

УДК 616.34-053.2:616.126-008:614.876

В. Г. Кондрашова✉, В. Ю. Вдовенко, І. Є. Колпаков, А. С. Попова, Л. П. Міщенко,
Т. В. Грищенко, Є. І. Степанова

Державна установа “Національний науковий центр радіаційної медицини Національної академії медичних наук України”, вул. Мельникова, 53, м. Київ, 04050, Україна

МІКРОБІОЦЕНОЗ КИШЕЧНИКА У ДІТЕЙ-МЕШКАНЦІВ РАДІОАКТИВНО ЗАБРУДНЕНИХ ТЕРИТОРІЙ ІЗ СИНДРОМОМ ДИПЛАЗІЇ СПОЛУЧНОЇ ТКАНИНИ СЕРЦЯ

Мета. Оцінити стан мікробіоценозу кишечника (товстої кишки) у дітей- мешканців зон радіоактивного забруднення із синдромом дисплазії сполучної тканини серця (СДСТС).

Матеріали та методи. Обстежено 99 дітей- мешканців зон радіоактивного забруднення, які розподілялися на дві підгрупи: ІА (підгрупа порівняння) – 44 дитини без ознак СДСТС, ІБ підгрупа – 55 дітей із СДСТС та 24 дитини контрольної групи у віці від 7 до 17 років. Групи спостереження були однаковими за статевою та віковою структурами.

Результати. У дітей- мешканців радіоактивно забруднених територій, за відсутності будь- яких специфічних скарг, з високою частотою (96,36 %) визначаються порушення мікробіоценозу кишечника, як кількісного так і якісного характеру, що можна розглядати як процес дезадаптації органів травлення та організму в цілому. При наявності СДСТС ці зміни носять більш виразний характер, що характеризуються суттєвим зменшенням кількості індигенної мікрофлори та зниженням її захисних властивостей. Частота дизбактеріозу III ступеня у дітей з СДСТС вірогідно перевищує цей показник у дітей контрольної групи та підгрупи порівняння. При наявності СДСТС зміни якісних показників мікробіоценозу проявлялися більш виразною активною контамінацією кишечника кишковими паличками зі зміненими властивостями, різними видами умовно- патогенних мікроорганізмів, значною частотою виявлення грибів роду *Candida* на тлі суттєвого зниження представників нормальної мікрофлори товстої кишки. З високою частотою у них виявляється присутність у товстій кишці 3–5-компонентних асоціацій умовно- патогенних мікроорганізмів.

Висновок. Отримані результати свідчать про необхідність бактеріального обстеження кишечника дітей- мешканців радіоактивно забруднених територій та застосування лікувально- профілактичних заходів, спрямованих на нормалізацію показників мікробіоценозу кишечника.

Ключові слова: мікробіоценоз кишечника, синдром дисплазії сполучної тканини серця, діти, Чорнобильська аварія.

Проблеми радіаційної медицини та радіобіології. 2014. Вип. 19. С. 277–286.

✉ Кондрашова Валентина Григорівна, e-mail: n.s.kondrashova@gmail.com

V. G. Kondrashova✉, V. Yu. Vdovenko, I. E. Kolpakov, A. S. Popova, L. P. Mishchenko, T. V. Gritsenko, E. I. Stepanova

State Institution "National Research Center for Radiation Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Melnykov str., 53, Kyiv, 04050, Ukraine

Gut microbiota among children living in areas contaminated by radiation and having the cardiac connective tissue dysplasia syndrome

Objective. The study examined the gut (colonic) microbiota in children being domiciled in contaminated zones and suffering the cardiac connective tissue dysplasia syndrome (CCTDS).

Materials and methods. The study included 99 children living in contaminated zones. Study subjects were divided into subgroup IA (a comparison subgroup) of 44 children with no signs of CCTDS and subgroup IB of 55 children having the CCTDS. The control group included 24 children aged from 7 to 17 years old. Study groups were of the same gender and age.

Results. In the absence of any specific complaints the abnormal gut microbiota was revealed in children living in contaminated areas with a high incidence of 96.36 % featuring both quantitative and qualitative abnormalities that can be considered a dysadaptation phenomenon of both digestive system and body as a whole. Under the concomitant CCTDS these disorders are more expressive, being characterized by a significant decrease in the number of obligate gut flora and failure of its protective capabilities. Incidence of dysbacteriosis grade III in children having the CCTDS is significantly higher vs. children of the control group and comparison subgroup. Under CCTDS the gut microbiota abnormalities were represented with a severe bowel contamination by *E. coli* with altered enzymatic properties, various types of opportunistic microorganisms, and a high identification incidence of genus *Candida* fungi at the background of a significant depression of normal colonic flora. Presence of 3–5-component associations of opportunistic pathogens in the colon was found with high incidence.

Conclusion. According to received results the examination of intestinal bacterial flora is expedient in children living in areas contaminated by radiation. Application of health care arrangements aimed at normalization of gut microbiota is obligate.

Key words: gut microbiota, cardiac connective tissue dysplasia syndrome, children, Chernobyl accident.

Problems of radiation medicine and radiobiology. 2014;19:277-286.

