

УДК 616-056.43-02:613.287-078

DOI: 10.17238/PmJ1609-1175.2017.2.18-21

## Зонулин, фактор некроза опухоли- $\alpha$ и оксид азота в диагностике IgE-зависимой и IgE-независимой пищевой аллергии у детей

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

Тихоокеанский государственный медицинский университет (690960, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2)

Для оценки фекального уровня зонулина, фактора некроза опухоли- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) и метаболитов оксида у детей с гастроинтестинальными формами пищевой аллергии (ПА) и определения их патогенетической значимости в диагностике IgE-зависимой и IgE-независимой форм проведено клинико-лабораторное обследование 39 детей с ПА к белку коровьего молока. Обнаружено увеличение содержания зонулина и TNF $\alpha$ , более выраженное при IgE-независимой ПА. Фекальный уровень метаболитов оксида азота при IgE-зависимой ПА превышал показатели контрольной группы, а у детей с IgE-независимой ПА уровень этих метаболитов был достоверно ниже. Отсутствие противопоказаний позволяет использовать анализ содержания указанных маркеров, как в острый период, так и в период ремиссии ПА, что перспективно для донозологической диагностики этой патологии у детей.

**Ключевые слова:** аллергические реакции, кишечная проницаемость, белок коровьего молока, копрофильтраты.

Пищевая гиперчувствительность и пищевая аллергия (ПА) считаются одной из актуальнейших проблем современной педиатрии и аллергологии [3, 9, 10]. Многообразие клинических проявлений, отсутствие общепринятой классификации, возможности «безграничной интерпретации неизвестных» механизмов реакций на пищевые продукты сегодня зачастую приводят к сомнительному диагнозу и неоправданным ограничениям рациона питания. Особенно актуально этот вопрос стоит у детей раннего возраста в период формирования оральной толерантности к пище [2, 3]. ПА – первая по времени развития сенсибилизация – играет огромную роль в формировании и последующем развитии большинства кожных, гастроинтестинальных и респираторных проявлений аллергии. Сложность проблемы заключается и в том, что непереносимость пищевых продуктов может быть обусловлена различными механизмами [9, 10]. Так, под термином ПА в настоящее время объединяется группа IgE-зависимых и IgE-независимых патологий. Критерии диагностики заболеваний, сопровождающихся гастроинтестинальной пищевой аллергией, основываются на анамнезе, комплексном клинико-лабораторном и инструментальном исследовании [2, 3, 7]. Наибольшую трудность представляет диагностика IgE-независимой ПА в связи с отсутствием стандартизированных реагентов и методов [10]. Установление точного диагноза особенно важно у детей первых лет жизни, поскольку ошибка здесь чревата развитием жизнеугрожающих реакций или назначением необоснованных ограничительных диет [2]. Для совершенствования диагностики ПА, выделения групп риска, определения ранних критериев заболевания и динамического контроля за состоянием больного в педиатрической практике необходимо более широкое использование новых патогенетически

обоснованных методов с применением более эффективных маркеров [1, 3, 4, 9, 10].

Рядом исследований было установлено, что повышение проницаемости слизистой оболочки кишечника для макромолекул предшествует развитию клинических проявлений ПА у детей [5, 6, 12]. Важным регулятором проницаемости является зонулин, пептид с молекулярной массой 47 кДа [3]. Некоторые медиаторы воспаления, такие как фактор некроза опухоли- $\alpha$  (tumor necrosis factor alpha – TNF $\alpha$ ) и метаболиты оксида азота, также способны усиливать проницаемость эпителия и эндотелия [1, 7, 13]. Имеются немногочисленные исследования, посвященные изучению уровней зонулина, TNF $\alpha$  и метаболитов оксида азота в патогенезе ряда заболеваний пищеварительного тракта и некоторых форм ПА у детей [5], однако в доступной нам литературе не удалось найти комплексной оценки этих показателей с определением их патогенетической значимости при IgE-зависимой и IgE-независимой ПА у детей.

