

КЛИНИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ИНВАЗИВНЫХ И НЕИНВАЗИВНЫХ МЕТОДОВ ПРИ ДИАГНОСТИКЕ АЛЛЕРГИЧЕСКОЙ ЭНТЕРОПАТИИ У ДЕТЕЙ

Шуматова Т.А.¹, Приходченко Н.Г.¹, Зернова Е.С.¹, Ни А.Н.¹, Григорян Л.А.¹, Катенкова Э.Ю.¹, Шишацкая С.Н.¹

¹Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Владивосток, e-mail: kate-zernova@mail.ru

С целью клинической оценки инвазивных и неинвазивных методов диагностики аллергической энтеропатии у 39 детей раннего возраста в сыворотке крови определено содержание интестинальной формы белка, связывающего жирные кислоты (I-FABP), тумор-некротического фактора α (TNF- α), в копрофильтратах проведено определение TNF- α и его растворимых рецепторов sTNF RI, sTNF RII. Проведенное исследование показало, что развитие аллергической энтеропатии у детей сопровождается морфологическими изменениями с нарушением барьерной функции кишечника, повышением I-FABP, TNF- α сыворотки крови, фекальных уровней зонулина, TNF- α и его растворимого рецептора TNF- α II ($p < 0,05$). Определение биомаркеров в копрофильтратах малоинвазивно, высокоинформативно и позволяет достоверно выявить характер и глубину поражения гастроинтестинальной зоны у детей, способствует определению правильной тактики лечения. Отсутствие противопоказаний позволяет использовать определение фекальных маркеров как в острый период, так и в период ремиссии и перспективно для контроля над течением заболевания и его прогнозированием.

Ключевые слова: аллергическая энтеропатия, дети раннего возраста, белки, связывающие жирные кислоты (FABP), зонулин, тумор-некротический фактор- α (TNF- α)

CLINICAL EVALUATION INVASIVE AND NON-INVASIVE METHOD IN THE DIAGNOSIS OF ALLERGIC ENTEROPATHY IN CHILDREN

Shumatova T.A.¹, Prikhodchenko N.G.¹, Zernova E.S.¹, Nee A.N.¹, Grigoryan L.A.¹, Katenkova E.Y.¹, Shishackaya S.N.¹

¹ Pacific State Medical University, Vladivostok, e-mail: kate-zernova@mail.ru

With a view to clinical evaluation of invasive and non-invasive methods of diagnosis of allergic enteropathy in 39 infants in the serum determined the content of intestinal form of the protein, fatty acid binding (I-FABP), a tumor-necrosis factor α (TNF- α), held in coprofiltrates definition TNF- α and its soluble receptors, sTNF RI, sTNF RII. The study showed that the development of allergic malabsorption in children accompanied by morphological changes violation intestinal barrier function and increase I-FABP, TNF- α serum, fecal levels of zonulin, TNF- α and its soluble receptor TNF- α II ($p < 0,05$). Determination of serum biomarkers and coprofiltrates minimally invasive, highly informative, and can reliably identify the nature and depth of the lesion area of gastrointestinal in children helps to determine the correct tactics of treatment. The absence of contraindications allows determination of fecal markers in the acute phase and in remission and promising to control the course of the disease and the process of forecasting.

Keywords: allergic enteropathy, young children, binding proteins, fatty acids, zonulin, tumor-necrosis factor- α (TNF- α)

Актуальность

В настоящее время для понимания патогенеза многих заболеваний большое внимание уделяется роли барьерных органов и оценке их функционального состояния, фундаментальную роль при этом играет желудочно-кишечный тракт [1, 2, 3, 7]. Согласно современным представлениям изменение состояния слизистой оболочки кишечника и нарушение его барьерной функции под влиянием врожденных или приобретенных факторов является причиной нарушения формирования оральной толерантности и развития целого ряда различных патологических состояний, включая пищевую аллергию, целиакию,

воспалительные заболевания кишечника, системные заболевания [2, 3, 4, 12, 14]. Тяжелые, длительно протекающие формы алергоэнтеропатии способствуют появлению иммунологической несостоятельности, вызывают нарушение водно-электролитного баланса организма, приводят к формированию полидефицитных состояний, белково-энергетической недостаточности, создавая так называемый порочный круг и усугубляя патологические гастроинтестинальные проявления, способствуя развитию токсических, дистрофических состояний, явлений поливалентной пищевой непереносимости. В целях профилактики развития подобных состояний в настоящее время интенсивно разрабатываются методы диагностики нарушения проницаемости кишечного барьера с использованием различных методик [11]. Однако высокая инвазивность основных методов диагностики ограничивает их рутинное использование в клинической практике и затягивает постановку диагноза, способствует формированию хронических заболеваний, полидефицитных состояний [7]. В связи с этим разработка и внедрение в клиническую практику неинвазивных методов диагностики, своевременное прогнозирование заболевания и проведение предиктивной терапии особенно актуальны в педиатрической практике.