Шлунково-кишковий тракт другий за частотою залучення до диспластичного процесу і його зміни зустрічаються майже у 40–60 % дітей з синдромом дисплазії сполучної тканини серця (СДСТС). Наявність синдрому дисплазії сполучної тканини обумовлює певні особливості обміну, адаптації та існування дитячого організму [1, 2]. Численні літературні джерела свідчать про те, що сполучна тканина є важливою інтегративною системою організму людини та виконує цілий ряд життєво важливих функцій в єдності з імунною системою та мікробіоценозом організму. Слід взяти до уваги той факт, що мікрофлора, завдяки наявності різноманітних ферментів, прямо або опосередковано впливає на сполучну тканину та здійснює регуляцію імунної відповіді на локальному та системному рівнях [3–6].

При дослідженні мікробіотопів дітей, які мешкають в несприятливій еколого-біогеохімічній зоні, встановлено суттєві порушення мікробної колонізації.

Gastrointestinal tract is second in a frequency range of involvement in the dysplastic process and its disorders occur in almost 40–60 % of children having the cardiac connective tissue dysplasia syndrome (CCTDS). Presence of connective tissue dysplasia syndrome determines certain metabolic and adaptation characteristics both with child's body features in general [1, 2]. A lot of literature sources indicate that the connective tissue is an important integrative system of the human body and provides a number of vital functions in connection with immune system and body microbiota. One should take into account the fact that microflora due to enzymatic variability directly or indirectly impacts the connective tissue and provides regulation of the immune response at local and systemic levels [3–6].

Serious abnormalities of microbial colonization were found in children living in hazardous environmental in general and biogeochemical in particular

Вони проявлялися у зниженні та змінах властивостей симбіотичних бактерій, модифікації загального мікробного засівання кишечника і появі умовно-патогенних мікроорганізмів, що не притаманні даному біотопу [3, 4]. Наші попередні дослідження показали, що це стосується й територій радіоактивного забруднення [7]. На думку багатьох авторів, порушення мікробного гомеостазу мають загальноекологічний характер та відображають глобальні екологічні зміни зовнішнього середовища [3–6].

МЕТА ДОСЛІДЖЕННЯ

Оцінити стан мікробіоценозу кишечника (товстої кишки) у дітей-мешканців зон радіоактивного забруднення із СДСТС.

МАТЕРІАЛ ТА МЕТОДИ

Під спостереженням знаходилися 99 дітей-мешканців зон радіоактивного забруднення віком від 7 до 17 років (I група), які надійшли на обстеження та лікування в Клініку ННЦРМ. Пацієнти були обрані методом випадкових чисел серед дітей-мешканців 2-3-ї зон радіоактивного забруднення та розподілялися на дві підгрупи: IA (підгрупа порівняння) – 44 дитини без ознак СДСТС та IB підгрупа – 55 дітей із СДСТС. Середній вік дітей IA підгрупи $11,16 \pm 0,5$ р. і вона включала 29 дівчаток (65,91 %), середній вік ($11,11 \pm 0,63$) років та 15 хлопців (34,09 %), середній вік – ($11,36 \pm 0,91$) років. В IB підгрупі середній вік обстежених ($11,67 \pm 0,35$) років. Вона складалася з 30 дівчаток (54,55 %), середній вік ($11,72 \pm 0,54$) років, і з 25 хлопців (45,45 %), середній вік ($11,46 \pm 0,45$) років. Території проживання дітей основної групи належать до 2-ї зони (зона обов'язкового відселення – територія з щільністю забруднення ізотопами ^{137}Cs понад 555 кБк/м² або ^{90}Sr понад 111 кБк/м²) та 3-ї зони (зона гарантованого добровільного відселення – територія з щільністю забруднення ізотопами ^{137}Cs від 185 до 555 кБк/м² або ^{90}Sr від 5,55 до 111 кБк/м²). Впродовж попередніх 6 місяців цим дітям не призначалися антибактеріальні препарати. Контрольна група включала 24 дитини (практично здорові діти, які не відносяться до постраждалих контингентів), середній вік ($11,27 \pm 0,84$) років. Складалася контрольна група з 16 дівчаток (66,67 %), середній вік ($11,27 \pm 1,09$) років, та з 8 хлопців (33,33 %), середній вік ($11,43 \pm 1,57$) років.

Комісією з медичної етики ННЦРМ встановлено, що проведені дослідження відповідають етичним та морально-правовим вимогам відповідно до наказу МОЗ України № 281 від 01.11.2000 р.

zones. Abnormalities are represented in such a way as reduction and changes of profile of symbiotic bacteria, modified total microbial gut population and emergence of opportunistic pathogens that are not typical to this biotope [3, 4]. Our previous research had shown the actuality of the issue for population of contaminated areas [7]. According to many authors, the abnormalities of microbial balance have the entirely environmental nature and reflect global ecological variations in the ambient [3–6].

OBJECTIVE

The study examined the gut (colonic) microbiota in children being domiciled in contaminated zones and suffering the CCTDS.

