

А.В. Алешукина, Е.В. Голошва

## ВТОРИЧНАЯ ЛАКТАЗНАЯ НЕДОСТАТОЧНОСТЬ У ДЕТЕЙ С ДИСБИОЗАМИ КИШЕЧНИКА НА ФОНЕ АТОПИЧЕСКОГО ДЕРМАТИТА

ФГУН «РостовНИИМП» Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону, РФ

В статье представлены результаты обследования 213 детей в возрасте от 1 месяца до 2 лет с атопическим дерматитом. Изучали содержание ротавирусов, количество лактозы в копрофильтратах и нарушение состава микрофлоры кишечника. Лактазная недостаточность выявлялась одновременно с ротавирусами у большинства обследованных детей в возрастной группе 1–6 мес. Показано, что одним из возможных механизмов снижения лактазной активности эшерихий при лактазной недостаточности кишечника является ретроградное биохимическое ингибирование.

*Ключевые слова:* дети, атопический дерматит, лактазная недостаточность, дисбактериоз кишечника, ротавирусы, лактазная активность эшерихий.

---

Authors present results of examination performed in 213 children aged 1 month – 2 years with atopic dermatitis. Examination included determination of *Rotavirus* in stool, determination of lactose concentration in coprofiltrates and study of intestinal biocenosis. Presence of *Rotavirus* and signs of lactase insufficiency were determined in majority of patients at the age <6 months. Examination showed that retrograde biochemical inhibition may be one of possible mechanisms of decreased lactase activity of *E. coli* in cases of lactase insufficiency.

*Key words:* children, allergodermatoses, lactase insufficiency, intestinal dysbiosis, *Rotavirus*, lactase activity of *E. coli*.

### **Контактная информация:**

Алешукина Анна Валентиновна – к.м.н., ведущий сотрудник лаб. микробиологии и разработки медицинских иммунобиологических препаратов ФГУН «РостовНИИМП» Роспотребнадзора

Адрес: 344000 г. Ростов-на-Дону, пер. Газетный, 119

Тел.: (863) 234-91-83, E-mail: rostovniimp@mail.ru

Статья поступила 3.03.11, принята к печати 25.01.12.

У детей раннего возраста дисбиоз кишечника (ДК) клинически проявляется в виде кишечной колики, часто сочетаемой с мальабсорбцией. При этом выявляемые нарушения моторики кишечника (запоры, поносы, частые срыгивания) и дисбиотические нарушения приводят к плохой или находящейся на нижней границе нормы прибавке в весе и дисгармонии развития. В целом этот симптомокомплекс формирует синдром функциональных нарушений желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) у детей 1-го года жизни. Очень часто этот синдром у детей провоцируют перенесенные острые кишечные инфекции (ротавирусная, энтеровирусная, аденовирусная, сальмонеллезная, шигеллезная, коли-инфекции и др.) [1]. К синдрому мальабсорбции относят лактазную недостаточность (ЛН), которая в свою очередь считается одной из существенных причин аллергических проявлений у детей, связанных с всасыванием метаболитов в кишечнике [2, 3].

Под термином ЛН понимают сниженную активность кишечной лактазы – фермента пристеночного пищеварения, расщепляющего лактозу на моносахариды – галактозу и глюкозу. Непереносимость лактозы бывает двух видов: наследственно обусловленная и временная. Временная (транзиторная) непереносимость лактозы может быть связана с незрелостью плода к моменту рождения, перинатальной патологией, незрелостью ферментативных систем в грудном возрасте, перенесенной вирусной инфекцией и др. [4]. Обнаружение ЛН имеет большое значение для корректирующей диетотерапии [3, 5, 6].

Функции лактазы ( $\beta$ -галактозидазы) сводятся к гидролизу лактозы до D-глюкозы и D-галактозы. Полученные в результате гидролиза углеводы участвуют в энергетическом обмене и служат субстратами для слизееобразования, построения мембран, синтеза ферментов и др. Кроме  $\beta$ -галактозидазы организма, в просвете кишечника в метаболизме лактозы активно участвуют  $\beta$ -галактозидазы собственной микрофлоры. Выраженной лактазной активностью обладают бифидобактерии (ББ) [7], лактобактерии (ЛБ) [8], эшерихии [9], ряд представителей семейства энтеробактерий [10], стафилококки [11], ряд дрожжеподобных грибов рода *Candida* [12].

