

УДК 616.34-008.314.4./6-053.3:612.396:546.17

## НИТРОКСИДЕРГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ В ПАТОГЕНЕЗЕ ПЕРСИСТИРУЮЩИХ ДИАРЕЙ У ДЕТЕЙ ПЕРВОГО ГОДА ЖИЗНИ

*Т.А. Шуматова, Н.Г. Приходченко, Л.А. Григорян, Я.Е. Павлова*

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

*Ключевые слова: персистирующие диареи, лактазная недостаточность, функциональное состояние энтероцитов, оксид азота.*

До настоящего времени остаются неизученными патогенетические механизмы развития вторичной лактазной недостаточности (ЛН) у детей, ее влияние на состояние реактивности организма ребенка, вопросы коррекции и профилактики. С целью определения взаимосвязи между структурными изменениями желудочно-кишечного тракта, оценки функционального состояния слизистой оболочки тонкой кишки по ее способности синтезировать оксид азота, было обследовано 36 детей с ЛН в возрасте от 1,5 до 12 месяцев. Полученные результаты убедительно свидетельствуют о наличии структурных изменений всех отделов желудочно-кишечного тракта при вторичной ЛН у детей. Анализ экспрессии нитроксидсинтазы клеточными элементами слизистой оболочки тонкой кишки свидетельствуют о патогенетическом участии нитроксидергических механизмов в процессах кишечного всасывания.

Острые кишечные инфекции продолжают занимать одно из ведущих мест в патологии детского возраста [2, 4, 7, 10]. Инфекционные диареи характеризуются высокой частотой развития среднетяжелых и тяжелых форм, осложнений и летальностью, особенно у детей грудного возраста, приводят к постинфекционным нарушениям пищеварения [2, 4]. Серьезную проблему у детей грудного и раннего возраста представляет рост гастроинтестинальной патологии, пищевой аллергии и персистирующих диарей, нарушающих нутритивный статус ребенка и способствующих формированию иммунологической несостоятельности естественных барьеров организма [7, 8]. По данным клинической практики, у детей чаще встречается так называемая вторичная лактазная недостаточность (гиполактазия). Установлено, что она формируется как следствие повреждения энтероцитов особенно часто на фоне острой кишечной инфекции ротавирусной этиологии [1, 6]. Существует мнение о связи персистирующей ротавирусной инфекции с формированием хронической лактазной недостаточности [5, 9]. Лактаза щеточной каймы энтероцитов по сравнению с другими дисахаридазами расположена ближе к вершине ворсин, особенно в двенадцатиперстной кишке, чем и обусловлено более частое возникновение гиполактазии при повреждении слизистой оболочки любой этиологии [6, 9]. В результате формируются полидефицитные состояния, нарушающие реактивность, физическое и нервно-психическое развитие ребенка.

Шуматова Татьяна Александровна – д-р мед. наук, профессор, заведующая кафедрой педиатрии факультета повышения квалификации ВГМУ; тел.: 8 (4232) 42-06-53.

В последние годы особый интерес исследователей вызывает молекулярная природа межклеточных взаимодействий, а именно роль оксида азота и апоптоза, что позволяет по-новому взглянуть на патогенез заболеваний, сопровождающихся нарушениями кишечного всасывания [3, 6].

Несмотря на многочисленные исследования, посвященные изучению особенностей иммунопатогенеза, диагностики и лечения вторичной лактазной недостаточности у детей, до настоящего времени многие практические вопросы решаются неоднозначно, клинический результат применения существующих протоколов терапии не всегда удовлетворителен, а проводимые меры профилактики не позволяют предупредить развитие осложнений. В связи с этим дальнейшие исследования в данной области актуальны и клинически значимы [8, 9].

Целью настоящего исследования явилась оценка состояния слизистой оболочки пищевода, желудка и тонкой кишки, а также функционального состояния слизистой оболочки тонкой кишки по ее способности синтезировать оксид азота у детей с лактазной недостаточностью.

