

На правах рукописи

Сугян Нарине Григорьевна

**КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ КОРОТКОЦЕПОЧЕЧНЫХ
ЖИРНЫХ КИСЛОТ ПРИ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ
НАРУШЕНИЯХ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА У
ДЕТЕЙ РАННЕГО ВОЗРАСТА.**

14.01.08 — Педиатрия

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т
диссертации на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук

Москва — 2010

Работа выполнена в ГОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования» Росздрава.

Научный руководитель: доктор медицинских наук,
профессор
Захарова Ирина Николаевна

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук,
профессор
Боровик Татьяна Эдуардовна

доктор медицинских наук,
профессор
Мазанкова Людмила Николаевна

Ведущая организация: ГОУ ВПО Российский государственный медицинский университет МЗ РФ.

Защита состоится «12 » октября 2010г. в 13.00 часов на заседании диссертационного совета Д.208.071.01 при ГОУ ДПО Российская медицинская академия последипломного образования Росздрава по адресу: 123995 г. Москва, ул. Баррикадная, д.2/1.

С диссертацией можно ознакомиться в фундаментальной библиотеке ГОУ ДПО Российская медицинская академия последипломного образования Росздрава по адресу: 125445 г. Москва, ул. Беломорская, д. 19.

Автореферат разослан «...».....2010 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета

В.П.Зыков

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ.

Актуальность темы. Функциональные нарушения желудочно-кишечного тракта (срыгивания, запоры, кишечные колики) широко распространены среди детей раннего возраста [Хавкин А.И.(2000); Конь И.Я., Сорвачева Т.Н.(2004); Захарова И.Н. с соавт. (2009)]. Более 50% младенцев имеют одновременно две или три жалобы, что приводит не только к дискомфорту, болевым ощущениям у ребенка, но и нарушению качества жизни семьи [Сорвачева Т.Н., Конь И.Я. (2001); Корниенко Е.А., Шабалов Н.П. (2001)]. Кишечные колики часто встречаются у детей первых месяцев жизни и составляют по разным данным от 20 до 48% [St.James-Roberts J.(1999), Боровик Т.Э., Яцык Г.В. (2010)]. Большое значение в развитии функциональных расстройств со стороны ЖКТ имеет дисбаланс в составе микрофлоры кишечника [Хавкин А.И., Эйберман А.С.(2004)]. Исследования, посвященные изучению микрофлоры кишечника, проводимые в конце XX века, базировались, в основном, на микробиологическом подходе, что привело к переоценке синдрома «дисбактериоза» при недостаточном внимании к основной патологии. Микробиологическое исследование микрофлоры кишечника в настоящее время рассматривается как недостаточно информативный метод диагностики, не отражающий ее метаболическую активность [Маянский А.Н. (2001), Мазанкова Л.Н. (2003)]. Установленный факт обмена между низкомолекулярными метаболитами индигенной микрофлоры и макроорганизмом, послужил основой для создания принципиально новых методов оценки состояния микробиоценоза кишечника [Ардатская М.Д., Минушкин О.Н. (1996)]. К низкомолекулярным метаболитам относят короткоцепочечные монокарбоновые кислоты и их соли, продуцируемые анаэробными микроорганизмами [Готтшалк Г.(1982)]. Доказано их участие в энергообеспечении кишечного эпителия, процессах роста и дифференцировки колоноцитов, поставке субстратов липо - и глюконеогенеза, поддержании ионного обмена, осуществлении антибактериального эффекта, блокировке адгезии патогенов, активации местного иммунитета [Ардатская М.Д.(2003), Roediger W.E.W.(1994), Cummings J.H.(1997)]. Исследование короткоцепочечных жирных кислот (КЖК) методом газожидкостного хроматографического анализа (ГЖХ-анализа) обладает высокой чувствительностью и специфичностью, простотой воспроизведения, возможностью быстрого получения данных. Этот метод отображает

не только состояние микробиоценоза толстой кишки, но и может использоваться в качестве теста для оценки эффективности проводимого лечения и индивидуального подбора терапии [Ардатская М.Д. (1996, 2003)]. Однако до настоящего времени нет единого мнения о диагностической и прогностической роли сдвигов метаболической активности кишечной микрофлоры при ФН ЖКТ у детей раннего возраста.