Лактазный признак определяет для эшерихий их качественные изменения при дисбиозах. Появление *Escherichia coli*, неферментирующих лактозу, в анализах кишечной микрофлоры свыше допустимых значений (более 5%) сопровождается нарастанием их патогенного потенциала [13]. Несмотря на то, что наличие лактазы и ее активация рассмотрены в настоящее время на генном уровне, механизм «потери» эшерихиями способности к ферментации лактозы до сих пор не ясен.

Цель исследования: определить основную причину ЛН у детей первых 2 лет жизни с ДК,

выяснить возможный механизм появления при этом состоянии эшерихий со сниженной лактазной активностью.

#### Материалы и методы исследования

Для изучения частоты встречаемости ЛН были обследованы 213 детей с установленным дерматологами диагнозом атопического дерматита (АтД) различной локализации в возрасте от 1 месяца до 2 лет. Тяжесть проявлений АтД характеризовалась у детей в диапазоне 18–34 балла по шкале SCORAD.

Проводили изучение качественно-количественных изменений состава микрофлоры кишечника в соответствии с отраслевым стандартом (2003) [14]. В копрофильтратах детей были изучены содержание ротавирусов в РНГА (диагностикум «Ротатест» ФГУН РостовНИИМП Роспотребнадзора) и количество остаточной лактозы пробой Бенедикта [15].

Изменение лактазной активности эшерихий оценивали в процессе глубинного культивирования. Предварительно была определена селективная доза антибиотиков: гентамицина (1 мкг/мл), ципрофлоксацина (5 мкг/мл) и цефазолина (6 мкг/мл). Средой культивирования был питательный бульон (НПО «Питательные среды» Махачкала) с 1% лактозы. Глубинное культивирование *Escherichia coli* М-17 проводили в присутствии селективных доз антибиотиков и без них в разных условиях аэрирования культуры:

1) аэробный вариант – при интенсивном перемешивании культуральной среды (60 об/мин) на установке УВТМ;

2) анаэробный вариант – стационарная культура в присутствии углекислого газа.

Фазы роста культуры *E. coli* М-17 контролировали путем измерения оптической плотности (КФК-2-УХЛ42,  $\lambda=540$ ), рН среды (иономер универсальный ЭВ-74). Жизнеспособность культуры и концентрацию оценивали контрольным высевом почасовых проб на среду Эндо. При этом учитывали диссоциацию культуры по лактазному признаку в процентах.

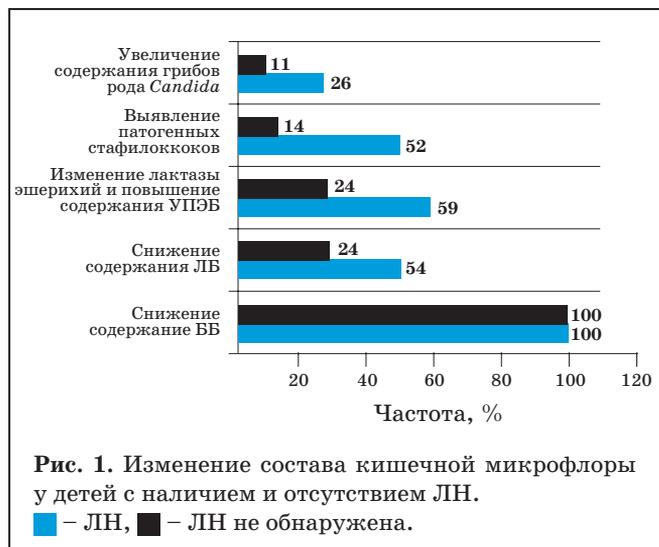
В присутствии селективной дозы гентамицина проводили исследование диссоциации *E. coli* с нормальной лактазной активностью, выделенных от людей с ДК (24 штамма), в условиях повышенной аэрации и в анаэробно-биозе.

Статистическую обработку данных проводили с помощью компьютерной программы SPSS 8.0 for Windows.

#### Результаты и их обсуждение

Исследование содержания лактозы в кишечнике детей, обследованных на дисбиоз, выявило положительные диагностически значимые пробы в 68,5±3,2% случаев, что значительно превышало количество проб с отсутствием лактозы.

