захворювань дитячого віку [1, 4]. Ще 30 років тому це захворювання закінчувалося летально більш, ніж у 90% хворих. Впровадження тривалої, мультимодальної хіміотерапії з урахуванням індивідуального ризику виникнення рецидиву захворювання дозволило досягти 5-річного безподійного виживання у 50-75% хворих дітей [2-20]. Відомо, що показники виживання дітей з ГЛЛ неодмінно залежать від підвищення рівня профілактики, діагностики та лікування різних ускладнень інтенсивної хіміотерапії, як під час її проведення, так і на етапі довготривалої ремісії, що є безпосереднім доповненням до загального комплексу медичних та психосоціальних заходів, скерованих на покращання якості їх життя [9].

Однією із систем, яка безпосередньо бере участь у балансуванні гомеостазу у дітей з ГЛЛ, є травний канал, який майже у 100% уражається під час проведення програмної хіміотерапії, що суттєво впливає на рівновагу природного мікробіоценозу. Стійкі зміни мікрофлори кишечника у дітей з ГЛЛ тісно пов'язані зі змінами загального та місцевого імунітету, які обумовлені як самим захворю-

ванням, так і специфічним лікуванням, що застосовується для подолання хвороби. Саме ці умови сприяють розвитку інфекційних ускладнень та летальності у дітей з ГЛЛ на етапі інтенсивної фази лікування [3, 19]. Тривалі порушення мікробного пейзажу товстого кишечника та розвиток дисбіозів у дітей з ГЛЛ призводять до структурних змін його оболонки та її всмоктувальної спроможності. Слід зазначити, що після завершення програмного лікування, а також на етапі довготривалої ремісії відбуваються регенераторні процеси, які визначають адаптаційні можливості дитячого організму до «нових» умов життя. Відновлення нормальної мікрофлори кишечника є невід'ємною частиною загально-регенераторних процесів, порушення яких може сприяти розвитку різних ускладнень місцевого та системного характеру [1, 5, 7].

У літературних джерелах описується гастроінтестинальний синдром, який виникає під час цитостатичної терапії ГЛЛ у дітей. Зміни в ультраструктурі кишечника хворих вказують на розвиток мальабсорбції, ступінь якої залежить від кумулятивної дози медикаменту [4, 5]. Окремі дослідники стверджують, що інтестинальні ушкодження виникають внаслідок патологічне дієвої гепатоінтестинальної циркуляції цитостатика, що сприяє інтра-ламінальному підвищенню його концентрації і вважають, що саме за таких умов виникають субклінічні та клінічні прояви інтестинальної токсичності [6, 7, 11].

(19) **UA** (11) **52994** (13) **U**

Численні наукові дослідження демонструють вплив екзогенних факторів (цитостатичні засоби, антибактерійні засоби, характер харчування тощо) на формування мікробних асоціацій у дітей з ГЛЛ. Вони здатні змінювати взаємозв'язки між слизовою оболонкою травного каналу з мікроорганізмами [15], антагоністичні та симбіотичні взаємозв'язки між мікроорганізмами [14], впливати на різноманітні компоненти секретів, що виділяються у шлунково-кишковий тракт [3, 16, 12].

Порушення балансу мікрофлори кишечника у дітей з ГЛЛ продовжуються й на етапі повного їх одужання. Відновлення його функції відбувається неоднозначно, що визначає адаптаційні можливості дитячого організму.

Завдання корисної моделі полягає в опрацюванні такого способу оцінки стану мікробіоценозу кишечника у дітей з ГЛЛ, які перебувають на етапі п'ятирічної ремісії, який би забезпечив використання найбільш інформативних мікробіологічних параметрів для оцінки прогресування дисбіотичних порушень при яких вирішальне значення має контамінація та поява домінування умовнопатогенної флори.

В основу запропонованого нами способу оцінки стану мікробіоценозу кишечника у дітей з ГЛЛ покладено власний п'ятирічний досвід дослідження мікробіологічних показників на підставі вивчення не лише видового і кількісного складу мікрофлори кишечника, але й визначення спеціальних коефіцієнтів, зокрема, відношення біфідобактерій до кишкової палички, відношення лактобактерій до кишкової палички та коефіцієнта збалансованості мікрофлори.

За отриманими даними, у дітей досліджуваної групи, незалежно від їх віку, при мікробіологічному дослідженні встановлено, що у кишковому мікробіоценозі домінували біфідобактерії, бактероїди, звичайна кишкова паличка та пептокок. Коефіцієнт домінування для ентерокока був високим лише у дітей з ГЛЛ віком до п'яти років. Найнижчий вміст біфідобактерій спостерігався у дітей основної групи віком 11-14 років. Заслуговує на увагу той факт, що у дітей з ГЛЛ, які перебувають у ранньому терміні довготривалої ремісії, зафіксовано зменшення кількості життєздатних лактобактерій та еубактерій у дітей віком 6-10 років та у підлітків. Нами також виявлено низький вміст стафілокока у порожнині товстого кишечника. Особливо низький вміст цього мікроорганізму спостерігався у дітей з ГЛЛ віком 1-5 років та підлітків віком 11-14 років.