**Материал и методы.** Обследовано 36 детей с вторичной лактазной недостаточностью (ЛН) в возрасте от 1,5 до 12 месяцев. Диагноз ЛН выставлен на основании типичной клинической картины, комплексного биохимического и копрологического исследования, положительной реакции Бенедикта. Во всех случаях уровень фекальной экскреции углеводов колебался от 0,4 до 1,65%. Всем пациентам в периоде выраженных клинических проявлений проведена эзофагогастроюноскопия с энтеробиопсией. Кроме этого, 15 детям с недостаточными прибавками массы тела в динамике и анемией выполнено повторное обследование с интервалом от 6 до 12 мес. Биопсийный материал получали через рабочий канал фиброгастроскопа PENTAX FG 24V при помощи фарцепта из тощей кишки до связки Трейца, фиксировали в параформальдегиде и использовали для приготовления гистологических срезов с последующей окраской их гематоксилином и эозином. Оценка морфологических данных проводилась с помощью световой и электронной микроскопии. Для изучения нитроксидобразующей функции слизистой оболочки биопсийный материал исследовали по методу Норе и Vincent (1989). О количественном содержании оксида азота судили по активности NADPH-диафоразы – фермента,

солокализованного в клетках с нитроксидсинтазой. Преимущество данной реакции заключается в том, что плотность образующегося осадка диформазама прямо пропорционально молекулярному содержанию нитроксидсинтазы. Количественные исследования активности NADPH-диафоразы выполнялись на микроденситометре Vickers-M85 (величина маски – 2, длина волны – 550 нм, увеличение – 400).

Контролем служил материал слизистой оболочки тонкой кишки, полученный от 8 плодов человека 20–22 недель, органы которых сформировались, но не подвергались воздействию окружающей среды (1-я группа), и 10 биоптатов тонкой кишки лиц, погибших от несчастных случаев, не имевших морфологических признаков воспаления и атрофии слизистой оболочки (2-я группа). Активность нитроксидсинтазы в эпителиоцитах ворсин и крипт в 1-й группе контроля составила  $21,5 \pm 1,3$  единицы оптической плотности (ЕОП). Активность фермента во 2-й группе контроля была равна  $41,0 \pm 2,5$  ЕОП. Учитывая незрелость слизистой оболочки тонкой кишки у плодов и гиперпродукцию оксида азота в момент болевого шока, указанные показатели имеют относительный, ориентировочный характер.

**Результаты исследования.** При эндоскопическом исследовании в периоде выраженных клинических проявлений вторичной лактазной недостаточности изменений слизистой оболочки пищевода не выявлено ни у одного пациента, в 15 случаях (41,7%) найдены воспалительные изменения слизистой оболочки желудка, в 7 (19,4%) – патология слизистой оболочки тонкой кишки. У 16 пациентов (44,4%) состояние слизистой оболочки на момент осмотра соответствовало возрастной норме. К периоду ремиссии изменения слизистой оболочки желудка и тонкой кишки сохранялись у 2 (13,3%) и 1 (6,7%) больных соответственно, а неизменная слизистая оболочка встречалась достоверно чаще – в 86,7% наблюдений. Обсемененность *Helicobacter pylori* (уреазный тест) зарегистрирована в 20% случаев. У 2/3 пациентов кислотообразующая функция желудка была сохранена, у 1/3 – повышена. При динамическом наблюдении за 15 детьми в периоде ремиссии на фоне диетотерапии, при исчезновении клинических проявлений заболевания воспалительные изменения слизистой оболочки желудка практически полностью купировались и сохранились лишь в 2 случаях по типу поверхностной (эритематозной) гастропатии.

Отсутствие структурных изменений слизистой оболочки пищевода подтверждено выборочными биопсиями, при этом в биоптатах определялся многослойный плоский неороговевающий эпителий без патологических изменений. В биоптатах слизистой оболочки желудка воспалительные изменения были подтверждены у 8 больных. Гистологическое изучение слизистой оболочки тонкой кишки у 36 детей на фоне клинических проявлений лактазной недостаточности существенных изменений структуры кишечных вор-

син и энтероцитов не выявило. У 12 больных (33,3%) отмечалось небольшое уменьшение длины ворсин (до  $487,8 \pm 2,0$  мкм) без углубления крипт ( $71,8 \pm 6,6$  мкм). Соотношение длины ворсин к глубине крипт соответствовало  $2,83 \pm 0,01$ . Однако структура энтероцитов не имела существенных отклонений от нормы.

