

УДК 616-008.934.54-06:616.33/34-053.3]-092

ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ И КЛИНИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ФОРМИРОВАНИЯ ПИЩЕВОЙ ИНТОЛЕРАНТНОСТИ У ДЕТЕЙ

Т.А. Шуматова, Н.Г. Приходченко, Л.А. Григорян

Владивостокский государственный медицинский университет (690950 г. Владивосток, пр-т Острякова, 2)

Ключевые слова: пищевая intolerance, лактоза, энтероциты, оксид азота.

До настоящего времени остаются не изученными все патогенетические механизмы развития пищевой intolerance у детей, влияние на этот процесс состояния реактивности организма ребенка, вопросы коррекции и профилактики. Проведено комплексное клиничко-иммунологическое, биохимическое и функциональное обследование в динамике 39 детей с лактазной недостаточностью в возрасте от 1,5 до 12 месяцев. Установлено, что формирование пищевой intolerance лактозы у детей сопровождается нарушением всех этапов пищеварения: полостного, пристеночного, внутриклеточного с изменением состояния мукозального иммунитета, микробиоты кишечника и дисбалансом продукции провоспалительных и противовоспалительных цитокинов. Исследование неспецифических факторов защиты слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта, особенностей мукозального иммунитета перспективно для расшифровки патогенеза пищевой intolerance у детей и разработки алгоритмов ее лечения и профилактики.

Пищевая intolerance является актуальной проблемой педиатрии и современного здравоохранения в целом [3, 10, 13, 15]. Это обусловлено значительным ростом частоты ее регистрации в последнее десятилетие, отсутствием ранних достоверных критериев диагностики и недостаточной эффективностью терапии, что способствует формированию хронической патологии желудочно-кишечного тракта и тяжелых аллергических заболеваний [4, 5, 10, 14].

Наиболее частым вариантом пищевой intolerance у детей является непереносимость лактозы (гиполактазия, лактазная недостаточность) [1, 2, 7, 15]. Установлено, что до 70% случаев лактазной недостаточности (ЛН) у детей грудного возраста носит приобретенный (вторичный) характер, при котором снижение активности лактазы связано с повреждением энтероцита, возможным при инфекционном или иммунном (пищевая аллергия) воспалительном процессе в кишечнике, атрофических и субатрофических изменениях, при недостатке трофических факторов [7, 9, 12, 15]. Несмотря на многочисленные исследования в области физиологии процессов кишечного всасывания, механизмы развития пищевой intolerance продолжают оставаться неясными.

В работах, посвященных непереносимости лактозы, имеются единичные упоминания об участии нитрооксидергических механизмов в формировании данной патологии [6, 8, 11]. Известно, что оксид азота может регулировать процессы абсорбции в тонком кишечнике, что он является важнейшим защитным

фактором, ингибция продукции которого приводит к нарушению функций энтероцитов. Особый интерес имеет изучение молекулярной природы межклеточных взаимодействий и их роли в возникновении пищевой intolerance. Для клинической практики несомненное значение имеет разработка новых гистохимических и иммунологических маркеров ранней идентификации нарушений процессов мембранного всасывания с определением их ведущего патогенетического звена.

Цель настоящего исследования состояла в анализе клинических и патогенетических особенностей формирования пищевой intolerance у детей первого года жизни с пищевой непереносимостью лактозы.

Материал и методы. Наблюдали 39 детей, страдавших пищевой непереносимостью лактозы, в возрасте от 1,5 до 12 месяцев (1-я группа). Анализ анамнестических (наличие персистирующей кислой диареи), и лабораторных (положительная реакция Бенедикта, стеаторея смешанного типа, амилорея) данных позволил выявить вторичную ЛН. На момент установления диагноза все дети находились исключительно на грудном вскармливании. 2-ю группу (сравнения) составили 20 детей, не имевших симптомов пищевой непереносимости в анамнезе. Во всех случаях проведено комплексное клиничко-иммунологическое, биохимическое и функциональное обследование в динамике. Оценивали состояние микробиоты толстой кишки, уровень экскреции углеводов с калом, проводили многократное копрологическое исследование. Изучали состояние гуморального иммунного статуса: содержание иммуноглобулинов (Ig) – А, М, G и общего E и цитокинов – интерлейкинов (ИЛ) 1β, 2, 4, 6, 8 и фактора некроза опухоли-α (ФНОα) в сыворотке крови и слюне. Определение иммуноглобулинов и цитокинов в биологических жидкостях проводилось согласно методическим рекомендациям «Исследование иммуноглобулинов и других белков в секретах человека» (М., 1987). 36 пациентам в периоде выраженных клинических проявлений по показаниям была проведена эзофагогастродуоденоскопия с энтеробиопсией. Биопсию забирали через рабочий канал фиброгастроскопа PENTAX FG 24V при помощи фарцепта из тощей кишки до связки Трейца. Полученный материал фиксировали в параформальдегиде и использовали для приготовления срезов с последующей окраской их гематоксилином и эозином. Оценка морфологических данных проводилась с помощью световой и электронной микроскопии. Для

