



УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **71988**

(13) **U**

(51) МПК

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/48 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2011 10723**

(22) Дата подання заявки: **06.09.2011**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **10.08.2012**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **10.08.2012, Бюл.№ 15**

(72) Винахідник(и):

**Дубей Леонід Ярославович (UA),
Семенюк Олександр Олександрович
(UA),**

**Дубей Наталія Василівна (UA),
Дорош Ольга Ігорівна (UA)**

(73) Власник(и):

**ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ
ПАТОЛОГІЇ КРОВІ ТА ТРАНСFUЗІЙНОЇ
МЕДИЦИНИ НАМН УКРАЇНИ",**

вул. Генерала Чупринки, 45, м. Львів, 79044
(UA),

**Дубей Леонід Ярославович,
вул. Котляревського, 43, 1-а, м. Львів, 79013
(UA),**

**Семенюк Олександр Олександрович,
вул. Лисенка, 2, 14, м. Львів, 79008 (UA),**

**Дубей Наталія Василівна,
вул. Котляревського, 43, 1-а, м. Львів, 79013
(UA),**

**Дорош Ольга Ігорівна,
вул. Зерова, 22, 3, м. Львів, 79015 (UA)**

(54) СПОСІБ ОЦІНКИ СТАНУ МІКРОБІОЦЕНОЗУ КИШЕЧНИКА У ДІТЕЙ З ГОСТРОЮ ЛІМФОБЛАСТНОЮ ЛЕЙКЕМІЄЮ, ЯКІ ПЕРЕБУВАЮТЬ У ПІЗНІХ ТЕРМІНАХ ДОВГОТРИВАЛОЇ РЕМІСІЇ

(57) Реферат:

Спосіб оцінки стану мікробіоценозу кишечника у дітей з гострою лімфобластною лейкемією, що перебувають у пізніх термінах довготривалої ремісії, включає визначення як найбільш інформативних додаткових мікробіологічних показників спеціальних індексів (коефіцієнта відношення біфідобактерій до кишкової палички, коефіцієнта відношення лактобактерій до кишкової палички та коефіцієнта збалансованості мікрофлори).

UA 71988 U

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

Гостра лімфобластна лейкоемія (ГЛЛ) найчастіше спостерігається серед онкологічних захворювань дитячого віку [1, 4, 6]. Летальність при цих захворюваннях 20 років тому становила 90 %. Завдяки сучасній мультимодальній хіміотерапії з врахуванням індивідуального ризику рецидиву досягнуто п'ятирічне безподійне виживання у 70-75 % хворих дітей [2, 3]. Проте, інтенсивна хіміотерапія супроводжується розвитком різних ускладнень. Заходи щодо їх профілактики, покращення діагностики і лікування суттєво сприяють підвищенню показників виживання дітей з ГЛЛ як під час протокольного лікування, так і на етапі довготривалої ремісії [4].

Травний канал як одна із систем активного балансування гомеостазу на фоні програмної хіміотерапії уражується у всіх дітей з ГЛЛ, з порушенням рівноваги природного мікробіоценозу. Зміни загального та місцевого імунітету внаслідок захворювання і специфічного лікування тісно пов'язані зі стійкими змінами мікрофлори кишечника. Це створює сприятливі умови для розвитку інфекційних ускладнень як однієї з причин летальності серед дітей з даним гемобластозом [5, 15]. Структурні зміни слизової оболонки товстого кишечника, що спричиняють порушення всмоктування та його моторики, спостерігаються й на етапі довготривалої ремісії. Регенерація слизової оболонки товстої кишки на фоні загально-регенеративних процесів починається після повного завершення програмної терапії. Це визначає ступінь адаптації дитини до якісно "нових" умов життя. Необхідно відзначити, що порушення відновлення нормальної мікрофлори кишечника сприяє виникненню місцевих і системних захворювань [1,7, 14].

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 медикамента [3, 4, 7]. Окремі дослідники стверджують, що інтестинальні ушкодження виникають внаслідок патологічно дієвої гепатоінтестинальної циркуляції цитостатика, що сприяє інтраламінальному підвищенню його концентрації і вважають, що саме за таких умов виникають субклінічні та клінічні прояви інтестинальної токсичності [5, 11].

