

ВИДОВОЙ СОСТАВ КИШЕЧНОЙ МИКРОБИОТЫ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У БОЛЬНЫХ ОСТРЫМИ ГЕМОБЛАСТОЗАМИ

Голубева О.В., Хлынова О.В., Маслов Ю.Н.

ГБОУ ВПО Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера Минздрава России, Пермь, Россия, e-mail: rector@psma.ru

Проведен анализ состояния кишечной микробиоты и установлены особенности функционального статуса поджелудочной железы у больных острыми лейкозами (ОЛ) до и после полихимиотерапии (ПХТ). Состав микрофлоры толстой кишки определяли классическим бактериологическим методом. Нарушения в функциональном статусе поджелудочной железы (ПЖ) оценивали по изменению концентрации сывороточных панкреатических ферментов – амилазы, липазы, фекальной эластазы-1. У всех больных до и после ПХТ установлен дисбиоз кишечника преимущественно второй степени. Изменения кишечной микробиоты у данной группы больных связано преимущественно со снижением количества бифидобактерий и типичной кишечной палочки. Снижение уровня сывороточных амилазы и липазы до и после ПХТ зафиксировано в 19 : 33 % ($p=0,06$) и 40 : 60 % случаев ($p=0,04$). Исследование уровня эластазы-1 в кале выявило статистически значимое снижение уровня показателя с 0 % до 15 % случаев ($p=0,002$) у больных после цитостатической терапии. Установлена умеренная обратная коррелятивная зависимость между уровнем эластазы-1 и степенью дисбиоза, а также уровнем эластазы-1 и проявлением диарейного синдрома. Между степенью дисбиоза и частотой диарейного синдрома установлена умеренная прямая коррелятивная связь. Полученные результаты диктуют необходимость мониторинга за состоянием ПЖ и кишечной микрофлоры на разных этапах ведения больных ОЛ и проведения соответствующих профилактических и лечебных мер выявленных нарушений.

Ключевые слова: острый лейкоз, полихимиотерапия, дисфункция поджелудочной железы, дисбиоз кишечника.

SPECIES COMPOSITION OF INTESTINAL MICROBIOTA AND PANCREASDYSFUNCTIONINPATIENTS WITH ACUTE HEMOBLASTOSIS

Golubeva O.V., Khlynova O.V., Maslov Y.N.

Perm State Medical University n.a. E.A. Wagner, Perm, Russia, e-mail: rector@psma.ru

Intestinal microbiota of patients with acute leukemia (AL), both prior to and after polychemotherapy (PCT), has been analyzed and distinctive features of their pancreas functional status changes have been identified. Large intestine's microflora composition was determined by the classical bacterial culture technique. Pancreatic function aberrations were assessed by the change in serum pancreatic enzymes – amylase, lipase and fecal elastase-1. The research has revealed all the patients prior to and after PCT to have intestinal dysbiosis (mostly, second-degree). Intestinal microbiota changes of the given group of patients are primarily related to the reduction in bifidobacteria and *Escherichia coli*. Decline in serum amylase and lipase prior to and after PCT was registered in 19 (33 %, $p=0.06$) and 40 (60%, $p=0.04$) cases respectively. Fecal elastase-1 level analysis has revealed its statistically significant decrease from 0% to 15 % of cases ($p=0.002$) in patients after cytostatic treatment. A moderate inverse relationship has been identified between the elastase-1 level and dysbiosis degree, as well as between the elastase-1 level and diarrhea; the dysbiosis degree and frequency of diarrhea have been shown to have a moderate direct relationship. The findings demonstrate necessity of monitoring over pancreatic status and intestinal microflora at different stages of treatment of patients with AL as well as of implementing required preventative and remedial measures for the aberrations revealed.

Keywords: acute leukemia, polychemotherapy, pancreas disfunction, intestinal dysbiosis.

Сопроводительное лечение, как и специфическая химиотерапия острых лейкозов (ОЛ), являются решающими факторами ближайшего и отдаленного прогнозов заболевания [3]. При этом состояние иммуносупрессии, индуцированной полихимиотерапией (ПХТ), создает угрозу развития инфекционных осложнений, максимальная частота которых приходится на фазу индуцированной гипоплазии кроветворения. Подавляющее большинство инфекций,

встречающихся у данной группы больных, вызваны возбудителями эндогенной флоры, основным резервуаром которых является кишечный биотоп.

