

*Т. Н. НУРПЕИСОВ<sup>1</sup>, Е. А. ИЗАТУЛЛАЕВ<sup>1</sup>, Е. К. МАКАШЕВ<sup>2</sup>, Т. Т. НУРПЕИСОВ<sup>1</sup>*

(<sup>1</sup>НИИ кардиологии и внутренних болезней, Алматы

<sup>2</sup>РГП ПХВ «Институт физиологии человека и животных» КН МОН РК, Алматы)

**РАЗРАБОТКА МЕТОДОЛОГИИ ИССЛЕДОВАНИЯ  
МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫХ НАРУШЕНИЙ ТОНКОЙ КИШКИ  
В РАЗВИТИИ ТОКСИКО-АЛЛЕРГИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ**

**Аннотация**

Несмотря на то, что влияние нарушений морфофункционального состояния тонкой кишки на развитие аллергических реакций не вызывает сомнения, патогенетический механизм возникновения и развития системных реакций остается неизученным. Предполагается, что ключевую роль играют нарушения микрофлоры тонкой кишки, приводящие к изменению баланса провоспалительных медиаторов и цитокинов Т-хелперов 1 и 2 типов, а также морфологические нарушения (дивертикулярная болезнь тонкой кишки и др.). Появились данные о том, что одной из причин пищевой аллергии может быть лямблиоз тонкого кишечника. Таким образом, это позволяет взглянуть на проблему системных аллергозов, в частности, пищевой аллергии, с совершенно нового угла. В 2012 году наша исследовательская группа получила государственный грант для изучения данного вопроса. В ходе выполнения программы были использованы современные методики, такие, как интестиноскопия с прицельной биопсией и последующим морфологическим исследованием, специфическая аллергодиагностика, исследование микрофлоры тонкого и толстого кишечника.

**Ключевые слова:** аллергия, тонкая кишка, пациенты, морфология, ткани.

**Кілт сөздер:** аллергия, аш ішек, сырқаттар, құрылымы, ұлпалар.

**Keywords:** allergy, small intestine, patients, morphology, tissue.

Пищевая аллергия и пищевая непереносимость за последние десятилетия превратились в глобальную медико-социальную проблему. В настоящее время до 30% населения планеты страдают аллергическими заболеваниями, среди которых значительную часть занимает пищевая аллергия.

За последние годы накопились многочисленные данные о значении нарушений морфофункционального состояния тонкой кишки в развитии различных аллергических проявлений. Доказательствами связи указанных проявлений с пищевой аллергией до

настоящего времени служат анамнестические данные, кожные тесты, определение аллергенспецифических антител класса IgE и применение элиминационных диет. При этом остаются неясными механизмы возникновения и развития системных иммунных реакций. Предполагается, что ключевую роль играют нарушения микро-флоры тонкой кишки, приводящие к изменению баланса провоспалительных медиаторов и цитокинов Th1 и Th2 типов. В работах последних лет усиленно изучается роль синдрома избыточного кишечного обсеменения (СИБО) в развитии пищевой аллергии, появились данные о значении морфологических нарушений (дивертикулярная болезнь тонкой кишки и др.) в патогенезе пищевой аллергии.

Таким образом, различные морфофункциональные нарушения тонкой кишки могут служить причиной развития токсико-аллергических реакций и причины возникновения пищевой аллергии могут быть установлены только сейчас – с появлением методов интестиноскопии, морфологического исследования биоптатов слизистой тонкой кишки, бактериологического и паразитологического исследования непосредственно тонкокишечного содержимого.

В ходе разработки дизайна исследования было принято решение сформировать контрольную и опытную группы исследуемых больных – с отсутствием и наличием проявлений пищевой аллергии/непереносимости соответственно.

Отбор больных проходил по следующим критериям включения/исключения:

- 1) Возраст больных – от 16 до 50 лет, пол любой.
- 2) Гражданство РК.
- 3) Наличие пищевой аллергии или непереносимости к пищевым продуктам для первой группы, отсутствие аллергических заболеваний в анамнезе для второй.
- 4) Отсутствие серьезной органической патологии желудочно-кишечного тракта (язвенная болезнь желудка и ДПК, состояние после резекции желудка, грыжа пищевода и желудка).
- 5) Отсутствие сопутствующих заболеваний других органов и систем, которые кардинально влияли бы на степень тяжести больного на момент включения в исследование, угрожали жизни пациента или требовали бы врачебного вмешательства.
- 6) Отсутствие беременности и периода лактации у пациента.
- 7) Контактность больного (нормальный слух, отсутствие языковых барьеров, адекватность психики и т.п.).
- 8) Информированное согласие больного на участие в исследовании.