MATERIALS AND METHODS

The survey population included 99 children aged 7–17 years old (group I) residing in areas contaminated by radiation and managed at the NRCRM Clinic. Study subjects were selected using a random number approach among children living in contaminated zones #2 and #3 and distributed into subgroup IA (comparison subgroup) of 44 children with no signs of CCTDS and subgroup IB of 55 children having the CCTDS. Average age of children in subgroup IA was (11.16 ± 0.5) years old and there were 29 girls (65.91 %, mean age 11.11 ± 0.63 years) and 15 boys (34.09 %, mean age 11.36 ± 0.91 years). In IB subgroup the mean age was (11.67 ± 0.35) years old and there were 30 girls (54.55 %, mean age 11.72 ± 0.54 years) and 25 boys (45.45 %, mean age 11.46 ± 0.45 years). Territory of residence of the main study group subjects is attributed to the zone #2 (territories of obligatory resettlement with soil contamination density by ^{137}Cs over 555 kBq/m² or by ^{90}Sr over 111 kBq/m²) and zone #3 (territories of guaranteed voluntary resettlement with soil contamination density by ^{137}Cs from 185 kBq/m² to 555 kBq/m² or by ^{90}Sr from 5.55 to 111 kBq/m²). No antibiobal medications were administered to children over the past 6 months before study. The control group included 24 children (almost healthy ones not attributed to the cohorts of survivors) in a mean age of (11.27 ± 0.84) years old. There were 16 girls (66.67 %, mean age 11.27 ± 1.09 years old) and 8 boys (33.33 %, mean age 11.43 ± 1.57 years old). According to the NRCRM Commission on Medical Ethic issues the study was meeting ethical, moral and legal requirements pursuant to the Order of Ministry of Health of Ukraine #281 from 01.11.2000.

Методи дослідження

Проведено комплексне клініко-лабораторне та інструментальне обстеження із застосуванням ехокардіографії для встановлення наявності СДСТС. Визначення показників здійснювали на апараті Aloka SSD-630 з використанням ехокардіографії у В- і М-режимах та доплерокардіографії з частотою датчика 3,5 МГц. Дослідження проводили за стандартною методикою з парастернального доступу.

Вивчення мікробіоценозу кишечника включало в себе визначення видового та кількісного складу мікрофлори. Ступінь порушень мікробіоценозу кишечника у дітей оцінювали згідно з методичними рекомендаціями [8].

Для кількісного аналізу мікрофлори кишечника з 1 г фекалій готували робоче розведення (1 : 10), з якого робили ряд серійних розведень (10^3 – 10^8). Кількісні показники мікрофлори кишечника вивчали шляхом висіву 1 мл з кожного розведення на диференціально-діагностичні середовища: Ендо; Проскірева; ВСА – для виявлення патогенних ентеробактерій; середовище Сабуро – для визначення грибів; Ендо та цитрат Сімонса – для визначення кишкової палички та умовно патогенних ентеробактерій; 5 % кров'яний агар – для визначення мікрофлори, що має гемолітичні властивості; ентерококагар – для визначення ентерококів; середовище Блаурока – для біфідобактерій та лактобактагар – для лактобацил; ЖСА – для визначення стафілококів.

Виявлення максимально можливого спектру аеробної та факультативно-анаеробної мікрофлори досягалося шляхом проведення секторного посіву на щільні поживні середовища при відповідних умовах інкубації. За допомогою мікроскопії визначали ступінь мікробного засівання.

Ідентифікацію виділених мікроорганізмів проводили відповідно до класифікації Bergey.

Кількість біфідобактерій та лактобактерій виражали кратністю розведення фекалій, при якому виявлено ріст вказаних мікроорганізмів. Вміст умовно-патогенних мікроорганізмів (УПМ) у досліджуваному матеріалі виражали кількістю колонієутворюючих одиниць в 1 г (КУО/г) біологічного матеріалу.

Кількісні показники росту мікробних клітин розраховували після підрахунку колоній та переводу даних в десятичні логарифми.

Статистичну обробку результатів проводили за стандартними методами варіаційної статистики з використанням пакета комп'ютерних програм Statistica 6.0 for Windows.

Methods

A comprehensive clinical, laboratory and instrumental examination using echocardiography to diagnose the CCTDS was applied. Parameters were received at the Aloka SSD-630 unit performing echocardiography in B- and M-modes and dopplercardiometry with a 3.5 MHz transducer. Examinations were conducted by the standard approach from parasternal position.

Study of gut microbiota included the identification of species and quantitative assay of microflora composition. Grading of abnormalities of gut microbiota in children were held in accordance with the guidelines [8].

Quantitative assay of gut microflora included the processing of 1 g of feces: the stock solution was prepared (1:10 dilution) from which a series of deeper dilutions (10^3 – 10^8) were produced. A 1 mL of each dilution was inoculated on differential-diagnostic mediums: Endo medium, Proskirev medium, bismuth sulfite agar (BSA) – for the detection of pathogenic enterobacteria, Sabouraud (dextrose) agar – to identify the fungi, Endo agar and Simons citrate agar – to reveal E. coli and opportunistic enterobacteria, 5 % blood agar – for the hemolytic microflora, enterococcus agar – for enterococci, Blaurok (bifidum) medium – for bifidobacteria and lactobacilli agar – for lactobacilli identification, and (mannitol) salt agar with egg yolk (MSEY) – for isolation of staphylococci.

Identification of maximum possible range of aerobic and facultative anaerobic microflora was achieved through the sectorial inoculation on solid medium under the appropriate conditions of incubation. Microbial contamination degree was assayed using the microscopy.

Isolated microorganisms were identified according to the Bergey's Manual.

Amount of bifidobacteria and lactobacilli was denoted as the order of dilution of feces in which the growth of these microorganisms was registered. Content of opportunistic microorganisms (OM) in a tested material was denoted as a number of colony forming units per 1 gram (CFU/g) of biological material.

Quantitative indices of growth of microbial cells were calculated after the colony counting and data conversion to the decimal logarithms.