Цель исследования: определить клиническое и диагностическое значение короткоцепочечных жирных кислот при функциональных нарушениях желудочно-кишечного тракта у детей раннего возраста.

Задачи исследования:

1. изучить содержание и профиль КЖК в кале в зависимости от степени нарушения микробиоценоза кишечника и характера вскармливания;
2. оценить значение исследования КЖК в кале при нарушениях полостного и пристеночного пищеварения у детей раннего возраста с ФН ЖКТ;
3. уточнить влияние антибактериальной терапии на метаболическую активность микрофлоры кишечника у детей раннего возраста, усовершенствовать схему профилактики и лечения антибиотик-ассоциированного дисбактериоза кишечника и антибиотик-ассоциированной диареи (ААД).

Научная новизна. Доказано, что метод ГЖХ - анализа с определением абсолютного и относительного содержания КЖК в фекалиях позволяет оценить метаболическую активность микрофлоры кишечника у детей с функциональными нарушениями ЖКТ. Определены закономерности изменения содержания и спектра КЖК в кале у детей в зависимости от степени нарушений микробиоценоза кишечника. Установлено, что, по мере усиления выраженности нарушений кишечного микробиоценоза, проявляющегося диареей, в кале снижается доля уксусной и повышается содержание масляной и пропионовой кислот, анаэробный индекс отклоняется более чем в 2 раза в резко-отрицательную область. Впервые показаны качественные изменения КЖК в фекалиях у детей с ФН ЖКТ при нарушениях переваривания

жиров и углеводов в зависимости от характера вскармливания. Установлено, что повышенная экскреция нейтрального жира сопровождается увеличением в 2,7 раза абсолютной и относительной концентрации масляной кислоты, а повышенная экскреция жирных кислот с калом сопровождается увеличением содержания пропионовой кислоты в 2,3 раза. Показана зависимость экскреции углеводов с калом от степени нарушения микробиоценоза и выраженности ФН ЖКТ при грудном и искусственном вскармливании. Доказано негативное влияние антибактериальной терапии на состав микрофлоры кишечника и установлено, что назначение жидких синбиотиков одновременно с антибиотиками способствует профилактике антибиотик - ассоциированного дисбактериоза кишечника и антибиотик - ассоциированной диареи.

Практическая значимость:

1. На основе полученных данных показана возможность использования исследования КЖК в качестве неинвазивного метода оценки степени нарушения микробиоценоза кишечника.
2. Определение КЖК в копрофильтратах методом ГЖХ у детей с ФН ЖКТ раннего возраста позволяет объективно оценить функциональные нарушения пищеварения жиров и углеводов по совокупности биохимических критериев в виде изменений абсолютного и относительного содержания КЖК, анаэробного индекса и индекса изокилот.
3. Исследование КЖК дает возможность оценить метаболическую активность кишечных микроорганизмов на фоне и после антибактериальной терапии.
4. Доказана целесообразность коррекции микробиоценоза кишечника жидкими синбиотиками, содержащими КЖК с первых дней назначения антибактериальной терапии.

Личный вклад автора. Автору принадлежит ведущая роль в выборе направления исследования, отборе пациентов, их динамическом наблюдении, анализе и обобщении полученных результатов. В работах, выполненных в соавторстве, вклад автора является определяющим и заключается в непосредственном участии на всех этапах исследования: от постановки задач, их экспериментально-теоретической и клинико-бактериологической реализации до обсуждения результатов в научных публикациях, докладах и их внедрения в практику.