Таблица
Содержание иммуноглобулинов и цитокинов в слюне

Показатель	1-я группа	2-я группа
IgG, г/л	9,624±0,412 ¹	0,084±0,032
IgM, г/л	5,506±0,211 ¹	4,915±0,211
Секреторный IgA, г/л	0,301±0,006 ¹	0,531±0,031
Общий IgE, г/л	2,112±0,091	1,861±0,211
ИЛ-1β, пкг/мл	186,035±26,617 ¹	97,644±11,226
ИЛ-2, пкг/мл	2,853±0,761 ¹	2,336±0,224
ИЛ-4, пкг/мл	71,294±1,789	12,774±3,225
ИЛ-8, пкг/мл	134,383±18,761 ¹	124,336±9,321
ФНОα, пкг/мл	176,803±18,276 ¹	124,365±18,654

¹ Разница с группой сравнения статистически значима.

изучения нитроксидобразующей функции слизистой оболочки тонкого кишечника биопсийный материал исследовали по методу Норе и Vincent (1989). О количественном синтезе оксида азота судили по NADPH-диафореазе – ферменту, солокализованному в клетках с нитроксидсинтазой.

Результаты исследования. Все пациенты 1-й группы имели пищевую непереносимость лактозы различной степени выраженности: в 100 % случаев регистрировали учащенный пенистый водянистый стул с кислым запахом, у 24 детей (61,5 %) – срыгивания и у 6 (15,4 %) – рвоту. Были характерны метеоризм (в 92,2 % случаев), флатуленция (87,0 %), кишечные колики (92,2 %). Копрологические нарушения были умеренными: смешанная стеаторея – у 15 (38,4 %), стеаторея II типа – у 18 (46,1 %), амилорея – у 37 (94,7 %), креаторея – у 18 (46,2 %), перевариваемая клетчатка – у 23 (58,9 %), йодофильная флора – у 34 (87,0 %) детей. pH кала составлял $5,47 \pm 0,32$, уровень общего содержания углеводов в кале (реакция Бенедикта) – $1,26 \pm 0,07$ %. Были выявлены нарушения микробиоты кишечника I степени у 31 (79,5 %), II степени – у 8 (20,5 %): общее количество кишечной палочки было сниженным у 35 (89,7 %),

бифидобактерий – 34 (87,0 %), лактобактерий – у 37 (94,8 %) детей. В 17 случаях (43,6 %) высевалась патогенная и условно-патогенная микрофлора (пролиферация лактозонегативных и гемолизинпродуцирующих эшерихий, стафилококков и грибов рода *Candida*).

В секрете ротоглотки у больных 1-й группы зафиксированы достоверно низкие по сравнению со 2-й группой показатели уровня секреторного IgA, ответственного за систему местного иммунитета. Концентрация IgE в секрете ротоглотки у детей с ЛН не отличалась от нормы. Содержание IgM и IgG у детей 1-й группы достоверно превышало показатели группы сравнения. Уровень цитокинов в слюне у пациентов с ЛН достоверно отличался от нормы. Соотношение про- и противовоспалительных цитокинов здесь у детей с ЛН было значительно повышено за счет преобладания эндогенной продукции провоспалительных цитокинов (табл.).