Был проведен анализ содержания лактозы в кишечнике у детей данной группы при ранжировании на возрастные группы: 1–3 мес, 3–6 мес, 6–12 мес, старше 1 года.



Максимальная обращаемость детей с ЛН приходилась на возрастную группу 1–6 мес (72,6±3,1% случаев). В группах детей с наличием и отсутствием ЛН были проанализированы основные изменения состава микрофлоры кишечника (рис. 1). По сравнению с группой детей, у которых ЛН не была обнаружена, у детей с положительными пробами в анализах на ДК было зафиксировано достоверное снижение содержания ЛБ (23,9±2,9 и 53,9±3,4% соответственно), достоверное повышение количества эшерихий с измененной лактазной активностью и частоты выявления условно-патогенных энтеробактерий (УПЭБ) (23,9±2,9 и 58,7±3,4% соответственно), достоверное повышение частоты случаев с увеличением количества патогенных стафилококков (14,1±2,4 и 52±3,4% соответственно), достоверное увеличение высеваемости дрожжеподобных грибов рода *Candida* (10,7±2,1 и 26,3±3,0% соответственно), снижение содержания ББ было обнаружено в обеих группах детей в 100% случаев.

Одной из причин ЛН считают ротавирусную инфекцию. Патогенез ротавирусной инфекции основан на спровоцированной вирусами вторичной ЛН. Под действием ротавирусов серьезно страдает тонкокишечный эпителий, к которому возбудитель имеет тропизм: происходит уплощение клеток, слизистая оболочка становится отеочной, нарушаются секреция и всасывание [16]. Был проведен многофакторный анализ с учетом изменений состава микрофлоры кишечника, содержания лактозы и наличия ротавирусов. Исследование показало достоверное преобладание у обследованного контингента детей одновременно положительных проб с наличием ЛН и ротавирусов (49,2±3,4%) (рис. 2). Необходимо отметить, что были зарегистрированы варианты обнаружения только одного признака: или высокое содержание ротавирусов, или ЛН (по 19,3±2,7% соответственно). Ротавирусы не были обнаружены в 31,5±3,2% проб. ЛН не была выявлена при отри-

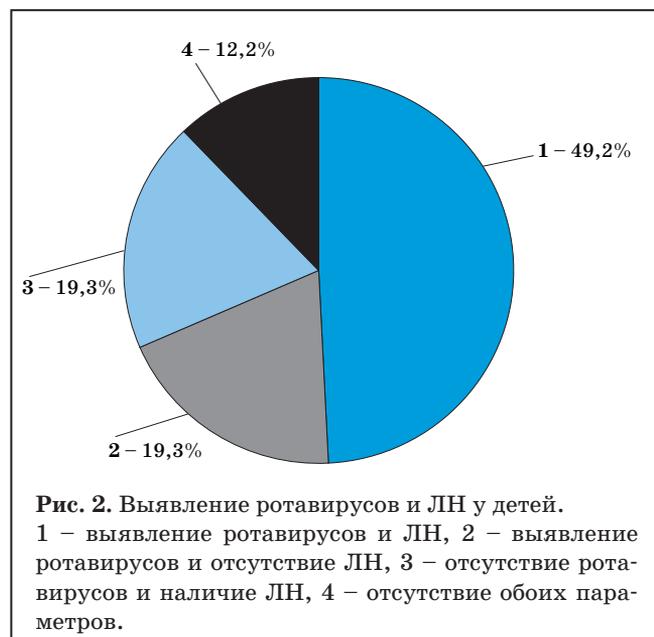
цательных пробах на ротавирусы в 12,2% случаев. Выявление ЛН в отсутствие ротавирусов (19,3%) может свидетельствовать о вероятном наличии у ребенка других вариантов кишечных вирусов, сходных по патогенетическому действию с ротавирусами (например, норовирусы, реовирусы и др.). Основным вариантом в данном случае может быть наличие у ребенка врожденной лактазной мальабсорбции.

С учетом возрастных критериев (полученных положительных проб ротавирусов и наличия лактозы в кишечном содержимом) проведенный анализ показал, что наиболее часто ЛН встречалась вместе с высоким содержанием ротавирусов в возрастных группах детей от 1 до 3 мес (46,7±3,4%) и от 3 до 6 мес (35,2±3,3%).