В соответствии с дизайном исследования, схема обследования каждого пациента строилась следующим образом: Сбор анамнестических данных. Проведение инструментальных обследований для исключения соматических патологий, входящих в критерии исключения: ультразвуковое исследование органов брюшной полости, электрокардиография, эхокардиография, при подозрении на патологию легких – спирография. Проведение фиброгастродуоденоскопии с интестиноскопией, прицельной биопсией и аспирацией содержимого тощей кишки. Морфологическое исследование полученных биоптатов с акцентом на обнаружение следов присутствия *Helicobacter pylori* и *Giardia intestinalis*. Проведение лабораторных исследований сыворотки крови, включая общеклинические анализы (общий анализ крови, биохимический анализ крови), уровень общего IgE, аллерго-диагностику (ППН, RIDA AllergyScreen), определение антител к гельминтам, *Helicobacter pylori* и *Giardia intestinalis* методом иммуноферментного анализа.

Исследование кала пациентов – копро-грамма, бактериологический посев для выявления дисбиоза толстого кишечника, а также экспресс диагностика на *Giardiaintestinalis*.

Видеоэзофагогастродуоденоскопия проводилась в эндоскопическом кабинете НИИ кардиоло-гии и внутренних болезней с использованием видеосистемы Pentax – EG 2470K видеэндоскопом ЕРК-1000 без премедикации в соответствии со стандартным протоколом.

В отличии от рутинного эндоскопического исследования дополнительно осматривалась пол-ностью вся 12-ти перстная кишка и начальные отделы тощей кишки, откуда забирался аспират для дальнейшего исследования на выявление лямблиоза и избыточной колонизации тонкого кишеч-ника. Аспирация содержимого тонкого содержимого проводилась с помощью «Набора для санации носа новорожденного» адаптированного сотрудниками исследовательской группы для использова-ния в ходе эндоскопии.

Кроме того, у каждого пациента проводилась трехточечная биопсия в полном соответствии с современными стандартами диагностики НР-инфекции:з антрального отдела желудка на расстоя-нии 5 см от пилорического жома, пищевода и луковицы двенадцатиперстной кишки.

Полученные в ходе биоптаты направлялись на морфологическое исследование, проводимое штатным специалистом лаборатории НИИ КиВБ.

Иссеченные кусочки ткани слизистой оболочки желудка и двенадцатиперстной кишки фикси-ровали в 10% забуференном формалине (BioVitrum) в течение 4–5 часов. Обезвоживание ткани проводили в батарее изопропиловых спиртов (IsoPrep, BioVitrum) по 30 минут. Уплотнение и про-питывание ткани проводилось в ксилоле в течение 30 минут. Пропитывание проходило в пара-фине, в три смены по 40 минут. Следующим этапом формировался парафиновый блок, и выпол-нялись гистологические срезы толщиной 5–7 микрон. Окрашивали по стандартной методике гематоксилином и эозином, микробную контаминацию выявляли при окрашивании по Гимзе, по Грамму, толуидиновым синим–альциановым желтым, кислые мукополисахаридыальциановым синим рН 2,5, рН 3.1 по Моури. Срезы заключали в монтирующую среду (BioMount, BioOptica), под покровное стекло. Использовали гистологическое оборудование компании Leica: криостатный микротом CM1510S, станция парафиновой заливки EG1150H, EG1120, водяная баня HI1212, микротом роторный RM2125RT.

Гистологические срезы оценивали при увеличении 10x, 20x, 40x микроскопом Leica DM1000. Захват изображения производился камерой Leica DFC310FX. Архивирование цифрового изо-бражения в формате .jpeg.

Оценка хронических гастритов проводилась при помощи классификации OLGa (OperativeLinkGastritisAssessment) и Российского пересмотра Международной классификации хронического гастрита. Основой интерпретации гистологических изменений явилась суммарная оценка выраженности атрофии, воспаления, степени контаминации *Helicobacterpylori* и рас-пространенности патологического процесса основанная на визуально-аналоговой шкале стадий гастрита.