Цель настоящего исследования — провести клиническую оценку инвазивных и неинвазивных методов для диагностики алергической энтеропатии у детей.

Материал и методы исследования. Под наблюдением находились 39 детей (основная группа) с алергической энтеропатией, индуцированной белком коровьего молока, в возрасте от 5 до 12 месяцев. Диагностика заболевания осуществлялась в соответствии с федеральными клиническими рекомендациями (2015), рекомендациями Европейского общества детских гастроэнтерологов, гепатологов и нутрициологов (ESPGAN, 2012), Европейской академии алергологии и клинической иммунологии (EAACI, 2014) [6, 8, 10]. Группу сравнения (II группа) составили 20 детей, сопоставимых по полу и возрасту, с неотягощенным алергологическим анамнезом. Все родители пациентов дали письменное согласие на участие в исследовании.

В сыворотке крови у детей определяли кишечную фракцию белков, переносящих жирные кислоты, — (I-FABP) с использованием реактивов фирмы Hycult Biotech (США) на иммуноферментном автоматическом 2-планшетном анализаторе EVOLIS Twin Plus производства Bio-Rad (США), а также тумор-некротический фактор- α (TNF- α), исследование которого проводилось в сыворотке крови стандартным сэндвич-методом непрямой иммунофлюоресценции. Наряду с многократным копрологическим исследованием у детей в кале определяли содержание зонулина с использованием реактивов фирмы Immundiagnostik (Германия) методом энзим-связанного иммуносорбентного анализа (ELISA). Иммунологическое исследование копрофильтратов на содержание TNF- α и его

трансмембранных растворимых рецепторов sTNFR1, sTNFR2 проводили с помощью реактивов фирмы «BSM» (USA) методом энзим-связанного иммуносорбентного анализа (ELISA). Учет результатов производили с помощью иммуноферментного анализатора «Multiscan» (Франция).

Оценку полученных результатов и комплексный системный анализ данных проводили методом вариационной статистики. Проверку гипотезы нормальности распределения количественных признаков в группах проводили с помощью критериев Колмогорова, Шапиро—Уилка и критерия согласия Пирсона χ^2 . Для всех количественных признаков в сравниваемых группах производилась оценка средних арифметических (M), среднеквадратических (стандартных) ошибок среднего (m), доверительного коэффициента Стьюдента (t) при заданном уровне значимости (p). Различия во всех случаях считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Оценку результатов исследования осуществляли с использованием пакета программного обеспечения Statistica 10 (StatSoft Inc., США) и Excel (Microsoft, США). Для оценки связи признаков применялся корреляционный анализ по методу Пирсона.

Результаты исследования. При оценке анамнеза четкие указания на аллергические реакции, связанные с белком коровьего молока, отмечены у 37 (94,7%) детей. Так, у большинства из них (89,7%) начало заболевания совпало с введением в питание детских молочных смесей и проявлялось в виде кожных высыпаний или гастроинтестинальных симптомов (колики, срыгивания, неустойчивый стул). У детей, находившихся на грудном вскармливании, во всех случаях выявлены докорм молочными смесями, а также употребление матерью значительного количества молочносодержащих продуктов во время лактационного периода. У 26 детей (66,6%) дебют заболевания ассоциировался с развитием гастроинтестинального синдрома, в 33,4% случаев первые проявления аллергии носили характер сочетанной кожно-гастроинтестинальной симптоматики. У детей регистрировали: учащенный стул водянистого характера, пенистый, с кислым запахом (100%), срыгивания у 24 (85,7%), рвоту у 4 (14,28%). Для пациентов были характерны метеоризм (в 92,16% случаев), флатуленция (87,04%), кишечные колики (92,16%). Выраженность проявлений атопического дерматита (АД) на момент обследования оценивалась по индексу SCORAD. Легкие проявления АД (SCORAD < 20) отмечались у 12 больных (30,7%), среднетяжелые (SCORAD – 20–60) у 18 детей (46,1%) и тяжелые (SCORAD > 60) – у 9 детей (23,2%). К началу исследования 9 (23,2%) детей находились на естественном вскармливании, 13 (33,3%) – на смешанном и 17 (43,5%) – на искусственном вскармливании. УЗИ брюшной полости выявило у 31 (79,4%) детей реактивные изменения поджелудочной железы, у 24 (61,4%) пациентов – признаки дисфункции билиарного тракта.