### Материал и методы

Проведено клинико-лабораторное обследование 39 детей с ПА к белку коровьего молока в возрасте от 6 месяцев до 3 лет (I группа). Диагноз был поставлен в соответствии с федеральными клиническими рекомендациями (2015), рекомендациями Европейского общества детских гастроэнтерологов, гепатологов и нутрициологов (ESPGAN, 2012), Европейской академии аллергологии и клинической иммунологии (EAACI, 2014). Группу сравнения (II группа) составили 30 детей, сопоставимых по полу и возрасту, с неотягощенным аллергологическим анамнезом. Критериями исключения были сердечно-сосудистая патология, сахарный диабет и другие хронические заболевания, а также пороки развития. Пациенты I группы были разделены на две подгруппы:

Приходченко Нелли Григорьевна – канд. мед. наук, доцент Института педиатрии ТГМУ; e-mail: prikhodchenko\_n@mail.ru

1А – 18 детей с IgE-зависимой ПА, имевшие повышенный уровень IgE; 1Б – 21 ребенок с IgE-независимой ПА. В подгруппе 1А медиана содержания IgE равнялась 88,25 МЕ/мл (95 %-ный доверительный интервал – 52,18–185,98 МЕ/мл), в подгруппе 1Б – 15 МЕ/мл (95 %-ный доверительный интервал – 7,9–23 МЕ/мл). Родители всех пациентов дали письменное согласие на участие в исследовании. Работа выполнена с учетом требований Хельсинской декларации Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными приказом МЗ РФ от 19.06.2003 г., № 266.

Наряду с многократным копрологическим исследованием у детей в кале определяли содержание зонулина с использованием реактивов фирмы Immunodiagnostik (Германия) методом энзим-связанного иммуносорбентного анализа (ELISA). Иммунологическое исследование копрофильтратов на содержание TNF $\alpha$  проводили с помощью реактивов фирмы BSM (США) методом энзим-связанного иммуносорбентного анализа (ELISA). Концентрацию метаболитов оксида азота в копрофильтратах определяли с помощью иммуноферментного анализа и набора Total Nitric Oxide and Nitrate/Nitrite Parameter Assay Kit (R&D Systems, США).

Статистическую обработку полученных данных выполняли с помощью специализированных пакетов прикладных программ (Excel 2010 и Statistica 10). Описательная статистика исследуемых качественных признаков представлена абсолютными значениями, процентными долями и их стандартными ошибками.

#### Результаты исследования

При оценке анамнеза четкие указания на аллергические реакции, связанные с белком коровьего молока, отмечены у 37 детей. Так, у большинства из них (89,7 %) начало заболевания совпало с введением в питание детских молочных смесей и проявлялось кожными высыпаниями или гастроинтестинальными симптомами (колики, срыгивания, неустойчивый стул). У детей, находившихся на грудном вскармливании, во всех случаях выявлен докорм молочными смесями, а также употребление матерью значительного количества молокосодержащих продуктов во время лактационного периода. У 26 детей (66,6 %) дебют заболевания ассоциировался с развитием гастроинтестинального синдрома, в 33,4 % случаев впервые возникшие проявления аллергии носили характер сочетанной кожно-гастроинтестинальной симптоматики. У всех пациентов I группы отмечалось длительное нарушение консистенции и частоты стула, вздутие живота, срыгивание, снижение аппетита, отсутствие достаточных прибавок в массе тела, развивались дефицитные состояния (анемия, рахит). У этих детей регистрировали: учащенный стул водянистого характера, пенистый, с кислым запахом (100 %), срыгивания (16 случаев – 88,9 %), рвоту (4 случая – 22,3 %). Были характерны метеоризм (94,5 %

случаев), флатуленция (88,9 % случаев), кишечные колики (83,4 % случаев). Копрологические нарушения отличались умеренной выраженностью: смешанная стеаторея – у 15 (53,6 %), стеаторея II типа – у 14 (46,1 %), амилорея – у 27 (94,7 %), креаторея – у 14 (46,1 %), перевариваемая клетчатка – у 19 (58,9 %), йодофильная флора – у 24 (87 %) детей. Водородный показатель кала составлял в среднем  $5,47 \pm 0,32$ .