Statistical analysis of the results was performed by standard methods of variation statistics using the software package Statistica 6.0 for Windows.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати проведеного дослідження показників стану кишкової мікрофлори у дітей- мешканців радіоактивно забруднених територій із СДСТС показали наявність відмінностей від показників дітей підгрупи порівняння та контрольної групи (табл. 1). При аналізі кількісного та якісного складу мікрофлори в підгрупі дітей із СДСТС встановлено зниження вмісту *Bifidobacterium* до $3,96 \pm 0,41 \log \text{КУО/г}$, що достовірно відрізнялося від показників дітей контрольної групи та підгрупи порівняння, $p < 0,05$. Аналогічно змінювалася й кількість *Lactobacillus* – $4,81 \pm 0,17 \log \text{КУО/г}$, $p < 0,05$. Встановлений дефіцит анаеробів відобразився й на аеробній частині мікробіоценозу. Найбільш характерним було достовірне змен-

RESULTS AND DISCUSSION

Results of the conducted study of gut microflora in children living in contaminated areas and having the CCTDS showed an existence of differences from that in children of the comparison subgroup and control group (Table 1). In analyzing the qualitative and quantitative content of gut microflora in the subgroup of children having CCTDS the reduced amount of *Bifidobacterium* down to $3.96 \pm 0.41 \log \text{CFU/g}$ was found being significantly different from that in children of the control group and comparison subgroup ($p < 0.05$). Similarly there was a changed amount of *Lactobacillus* i.e. $4.81 \pm 0.17 \log \text{CFU/g}$, $p < 0.05$. The revealed lack of anaerobes was reflected on aerobic flora too. A significant

Таблиця 1

Кількісні та якісні показники мікробіоценозу кишечника у дітей-мешканців радіоактивно забруднених територій та дітей контрольної групи ($\log \text{КУО/г}$)

Table 1

Quantitative and qualitative parameters of gut microbiota in children living in contaminated areas and children in the control group ($\log \text{CFU/g}$)

Показники Parameters	Контрольна група Control group n=24	Основна група / main group	
		IA підгрупа, n=44 IA subgroup, n=44	IB підгрупа, n=55 IB subgroup, n=55
Загальна кількість <i>E. coli</i> Total amount of <i>E. coli</i>	7,84 ± 0,09	7,52 ± 0,14*	7,18 ± 0,11**
<i>E. coli</i> зі зміненими ферментативними властивостями <i>E. coli</i> with altered enzymatic properties	0,38 ± 0,21	0,82 ± 0,28	0,87 ± 0,34*
<i>E. coli</i> лактозонегативна <i>E. coli</i> lactose-negative	0,63 ± 0,27	0,41 ± 0,12	0,82 ± 0,17#
<i>E. coli</i> гемолітична <i>E. coli</i> hemolytic	0,43 ± 0,14	0,69 ± 0,27	0,56 ± 0,27
<i>Lactobacillus</i>	7,38 ± 0,19	5,64 ± 0,11*	4,81 ± 0,17*#
<i>Bifidobacterium</i>	7,85 ± 0,14	5,69 ± 0,29*	3,96 ± 0,41*#
Умовно-патогенна мікрофлора Opportunistic microflora	0,31 ± 0,11	0,86 ± 0,31	1,37 ± 0,19
<i>Staphylococcus</i>	0,56 ± 0,13	0,54 ± 0,18	0,31 ± 0,15
Гриби роду <i>Candida</i> Genus <i>Candida</i> fungi	0,76 ± 0,15	0,75 ± 0,22	1,31 ± 0,28*#
<i>E. coli</i> з патогенними властивостями <i>E. coli</i> with pathogenic properties	0,12 ± 0,07	0,11 ± 0,03	0,16 ± 0,02
Інші Others	0,16 ± 0,08	0,08 ± 0,02*	0,13 ± 0,05

Примітка. * – достовірність відмінностей показників дітей контрольної та основної груп, $p < 0,05$;

– достовірність відмінностей показників дітей IA та IB підгруп основної групи, $p < 0,05$.

Note. * – significant difference between the control and main study groups, $p < 0.05$;

– significant difference between the IA and IB subgroups, $p < 0.05$.

шення, в порівнянні з контрольною групою, кількості лактозопозитивної кишкової палички (до $7,21 \pm 0,14 \log \text{ КОЕ/г}$) на тлі збільшення вмісту лактозонегативних кишкових паличок, ентеробактерій, стафілококів, грибів роду *Candida* та інших. Дизбіотичні зміни супроводжувалися наявністю умовно-патогенних мікроорганізмів.

Індивідуальний аналіз показав, що тільки у 2 (3,64 %) дітей-мешканців радіоактивно забруднених територій із СДСТС склад кишкової мікрофлори (якісний та кількісний) відповідав еубіотичному стану (в контрольній групі у 5 дітей – 20,83 %; в підгрупі порівняння у 7 дітей – 15,91 % $p < 0,05$). Він характеризувався переважанням анаеробної флори (біфідобактерії $7,50 \pm 0,50 \log \text{ КУО/г}$ і лактобактерії у кількості $6,5 \pm 0,5 \log \text{ КУО/г}$) над сумою аеробів, що були представлені повноцінними у ферментативному відношенні кишковими паличками у кількості $8,02 \pm 0,28 \log \text{ КУО/г}$. Умовно-патогенні мікроорганізми не виділялися.