В иммуноглобулиновом спектре сыворотки крови детей с ЛН достоверных различий по сравнению с контрольной группой зарегистрировано не было. На системном уровне было выявлено незначительное увеличение концентрации про- и противовоспалительных цитокинов, при этом в сыворотке крови отмечалось преобладание противовоспалительных цитокинов (рис. 1).

При эндоскопическом исследовании в период выраженных клинических проявлений ЛН изменений слизистой оболочки пищевода не выявлено ни в одном случае. В 15 наблюдениях (41,7 %) найдены воспалительные изменения слизистой оболочки желудка. У 1/3 пациентов отмечалась повышенная с кислотообразующая функция желудка. При динамическом наблюдении за 15 детьми в периоде ремиссии на фоне диетотерапии и исчезновении клинических проявлений заболевания воспалительные изменения слизистой оболочки желудка практически полностью купировались и сохранились по типу поверхностной (эритематозной) гастропатии лишь в 2 случаях.

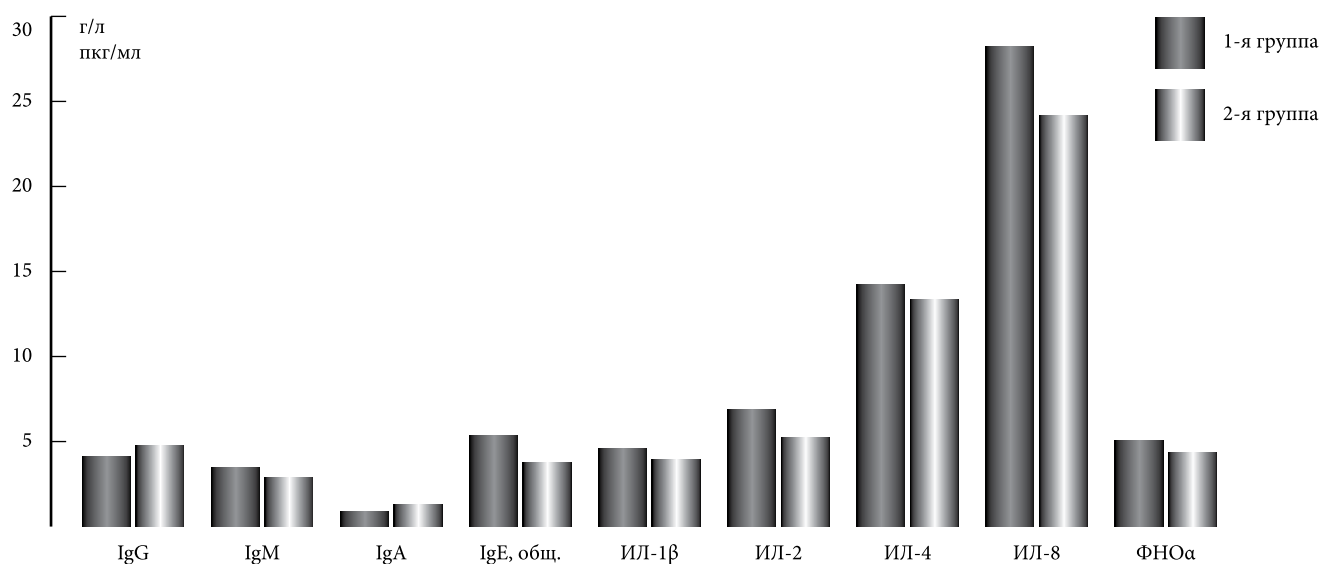


Рис. 1. Содержание иммуноглобулинов и цитокинов в сыворотке крови.