У всех пациентов клиника персистирующей диареи сочеталась с кожным синдромом, проявлявшимся локальным поражением (до 5 % поверхности тела), гиперемией, отеком, шелушением, эксфолиациями. Выраженность проявлений на момент обследования оценивалась по индексу SCORAD. Легкие признаки атопического дерматита (SCORAD <20) отмечались у 12 (30,7 %), среднетяжелые (SCORAD 20–60) – у 18 (46,1 %) и тяжелые (SCORAD >60) – у 9 (23,2 %) детей. Подгруппы 1А и 1Б по этому индексу не различались.

Средние концентрации зонулина в образцах стула у детей I и II групп достоверно различались. Уровень TNF $\alpha$  у детей с ПА в 7,6 раза превышал показатели контроля. Фекальный уровень эндогенного нитрита у детей I группы был ниже показателей контрольной группы в 1,6 раза. Суммарный же уровень метаболитов оксида азота в обеих группах достоверно не различался (табл. 1).

При анализе содержания метаболитов оксида азота у детей с IgE-зависимой и IgE-независимой ПА были обнаружены разнонаправленные изменения продукции этого соединения (табл. 2). Выявлена линейная прямая корреляционная взаимосвязь умеренной силы ( $r=0,6$ ) между выраженностью гастроинтестинальных проявлений и уровнем фекального зонулина и TNF $\alpha$ , а также умеренная обратная корреляция ( $r=0,6$ ) между уровнем зонулина и метаболитов оксида азота в копрофильtrate.

Таблица 1

Содержание зонулина, TNF $\alpha$  и метаболитов оксида азота в копрофильтратах у детей с ПА

Показатель	I группа	II группа
Зонулин, нг/мл	$1,75 \pm 0,16^a$	$0,75 \pm 0,01$
TNF $\alpha$ , ммоль/л	$31,04 \pm 2,71^a$	$4,08 \pm 0,56$
Эндогенный нитрит, мкмоль/л	$14,05 \pm 0,89^a$	$22,61 \pm 4,62$
Нитраты/нитриты, мкмоль/л	$280,45 \pm 23,52$	$270,42 \pm 21,86$

<sup>a</sup> Разница с контролем (II группа) статистически значима.

Таблица 2

Фекальный уровень зонулина, TNF $\alpha$  и метаболитов оксида азота у детей с IgE-зависимой и с IgE-независимой ПА

Показатель	I группа	
	подгруппа 1А	подгруппа 1Б
Зонулин, нг/мл	$1,18 \pm 0,14^{a,6}$	$1,94 \pm 0,14^a$
TNF $\alpha$ , ммоль/л	$18,16 \pm 2,02^{a,6}$	$32,85 \pm 3,01^a$
Эндогенный нитрит, мкмоль/л	$18,21 \pm 1,09^{a,6}$	$9,94 \pm 0,89^a$
Нитраты/нитриты, мкмоль/л	$336,61 \pm 19,89^{a,6}$	$226,32 \pm 11,31^a$

<sup>a</sup> Разница с контролем (см. табл. 1) статистически значима.

<sup>6</sup> Разница с подгруппой 1Б статистически значима.