Кишечник с его микробиологическим составом не является замкнутой системой, а состояние его микробиоты и ее свойства напрямую или опосредованно являются отражением морфо-функционального состояния других органов желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), в частности, поджелудочной железы (ПЖ) [2, 6]. Также известен и факт, что быстро делящийся эпителий ЖКТ и ПЖ отличается значительной чувствительностью к действию цитостатиков [3].

В современной литературе вопросу острой панкреатотоксичности при цитостатической терапии посвящены отдельные случаи, преимущественно описательного характера [1, 8]. Что касается проблемы функциональных расстройств ПЖ на фоне химиотерапии (ХТ), информация по данному вопросу практически отсутствует [3].

Вместе с тем патогенетическая взаимосвязь между нарушением количественных, а также функциональных свойств кишечной микробиоты, и панкреатической недостаточностью у больных ОЛ очевидна [7]. Сама микрофлора принимает участие в процессе пищеварения, в метаболизме азот- и углеродсодержащих соединений, обмене и разложении до конечных продуктов белков и липидов, жирных кислот [2]. В свою очередь, нарушение процессов пищеварения в результате первичной или вторичной недостаточности ПЖ является важнейшим предрасполагающим фактором развития кишечного дисбиоза. В любом случае, вне зависимости от ведущего механизма та или иная степень ферментной недостаточности требует адекватной коррекции [6]. В этой связи изучение состояния кишечной микробиоты и нарушения функции ПЖ у больных ОЛ, подвергающихся активной цитостатической и антибактериальной терапии (АБТ), приобретает особую значимость.

Цель настоящего исследования – изучить клинико-бактериологические аспекты состояния микробиоты толстой кишки и функциональную активность поджелудочной железы у больных острыми гемобластозами на различных этапах их ведения.

Материал и методы

Всего обследовано 42 пациента с острым миелобластным лейкозом (ОМЛ) (средний возраст $46 \pm 2,2$ года) и 10 пациентов с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) (средний возраст $43 \pm 4,9$ года), возрастной диапазон обследуемых – 18–60 лет. Исследование проводилось в два этапа – до и после первого курса индукции ремиссии. Наряду с оценкой объективного статуса ПЖ проведен анализ анамнеза (наличие хронического панкреатита (ХП), сахарного диабета). Все больные получали лечение по стандартным протоколам программного лечения ОЛ (протокол 01.10 при ОМЛ, протокол OLL-2009 при ОЛЛ).

Качественный и количественный состав микрофлоры толстой кишки определяли классическим бактериологическим методом [5].

Нарушения в функциональном статусе ПЖ оценивали по следующим критериям:

- клинические признаки экзокринной недостаточности (диарейный синдром);
- изменение концентрации сывороточных панкреатических ферментов – амилазы и липазы (кинетический метод, биохимический автоматический анализатор «CobasIntegra 400 Plus», реактивы фирмы «Roche», Швейцария);
- определение уровня фекальной эластазы-1 в качестве оценки внешнесекреторной функции (иммуноферментный анализ, тест система фирмы «BioservDiagnostics», Германия);

Для статистического анализа данных использовали программы БИОСТАТ 4.03 и Statistica 6.1 forWindows (StatSoft, USA). Статистическую значимость различий между двумя группами наблюдений оценивали с помощью непараметрического критерия Вилкоксона. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Корреляционный анализ проводили с использованием коэффициента ранговой корреляции Spearman.

Результаты и обсуждение

Клинико-бактериологическая оценка показателей кишечной микробиоты

Проведенные исследования показали, что практически с одинаковой частотой независимо от этапа исследования у всех обследованных больных выявлены дисбиотические изменения различной степени выраженности. Результаты количественного анализа индигенной микрофлоры, как основного компонента кишечной микробиоты, представлены в таблице 1.

Таблица 1

Частота встречаемости изменений количества основных представителей облигатной микрофлоры у больных ОЛ, %

Виды микроорганизмов	Доля больных со сниженным количеством бактерий	
	До ПХТ($n=52$)	После ПХТ($n=52$)
Бифидобактерии	59,6	80,8*
Лактобактерии	67,3	71,2
Эшерихии <i>spp</i>	42,3	61,5

Примечание. * – различия между группами статистически значимы ($p = 0,03$).

Приведенные данные свидетельствуют о том, что у больных острыми гемобластозами зафиксировано значительное снижение уровня бифидобактерий ($p=0,03$) и типичной кишечной палочки ($p=0,05$) в результате проведения ПХТ.