Не менш важливим є й те, що у дітей різного віку основної групи на даному етапі дослідження кишечник заселявся ентеробактеріями.

Нами виявлено, що на даному етапі мікробіологічного дослідження в мікроекології порожнини товстої кишки у 87,9% дітей з ГЛЛ незалежно від їх віку спостерігається контамінація та розмноження до високих цифр патогенної кишкової палички, яка продукує гемотоксин, а також ентерогенних та ентеротоксигенних серотипів ешерихій, здатних продукувати термостабільні та термолабільні ентеротокси.

У дітей з ГЛЛ у терміні ремісії до п'яти років кількість цитробактера, клостридій та грибів роду

*Candida*, які приживаються у кишечнику істотно не відрізняється у різних вікових категоріях. Зазначимо, що найбільшою кількістю клостридій була у дітей віком 6-10 років та 11-14-річних підлітків, а цитробактера - у дітей віком 1-5 років та віком 6-10 років.

За результатами оцінки показників мікрофлори кишечника у дітей з ГЛЛ на етапі довготривалої ремісії до п'яти років виділені такі стани. Еубіоз встановлено у 18% дітей віком до п'яти років основної групи. У дітей віком 6-10 років та підлітків віком 11-14 років стан еубіозу спостерігався з частотою 10% та 13% відповідно. Дисбіоз I ступеня виявлено в усіх вікових категоріях дітей основної групи з майже однаковою частотою. А саме: у дітей віком до 5 років - 24,7%, у дітей віком 6-10 років - 25,3% та у 11-14-річних підлітків - 21%. Особливо показовою була динаміка показників відсотку дисбіозу II ступеня у дітей основної групи. Вона полягала у їх зростанні відповідно до віку. Отже, у дітей віком 1-5 років дисбіоз II ступеня виявлено у 22% випадків, у дітей віком 6-10 років - у 29% випадків та у дітей найстаршої вікової категорії - у 31% випадків. Щодо дисбіозу III ступеня, то спостерігається інверсійність його частоти відповідно до віку дітей основної групи порівняно з динамікою частоти випадків дисбіозу II ступеня. Так, у дітей наймолодшої вікової категорії частота випадків дисбіозу III ступеня становила 31%, у дітей віком від 6 до 10 років - 28%, у підлітків віком 11-14 років - 24%. Глибокі порушення мікрофлори кишечника у дітей з ГЛЛ на етапі довготривалої ремісії до п'яти років траплялись у невеликій кількості хворих, їх частота зростала з віком. Зокрема, дисбіоз IV ступеня зустрічався у 6% дітей віком до 5 років, у 9% дітей віком 6-10 років, та у 15% дітей підліткового віку.

Враховуючи труднощі у практичній оцінці стану кишкового мікробіоценозу, ми використали спрощену оцінку за допомогою спеціальних індексів. Аналіз мікробіоценозу кишечника у дітей основної групи усіх вікових категорій показав, що діагностичними чинниками для визначення ступеня дисбіозу на початкових стадіях порушень мікробіоценозу є кількість біфідобактерій, лактобактерій та кишкової палички. І тільки при подальшому прогресуванні дисбіотичних порушень вирішальне значення має контамінація та поява домінування умовнопатогенної флори.

Таким чином, для встановлення ступеня дисбіозу ми використали три коефіцієнти. Для їх визначення вираховували співвідношення кількості біфідобактерій, лактобактерій до кількості кишкової палички. За коефіцієнт збалансованості мікрофлори (КЗМ) було взято співвідношення суми біфідобактерій та лактобактерій до кишкової палички. Визначали також коефіцієнти відношення кількості біфідобактерій та лактобактерій до кількості кишкової палички окремо. Використання цих коефіцієнтів дало можливість співставити в трьох вікових групах дітей з ГЛЛ не тільки кількісні показники окремих представників мікробіоценозу, але й виражені у вигляді коефіцієнтів їх взаємозв'язки.

За отриманими даними, коефіцієнт збалансованості мікрофлори у дітей основної групи був

зниженим. Найнижчий КЗМ спостерігався у підлітків віком 11-14 років основної групи. Коефіцієнти відношення кількості окремих представників молочнокислої флори, а саме біфідобактерій та лактобактерій до кількості кишкової палички, з урахуванням віку дітей суттєво не відрізнялись. Проведений аналіз показника КЗМ у дітей з ГЛЛ різного віку, які перебувають у довготривалій ремісії до п'яти років і в яких виявлено різний ступінь дисбіотичних змін порожнини кишечника, свідчить, що з поглибленням дисбіозу, КЗМ вірогідно зменшується, що дає можливість використовувати його для скринінгової оцінки ступеня дисбіозу.