В той же час у більшості дітей-мешканців радіоактивно забруднених територій із СДСТС (96,36 %), за відсутності будь-яких специфічних скарг, спостерігалася колонізація товстого кишечника гемолізуючою та умовно-патогенною флорою на тлі зниження загальної кількості індигенної флори, а саме *E. coli*, *Lactobacillus* та *Bifidobacterium*.

Різні ступені дисбіозу кишечника у дітей із СДСТС мали таку частоту: дисбіоз I ступеня виявлявся у 20 осіб (36,36 %), II ступеня – у 14 осіб (25,45 %) та III ступеня у 19 осіб (34,55 %).

У дітей підгрупи порівняння дисбіоз I ступеня виявлявся у 17 осіб (38,64 %), II ступеня – у 12 осіб (27,27 %) та III ступеня у 8 осіб (18,18 %).

В контрольній групі частота виявлення дисбіозу I та II ступеня вірогідно не відрізнялася від показників дітей основної групи, відповідно 50,0 та 16,67 %. В той же час частота виявлення дисбіозу III ступеня була достовірно нижчою, ніж в підгрупах дітей основної групи (відповідно 12,50; 18,18 та 34,55 %, $p < 0,05$).

Якісний аналіз показників мікробіоценозу кишечника при дисбіозі I ступеня у дітей основної групи в підгрупах був ідентичним і характеризувався зниженням кількості індигенної флори, а саме *E. coli*, *Lactobacillus* та *Bifidobacterium*.

Проте вже дисбіоз II ступеня у дітей із СДСТС характеризувався більш виразними змінами в порівнянні з показниками дітей IA підгрупи. Загальна кількість повноцінної кишкової палички була зниженою та становила $6,22 \pm 0,24 \log \text{ КУО/г}$, при цьому

decrease vs. control group of the number of lactose-positive *E. coli* (up to $7.21 \pm 0.14 \log \text{ CFU/g}$) was most characteristic against an increased content of lactose-negative *E. coli*, Enterobacteriaceae, staphylococci, genus *Candida* fungi and others. Disbiotic abnormalities were accompanied by the presence of opportunistic pathogens.

Individual analysis showed that only 2 children (3.64 %) from contaminated areas suffering the CCTDS had eubiotic state of intestinal microflora corresponding to on the contrary to the 5 children in the control group (20.83 %) and 7 children in the comparison subgroup (15.91 %), $p < 0.05$. It was characterized by a predominance of anaerobic flora i.e. bifidobacteria ($7.50 \pm 0.50 \log \text{ CFU/g}$) and lactobacilli ($6.5 \pm 0.5 \log \text{ CFU/g}$) over the integral amount of aerobic species, which were represented by the *E. coli* with full-featured enzymatic properties in an amount of $8.02 \pm 0.28 \log \text{ CFU/g}$. Opportunistic bacteria were not isolated there.

At the same time there was a gut colonization by hemolytic and opportunistic flora against general depopulation of obligate flora, namely *E. coli*, *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* in the absence of any specific complaints in the majority of children living in contaminated areas and having the CCTDS (96.36 %).

Intestinal dysbiosis in children suffering the CCTDS were of such an incidence: grade I was detected in 20 persons (36.36 %), grade II – in 14 subjects (25.45 %), and grade III – in 19 ones (34.55 %).

Grade I dysbiosis was identified in 17 children (38.64 %), II – in 12 children (27.27 %) and III – in 8 subjects (18.18 %) of the comparison subgroup.

Incidence of dysbiosis grade I and II in the control group did not differ significantly from that of the main study group (50.0 and 16.67 % respectively). At the same time, the incidence of dysbiosis grade III was significantly lower vs. subgroups of the main study group (12.50; 18.18 and 34.55 % respectively, $p < 0.05$).

Qualitative analysis of gut microbiota in dysbiosis grade I in the subgroups of main study group was similar being characterized by a decrease in the amount of obligate flora such as *E. coli*, *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*.

However just dysbiosis grade II in children suffering the CCTDS was characterized by the more pronounced changes vs. IA subgroup. Total amount of the full-featured *E. coli* was low down to $6.22 \pm 0.24 \log \text{ CFU/g}$, while its atypical variants were found in

більш ніж у половини дітей (7 осіб, 58,33 %) виявлялися її атипові варіанти. Кількість атипових варіантів кишкової палички у дітей із СДСТС достовірно перевищувала її у дітей ІА підгрупи. Кількість *E. coli* зі зміненими ферментативними властивостями у дітей ІБ підгрупи дорівнювала $2,19 \pm 0,56 \log \text{ КУО/г}$, а у дітей ІА підгрупи – $0,86 \pm 0,29 \log \text{ КУО/г}$, $p < 0,05$; кількість *E. coli* лактозонегативної відповідно $1,98 \pm 0,57 \log \text{ КУО/г}$ та $0,86 \pm 0,39 \log \text{ КУО/г}$, $p < 0,05$; кількість *E. coli* гемолітичної – $1,88 \pm 0,49 \log \text{ КУО/г}$ та $0,78 \pm 0,29 \log \text{ КУО/г}$, $p < 0,05$. Умовно-патогенні мікроорганізми (УПМ) визначалися у 5 (41,67 %) дітей із СДСТС, проте середньостатистична їх кількість складала $6,01 \pm 0,79 \log \text{ КУО/г}$, що достовірно перевищувало їх кількість у дітей ІА групи. Представлені УПМ переважно *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.* та різними видами ентеробактерій.