Далее, при идентификации изолированных культур обнаружены качественные изменения некоторых представителей нормофлоры. Так, атипичные эшерихии до ПХТ

выделены у 35 % пациентов с ОЛ, после – в 21 % случаев ($p=0,04$). Статистически значимое уменьшение случаев выделения данного представителя после ПХТ, вероятно, связано с общей тенденцией к снижению количества микрофлоры в результате прямого действия цитостатиков на слизистую ЖКТ, а также проведением сопроводительной АБТ.

Среди выделенных атипичных кишечных палочек до и после лечения доминировали лактозонегативные варианты (27 % : 19 %). Выявление гемолитических форм (8 % : 2 %) является одним из существенных показателей кишечного дисбиоза. В соответствии с нормативными документами они не должны присутствовать в составе нормофлоры [5].

Среди энтерококков – ещё одного представителя облигатных микроорганизмов, преобладали *E. faecalis* и *E. faecium*. Благодаря своим антагонистическим свойствам и ферментативной активности они относятся к индигенной микрофлоре. С другой стороны, выраженные амбивалентные свойства позволяют рассматривать их в качестве возбудителей типичных оппортунистических инфекций.

Выявленные изменения в основном были связаны с уменьшением популяции энтерококков, как до, так и после ПХТ (28,9 % : 21,2 %). Незначительная тенденция к увеличению количества данного представителя отмечается после проведенной терапии (11,5 % : 15,4 %). Установленные различия в группах не являются статистически значимыми, что вполне объясняется высокой устойчивостью энтерококков к АБТ.

Снижение уровня концентрации представителей индигенной микрофлоры, как правило, сопровождается расширением спектра и увеличением количества условно-патогенных бактерий. Родовой состав наиболее часто выделяемых условно-патогенных бактерий и количество случаев увеличения их концентрации представлены в таблице 2.

Таблица 2

Частота превышения содержания факультативной анаэробной, условно-патогенной микрофлоры у больных острыми гемобластозами

Родовой состав	Увеличение концентрации микроорганизмов, %	
	До ПХТ ($n=52$)	После ПХТ ($n=52$)
<i>Clostridium spp.</i>	28,9	9,6*
<i>Klebsiella spp.</i>	13,5	17,3
<i>Enterobacter spp.</i>	5,8	5,8
<i>Morganella spp.</i>	0	3,8
<i>Acinetobacter spp.</i>	3,8	3,8
<i>Pseudomonas spp.</i>	7,7	3,8
<i>Candida spp.</i>	32,7	40,4

Примечание. * – различия между группами статистически значимы ($p = 0,04$).

Родовой состав микроорганизмов, представленный в таблице, свидетельствует о достаточном разнообразии условно-патогенной микрофлоры (УПМ) у больных ОЛ. Причем у пациентов обеих групп преобладали *Klebsiellaspp.* и *Clostridium spp.* Первый из них является наиболее распространенным представителем УПМ, наиболее часто встречающимся при дисбиотических состояниях у больных различного профиля. Обращает на себя внимание относительно высокий процент обнаружения грибов рода *Candida*.

К представителям грамположительной УПМ, колонизирующим кишечный биотоп, относят различные виды стафилококков. Результаты исследования свидетельствуют о том, что среди выделенных видов в повышенной концентрации у пациентов с ОЛ как до, так и после курса ХТ доминирует золотистый стафилококк (17,3 % : 13,5 %). Данный вид является патогенным и не должен присутствовать в составе кишечной микрофлоры [5].

Проведение бактериологического анализа на дисбиоз позволило определить степень тяжести нарушений микробиоты кишечника у больных ОЛ. Распределение больных ОЛ в зависимости от степени тяжести дисбиотических нарушений представлено на рис.1.