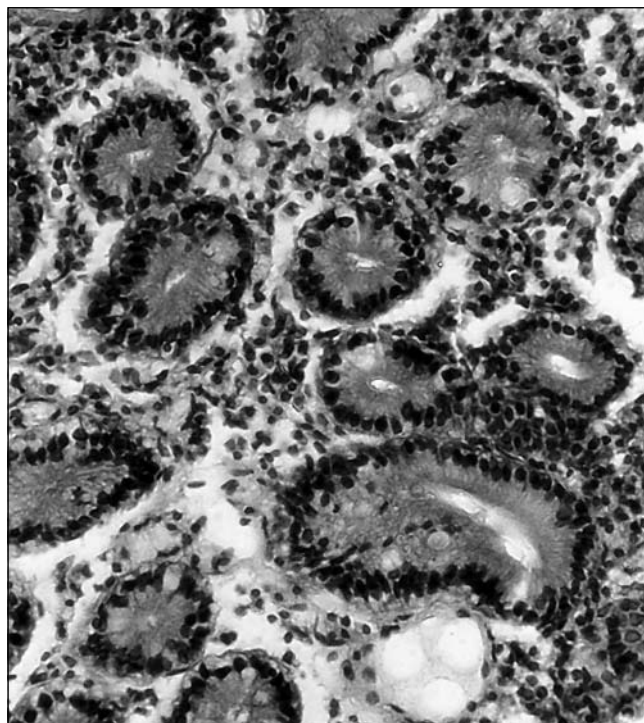


Рис. 2. Биопсия тонкой кишки при ЛН, период выраженных клинических проявлений:

лимфоидно-плазмноклеточная инфильтрация собственной пластики слизистой оболочки. Окр. гематоксилином и эозином, $\times 200$.

Отсутствие структурных изменений слизистой оболочки пищевода подтверждено выборочными биопсиями, в которых определялся многослойный плоский неороговевающий эпителий без признаков воспаления. Воспалительные изменения в биоптатах желудка были выявлены у 8 человек (22,2%).

Эндоскопическое исследование слизистой оболочки тонкой кишки показало наличие у 19 пациентов (52,8%) очаговой гиперемии и отека. У 8 детей (22,2%) зарегистрированы дополнительные изменения, описанные как «симптом манной крупы», проявления которого усиливались в дистальном направлении. Гистологическое изучение слизистой оболочки тонкой кишки у 36 больных на фоне клинических проявлений ЛН не выявило существенных изменений структуры ворсин и энтероцитов. В 12 случаях (33,3%) отмечалось небольшое уменьшение длины ворсин (до $487,8 \pm 2,0$ мкм) без углубления крипт ($171,8 \pm 6,6$ мкм). Соотношение длины ворсин к глубине крипт соответствовало $2,83 \pm 0,01$. Специфических изменений структуры кишечных ворсин и энтероцитов при ЛН выявлено не было. В собственной пластинке слизистой оболочки при гистологическом исследовании отмечалось нарастание клеточной плотности за счет межэпителиальных лимфоцитов и плазматических клеток (рис. 2). Определялись энтероциты, в цитоплазме которых содержалось большое количество митохондрий, рибосом и структур эндоплазматического ретикулаума (рис. 3).

Установлено, что энтероциты ворсин и крипт проявляли высокую нитрооксидсинтазную активность. Диформазан окрашивал эпителиальные клетки в

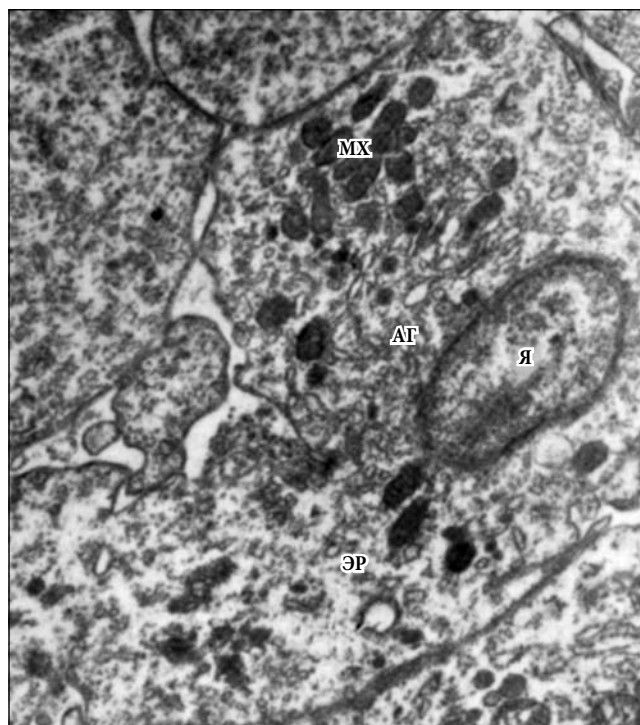


Рис. 3. Эпителиальная клетка кишечника при лактозной недостаточности:

Я – ядро, МХ – митохондрия, ЭР – эндоплазматический ретикулум, АГ – аппарат Гольджи. Электронограмма, $\times 7000$.