Внедрение в практику. Результаты настоящего исследования используются в работе педиатрического отделения ДГП №133 УЗ САО г. Москвы. Основные положения диссертации используются в педагогическом процессе на кафедре педиатрии ГОУ ДПО РМАПО Росздрава, в докладах и лекциях для врачей лечебных учреждений России и Москвы.

Апробация работы. Основные материалы диссертации доложены и обсуждены на межкафедральной научно-практической конференции кафедр педиатрии и детских инфекционных болезней ГОУ ДПО РМАПО Росздрава 30 апреля 2010 года, XIV, XV и XVI Конгрессах детских гастроэнтерологов России (2007, 2008, 2009 гг.); VII Российском конгрессе «Современные технологии в педиатрии и детской хирургии» (Москва, 21-23 октября 2008 г.).

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Качественный состав КЖК при ФН ЖКТ у детей раннего возраста может служить неинвазивным тестом, определяющим глубину нарушения кишечной микрофлоры.
2. Изменение содержания и спектра КЖК в кале коррелирует с результатами клинико-лабораторных показателей у детей раннего возраста с нарушениями пищеварения жиров и углеводов.
3. Антибактериальная терапия с первых дней применения негативно влияет на метаболическую активность кишечной микрофлоры и требует назначение пробиотков, содержащих КЖК.
4. Изменения спектра КЖК могут использоваться в качестве скринингового теста для оценки эффективности проводимой коррекции микробиоценоза кишечника.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 10 печатных работ, в том числе две - в журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 143 страницах машинописного текста, содержит 28 таблиц, 8 рисунков. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, 2 глав собственных исследований,

заклучения, выводов и практических рекомендаций. Список литературы включает 217 источников, из них 86 отечественных и 131 зарубежных авторов.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ.

Материалы и методы исследования. В основу работы положены результаты обследования 143 детей (74 мальчиков и 69 девочек) в возрасте от 1 месяца до 3-х лет с функциональными нарушениями желудочно-кишечного тракта, проявляющимися диареей. Нами изучена метаболическая активность микрофлоры кишечника у детей двух групп в зависимости от причин возникновения диареи:

- в **группу А** вошло 69 детей с минимальными пищеварительными дисфункциям в виде диареи и кишечных колик;
- в **группу В** было включено 74 ребенка с диареей, развившейся на фоне антибактериальной терапии.

Согласно протоколу, дети набирались в группы методом случайной выборки после получения от родителей информированного согласия об участии в исследовании. Пациенты включались в группы наблюдения в том случае, если в течение последних 3 месяцев перед проведением исследования они не принимали пре- и пробиотики. Основными критериями включения пациентов в исследование являлись: жалобы на жидкий стул, кишечные колики, оценка по шкале Апгар не менее 7 баллов, нормальное физическое и психомоторное развитие. Наблюдение и обследование детей группы А проводилось в амбулаторных условиях на базе детской городской поликлиники №133 САО г. Москвы (главный врач Васильковская Н.К.).

Таблица 1.

Общая характеристика обследованного контингента детей.

Группы		число	мальч.	девоч.	ср. возраст
Группа А	І подгруппа (ГВ)	40	14	26	9,15±0,90 нед
	ІІ подгруппа (ІВ)	29	17	12	8,13±0,98 нед
Группа В	І подгруппа	25	16	9	6,56±0,76 мес
	ІІ подгруппа	28	15	13	19,66±1,96 мес
	ІІІ подгруппа	21	12	9	11,93±1,15 мес

В зависимости от характера вскармливания исследуемые дети группы А были разделены на 2 подгруппы:

В **I подгруппу** вошло 40 детей (14 мальчиков и 26 девочек), находящихся на грудном вскармливании (**ГВ**). Средний возраст исследуемых детей составил $9,15 \pm 0,90$ недель.