Таким чином, у дітей з ГЛЛ, які перебувають на ранніх термінах довготривалої ремісії, при мікробіологічному дослідженні виявлено зміни мікроекології порожнини товстої кишки, які не залежать від їх віку. Це проявляється передусім в елімінації або дефіциті біфідобактерій, лактобактерій, еубактерій та грампозитивних спороутворюючих стрептобацил. В той же час відбувається заселення та розмноження таких мікроорганізмів, як протей, грибів роду *Candida*, цитробактеру, ентеробактеру та патогенної кишкової палички. Порушення видового і кількісного складу мікрофлори суттєво впливає на зменшення коефіцієнту збалансованості мікрофлори кишечника і, як наслідок, формування дисбіозу різного ступеня важкості.

Отже, особливості динаміки змін мікрофлори кишечника у дітей з ГЛЛ, які перебувають у ранніх термінах довготривалої ремісії, дозволяють виділити спеціальні коефіцієнти як найбільш інформативні, що характеризують залучення у патологічний процес біфідобактерій, лактобактерій та кишкової палички.

Джерела інформації:

1. Владимирская Е.Б., Казначеев К.С. Позднее миелосупрессивное воздействие программной химиотерапии при остром лимфобластном лейкозе у детей. Гематол. и трансфуз. 2000; 1: 23-26.
2. Кисляк Н.С., Байдун Л.В., Ленская Р.В. Ретроспективный анализ инициальных клинико-гематологических данных, течения и исходов острого лимфобластного лейкоза у детей с безрецидивным течением болезни свыше 5 лет. Гематол. и трансф. 1987; 2: 8-14.
3. Dzhevadov S.S., Suleimanova T.Kh. Colonization of intestinal tract of leukaemia patients with *Candida* and development of systemic candidemia. Georgian Med. News. 2009; 170:61-63.
4. Hakim F.T., Cepeda R., Kaimei S. et al. Constraints on CD4 recovery post chemotherapy in adults. Blood. 1998; 2: 3789-3798.
5. Heithger A., Greinix H., Mannhatter C. et al. Requirement of residual thymus to restore normal T-cell subsets after human allogeneic bone marrow transplantation. Blood. 2000; 9: 2366-2377.

6. Hempel G., Flege S., Wurthwein G. Peak plasma concentrations of doxorubicin in children with acute lymphoblastic leukemia or non-Hodgkin lymphoma. Cancer Chemother Pharmacol. 2002; 2: 133-141.

7. Koh A.Y., Kohler J.R., Coggs K.T. et al. Mucosal damage and neutropenia are required for *Candida albicans* dissemination. PLoS Pathog. 2008; 8; 4: e35.

8. Lake D., Hynnh W., Hersh E. Natural and induced human antibody response to cancer. Cancer invest. 2001; 18: 480-489.

9. Li T.S., Tubtana R., Katlama C. et al. Long-lasting recovery in CD4 T-cell function and viral-load reduction after highly active antiretroviral therapy in advanced HIV-1 disease. Lancet. 1998; 5: 1682-1686.

10. Mirelis B., Cool P., Lopez P. Metodos de aislamiento tecnicas de identificacion convencionales de las enterobacterias. Laboratorio. 1996; 82: 233-245. 11. Pamer E.G. Immune responses to commensal and environmental microbes. Nat. Immunol. 2007; 11: 1173-1178. 12. Rockman S., Demmler K., Roczo N. et al. Expression of interleukin-6, leukemia inhibitory factor and their receptors by colonic epithelium and pericryptal fibroblasts. J. Gastroenterol Hepatol. 2001; 9: 991-1000. 13. Savage D.C. Overview of the association of microbes with epithelial surfaces.

Microbiol. Therapy. 1994; 14: 69-182. 14. Smith G.M., Chesner L.M., Leyland M.J. Small intestinal bacterial overgrowth in patients with chronic lymphocytic leukaemia. J. Clin Pathol. 1990; 1: 57-59. 15. Stringer A.M., Gibson R.J., Bowen J.M. et al. Irinotecan-induced mucositis manifesting as diarrhoea corresponds with an amended intestinal flora and mucin profile. Int. J. Exp. Pathol. 2009; 5: 489-499.

16. Stringer A.M., Gibson R.J., Logan R.M. et al. Gastrointestinal microflora and mucins may play a critical role in the development of 5-Fluorouracil-induced gastrointestinal mucositis. Exp. Biol. Med. 2009; 4: 430-441.

17. Sutter V.Z., Citron D.M., Edelstein A. Wardsworth anaerobic bacteriology manual: 4th edition. Starr Publ Co. Belmont. 1996; el 54.

18. Van Cool S. W., Van den Hove L., Ceuppens J. Activation of the immune system in cancer patients. Med. Pediatr. Oncol. 2000; 4: 1-9.

19. van Vliet M., Tissing W., Rings E. et al. Citrulline as a marker for chemotherapy induced mucosal barrier injury in pediatric patients. Pediatr. Blood Cancer. 2009; 7: 1188-1194.

20. Yang W., Liu H., Duan J. et al. Effects of high-dose methotrexate therapy on intestinal bacterial flora in children with acute lymphoblastic leukemia. Zhonghua Er Ke Za Zhi. 2008; 4: 252-256.