В отношении состава микрофлоры кишечника в анализируемых группах отмечено снижение содержания ББ (100%), ЛБ (69–85%), увеличение содержания эшерихий со сниженной лактазной активностью (73–83%), УПЭБ (73–83%), патогенных стафилококков (41–71%) и дрожжеподобных грибов рода *Candida* (27–40%).

Незначительное повышение частоты встречаемости ЛН в отсутствие ротавирусов у детей в возрастной группе 3–6 мес может быть связано с переходом детей на другие варианты вскармливания (естественное на искусственное; смена искусственной молочной смеси; введение прикормов и др.).

Было обнаружено, что при довольно высокой частоте выявляемости ротавирусов (68,5%) ЛН у детей с АтД встречалась у 71,9±3,1% (от количества с положительными пробами на ротавирусы). При этом наиболее часто ротавирусная инфекция встречалась у детей в возрасте 1–6 мес (76,7±2,9%) и у этого контингента была выше частота встречаемости ЛН (76,8±2,9%). Полученные результаты выявления вторичной ЛН с учетом данных анам-



неза детей показали, что у обследованного контингента более часто встречались такие факторы риска, как асфиксия в родах, недоношенность, внутриутробная гипотрофия, ранний перевод на искусственное вскармливание ( $86 \pm 2,4\%$  обследованных). Угнетающее влияние этих факторов на лактазную активность подтверждают наблюдения других исследователей [4].

Патогенез ЛН изучен хорошо. Поступающая с пищей лактоза расщепляется до мономеров собственной кишечной карбогидразой – лактазой. Высокая специфичность карбогидраз является причиной развития дисахаридазной недостаточности, которая проявляется непереносимостью лактозы. Дефекты синтеза ферментов приводят к тому, что нерасщепленные дисахариды не всасываются и, поступая в дистальные отделы кишечника, подвергаются бактериальному разложению. Кроме того, обладая осмотической активностью, невсосавшиеся углеводы способствуют выходу воды и углеводов в просвет тонкой кишки. В результате процессов брожения рН содержимого кишечника сдвигается в кислую сторону за счет образования органических кислот, главным образом молочной и уксусной, что служит причиной дисфункции кишечника и способствует транслокации микроорганизмов в верхние отделы кишечника. Несмотря на то, что часть воды и электролитов всасывается, все же остается избыточное количество воды, вследствие чего стул становится жидким. Образующиеся бактериальные метаболиты, всасываясь, могут вызывать, кроме диареи, токсическое воздействие.

Известно, что симбиотические микроорганизмы принимают непосредственное участие в ферментации лактозы, чаще всего для этого используя фермент  $\beta$ -галактозидазу. Выявляемая зависимость между повышением содержания лактозы в копрофильтратах и более выраженным снижением лактазной активности эшерихий дала нам основание для предположения, что одним из возможных механизмов снижения лактазной активности может быть явление так называемого ретроградного биохимического ингибирования, которое, как известно, происходит на фоне повышенного содержания продуктов метаболизма и хорошо изучено при глубинном реакторном культивировании микроорганизмов [17]. В этом плане также необходимо отметить, что глубинное культивирование во многом может соответствовать процессам, происходящим в кишечнике. Для подтверждения предположений нами были проведены экспериментальные исследования по изучению лактазной активности *E. coli* M-17 в процессе глубинного культивирования в присутствии селективных доз антибиотиков (гентамицина, цефазолина, ципрофлоксацина). При этом вне зависимости от использованного препарата в целом была выявлена тенденция к снижению жизнеспособности

культуры с удлинением фазы адаптации и сокращением протяженности всех остальных фаз роста культуры. Более щадящим действием обладал гентамицин. В присутствии цефазолина и ципрофлоксацина в анаэробных условиях жизнеспособность *E. coli* M-17 была достоверно ниже, чем в контрольном опыте и в присутствии гентамицина. Изменения лактазной способности тест-культуры представлены в таблице.

Приведенные в таблице данные свидетельствуют, что клоны со сниженной лактазной активностью появлялись в начале и в середине стационарной фазы роста даже без применения антибиотиков. При глубинном культивировании *E. coli* M-17 в присутствии селективных доз антибиотиков вне зависимости от используемого препарата и разных условий аэрирования культуры по сравнению с вариантами без препаратов было зафиксировано более значимое появление, а затем увеличение частоты встречаемости клонов тестируемого штамма, обладающих сниженной лактазной активностью.