## Обсуждение полученных данных

Согласно современным исследованиям, в развитии пищевой аллергии повреждение кишечного барьера, селективно защищающего организм от антигенных субстанций, занимает одно из ведущих мест [3, 5, 11]. Зонулин с его способностью влиять на повышение межклеточной проницаемости может потенциально провоцировать интестинальную недостаточность при формировании пищевой толерантности у детей раннего возраста. Взаимодействуя с особыми рецепторами на поверхности кишечного эпителия с последующей активацией каскадного комплекса внутриклеточных событий, зонулин регулирует проницаемость плотных соединений, имитируя эффект функционально и иммунологически связанных модуляторов, разрушая плотные соединения кишечного эпителия. Именно утрата эпителиальных барьерных функций может вызывать неконтролируемое поступление белковых антигенов из просвета кишки в собственную пластинку слизистой оболочки с последующей презентацией их иммунной системе, нарушая процесс формирования иммунологической пищевой толерантности и способствуя развитию различных форм ПА. При этом TNF $\alpha$  можно рассматривать в качестве аутокринного участника мукоэпителиального повреждения и триггера целого каскада иммунопатологических реакций [1]. Поскольку этот цитокин играет важную роль в формировании специфического иммунного ответа, его избыток создает условия для поддержания и 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 $\alpha$  (обнаруженный в нашем исследовании) увеличивает проницаемость капилляров, повреждая эндотелий сосудов, повышая синтез нейтрофилами и моноцитами молекул эндотелиальной лейкоцитарной и внутрисосудистой адгезии. Полученные данные убедительно свидетельствуют об активном участии эндотелиальной дисфункции и нитроксидагических механизмов в развитии ПА у детей. Очевидно при этом, что как недостаток, так и избыток этого свободного радикала играет значимую роль в повреждении тканей, развитии целого каскада иммунопатологических реакций и других нарушений. Блокада синтеза оксида азота, обнаруженная при IgE-независимой ПА, значительно уменьшает кровоток в сосудах слизистой оболочки. Косвенно это сказывается на секреторной функции желудочно-кишечного тракта, на способности его слизистой оболочки противостоять воздействию факторов агрессии, на развитии клеточных реакций и возникновении повреждений слизистой с нарушениями ее репарации [8, 11]. Кроме того, в ранней фазе иммунного ответа оксид азота выполняет как эффекторные, так и важные регуляторные функции, и снижение его эндогенного

содержания усиливает апоптоз натуральных киллеров, поддерживает их цитолитическую способность, а также препятствует продукции ими  $\gamma$ -интерферона [1, 13]. Гиперпродукция оксида азота, обнаруженная при IgE-зависимой ПА, вероятно, является защитной реакцией, направленной на адаптацию к изменившимся условиям существования клетки из-за активации цитокинового каскада, развития гипериммуноглобулинемии E и перехода клеток кишечника на более экономный (нитритный) путь дыхания. С другой стороны, образовавшиеся биологически активные молекулы – пероксинитрит и активные формы кислорода – токсически действуют на эпителиоциты кишечника, их ферментативные системы, что нарушает внутриклеточный этап пищеварения и усугубляет воспалительные изменения слизистой оболочки при длительном течении процесса [6].

Таким образом, определение концентраций фекального зонулина, TNF $\alpha$  и метаболитов оксида азота может служить информативным критерием повреждения кишечного барьера при ПА у детей. Высокие цифры данных маркеров в копрофильtrate характерны для IgE-зависимой формы заболевания, повышение концентраций зонулина и TNF $\alpha$  при снижении уровня метаболитов азота – для IgE-независимой ПА. Отсутствие противопоказаний позволяет использовать анализ содержания данных маркеров как в острый период, так и в период ремиссии, и перспективно для ранней донологической диагностики ПА у детей.