При эндоскопическом обследовании с последующим морфологическим изучением слизистой оболочки тонкой кишки (СОТК) определялись зоны гиперемии и отека. Обращало на себя внимание наличие у 21 из 39 обследованных детей лимфонодулярной гиперплазии, которая является характерным эндоскопическим признаком аллергического поражения слизистой оболочки тонкой кишки. У 17 больных также были выявлены снижение высоты и сглаженности складок, нарушение макрорельефа слизистой луковицы двенадцатиперстной кишки. У данных пациентов определялись рыхлость, белёсость СОТК с явлениями атрофии (ворсинчатый аппарат при этом не визуализировался) и симптом «манной крупы».

Анализ срезов, полученных из биоптатов СОТК у наблюдаемых пациентов, показал сглаженность слизистой оболочки, при этом определялись лишь единичные деформированные (короткие и широкие) ворсины, длина крипт заметно увеличивалась. Эпителий ворсинок и крипт был обильно инфильтрирован интраэпителиальными лимфоцитами, плазматическими клетками. Регистрировали единичные эозинофилы, что подтверждало наличие иммунологической реакции.

В последние годы большой интерес вызывает внедрение в практику исследований, основанных на определении уровня маркеров воспаления и повреждения кишечника в различных биологических жидкостях [4, 5, 9].

Мы определили I-FABP в сыворотке крови у обследуемых детей. Нами получены следующие результаты. Содержание в крови I-FABP у детей с аллергоэнтеропатией составило $120,92 \pm 8,79$ пг/мл и было достоверно выше, чем в контрольной группе ($19,21 \pm 1,94$ пг/мл, $p < 0,05$).

В нашем исследовании выявлено, что у больных основной группы содержание TNF- α в сыворотке крови в 6,4 раза превышало показатели контрольной группы и составило $13,85 \pm 0,91$ ммоль/л и $2,17 \pm 0,19$ ммоль/л соответственно ($p < 0,05$).

В копрофильtrate определяли содержание зонулина, тумор-некротического фактора- α (TNF- α) и его растворимых рецепторов sTNF RI, sTNF RII (табл.).

Содержание зонулина, TNF- α и его растворимых рецепторов в копрофильтраатах у детей

Показатели	Основная группа (n =39)	Контрольная группа (n =20)	Достоверность
Зонулин (нг/мл)	$1,75 \pm 0,16$	$0,75 \pm 0,01$	$p < 0,05$
TNF- α (ммоль/л)	$31,04 \pm 2,71$	$4,08 \pm 0,56$	$p < 0,001$
sTNF RI (нг/мл)	$0,14 \pm 0,04$	$0,12 \pm 0,05$	$p > 0,05$
sTNF RII (нг/мл)	$0,89 \pm 0,05$	$0,68 \pm 0,06$	$p < 0,05$

Человеческий зонулин является единственным обнаруженным на сегодняшний день физиологическим посредником, регулирующим проницаемость кишечника [9]. Содержание зонулина в копрофильтратах у детей основной группы в 2,3 раза превышало показатели группы контроля. Выявлена умеренная линейная прямая корреляционная взаимосвязь между уровнем I-FABP крови и зонулина в копрофильtrate ($r_s = 0,24$, $p < 0,05$) у детей с аллергоэнтеропатией.

При исследовании TNF- α в копрофильтратах были получены данные, свидетельствующие о достоверном его повышении только у детей основной группы. Уровень TNF- α в копрофильтратах ($31,04 \pm 2,71$) ммоль/л у пациентов основной группы в 7,6 раза превышал показатели, определяемые у здоровых детей ($p < 0,001$). Проведенный анализ показал наличие линейной прямой средней степени выраженности корреляционной связи между уровнем TNF- α в крови и кале ($r_s = 0,69$, $p < 0,05$) у детей с аллергоэнтеропатией.