Подобная тенденция снижения лактазной способности нами была подтверждена в группе эшерихий с нормальной лактазной активностью, выделенных от людей с ДК. Так, при культивировании этих штаммов в различных условиях (при повышенной аэрации, в анаэробных условиях, в присутствии селективных доз гентамицина) было выявлено снижение способности к ферментации лактозы в 100% случаев.

Таким образом, в процессе глубинного культивирования при использовании лактозы в качестве основного субстрата вне зависимости от условий аэрирования срабатывал в полной мере механизм регуляции работы лактозного оперона: при наличии в среде лактозы (лаг-фаза, фаза экспоненциального роста и начало стационарной фазы роста) *E. coli* M-17 использовала лактазу, накапливая в клетке глюкозу, которая в свою очередь в достаточном количестве ингибировала работу фермента, и уже в стационарной фазе роста культуры начинали появляться клоны *E. coli* M-17 со сниженной лактазной способностью. Фаза угнетения роста культуры без притока субстрата показывала также отсутствие лактазной активности эшерихий, задействовав двойную отрицательную обратную связь: чем меньше субстрата, тем меньше производится фермента. Влияние антибиотиков проявилось в существенном ингибировании роста *E. coli* M-17, усиленном метаболизме субстрата, накоплении продуктов метаболизма и, соответственно, в более ранней по сравнению с контрольной серией эксперимента «потере» лактазной способности. Проведенные исследования позволяют нам предположить одну из моделей развития ЛН микроорганизмов при ДК (рис. 3).

Как представлено на рис. 3, причинами ЛН могут быть функциональная недостаточность лак-

Таблица

**Изменение лактазной активности *E. coli* М-17 в процессе глубинного культивирования в разных условиях в присутствии селективной дозы антибиотиков**

Условия культивирования	Наличие клонов с лактазной активностью									
	исходный уровень	часы культивирования								
		1	2	3	4	5	6	7	18	24
<b>Культивирование в условиях повышенной аэрации, % положительных клонов</b>										
Культивирование <i>E. coli</i> М-17	100	100	100	100	100	98±1,4	95±2,2	56±4,9	25±4,3	0
Культивирование <i>E. coli</i> М-17 в присутствии гентамицина	100	100	100	95±2,2	80±4	60±4,9	25±4,3	0	0	0
Культивирование <i>E. coli</i> М-17 в присутствии цефазолина	100	100	80±4	50±5	45±4,9	25±4,3	0	0	0	0
Культивирование <i>E. coli</i> М-17 в присутствии ципрофлоксацина	100	100	100	80±4	50±5	25±4,3	0	0	0	0
<b>Культивирование в анаэробных условиях, % положительных клонов</b>										
Культивирование <i>E. coli</i> М-17	100	100	100	100	100	98±1,4	95±2,2	56±4,9	25±4,3	0
Культивирование <i>E. coli</i> М-17 в присутствии гентамицина	100	100	75±4,3	60±4,9	50±5	25±4,3	10±3			
Культивирование <i>E. coli</i> М-17 в присутствии цефазолина	100	100	80±4	50±5	45±4,9	25±4,3	0	0	0	0
Культивирование <i>E. coli</i> М-17 в присутствии ципрофлоксацина	100	100	75±4,3	60±4,9	50±5	25±4,3	10±3	0	0	0

тазы в результате перенесенной вирусной инфекции или в связи с функциональной незрелостью пищеварительного тракта; соматическая патология самостоятельно или в сочетании со снижением содержания бактерий, ферментирующих лактозу. Увеличение лактозы в просвете толстого кишечника создает условие для увеличения популяций микроорганизмов, утилизирующих лактозу. Активная ферментация лактозы приводит к тому, что в просвете кишечника накапливаются продукты неполного расщепления лактозы (молочная кислота, пировиноградная кислота, уксусная кислота), что в свою очередь изменяет рН кишечного содержимого в кислую сторону. Образование углекислого газа способствует росту анаэробных микроорганизмов и одновременно усиливает бродильные процессы в кишечнике. На фоне высокой концентрации метаболитов лактозы в просвете кишечника происходит ретроградное биохимическое ингибирование лактазной активности микроорганизмов и отмечается рост микроорганизмов, у которых лактазная