интенсивно-синий цвет. Максимальная способность к синтезу оксида азота установлена в энтероцитах ворсин. Активность фермента в них составила $109,61 \pm 1,70$ единиц оптической плотности. Клетки, расположенные в криптах, содержали на $52,7 \pm 3,2\%$ фермент средней активности. $71,5 \pm 3,8\%$ энтероцитов ворсин содержали фермент высокой, $25,2 \pm 2,2\%$ – средней активности, единичные энтероциты проявляли слабую нитроксидобразующую способность. Бокаловидные клетки были диафоразонегативными. Наряду с указанными структурами в синий цвет окрашивались клетки концевых отделов желез. Эндотелий сосудов имел голубую окраску. В стадии клинико-лабораторной ремиссии, на фоне безлактозной диеты и восстановления гистологических структур регистрировали значительное снижение нитрооксидсинтазной активности клеток. Подавляющее большинство эпителиоцитов содержало нитрооксидсинтазу низкой и средней плотности, у бокаловидных клеток появлялась слабая нитрооксидсинтезирующая способность, гранулы диформазана в них располагались по периферии цитоплазмы.

Обсуждение полученных данных. Одним из важнейших условий развития пищевой intolerance является нарушение проницаемости пищеварительного барьера, селективно защищающего организм от антигенных субстанций [8, 10]. В этой защите большую роль играют анатомо-функциональная состоятельность эпителиального пласта и напряженность местного иммунного ответа, что отражается локальным цитокиновым профилем и экспрессией костимулирующих молекул на антигенпредставляющих клетках, угнетением

синтеза IgA и повышенной проницаемости эпителия кишечника, что способствует проникновению антигенов в кровоток. Анализ полученных данных позволяет считать, что формирование пищевой intolerance сопровождается нарушением всех этапов пищеварения – полостного, пристеночного, внутриклеточного – с изменением состояния местного иммунитета и микробиоты кишечника. Полученные данные убедительно свидетельствуют о наличии структурных изменений всех отделов желудочно-кишечного тракта. Длительное нарушение расщепления сахаров сопровождается вовлечением в патологический процесс слизистой оболочки желудка, тонкой кишки, печени и поджелудочной железы. Данные изменения у большинства пациентов носят транзиторный характер.

Согласно современным представлениям в механизмах формирования пищевой толерантности могут участвовать не только клетки слизистой оболочки тонкой кишки с локализованным на их поверхности ферментом, расщепляющим молочный сахар. Решающая роль в развитии толерантности принадлежит процессу взаимодействия Т-лимфоцитов с антиген-презентирующими клетками и присутствию при этом взаимодействии ко-стимулирующих молекул [11, 12]. Наше исследование показало, что в механизмах компенсации происходящих нарушений принимают участие некоторые мембранные, лизосомальные и митохондриальные ферменты, локализованные в энтероцитах. Нарастание клеточной плотности в собственной пластинке слизистой оболочки за счет межэпителиальных лимфоцитов и плазматических клеток, выявление энтероцитов с большим количеством органелл свидетельствуют о компенсаторной реакции и большой физиологической нагрузке клеток. Анализ экспрессии нитроксидазы клеточными элементами слизистой оболочки тонкой кишки у детей с ЛН свидетельствуют о патогенетическом участии нитроксидагических механизмов в процессах кишечного всасывания. Эндогенное образование оксида азота и содержание его метаболитов при различных патологических состояниях изменяются посредством регуляторных воздействий провоспалительных цитокинов, динамика содержания которых в крови и биологических жидкостях позволяет судить об адекватности иммунного процесса при поражении пищеварительного тракта. Нарушения продукции противовоспалительных цитокинов создают условия для поддержания и дальнейшего развития хронического воспаления в слизистой оболочке путем снижения антиинфекционной защиты, формирования локального иммунодефицита и усиления повреждающего действия различных антигенов и патогенных микроорганизмов. Исследование неспецифических факторов защиты слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта, особенностей мукозального иммунитета перспективно для расшифровки патогенеза пищевой intolerance у детей и разработки алгоритмов ее лечения и профилактики.