## References

1. Kolesov S.A., Zhukova E.A., Korkotashvili L.V. [et al.]. Metabolites of nitric oxide, heat shock protein 70 and pro-inflammatory cytokines in children with bowel diseases // *International journal of applied and fundamental research*. 2014. No. 4. P. 75–78.
2. Pampura A.N. Food allergies in infants // *Pediatrics*. 2016. Vol. 95, No. 3. P. 152–157.
3. Shumatova T.A., Prikhodchenko N.G., Zernova E.S. [et al.]. Polymorphism of folate cycle genes and endogenous peptides in children with allergies to cow's milk proteins // *Russian Bulletin of Perinatology and Pediatrics*. 2016. Vol. 61, No. 6. P. 113–118.
4. Shumatova T.A., Shashatskaya S.N., Zernova E.S. [et al.]. Modern markers in the diagnosis of food intolerance in infants // *Pacific Medical Journal*. 2015. No. 3. P. 55–58.
5. Berin M. C., Sampson H. A. Mucosal immunology of food allergy // *Curr. Biol*. 2013. Vol. 6, No. 23. P. 389–400.
6. Good M., Sodhi C. P., Yamaguchi Y. [et al.]. The human milk oligosaccharide 2'-fucosyllactose attenuates the severity of experimental necrotizing enterocolitis by enhancing mesenteric perfusion in the neonatal intestine // *Br. J. Nutr*. 2016. Vol. 116, No. 7. P. 1175–1187.
7. Lee J., Bae E. H., Ma S. K., Kim S. W. Altered Nitric Oxide System in Cardiovascular and Renal Diseases // *Chonnam. Med. J*. 2016. Vol. 52, No. 2. P. 81–90.
8. Mattila J.T., Thomas A.C. Nitric oxide synthase: non-canonical expression patterns // *Front. Immunol*. 2014. Vol. 9, No. 5. P. 478.
9. Scurlock A.M., Vickery B.P., Hourihane J.O., Burks A.W. Pediatric food allergy and mucosal tolerance // *Mucosal Immunol*. 2010. Vol. 3, No. 4. P. 345–354.
10. Steele L., Mayer L., Berin M. C. Mucosal immunology of tolerance and allergy in the gastrointestinal tract // *Immunol. Res*. 2012. Vol. 54, No. 1. P. 75–82.
11. Stepanova E.I., Skvarskaia E.A. Role of polymorphism NO-synthase gene in the pathogenesis of multifactorial diseases // *Lik. Sprava*. 2014. Vol. 5–6. P. 47–55.

12. Velickovic K., Markelic M., Golic I. [et al.]. Long-term dietary L-arginine supplementation increases endothelial nitric oxide synthase and vasoactive intestinal peptide immunoreexpression in rat small intestine // *Eur. J. Nutr.* 2014. Vol. 53, No. 3. P. 813–821.
13. Yazji I., Sodhi C.P., Lee E.K. [et al.]. Endothelial TLR4 activation impairs intestinal microcirculatory perfusion in necrotizing enterocolitis via eNOS-NO-nitrite signaling // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013. Vol. 110, No. 23. P. 9451–9456.

Поступила в редакцию 13.04.2017.

#### ZONULIN, TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA AND NITRIC OXIDE IN THE DIAGNOSIS OF IGE-DEPENDENT AND IGE-INDEPENDENT FOOD ALLERGY IN CHILDREN

T.A. Shumatova, N.G. Prihodchenko, A.N. Ni, E.Y. Katenkova, L.A. Grigoryan, E.S. Zernova, S.N. Shishatskaya  
*Pacific State Medical University (2 Ostryakova Ave. Vladivostok 690950 Russian Federation)*

**Objective.** The purpose of this study was to determine the fecal level of zonulin, tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ) and nitric oxide metabolites in children with gastrointestinal forms of food allergy (FA) and to assess their pathogenetic significance in the diagnosis of IgE-dependent and IgE-independent FA.

**Methods.** It was clinical and laboratory examines 39 children with food allergy to the cow milk protein at the age of 6 months to 3 years (Group I). The comparison group (Group II) consisted of 30 healthy children. The content of zonulin was determined us-

ing Immunodiagnostic (Germany) reagents using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Immunological study of fecal TNF $\alpha$  was performed with the help of BSM (USA) reagents using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method. The concentration of NO metabolites in co-filters was determined using an enzyme immunoassay (ELISA) and the "Total Nitric Oxide and Nitrate/Nitrite Parameter Assay Kit" (R&D Systems, USA).