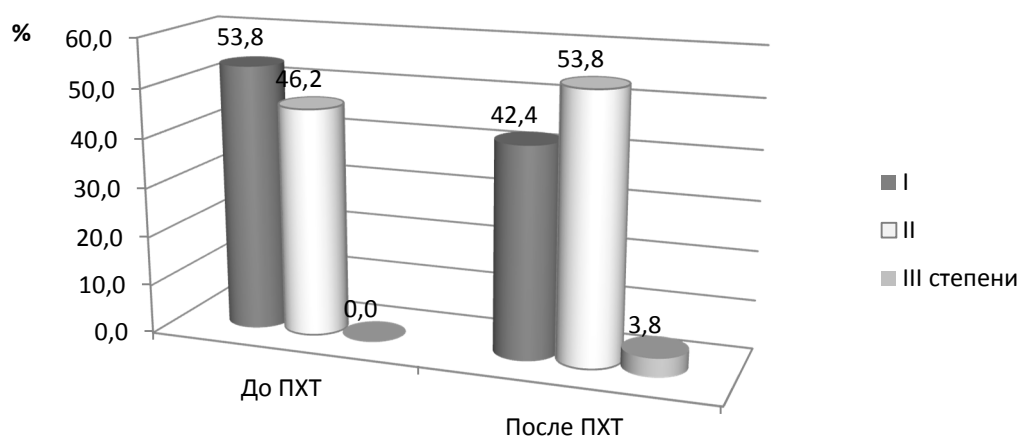


Рис. 1. Степень выраженности кишечного дисбиоза у больных ОЛ до и после лечения, %

В обеих группах преобладали больные с первой и второй степенью дисбиоза с тенденцией к увеличению частоты второй степени после курса ПХТ ($p=0,1$).

Оценка функционального статуса поджелудочной железы

Несмотря на то, что исследование сывороточных ферментов традиционно используется для диагностики обострения ХП, определение их уровня можно использовать и в качестве альтернативных методов оценки внешнесекреторной функции железы [4].

По результатам проведенного исследования снижение уровня амилазы крови отмечено у 19 % (11/52) от общего числа больных до ПХТ и у 33 % (17/52) в период индуцированной гипоплазии кроветворения ($p=0,06$). Аналогичная тенденция констатирована в отношении уровня сывороточной липазы. Снижение концентрации фермента до и после ПХТ

зафиксировано в 40 % (21/52) и 60 % (31/52) случаев ($p=0,04$). Подробный анализ распределения уровней панкреатических ферментов представлен на рис. 2.

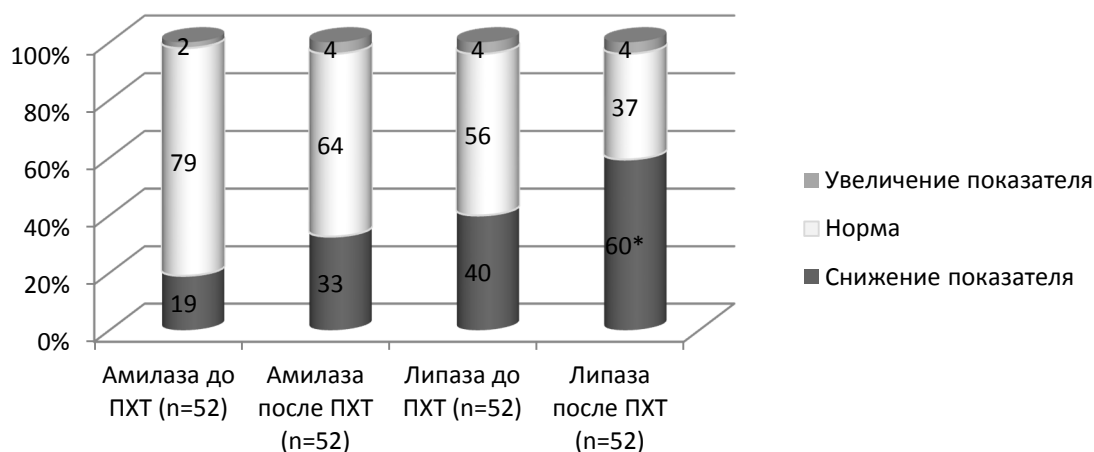


Рис. 2. Распределение уровней сывороточных панкреатических ферментов на разных этапах ведения больных острыми лейкозами, %

Примечание. *Различия между группами статистически значимы ($p<0,05$).

Концентрация эластазы-1 в кале у обследованных больных (медиана и интерквартильный размах) до лечения составил 502,00 (от 408,00 до 533,80 мкг э/г), после лечения 428,00 (от 286,00 до 501,00 мкг э/г). Динамика уровня эластазы-1 представлена в таблице 3.

Таблица 3

Динамика уровня эластазы-1 у больных острыми гемобластозами, %

Этап исследования	Характер изменения уровня эластазы-1		
	Снижение уровня	Превышение уровня	Нормальный уровень
До ПХТ (n=52)	0	7,7	92,3
После ПХТ (n=52)	15,4*	0	84,6

Примечание. * $p=0,002$

Оценка коморбидности дисфункции ПЖ и дисбиотических процессов

В результате исследования установлена умеренная обратная коррелятивная зависимость между уровнем эластазы-1 и степенью дисбиоза после программной ПХТ ($r= -0,26$; $p=0,06$), аналогично между уровнем эластазы-1 и проявлением диарейного синдрома ($r= -0,25$; $p=0,07$). При оценке коррелятивной связи между степенью дисбиоза и частотой проявления диарейного синдрома по группам установлены следующие коэффициенты: $r=0,17$ ($p=0,2$) и $r=0,44$ ($p=0,001$) соответственно.