Необхідно підкреслити той факт, що у дітей-мешканців радіоактивно забруднених територій при другому ступені дисбіозу в кишечнику з високою частотою виявлялися 3–4-компонентні асоціації мікроорганізмів (у 46,15 % дітей). В групі дітей із СДСТС 3–4-компонентні асоціації мікроорганізмів виявлялися з частотою 66,67 % (8 осіб), що були представлені *E. coli* зі зміненими ферментативними властивостями, *E. coli* лактозонегативною, *E. coli* гемолітичною, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.* та різними видами ентеробактерій і достовірно відрізнялися від показника дітей підгрупи порівняння, $p < 0,05$.

Збільшення ступеня порушень мікробіоценозу кишечника (ІІІ ступінь) у дітей-мешканців радіоактивно забруднених територій із СДСТС характеризувалося подальшим зниженням кількості повноцінної кишкової палички ($6,19 \pm 0,19 \log \text{ КУО/г}$) та індигенної флори і у 9 осіб (47,37 %) виявлялися її атипові варіанти. З такою ж частотою реєструвалися й умовно-патогенні мікроорганізми. Частота виявлення грибів роду *Candida* досягала 94,74 % (18 осіб), в підгрупі порівняння – 75,0 %, $p < 0,05$; різних видів стафілококів – 47,37 % (9 осіб), в підгрупі порівняння – 37,5 %, $p < 0,05$ та їх асоціацій – 36,84 % (7 осіб) в підгрупі порівняння – 12,5 %, $p > 0,05$. Присутність у кишечнику 4-5-компонентних асоціацій мікроорганізмів у дітей із СДСТС досягала 31,58 % (6 осіб), а підгрупі порівняння – 25,0 %, $p > 0,05$; 3-компонентних асоціацій відповідно – 57,89 % (11 осіб) та 37,5 %, $p < 0,05$. До складу асоціацій, окрім грибів роду *Candida*, різних видів стафілококів, входили також *Klebsiella spp.* та *Proteus spp.*, різні види ентеробактерій, проте зі значно меншою частотою.

more than a half of the children ($n=7$, 58.33 %). Number of atypical variants of *E. coli* in children having the SCCTDS significantly exceeded that in the IA subgroup. Number of *E. coli* with abnormal enzymatic properties was $2.19 \pm 0.56 \log \text{ CFU/g}$ in IB subgroup and $0.86 \pm 0.29 \log \text{ CFU/g}$ in IA subgroup, $p < 0.05$. Amount of lactose-negative *E. coli* was respectively $1.98 \pm 0.57 \log \text{ CFU/g}$ and $0.86 \pm 0.39 \log \text{ CFU/g}$, $p < 0.05$. Number of hemolytic *E. coli* was $1.88 \pm 0.49 \log \text{ CFU/g}$ and $0.78 \pm 0.29 \log \text{ CFU/g}$ respectively, $p < 0.05$. Opportunistic microorganisms (OM) were identified in 5 children (41.67 %) having the CCTDS, but the average number was $6.01 \pm 0.79 \log \text{ CFU/g}$ significantly exceeding the value in IA subgroup. OM were represented mainly with *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.* and various types of *Enterobacteriaceae*.

Of note is the fact that a 3–4-component associations of microorganisms were identified with a high frequency (46.15 %) in children living in contaminated areas and having the grade II gut dysbiosis. The 3–4-component microbial associations were found in children suffering CCTDS with a frequency of 66.67 % (8 persons). Associations were represented by *E. coli* with abnormal enzymatic properties, lactose-negative *E. coli*, hemolytic *E. coli*, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.* and some types of enterobacteria. All that was significantly different from the rates in children of comparison subgroup ($p < 0.05$).

Increased degree of gut dysbiosis (grade III) in children living in contaminated areas and suffering the CCTDS featured a further decrease of amount of the full-featured *E. coli* ($6.19 \pm 0.19 \log \text{ CFU/g}$) and obligatory flora in 9 persons (47.37 %). Atypical variants of flora were found. Opportunistic pathogens were isolated with the same frequency. Incidence of genus *Candida* fungi reached 94.74 % ($n = 18$) vs. 75.0 % in the comparison subgroup, $p < 0.05$. Species of staphylococci were isolated in 47.37 % ($n = 9$) vs. 37.5 % in the comparison subgroup ($p < 0.05$) and their associations – in 36.84 % ($n = 7$) and in 12.5 % (the comparison subgroup) respectively, $p > 0.05$. Incidence of 4–5-component microbial associations in children suffering the CCTDS was 31.58 % ($n = 6$) vs. 25.0 % in the comparison subgroup ($p > 0.05$), the 3-component associations were present respectively in 57.89 % ($n = 11$) and 37.5 % ($p < 0.05$). Associations included alongside the genus *Candida* fungi and species of staphylococci also the *Klebsiella spp.* and *Proteus spp.*, and various types of *Enterobacteriaceae*, but with much less frequency.

Необхідно враховувати той факт, що мікробні асоціації можуть мати високу токсигенність, тоді як окремі види мікробів, що входять до складу асоціацій, самі по собі таких властивостей не мають. Встановлено, що *Proteus* в асоціації з іншими мікроорганізмами посилює патогенні й токсичні властивості симбіонтів. Дріжджоподібні гриби сприяють розмноженню стафілококів та посиленню їх патогенних властивостей, внаслідок чого можуть спостерігатися тяжкі форми ураження кишечника [1–6]. Також гриби роду *Candida* здатні продукувати мікробні ферменти, що сприяють дезорганізації сполучної тканини (ліпаза, плазмокоагулаза, гемолізін, дезоксирибонуклеаза, фібринолізін, желатиназна активність та ін.) і, таким чином, впливати на перебіг синдрому дисплазії сполучної тканини.