Общеклинические лабораторные исследования проводились на базе лаборатории НИИ кардио-логии и внутренних болезней с использованием стандартных методик и реактивов (Россия) и включают в себя: развернутый общий анализ крови, биохимический анализ крови, акцентированный на показателях функции печени.

Определение общего количества иммуноглобулинов класса Е в сыворотке крови пациентов проводилось методом иммуноферментного анализа на аппарате Anthos 2020 с использованием реактивов компании ХЕМА (Россия) на длине волны 450 нм.

Определение уровня сывороточного специфического IgЕопределяли с использованием «RIDA Screen» также посредством метода ИФА на фотометре Anthos 2020 на длине волн 405/620 нм.

Также наличие повышенного уровня сывороточного специфического IgЕопределяли полуколичественным методом с использованием набора «RIDA AllergyScreen Панель 3» (Германия).

Тест RIDA® AllergyScreen основан на принципе иммуноблотинга. Специфические аллергены, соответствующие составу панели, нанесены на поверхность нитроцеллюлозных мембран (стри-пов). IgE-антитела, специфичные к этим аллергенам, присутствующие в образцах пациентов, реагируют с антигенами, обеспечивая тем самым на второй стадии инкубации прикрепление антител к IgE человека, конъюгированных с биотином (проявляющие антитела), к полосам аллергенов на стрипах. Во время третьей стадии инкубации к биотину прикрепляется стрептавидин, конъюгированный с щелочной фосфатазой (конъюгат). Фермент превращает бесцветный субстрат (BCIP/NBT) в конечный продукт реакции сине-сиреневого цвета. Интенсивность синего окрашивания прямо пропорциональна количеству аллерген-специфических антител в сыворотке. Оценка результата производится на приборе RIDA® XScreen или (менее точно) визуально по специальному шаблону.

Присутствие у пациентов паразитарных инфекций определялось методом иммуноферментного анализа с использованием реактивов ХЕМА (Россия) на фотометре Anthos 2020. Определялось наличие антител к описторхиям, трихинеллам, эхинококкам, токсокариям, лямблиям, аскаридам и аспергиллам.

В связи с зачастую стертой клинической картиной лямблиоза (субклиническое течение заболевания) и наличием сопутствующих заболеваний желудочно-кишечного тракта, диагностика лямблиоза чрезвычайно затруднена.

В данном исследовании она проводилась тремя методами:

1. Иммуноферментный анализ на наличие антител к *Giardiaintestinalis*. Главный его недостаток – косвенный характер методики, не позволяющий с уверенностью говорить о наличии возбудителя в организме в настоящий момент даже в случае положительного результата.

2. Обнаружение цист лямблий во время копрологического исследования, проводящееся трехкратно. Недостаток этого метода заключается в особенности жизненного цикла простейших – цисты выделяются не регулярно, что в комбинации с возможностью ошибки лаборанта, проводящего копрограмму, не позволяет рассматривать отрицательный результат, как достоверный.

3. RIDA quick. Тест предназначен для быстрого качественного определения антигенов *Giardia-lambliа* в образцах кала человека с целью диагностики лямблиоза. RIDA®QuickGiardia является одностадийным иммунохроматографическим тестом, включающим специфические к лямблиям антитела с окрашенными латексными частицами и специфические антитела к патогену, прикрепленные к мембране. Вначале образец кала суспендируют в буфере для экстракции, затем проводят процедуру осаждения. Аликвоту супернатанта образца вносят в окошко тестового стрипа. Если образец содержит антигены, то происходит образование комплекса антигенов с латексными частицами через специфические антитела; этот комплекс при прохождении через мембрану связывается со специфическими антителами, закрепленными в тестовой полосе. Достоверность и надежность данного метода, в виду его новизны, не имеют практического подтверждения в нашей стране.

Исходя из вышеперечисленного, с целью наилучшей диагностики лямблиоза, было принято решение о параллельном использовании всех трех методик в нашем исследовании.