За даними літератури, формування мікробних асоціацій у дітей з ГЛЛ відбувається під впливом низки екзогенних факторів: цитостатиків, антибіотиків, харчування та ін. Це змінює характер мікробіоти кишечника шляхом порушення взаємозв'язків мікроорганізмів і слизової оболонки травного каналу [10, 17, 18]. Внаслідок цього порушуються симбіотичні й антагоністичні взаємозв'язки між мікроорганізмами [14], що впливає на секреторну функцію травного каналу [3, 12, 15].

За нашими даними, на етапі довготривалої ремісії понад п'ять років у дітей, хворих на ГЛЛ, зміни кількісного і видового складу мікрофлори кишечника сприяють формуванню дисбіозу різного ступеня важкості на фоні порушення регенерації окремих ланок імунної системи. Кореляційні взаємозв'язки між показниками мікрофлори та опірності дитячого організму відображають складність і багатоетапність біологічних процесів у дітей з ГЛЛ.

Задача корисної моделі полягає в опрацюванні такого способу оцінки стану мікробіоценозу кишечника у дітей з ГЛЛ, які перебувають на етапі довготривалої ремісії більше п'яти років, 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 поставлено 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 найнижчі показники лактобактерій і біфідобактерій спостерігались у підлітків 11-14 років основної групи. Кількість бактероїдів у дітей віком від п'яти до десяти років була достовірно нижчою, ніж у дітей контрольної групи, хоча коефіцієнт домінування та частота цього мікроорганізму суттєво не відрізнялись від здорових дітей. Вміст еубактерій виявився найнижчим у підлітків. Кількість вейлонел у дітей основної групи з віком поступово зменшувалася, істотно відрізняючись від референтних величин. Вміст пептококів у порожнині товстої кишки у дітей основної групи з віком знижувався, найнижче його значення, зафіксоване у підлітків, суттєво відрізнялось від такого у дітей контрольної групи.

Частота виявлення пептострептококу у дітей основної групи була нижчою порівняно з такою у дітей контрольної групи. При цьому вміст даного мікроорганізму у порожнині товстої кишки був високий, істотно не відрізнявся від референтних величин.

Вміст клостридій у дітей основної групи достовірно перевищував нормальні величини. Його максимальне значення виявлено у дітей віком п'ять-десять років.

У дітей основної групи віком до десяти років на даному етапі мікробіологічного дослідження відбувалась контамінація кишечника патогенною кишковою паличкою, що продукує гемотоксин, а також умовно патогенними ентеробактеріями, цитробактером та дріжджоподібними грибами роду *Candida*. Вміст останніх виявився найбільшим у дітей підліткового віку, що істотно відрізнялось від цього показника у дітей контрольної групи.

Цікавою виявилась динаміка показників вмісту протею у просвіті товстої кишки дітей основної групи, яка полягала у збільшенні концентрації мікроорганізму з віком. А саме: у дітей від п'яти до десяти та 11-14 років. У дітей контрольної групи вікових особливостей вмісту протею не виявлено.

За результатами оцінки показників мікрофлори кишечника у дітей з ГЛЛ на етапі довготривалої ремісії після п'яти років виділені такі стани. Встановлено етапність змін мікрофлори кишечника у дітей з ГЛЛ у період повного їх одужання. Стан еубіозу діагностовано у 20 % дітей від п'яти до десяти років та у 30 % дітей віком 11-14 років. Дисбіоз I ступеня спостерігався майже з однаковою частотою у дітей усіх вікових груп (34 % та 36 % відповідно). Частота дисбіозу II ступеня з віком зменшувалася: від 15 % у дітей п'яти-десяти років до 13 % у дітей 11-14 років. Найбільшу частоту дисбіозу III ступеня зафіксовано у дітей наймолодшої вікової групи (18 % випадків). Нами встановлено, що у дітей основної групи відбувається зростання частоти дисбіозу IV ступеня. Зокрема, у дітей віком 5-10 років кількість випадків глибокого порушення мікробіоти кишечника збільшувалась втричі і становила 10 %, а у підлітків - у 5 % випадків. 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 умовно-патогенної 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.

Вивчення коефіцієнтів відношення біфідобактерій до кишкової палички і лактобактерій до кишкової палички показало, що у дітей основної групи, незалежно від їх віку, всі показники мало відрізнялися від таких показників у дітей контрольної групи. Коефіцієнт збалансованості мікрофлори (КЗМ) у хворих до десяти років дещо перевищував референтні величини. Низькі показники КЗМ зафіксовано у підлітків віком 11-14 років як основної, так і контрольної груп.