**Results.** Mean concentrations of zonulin in fecal samples in FA children and in control group children were  $1.79 \pm 0.16$  and  $0.75 \pm 0.01$  ng/ml, respectively ( $p < 0.05$ ). The level of TNF $\alpha$  ( $31,04 \pm 2,71$  mmol/L) in FA children was in 7.6 times higher than in the control group. Analyze of the NO metabolites content in children with IgE-dependent and IgE-independent FA show the multidirectional changes in production of nitric oxide in children of different subgroups.

**Conclusions.** Determination of fecal zonuline concentrations, TNF $\alpha$  and NO metabolites is an informative criterion for damage of the intestinal barrier in the development of food allergies in children. High numbers of these fecal markers are characteristic of the IgE-dependent form of the disease, increased zonulin, TNF $\alpha$  and decreased NO metabolites are characteristic of IgE-independent FA in children.

**Keywords:** allergic reactions, intestinal permeability, cow milk protein, fecal samples.

Pacific Medical Journal, 2017, No. 2, p. 18–21.

УДК 617.7-006-07-08

DOI: 10.17238/PmJ1609-1175.2017.2.21–25

## Диагностика и лечение новообразований органа зрения в Приморском центре микрохирургии глаза

В.В. Лузянина

*Тихоокеанский государственный медицинский университет (690950, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2),  
Приморский центр микрохирургии глаза (690088, г. Владивосток, ул. Борисенко, 100е)*

Проанализированы уровень и структура заболеваемости основными формами опухолей органа зрения в Приморском крае за 2011–2016 гг. За этот период в ПЦМГ с опухолями глазной локализации обратились 1256 пациентов в возрасте от 4 до 86 лет. Наиболее часто причиной обращения служили новообразования век – 87%. Новообразования поверхности глазного яблока и внутриглазной локализации зарегистрированы в 5,7% случаев. Первичные новообразования орбиты диагностированы у 16, вторичные – у 4, метастатические – у 3 человек. Отмечена более чем 90%-ная эффективность хирургического лечения опухолей органа зрения при сроках диспансерного наблюдения до 5 лет. Только 3,3% пациентов нуждались в комбинированном и высокотехнологичном неинвазивном лечении и пожизненном диспансерном наблюдении.

**Ключевые слова:** онкоофтальмология, инструментальные методы диагностики, высокотехнологичное лечение, динамическое наблюдение.

Раннее выявление опухолевых и предопухолевых заболеваний среди различных контингентов населения имеет в стратегии противораковой борьбы доминирующее значение. Разнообразие опухолей органа зрения, сложность их гистологического строения и вариабельность дифференцировки, по единому мнению онкоофтальмологов, требуют комплексного исследования и такого же комплексного лечения с применением современных методов лазерного, радиоактивного, химиотерапевтического и хирургического воздействия [4–7, 11].

Лузянина Владлена Валерьевна – канд. мед. наук, ассистент кафедры глазных болезней и оториноларингологии ТГМУ, врач ПЦМГ; e-mail: luzianinav@mail.ru

В России, в такой узкоспециализированной отрасли медицины, как офтальмоонкология отсутствует медицинская статистика [3, 4]. Зарубежный опыт также невелик, только в ряде стран (Франция, Германия и Дания) существуют канцер-регистры по офтальмологии, что позволяет на основе объективных эпидемиологических данных рационально и эффективно укомплектовать медицинские учреждения профильными специалистами и оборудованием, выстроить логистическую систему диагностики и высокотехнологичного лечения, а также финансирования всего процесса [2, 8, 10].

По данным российской литературы, офтальмоонкологическая помощь населению региона Урала и Западной Сибири достаточно полно и всесторонне