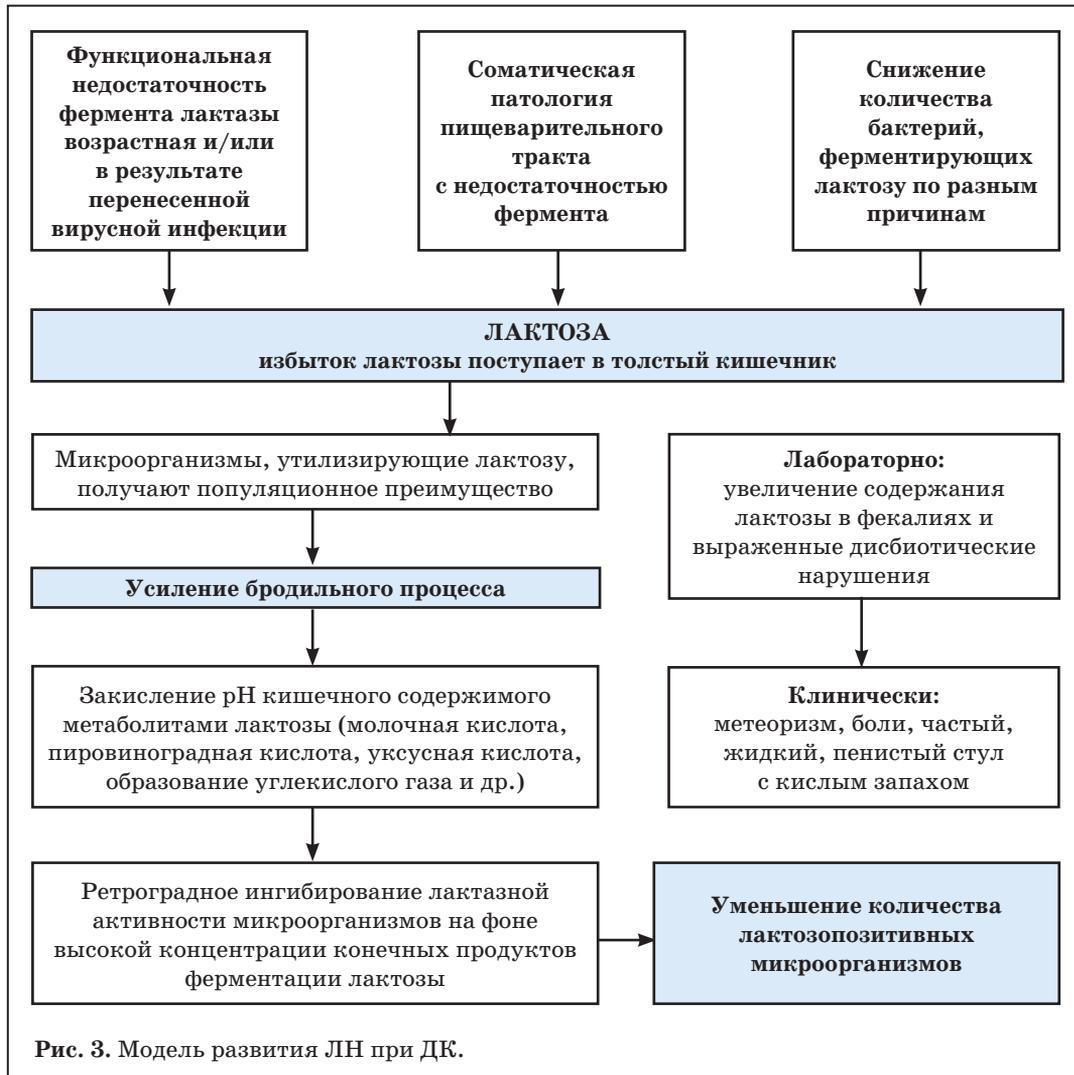
способность снижена. Таким образом лабораторно определяются лактозонегативные и лактозослабоферментирующие микроорганизмы (дисбиотические нарушения микрофлоры кишечника) на фоне повышения содержания лактозы в копрофильтратах. Клинически наблюдаются бродильная диспепсия, метеоризм и диарея.