Изучение содержания растворимых рецепторов к TNF- α I типа (sTNF RI) в копрофильтратах показало отсутствие достоверных ($p > 0,05$) различий у пациентов основной и контрольной групп. Представленность рецепторов sTNF RII TNF- α у детей основной группы в копрофильтратах была достоверно ($p > 0,05$) выше, чем у здоровых детей, зарегистрирована тенденция к более выраженной представленности рецепторов sTNF RII у больных с аллергоэнтеропатией на фоне выраженных клинических проявлений.

Обсуждение полученных результатов. Участие в осуществлении основных метаболических и барьерных функций, поддержании межорганных и межсистемных связей определяет важную роль кишечника в адаптационных реакциях организма. Одним из важнейших условий развития пищевой оральной толерантности является состоятельность пищеварительного барьера, селективно защищающего организм от антигенных субстанций. В этой защите играет большую роль структурно-функциональная состоятельность кишечного эпителиального барьера.

Одним из обещающих методов оценки повреждения энтероцитов является метод обнаружения в моче или плазме эндогенных белков энтероцитов. Среди них — низкомолекулярные белки, связывающие жирные кислоты (FABP) [9, 12, 13]. Тканеспецифичным для кишечника является изоформа (I)-FABP. Он локализован в клетках на вершинах ворсинок, попадает в циркуляцию при деструкции. FABP — точный маркер острого повреждения клеток, и исследование концентрации потенциально применимо для исследования повреждения энтероцита. Нарушение целостности кишечного барьера у детей с аллергоэнтеропатией сопровождается существенным увеличением содержания I-FABP в сыворотке крови.

В норме кишечный барьер непроницаем для макромолекул, в том числе для FABP.

Именно утрата эпителиальных барьерных функций может вызывать неконтролируемое поступление пищевых антигенов из просвета кишки в lamina propria с последующей презентацией их иммунной системе и развитием энтеропатии. Недавние исследования, которые были сфокусированы на раннем воздействии пищевых антигенов глина на слизистую оболочку кишки, показали, что глиадин способен активировать образование зонулина, в результате чего происходит быстрое снижение барьерных функций эпителия и усиливается проникновение макромолекул в подслизистый слой [11]. В эксперименте показано, что после стимуляции нормальных клеток кишечного эпителия зонулин через протеинкиназу С индуцирует полимеризацию внутриклеточных нитей актина, которые прямо связаны с комплексом белков межклеточных соединений, в результате усиливается проницаемость эпителиального барьера [14]. Вероятно, пищевые антигены вызывают высвобождение зонулина у детей с аллергоэнтеропатией, и обнаруженное нами повышение его уровня в копрофильtrate приводит к увеличению проницаемости СОТК.

TNF- α играет важную роль в формировании специфического иммунного ответа, избыток этого цитокина создает условия для поддержания и дальнейшего развития хронического воспаления в слизистой оболочке путем снижения процессов антиинфекционной защиты, формирования локального иммунодефицитного состояния и усиления повреждающего действия различных антигенов и патогенных микроорганизмов. Кроме того, высокий уровень TNF- α увеличивает проницаемость капилляров, повреждая эндотелий сосудов, повышая синтез нейтрофилами и моноцитами молекул эндотелиальной лейкоцитарной и внутрисосудистой адгезии. Выявленное локальное повышение TNF- α благодаря многочисленным эффектам может играть важную роль в процессах повреждения мукоэпителиального барьера слизистой оболочки кишки.

Нами выявлено повышение уровня растворимого рецептора TNF- α RII в копрофильtrатах у больных основной группы, в то время как активность растворимого рецептора TNF- α RI существенно не отличалась от показателей контрольной группы. Вероятно, что возрастание содержания растворимых форм рецептора (sTNF RII) к TNF- α является одним из механизмов снижения синтеза этого цитокина у пациентов с воспалительным процессом в кишечнике, в том числе аллергического характера. Поэтому исследование на содержание растворимых рецепторов к TNF- α II типа в копрофильtrатах у детей первого года жизни является одним из диагностических неинвазивных маркеров, подтверждающих наличие аллергической энтеропатии.