Ряд авторів [3–5, 9] вважають девіацію мікробного пейзажу кишечника від норми до дисбіозу I–II ступеня одним із проявів процесів напруження або зриву адаптації, що потребують корекції пробіотиками.

Аналіз отриманих результатів показав, що кількісні зміни мікрофлори кишечника у дітей-мешканців радіоактивно забруднених територій із СДСТС характеризуються більш виразним зменшенням загальної кількості індигенної мікрофлори, а якісні – зниженням її захисних властивостей (атипові форми кишкової палички), збільшенням кількості та змінами спектру умовно-патогенної флори. Умовно-патогенна флора була представлена переважно *E. coli* зі зміненими ферментативними властивостями, *E. coli* лактозонегативною, *E. coli* гемолітичною, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.*, різними видами ентеробактерій. Зі збільшенням ступеня дисбіозу з високою частотою висівалися гриби роду *Candida*, різні види стафілококів, що мають патогенні властивості (*S. aureus* та *S. epidermidis* гемолізуючий).

Таким чином, встановлено, що у дітей-мешканців радіоактивно забруднених територій із СДСТС спостерігаються більш виразні порушення мікробіоценозу кишечника, що у сукупності із радіоактивним забрудненням територій можуть виступати підґрунтям змін адаптаційно-приспосувальних механізмів та можуть бути розцінені як один із проявів процесів напруження або зриву адаптації в умовах постійного проживання на територіях радіоактивного забруднення, які потребують проведення заходів щодо зниження їх частоти.

Account must be taken of the fact that microbial associations can be highly toxigenic, while certain types of bacteria themselves within associations do not have such properties. It was established that *Proteus* in association with other microorganisms enhances the pathogenic and toxic properties of the symbionts. The yeast-like fungi contribute to the growth of staphylococci and enhance their pathogenic properties resulting in severe gut lesions [1–6]. Also fungi of the genus *Candida* are capable of producing the microbial enzymes that contribute to disorganization of the connective tissue (lipase, plasmocoagulase, haemolysin, deoxyribonuclease, fibrinolysin, gelatinase activity, etc.) and thus, influence the natural history of connective tissue dysplasia syndrome.

Some experts [3–5, 9] consider the gut flora deviation from normal intestinal biota to grade I–II dysbiosis being one of the manifestations of strain or failure of adaptation that require correction with administrations of probiotics.

Analysis of the results showed that the quantitative abnormalities of intestinal microflora in children living in contaminated areas and suffering the CCTDS are characterized by a distinct decrease in the total amount of obligatory microflora and some quality abnormalities, such as reduced protective capacities of flora (atypical forms of *E. coli*) both with increase in amount and spectrum variations of pathogenic flora. Opportunistic pathogenic microflora was represented mainly by *E. coli* with abnormal enzymatic properties, lactose-negative *E. coli*, hemolytic *E. coli*, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.*, and various types of *Enterobacteriaceae*. Along with exacerbation of gut dysbiosis the fungi of the genus *Candida* and various types of staphylococci with pathogenic properties (*S. aureus* and *S. epidermidis* hemolytic) were isolated with higher incidence.

Thus, it was found that the children being domiciled in contaminated areas and suffering the CCTDS have distinct abnormalities of gut microbiota, which together with radioactive contamination can be the source of disorders of adaptive pathways and can be regarded as a manifestation of the processes of strain or failure of adaptation under conditions of permanent residence in the radioactive contamination that require application of measures to reduce their incidence.

ВИСНОВКИ

1. У дітей-мешканців радіоактивно забруднених територій, за відсутності будь-яких специфічних скарг, з високою частотою (96,36 %) визначаються порушення мікробіоценозу кишечника, як кількісного так і якісного характеру, що можна розглядати як процес дезадаптації органів травлення та організму в цілому. При наявності СДСТС ці зміни носять більш виразний характер, що характеризуються суттєвим зменшенням кількості індигенної мікрофлори та зниженням її захисних властивостей. Частота дисбактеріозу III ступеня у дітей з СДСТС вірогідно перевищує цей показник у дітей контрольної групи та підгрупи порівняння.
2. При наявності СДСТС зміни якісних показників мікробіоценозу проявлялися більш виразною активною контамінацією кишечника кишковими палочками зі зміненими властивостями, різними видами умовно-патогенних мікроорганізмів, значною частотою виявлення грибів роду *Candida* на тлі суттєвого зниження представників нормальної мікрофлори товстої кишки. З високою частотою у них виявляється присутність у товстій кишці 3–5-компонентних асоціацій умовно-патогенних мікроорганізмів.
3. Отримані результати свідчать про необхідність бактеріального обстеження кишечника дітей-мешканців радіоактивно забруднених територій та застосування лікувально-профілактичних заходів, спрямованих на нормалізацію показників мікробіоценозу кишечника.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Арсентьев В. Г. Дисплазия соединительной ткани у детей как конституциональная основа полиорганных нарушений: вопросы классификации, критерии диагностики / В. Г. Арсентьев, Н. П. Шабалов // Вопросы практической педиатрии. – 2011. – Т. 6, № 5. – С. 59–65. Russian.
2. Наследственные нарушения соединительной ткани в кардиологии. Диагностика и лечение. Российские рекомендации (Первый пересмотр). Российское кардиологическое общество – секция дисплазии соединительной ткани // Рос. кард. журн. – 2013. – Т. 1 (99), Приложение 1. – 32 с.
3. Урсова Н. И. Проблема дисбактериоза в педиатрической практике / Н. И. Урсова, Г. В. Римарчук // Педиатрия. – 2007. – № 1. – С. 71–75.
4. Урсова Н. И. Особенности формирования хронической патологии у детей в экологически неблагоприятных условиях (факторы риска, лечение и реабилитация) : автореф. дис. на соискание науч. степени д-ра мед. наук : спец. "Педиатрия" / Урсова Наталья Игоревна. – М., 2001. – 38 с.
5. Ардатская М. Д. Дисбактериоз кишечника: современные аспекты изучения проблемы, принципы диагностики и лечения / М. Д. Ардатская, А. В. Дубинин, О. Н. Минушкин // Тер. арх. – 2001. – № 2. – С. 67–71.