#### Заключение

В результате проведенных исследований можно предложить следующий алгоритм исследования ЛН у детей раннего возраста:

- обнаружение ротавирусов в копрофильтратах должно быть показанием для проведения исследования уровня лактозы в кале;
- или, наоборот, выявление ЛН должно служить основанием для проведения исследования на кишечные вирусы.

Анализ историй развития детей, обследованных на ДК, показал высокую частоту встречаемости патологии пери- и постнатального периода,



увеличение частоты встречаемости АтД, выявление ЛН и распространенность среди данного контингента дисбиотических нарушений в кишечном биотопе. Многофакторный анализ показал наличие взаимосвязи этих признаков с использованием рангового коэффициента конкордации. Значимость коэффициента конкордации проверена на основе критерия Пирсона ( $\alpha=0,05, \nu=6$ ), что свидетельствовало о сильной связи между рассматриваемыми признаками.

Определение вторичной ЛН у детей групп

«риска», в частности с АтД, целесообразно проводить параллельно с исследованием дисбиотических нарушений в кишечнике. Подобная тактика поможет дифференцировать причины мальабсорбции лактозы и назначать соответствующее лечение детям с адекватной коррекцией дисбиотических нарушений.

Показано, что одним из возможных механизмов снижения лактазной активности эшерихий при ЛН является ретроградное биохимическое ингибирование.

ЛИТЕРАТУРА

1. Горелов А.В. Ротавирусная инфекция у детей. Вopr. совр. пед. 2008; 6: 76–78.
2. Мельникова И.Ю., Новикова В.П. Методы исследования кишечника у детей и подростков. С-Пб.: Уч.-мет. объедин. по мед. и фарм. образ. ВУЗов России, 2006.
3. Бабаян М.Л. Лактазная недостаточность у детей. Педиатрия: приложение к журналу Consilium medicum. 2009; 3: 49–52.
4. Алямовская Г.А., Кешишян Е.С. Особенности физиологического развития на первом году жизни детей с массой при рождении менее 1500 г. Рос. вестн. перинатологии и педиатрии. 2009; 3 (54): 20–28.
5. Чернышов В.Н., Дудникова Э.В., Кондратенко Т.А. и др. Питание здоровых и больных детей первых двух лет жизни.

Метод. реком. для врачей, фельдшеров, студентов. Ростов-на-Дону: «Эверест», 1998.

6. Бутко Т.С., Пупышева Н.В. Особенности вскармливания детей раннего возраста с ферментопатиями и некоторыми формами пищевой непереносимости. Метод. пособие для врачей, студентов. Волгоград: Волгоградская мед. академия, 1999.
7. Карпушина С.Г., Тюрин М.В., Иванов А.А. и др. Выделение, идентификация и некоторые биологические свойства бифидобактерий из кишечника человека. Биотехнология. 1998, 2: 28–36.
8. Костюк О.П., Чернышова Л.И., Волоха А.П. Физиологические и терапевтические свойства лактобактерий. Педиатрия. 1998; 1: 71–75.

9. *Борисов Л.Б.* Медицинская микробиология, вирусология, иммунология. М.: Мед. изд. агенство, 2002.

10. Медицинская микробиология. Часть первая. Уч. пособие. Под ред. А.М. Королюка, В.Б. Сбойчакова. С-Пб.: ЗАО «ЭЛБИ», 1999.

11. *Акатов А.К., Зуева В.С.* Стафилококки. М.: Медицина, 1983.

12. *Кашкин П.Н., Хохряков М.К., Кашкин А.П.* Определитель патогенных, токсигенных и вредных для человека грибов. Ленинград: Медицина, 1979.

13. *Бондаренко В.М., Грачева Н.М., Мацулевич Т.В.* Дисбак-

териозы кишечника у взрослых. М.: КМК Scientific Press, 2003.

14. Отраслевой стандарт «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника». М., 2003.

15. Справочник по функциональной диагностике в педиатрии. Под ред. Ю.Е. Вельтищева, Н.С. Кисляк. М.: Медицина, 1979.

16. *Михайлова Е.В., Левин Д.Ю.* Современные подходы к терапии ротавирусной инфекции у детей до 3 лет жизни. Вестн. РАМН. 2006; 4: 119–124.

17. *Ждан-Пушкина С.М.* Основы роста культур микроорганизмов. Л.: изд. ЛГУ, 1983.