Специфических для лактазной недостаточности изменений структуры кишечных ворсин и энтероцитов выявлено не было. В то же время в собственной пластинке слизистой оболочки отмечалось увеличение интенсивности клеточной реакции за счет лимфоцитов и плазматических клеток. Повторное изучение биоптатов у 15 детей в периоде нормализации процессов кишечного всасывания при дисахаридазной недостаточности показало полное восстановление структуры тонкой кишки. При электронномикроскопическом исследовании слизистой оболочки тонкой кишки были выявлены энтероциты, в цитоплазме которых определялось большое количество митохондрий, рибосом, эндоплазматического ретикулаума, что свидетельствует о компенсаторной реакции и большой физиологической нагрузке клеток.

Количественное определение нитрооксидсинтазы в клетках слизистой оболочки у детей с ЛН показало повышение ее активности в энтероцитах ворсин и крипт. Диформазама окрашивал клетки в интенсивно-синий цвет. Максимальная способность к синтезу оксида азота установлена в энтероцитах ворсин. Активность фермента здесь составила  $109,61 \pm 1,70$  ЕОП. 52,7% клеток, расположенных в криптах, содержали на 52,7% фермент средней активности, 71,5% энтероцитов ворсин обладали способностью к высокой продукции оксида азота, 25,2% клеток содержали фермент средней активности, и лишь единичные энтероциты проявляли слабую нитроксидаобразующую способность. Бокаловидные клетки были диафоразо-негативными. Наряду с указанными структурами синюю окраску приобретали клетки концевых отделов желез. Эндотелий сосудов имел голубую окраску.

В стадии полной клинической ремиссии на фоне низколактозной и безлактозной диеты и восстановления структуры слизистой оболочки регистрировали значительное снижение нитроксидсинтазной активности клеток. Подавляющее большинство энтероцитов содержало осадок диформазама низкой и средней плотности, слабая нитроксидсинтезирующая способность появлялась у бокаловидных клеток – отложение окрашенных гранул по периферии цитоплазмы.

**Обсуждение полученных данных.** Анализ приведенных данных позволяет считать, что наряду с ведущим механизмом формирования персистирующих диарей у пациентов с лактазной недостаточностью регистрируется нарушение всех этапов пищеварения: полостного, пристеночного, внутриклеточного. Полученные данные убедительно свидетельствуют о наличии структурных изменений всех отделов желудочно-кишечного тракта при персистирующих диареях у детей. Длительное нарушение расщепления

сахаров сопровождается вовлечением в патологический процесс слизистой оболочки желудка и тонкой кишки, печени и поджелудочной железы, однако данные изменения у большинства пациентов носят транзиторный характер. Имеются сведения, что изменения при дисахаридазной недостаточности не являются специфичными и связаны с вторичной бактериальной обсемененностью в тонкой кишке, которая не влечет за собой грубого нарушения архитектоники слизистой оболочки и, возможно, обусловлена глистной и лямблиозной инвазией [5, 9].

Изучена способность клеточных структур слизистой оболочки тонкой кишки у детей с ЛН синтезировать оксид азота. В то время как основные публикации по данной теме посвящены роли оксида азота в регуляции сердечно-сосудистой, иммунной, нервной, дыхательной систем организма, влияние оксида азота на систему пищеварения и его роль в процессах всасывания изучены недостаточно [3, 11, 12].

При сопоставлении показателей активности синтеза оксида азота структурами слизистой оболочки тонкой кишки у детей с ЛН выявлено, что наиболее высокая активность нитроксидсинтазы установлена в случаях с дисахаридазной недостаточностью ( $109,61 \pm 1,70$  ЕОП) в период выраженных клинических проявлений со структурными изменениями слизистой оболочки тонкой кишки, а купирование клинических проявлений приводит к уменьшению активности энзима в эпителиоцитах.

Проведенный анализ экспрессии нитроксидсинтазы клеточными элементами слизистой оболочки тонкой кишки у детей со вторичной ЛН свидетельствует о патогенетическом участии нитроксидергических механизмов в процессах кишечного всасывания. Гиперпродукция оксида азота является защитной реакцией, направленной на адаптацию к изменившимся условиям существования клетки и переход ее на более экономный (нитритный) путь дыхания. С другой стороны, образовавшиеся биологически активные молекулы пероксинитрита и активные формы кислорода токсически воздействуют на эпителий кишечника, ускоряя явления апоптоза, и, вероятно, являются причиной атрофических изменений слизистой оболочки кишечника и развития полидефицитных состояний у детей при длительном течении процесса.