CONCLUSIONS

1. Abnormalities of gut microbiota both of quantitative and qualitative nature that can be considered a dysadaptation process of digestive system and the body in whole were revealed with a high incidence (96.36 %) in the absence of any specific complaints in children living in areas contaminated by radiation. Under the concomitant CCTDS these abnormalities are more expressive and characterized by a significant decrease in obligatory microflora amount and lowering of its protective capacities. Incidence of grade III dysbacteriosis in children suffering the CCTDS is significantly higher than in children of both control group and comparison subgroup.
2. In the presence of CCTDS the abnormal microbiota quality profile was represented with a more pronounced gut contamination by *E. coli* with altered properties, various types of opportunistic microorganisms, and significant incidence of genus *Candida* fungi isolation at the background of a significant depopulation of normal gut microflora. Presence of 3–5-component associations of opportunistic pathogens in the colon was frequently identified in children suffering the CCTDS.
3. Received results suggest the need for bacteriological examination of gut in children living in areas contaminated by radiation and for application of healthcare arrangements focused at normalization of gut microbiota.

REFERENCES

1. Arsent'ev VG, Shabalov NP. [Connective tissue dysplasia in children as a constitutional basis for multi-organ disorders: questions of classification, criteria for diagnostic]. *Voprosy prakticheskoi pediatrii*. 2011;6(5):59-65. Russian.
2. Russian Society of Cardiology – section of connective tissue dysplasia. [Hereditary disorders of connective tissue in cardiology. Diagnosis and treatment. Russian recommendations (first revision)]. *Russian Journal of Cardiology*. 2013;1(99, 1 Suppl). 32 p. Russian.
3. Ursova NI, Rimarchuk GV. [The problem of dysbiosis in pediatric practice]. *Pediatriia*. 2007;(1):71-5. Russian.
4. Ursova NI. [Features of the development of chronic pathology in children in the ecologically unfavorable conditions (risk factors, treatment and rehabilitation)] [abstract of dissertation]. Moscow; 2001. 38 p. Russian.
5. Ardatkaia MD, Dubinin AV, Minushkin ON. [Intestinal dysbiosis: modern aspects of the problem, the principles of diagnosis and treatment]. *Terapevticheskii arkhiv*. 2001;(2): 67-71. Russian.
6. Walker W. A. [The role of the microflora in the development of protective functions of the intestine]. *Pediatriia*. 2005;(1):85-91. Russian.

6. Walker W. A. Роль микрофлоры в развитии защитных функций кишечника / W. A. Walker // Педиатрия. – 2005. – № 1. – С. 85–91.
7. Мікробіоценоз кишечника та стан імунної системи у дітей- мешканців радіоактивно забруднених територій / В. Г. Кондрашова, В. Ю. Вдовенко, І. Є. Колпаков [та ін.] // Международный журнал педиатрии, акушерства и гинекологии. – 2013. – Т. 4, № 2. – С. 39–44.
8. Діагностика, сучасна фармакотерапія та профілактика кишкового дисбактеріозу у дітей : методичні рекомендації / Національна медична академія післядипломної освіти імені П. М. Шупика. – К. : [б. в.], 2000. – 34 с.
9. Дисбіоз кишечника як прояв дезадаптаційного синдрому у дітей молодшого шкільного віку / В. П. Родіонов, А. В. Костенко, Ю. А. Маковкіна [та ін.] // Перинатология и педиатрия. – 2006. – № 4 (28). – С. 97–99.
7. Kondrashova VG, Vdovenko VYu, Kolpakov IE, et al. [Intestinal microbiota and state of immune system in children living in radiation contaminated areas]. International Journal of Pediatrics, Obstetrics and Gynecology. 2013;4(2):39-44. Ukrainian.
8. National Medical Academy of Postgraduate Education named Shupyk PM. [Diagnosis, modern pharmacotherapy and prevention of intestinal dysbiosis in children: methodical recommendations]. Kyiv: [s. n.]; 2000. 34 p. Ukrainian.
9. Rodionov VP, Kostenko AV, Makovkina YuA, Ponomariova IH, Kryshchuk SYu. [Intestinal dysbiosis as a manifestation of the maladaptation syndrome in primary school children]. Perinatology and pediatrics. 2006;4(28):97-9. Ukrainian.

Стаття надійшла до редакції 18.08.2014

Received: 18.08.2014