Заключение

Таким образом, на сегодняшний день имеются различные тесты на состоятельность кишечного барьера и проницаемость кишечника. Проведенное исследование показало, что

развитие аллергоэнтеропатии у детей сопровождается морфологическими изменениями, нарушением барьерной функции кишечника, повышением I-FABP, TNF- α сыворотки крови, а также фекальных уровней зонулина, TNF- α и его растворимого рецептора TNF- α II. Определение биомаркеров в сыворотке крови и копрофильтратах малоинвазивно, высокоинформативно и позволяет достоверно выявить характер и глубину поражения гастроинтестинальной зоны у детей, способствует определению правильной тактики лечения. Отсутствие противопоказаний позволяет использовать анализ содержания фекальных маркеров как в острый период, так и в период ремиссии и перспективно для контроля над течением заболевания и прогнозирования процесса.

Список литературы

1. Гастроинтестинальные проявления аллергии на белок коровьего молока у детей / С.Г. Макарова, Л.С. Намазова-Баранова, Т.Э. Боровик и др. // Медицинский совет. — 2014. — № 1. — С. 28–34.
2. Пампура А.Н. Пищевая аллергия у детей раннего возраста / А.Н. Пампура, Е.Е. Варламов, Н.Г. Конюкова // Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского. — 2016. — Т. 95. — № 3. — С. 152–157.
3. Принципы персонализированной диетотерапии при аллергии к белкам коровьего молока у детей / В.А. Ревякина, И.А. Ларькова, Е.Д. Кувшинова и др. // Российский аллергологический журнал. — 2015. — № 2. — С. 47–51.
4. Современные лабораторные методы диагностики пищевой непереносимости / М.Ю. Розенштейн, А.З. Розенштейн, С.Э. Кондаков, Н.А. Черевко // Бюллетень сибирской медицины. — 2016. — Т. 15. — № 1. — С. 69–78.
5. Современные маркеры в диагностике пищевой непереносимости у детей грудного возраста / Т.А. Шуматова, С.Н. Шишацкая, Е.С. Зернова и др. // Тихоокеанский медицинский журнал. — 2015. — № 3. — С. 55–58.
6. Федеральные клинические рекомендации по оказанию медицинской помощи детям с аллергией к белкам коровьего молока // Под ред. Баранова А.А., Намазовой-Барановой Л.С. М.: Союз педиатров России, 2015. — 28 с.
7. Чебуркин А.А. Диагностика аллергической и неаллергической формы пищевой непереносимости у детей / А.А. Чебуркин // Вопросы современной педиатрии. — 2013. — Т. 12, № 2. — С. 44–51.
8. Anaphylaxis: guidelines from the European Academy of Allergy and Clinical Immunology. EAACI Food Allergy and Anaphylaxis Guidelines Group./ Muraro A., Roberts G., Worm M. et al.

// Allergy. – 2014. — Vol. 69, № 8. — P. 1026–1045.

9. Biomarkers of Environmental Enteropathy, Inflammation, Stunting, and Impaired Growth in Children in Northeast Brazil / Guerrant R. L., Leite A. M., Pinkerton R. et al. // PLoS One. – 2016. — Vol. 11, № 2. — P. 342–348.

10. Diagnostic approach and management of cow's-milk protein allergy in infants and children: ESPGHAN GI committee practical guidelines // Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition. — 2012. — Vol. 55, № 2. — P. 221–229.

11. Effect of gliadin on permeability of intestinal biopsy explants from celiac disease patients and patients with non-celiac gluten sensitivity / Hollon J., Puppa E. L., Greenwald B. et al. // Nutrients. – 2015. — Vol. 27, № 3. — P. 1565–1576.

12. Gajda A. M. Enterocyte fatty acid-binding proteins (FABPs): different functions of liver and intestinal FABPs in the intestine / A. M. Gajda, J. Storch // Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. — 2015. — № 93. — P. 9–16.

13. Intestinal fatty acid-binding protein (I-FABP) as a new biomarker for intestinal diseases / H. Funaoka, T. Kanda, H. Fujii et al. // The Japanese Journal of Clinical Pathology. — 2010 Feb. — Vol. 58, № 2. — P. 162–168.

14. The role of serum intestinal fatty acid binding protein levels and D-lactate levels in the diagnosis of acute intestinal ischemia / Shi H, Wu B, Wan J et al. // Clinical Research of Hepatology and Gastroenterology. — 2015. — Vol. 39, № 3. — P. 373–378.