Наряду с бактериоскопическим проводил и бактериологическое исследование. На базе и силами сотрудников лаборатории АО «Нутритест» по отработанным методикам, на стандартных средах проводился бактериологический посев образцов кала пациентов. Кроме того, аналогичную процедуру проходило и содержимое тонкого кишечника аспирированное в ходе интестиноскопии. Наличие роста микроорганизмов определялось в течение 10 дней на различных средах, в различном разведении.

Это позволяло выявить избыточную колонизацию тонкого и нарушение микробной флоры толстого кишечника.

Промежуточные результаты полученные в ходе первого года выполнения программы позволяют утверждать, что выдвинутая нами гипотеза о существовании корреляционной связи между распространенностью пищевой аллергии/непереносимости и наличием функциональной недостаточности тонкого кишечника. А следовательно подобранная и отработанная нами методология является адекватной цели и задачам текущего исследования.

## Резюме

*Т. Н. Нұрпейісов<sup>1</sup>, Е. А. Изатуллаев<sup>1</sup>, Е. К. Мақашев<sup>2</sup>, Т. Т. Нұрпейісов<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Кардиология және ішкі аурулар ҒЗИ, Алматы

<sup>2</sup>ҚР БҒМ ҒК Адам және жануарлар физиологиясы институты, Алматы)

УЛАНУ НӘТИЖЕСІНДЕГІ АЛЛЕРГИЯЛЫҚ БЕЛГІЛЕРДІҢ ДАМУЫ КЕЗІНДЕ  
АШ ШЕКТІҢ ҚҰРЫЛЫМ ҚЫЗМЕТТІК БҰЗЫЛЫСТАРЫН ЗЕРТТЕУ ӘДІСТЕРІН  
ЖАСАУ

Аллергиялық реакциялардың дамуына жіңішке ішектің морфофункционалдық бұзылуына әсер етуіне еш күмән болмауына қарамастан, жүйелік реакциялардың пайда болуы және дамуының патогенетикалық меха-низмі зерттелмеген болып қалып отыр. Қабынушы медиаторлар мен 1 және 2 типтегі Т-хелперлер цито-киндер балансының өзгеруіне әкелетін жіңішке ішек микрофлорасының бұзылуы басты рөлді атқаратын-дығы жорамалданады. Сонымен қатар, тағамдық аллергия болуы себептерінің бірі жіңішке ішектің лямб-лиозы пайда болды. Осылайша, бұл жүйелі аллергоздар, оның ішінде тағамдық аллергия мәселесіне тіпті басқа жаңа бағыттан қарауға мүмкіндік береді. Бағдарламаны орындау барысында морфологиялық зерттеу-лер жүргізумен және мақсатты биопсиямен интестиноскопия жүргізу, спецификалық аллергодиагностика, жіңішке және жуан ішектің микрофлораларын зерттеуқолданылды.

**Кілт сөздер:** аллергия, аш ішек, сырқаттар, құрылымы, ұлпалар.

### Summary

*T. N. Nurpeisov<sup>1</sup>, E. A. Izatullaev<sup>1</sup>, E. K. Makashev<sup>2</sup>, T. N. Nurpeisov<sup>1</sup>*

*(<sup>1</sup>Institute of Cardiology and Internal Diseases, Almaty*

*<sup>2</sup>Institute of Human and Animal Physiology SC MES RK, Almaty)*

### DEVELOPMENT RESEARCH METHODOLOGY MORPHO-FUNCTIONAL VIOLATIONS IN THE DEVELOPMENT OF SMALL INTESTINE TOXIC-ALLERGIC REACTIONS

Despite the fact that the impact of violations of morpho-functional state of the small intestine to the development of allergic reactions is not in doubt, the pathogenetic mechanism of occurrence and development of systemic reactions remains unstudied. It is assumed that the key role is played by intestinal microflora disorders, leading to a change in the balance of pro-inflammatory mediators and cytokines by T-helper type 1 and 2, as well as morphological disorders (diverticular disease of the small intestine, etc.). There is evidence that intestinal giardiasis may be one of the causes of food allergy. Thus, it allows us to study the problem of systemic allergic diseases, especially food allergy, from a completely new angle. During the execution of the program, modern techniques were used, such as intestinoscopy with biopsy and subsequent morphological study, specific Allergodiagnosics, the study of microflora of small and large intestine.

**Keywords:** allergy, small intestine, patients, morphology, tissue.

*Поступила 15.07.2013 г.*