Таким образом, при вторичной лактазной недостаточности, формирующейся на фоне перенесенной кишечной инфекции, нарушается морфофункциональная активность энтероцитов. Гиперпродукция оксида азота с образованием его активных метаболитов оказывает токсическое воздействие на эпителиоциты кишечника, их ферментные системы, нарушает и внутриклеточный этап пищеварения. Существует прямая связь между уменьшением клинических проявлений синдрома мальабсорбции и процессами восстановления структуры слизистой оболочки тонкой

кишки. Установленные закономерности открывают перспективы для разработки новых диагностических тестов и расширяют возможности для поиска новых, патогенетически обоснованных вариантов терапии у данной категории больных. Применение гистохимического и иммуногистохимического исследования биоптатов слизистой тонкой кишки в сложных диагностических случаях позволит правильно поставить диагноз, своевременно назначить соответствующее лечение, уменьшить количество осложнений.

#### Литература

1. Белан Ю.Б., Полянская Н.А. Особенности клинического течения моно- и микст-вариантов ротавирусной инфекции у детей раннего возраста // РМЖ. 2008. Т. 16, № 18. С. 1190–1193.
2. Бельмер С.В., Гасилина Э.Я. Хронические диареи у детей: дифференциальная диагностика и общие принципы лечения // Фарматека. 2005. № 14 (109). С. 40–46.
3. Ванин А.Ф. Оксид азота в биомедицинских исследованиях // Вестн. РАМН. 2000. № 4. С. 3–5.
4. Запруднов А. М. Харитонов Л. А. Хроническая диарея у детей // Российский вестник перинатологии и педиатрии. 2005, № 4. С. 36–41.
5. Мухина Ю.Г., Чубарова А.И., Гераскина В.П. Современные аспекты проблемы лактазной недостаточности у детей раннего возраста // Вopr. детской диетологии. 2003. Т.1, № 1. С. 50–56.
6. Campbell A.K., Waud J.P., Matthews S.B. The molecular basis of lactose intolerance // Sci Prog. 2009. No. 92. P. 241–287.
7. Chouraqui J.P., Michard-Lenoir A.P. Feeding infants and young children with acute diarrhea // Arch Pediatr. 2007. No. 3. P. 176–180.
8. Hosoyamada T. Clinical studies of pediatric malabsorption syndromes // Fukuoka Igaku Zasshi. 2006. No. 97 (11). P. 322–350.
9. Hutvra T., Iwańczak B. Lactose intolerance: pathophysiology, clinical symptoms, diagnosis and treatment // Pol Merkur Lekarski. 2009. No. 26. P. 148–155.
10. Jankowiak C., Ludwig D. Frequent causes of diarrhea: celiac disease and lactose intolerance // Med Klin (Munich). 2008. No. 15. P. 413–422.
11. Mishra O.P., Dhawan T., Singla P.N. et al. Endoscopic and histopathological evaluation of preschool children with chronic diarrhoea // J. Trop. Pediatr. 2001. Vol. 47, No. 2. P. 77–80.
12. Oyama J. NO, cell death and heart failure // J. Oyama, S. Frantz, J. Blais // Heart Fail. Rev. 2002. Vol. 7, No. 4. P. 327–334.

Поступила в редакцию 26.02.2010.

#### NITROXIDERGIC MECHANISMS IN PATHOGENESIS OF PERSISTENT INFANTS' DIARRHEA

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

**Summary** – To this day, the pathogenetic mechanisms of secondary lactase deficiency in infants, its influence on the stress state and issues of its treatment and prevention still remain unstudied. To identify ties between the structural changes in the gastrointestinal tract, estimate the functional state of the mucous membrane of small bowel by its capability to produce nitric oxide, the authors have examined 36 infants aged 1.5 to 12 months with lactase deficiency. The findings are reliably indicative of available structural changes in the entire gastrointestinal tract in case of infants' lactase deficiency. The analysis of expression of NO synthase with cell elements of the mucous membrane of the small bowel is indicative of the pathogenetic role of NO mechanisms in the intestinal absorption processes.

**Key words:** persistent diarrhea, lactase deficiency, functional state of enterocytes, nitric oxide.

Pacific Medical Journal, 2010, No. 3, p. 59–61.