Литература

1. Бельмер С.В., Мухина Ю.Г., Чубарова А.И. и др. Непереносимость лактозы у детей и взрослых // *Лечащий врач*. 2005, № 1. С. 34–38.
2. Корниенко Е.А., Митрофанова Н.И., Ларченкова Л.В. Лактазная недостаточность у детей раннего возраста // *Вопросы современной педиатрии*. 2006. Т. 5, №4. С. 82–86.
3. Лусс Л.В., Сидорович О.И., Успенская К.С. Пищевая аллергия и пищевая непереносимость: принципы диагностики и терапии // *Лечащий врач*. 2007. № 4. С. 16–20.
4. Функциональные нарушения ЖКТ у детей раннего возраста. Лактазная недостаточность: пособие для врачей // под ред. А.И. Хавкина. М., 2007. 22 с.
5. Dowdee A., Ossege J. Assessment of childhood allergy for the primary care practitioner // *J. Am. Acad. Nurse. Pract.* 2007. Vol. 19, No. 2. P. 53–62.
6. Halken S. Prevention of allergic disease in childhood: clinical and epidemiological aspects of primary and secondary allergy prevention // *Pediatr. Allergy Immunol.* 2004. No. 15, suppl. 16. P. 4–5, 9–32.
7. Perino A., Cabras S., Obinu D. Lactose intolerance: a non-allergic disorder often managed by allergologists // *Eur. Ann. Allergy Clin. Immunol.* 2009. Vol. 41, No. 1. P. 3–16.
8. Swallow D.M. Genetics of lactase persistence and lactose intolerance. // *Annu. Rev. Genet.* 2003. Vol. 37. P. 197–219.
9. Szilagyi A., Shrier I., Heilpern D. Differential impact of lactose/lactase phenotype on colonic microflora // *Can. J. Gastroenterol.* 2010. Vol. 24, No. 6. P. 373–379.
10. Teuber S.S., Porch-Curren C. Unproved diagnostic and therapeutic approaches to food allergy and intolerance // *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2003. Vol. 3. P. 217–221.
11. Tomićić S., Fälth-Magnusson K., Böttcher M.F. Dysregulated Th1 and Th2 responses in food-allergic children--does elimination diet contribute to the dysregulation? // *Pediatr. Allergy. Immunol.* 2010. No. 21. P. 649–655.
12. Vrese M., Stegelmann A., Richter B. Probiotics-compensation for lactase insufficiency // *Am. J. Clin. Nutr.* 2001. No. 73. P. 421–429.
13. Waddell L. Food allergies in children: the difference between cows' milk protein allergy and food intolerance // *J. Fam. Health Care.* 2010. No. 20. P. 104.
14. Walker S., Wing A.. Allergies in children // *Fam. Health Care.* 2010. No. 20. P. 24–26.
15. Wilt T.J., Shaikat A., Shamlivan T. Lactose intolerance and health // *Evid. Rep. Technol. Assess (Full Rep)*. 2010. No. 192. P. 1–410.

Поступила в редакцию 22.12.2010.

PATHOGENETIC AND CLINICAL ASPECTS OF FORMING ALIMENTARY INTOLERANCE IN CHILDREN

T.A. Shumatova, N.G. Prihodchenko, L.A. Grigoryan
Vladivostok State Medical University (2 Ostryakova Av. Vladivostok 690950 Russia)

Summary – To this day, all pathogenetic mechanisms of forming alimentary intolerance in children, the influence of the child's organism responsiveness, issues of treatment and prevention remain unstudied. The authors have conducted an integrated clinico-immunological, biochemical and functional examination in dynamics of 39 children with lactase insufficiency aged 1.5 to 12 months, and found out the formation of alimentary intolerance of lactose in children has been associated with digestive disorders at all stages: abdominal, wall and intracellular digestion with the modified state of mucosal immunity, the bowels microbiota and imbalance in the production of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines. Studying non-specific factors for the protection of mucous tunic of the digestive tract, features of mucosal immunity is very promising to decode the pathogenesis of the alimentary intolerance in children and to develop algorithms for treating and preventing this pathology.

Key words: alimentary intolerance, lactose, enterocytes, nitric oxide.