Выводы

1. Для больных ОЛ на различных этапах ведения характерен тот или иной микробный дисбаланс различной степени выраженности, характеризующийся преимущественно уменьшением количества резидентной микрофлоры.
2. Более выраженное снижение облигатной анаэробной микрофлоры после ПХТ констатировано в отношении бифидобактерий.
3. В отношении индигенной аэробной микрофлоры установлено значительное увеличение частоты снижения уровня типичной *E. coli* после ПХТ (42 % : 62 %, $p=0,05$); в отношении энтерококков аналогичной тенденции не выявлено.
4. В ходе исследования установлен феномен снижения уровня сывороточных панкреатических ферментов (амилазы, липазы), достоверно более выраженный в период индуцированной гипоплазии кроветворения (после ПХТ).
5. Исследование динамики уровня эластазы-1 в кале у больных ОЛ выявил статистически значимое снижение ее уровня после ПХТ.
6. При анализе характера и степени взаимоотношений функционального состояния ПЖ и микрофлоры толстой кишки установлены умеренная обратная коррелятивная зависимость между уровнем эластазы-1 и степенью дисбиоза после ПХТ ($r= - 0,26$; $p=0,06$). Аналогичная зависимость установлена между уровнем эластазы-1 и частотой диарейного синдрома ($r= - 0,25$; $p=0,07$). Между степенью дисбиоза и частотой диарейного синдрома установлена умеренная прямая корреляция показателей у второй группы больных ($r=0,44$; $p=0,001$).
7. Полученные результаты диктуют необходимость мониторинга за состоянием ПЖ и кишечной микрофлоры на разных этапах ведения больных ОЛ и проведения соответствующих профилактических и лечебно-терапевтических мер при выявлении нарушений.

Список литературы

1. Гриднев А.Е., Богун Л.В. Лекарственный панкреатит // Ліки України, proGASTRO. – 2011. – № 7. – С. 56-60.
2. Звягинцева Т.Д., Сергиенко Е.И. Дисбактериоз кишечника: клиническое значение и перспективы лечения // Эксперим. клин. гастроэнтерол. – 2003. – № 3. – С. 70-74.
3. Казюлин А.Н., Бяхов М.Ю., Королева И.А., Козлов С.В., Кучерявый Ю.А. Ранняя и поздняя панкреатоксичность при неoadьювантной и адьювантной химиотерапии Негативного рака молочной железы: ретроспективное мультицентровое исследование // Клинич. перспективы гастроэнтерологии, гепатологии. – 2008. – № 1. – С. 11-16.

4. Кучерявый Ю.А. Пациент с хроническим панкреатитом: ошибки ведения, возможные причины и пути решения // *Consilium medicum*. – 2011. – № 1. – С. 65-68.
5. Отраслевой Стандарт «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника» (ОСТ 91500.11.0004-2003, Приказ Министерства здравоохранения РФ № 231 от 09.06.2003).
6. Токарева Е.В., Хлынова О.В., Горовиц Э.С. Микрофлора кишечника у больных хроническим панкреатитом // *Электронный научно-образовательный вестник Здоровье и образование в XXI веке*. – 2011. – Т. 13, № 2. – С. 84-85.
7. Токарева Е.В., Туев А.В., Хлынова О.В., Горовиц Э.С. Состояние экскреторной функции поджелудочной железы и микробиоценоза толстой кишки у больных хроническим панкреатитом в зависимости от тяжести течения заболевания // *Уральский медицинский журнал*. – 2011. – Т. 84, № 6. – С. 41-44.
8. Badalov N., Baradaran R., Iswara L.J., Sleinberg W., Tenner S. Drug-induced acute pancreatitis: an evidence-based review // *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 2007. № 5. P. 648-661.

Рецензенты:

Несчисляев В.А., д.м.н., начальник отделения препаратов бактериотерапии филиала ФГУП «НПО «Микроген» МЗ РФ «Пермское НПО «Биомед», г. Пермь;

Желобов В.Г., д.м.н., профессор кафедры госпитальной терапии ГБОУ ВПО «Пермский государственный медицинский университет им. ак. Е.А. Вагнера Минздрава России», г. Пермь.