Нами проаналізована динаміка показників КЗМ при різних ступенях дисбіозу у дітей, хворих на ГЛЛ, які перебувають на етапі довготривалої ремісії понад п'ять років. Встановлено, що із поглибленням ступеня порушення мікробіоценозу знижується показник КЗМ у дітей всіх вікових груп. Найнижчі цифри КЗМ зафіксовано при IV ступені дисбіозу, особливо у дітей віком 5-10 років.

Проведений аналіз показника КЗМ у дітей з ГЛЛ різного віку, які перебувають у довготривалій ремісії понад п'ять 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, хворих на ГЛЛ, які перебувають у довготривалій ремісії, виявлено зміни мікроекології порожнини товстої кишки. Це проявляється насамперед, в елімінації або дефіциті біфідобактерій, лактобактерій, еубактерій, грампозитивних спороутворюючих стрептобацил. Водночас збільшується концентрація протею, грибів роду *Candida*, цитробактеру, ентеробактеру та кишкової палички. Крім того, у дітей основної групи на даному етапі дослідження спостерігаються деякі відмінності у показниках мікрофлори кишечника, які залежать від їх віку. Зокрема, концентрація мікроорганізмів у кишечнику змінюється з

тенденцією як до збільшення, так і до зменшення, набуваючи істотного значення щодо дітей контрольної групи. 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 пізніх 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: 23-6.
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. Петрова Н. А., Толкачева Т. В., Клясова Г. А. Изменение микрофлоры толстого кишечника у больных гемобластомами в зависимости от курсов полихимиотерапии. Проблемы гематологии и переливания крови. 2002.-1: 69.
4. Сабирова А. В., Русанова Н. Н., Жуковская Е. В. и др. Оценка качества жизни и показателей здоровья детей с острым лимфобластным лейкозом в стадии длительной клинико-гематологической ремиссии // Детская онкология: мат. III съезда детских онкологов России. - М., 2004.-2: 45.
5. Agirbasli H., Ozcan S., Gedikoglu G. Fecal fungal flora of pediatric healthy volunteers and immunosuppressed patients. Mycopathologia. 2005; 159 (4): 515-20.
6. Blum S., Alvarez S., Haller D. et al. Intestinal microflora and the interaction with immunocompetent cells. Antonie van Leeuwenhoek. 1999; 76: 199-05.
7. Heithger A., Greinix H., Mannhatter C. et al. Requirement of residual thymus to restore normal T-cell subsets after human allogenic bone marrow transplantation. Blood. 2000; 9: 2366-77.
8. Lake D., Hnynh W., Hersh E. Natural and induced human antibody response to cancer. Cancer invest. 2001; 18: 480-89.
9. Mirelis B., Cool P., Lopez P. Metodos de aislamiento tecnicas de identificacion convencionales de las enterobacterias. Laboratorio. 1996; 82: 233-45.
10. Nyhlén A., Ljungberg B., Nilsson-Ehle I. et al. Impact of combinations of antineoplastic drugs on intestinal microflora in 9 patients with leukaemia. Scand. J. Infect. Dis. 2002; 34 (1): 17-21.
11. Pamer E. G. Immune responses to commensal and environmental microbes. Nat. Immunol. 2007; 11: 1173-78.
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: 169-82.
14. Smith G. M., Chesner I. M., Leyland M. J. Small intestinal bacterial overgrowth in patients with chronic lymphocytic leukaemia. J. Clin Pathol. 1990; 1: 57-9.
15. 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: 430-41.
16. Sutter V. Z., Citron D. M., Edelstein A. Wardsworth anaerobic bacteriology manual: 4-th edition. Starr Publ Co. Belmont. 1996; 154 p.
17. Wilson M., Seymour R., Henderson B. Bacterial Perturbation of Cytokine Networks. Infect. Immun. 1998; 66: 2401-09.
18. 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: 252-56.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб оцінки стану мікробіоценозу кишечника у дітей з гострою лімфобластною лейкемією, що перебувають у пізніх термінах довготривалої ремісії, який **відрізняється** тим, що для підвищення точності діагностики початкових порушень балансу мікрофлори кишечника та індивідуалізації лікувальної тактики визначають як найбільш інформативні додаткові мікробіологічні показники спеціальні індекси (коефіцієнта відношення біфідобактерій до

кишкової палички, коефіцієнта відношення лактобактерій до кишкової палички та коефіцієнта збалансованості мікрофлори).

Комп'ютерна верстка А. Крижанівський

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601