Во **II подгруппу** включено 29 детей, находящихся на искусственном вскармливании смесями, в качестве углеводного компонента содержащими только лактозу (**ИВ**). Средний возраст исследуемых детей составил $8,13 \pm 0,98$ недель.

Пациенты группы В были госпитализированы в отделение для детей раннего возраста Тушинской детской городской больницы г. Москвы (главный врач Куликова О.А) по поводу острой респираторной инфекции, осложненной бактериальной инфекцией или инфекцией мочевой системы. В зависимости от сроков назначения им пробиотиков в период проведения антибактериальной терапии дети группы В были разделены на 3 подгруппы.

I подгруппу составили 25 детей (16 мальчиков и 9 девочек), получавших синбиотик Нормофлорин Д с первых дней антибактериальной терапии. Средний возраст исследуемых детей составил $6,56 \pm 0,76$ месяцев.

Во **II подгруппу** вошло 28 детей (15 мальчиков и 13 девочек), получавших Нормофлорин Д только после того, как развилась диарея на фоне применения антибактериальной терапии по поводу основного заболевания. Средний возраст детей был $19,66 \pm 1,95$ месяцев.

III подгруппу (контрольную), составил 21 ребенок (12 мальчиков и 9 девочек), получавших только антибактериальную терапию без пробиотиков. Средний возраст детей был $11,93 \pm 1,15$ месяцев.

Для коррекции кишечного микробиоценоза использовался Нормофлорин Д, который представляет собой синбиотический биокомплекс («Бифилюкс» Россия, свидетельство о госрегистрации №77.99.23.3.У.414.1.10), содержащий бифидобактерии и лактобактерии (*B.bifidum*, *B.longum* 10^8 КОЕ/мл, *L.casei* spp. *ghamnosus* 10^9 КОЕ/мл), органические кислоты (уксусная, молочная, пропионовая, янтарная, масляная), пребиотик лактитол.

Основным поводом для назначения антибиотиков у исследуемых больных было осложненное течение ОРВИ. 94,5% детей [все пациенты из I подгруппы (100%), 24 ребенка (85,8%) II

подгруппы и 17 детей (80,9%) III подгруппы] были госпитализированы в связи с осложненным течением ОРВИ, присоединением бактериальной инфекции со стороны верхних и нижних дыхательных путей. По поводу инфекции мочевой системы было госпитализировано 4 ребенка (14,3%) II подгруппы и 2 ребенка (9,5%) III подгруппы. Лакунарная ангина явилась поводом для стационарного лечения 2 детей (9,5%) третьей подгруппы.

Всем детям в 1-2 день госпитализации проводился комплекс лабораторной диагностики, включающий в себя общеклиническое исследование, бактериологический анализ кала, проводимый в лаборатории кишечных инфекций НИИЭМ им. Г.Н.Габричевского (зав. лабораторией ст. научный сотрудник Волохович Т.Т.). Бактериологическое исследование фекалий проводилось в соответствии с требованиями, изложенными в приложении к Приказу Минздрава России от «9» июня 2003 года № 231 (ОСТ 91500.11.0004-2003).

Исследование содержания КЖК в кале методом газожидкостной хроматографии проводилось на базе кафедры гастроэнтерологии ФГУ «УНМЦ Управления делами Президента РФ», совместно с д.м.н., проф. М.Д. Ардатской (Патент на изобретение РФ № 2145511 «Способ разделения смеси жирных кислот фракции С2-С7 методом газожидкостной хроматографии» от 09.04.1999/ авт. Иконников Н.С., Ардатская М.Д., Минушкин О.Н. и др.). Определялись следующие показатели:

- суммарная массовая концентрация летучих жирных кислот;
- абсолютное содержание отдельных жирных кислот (уксусной, пропионовой, масляной, валериановой, капроновой) и долю каждой кислоты в общем пуле;
- анаэробный индекс: отношение содержания суммы пропионовой и масляной кислот к содержанию уксусной кислоты.
- абсолютное и относительное содержание изокилот и отношение суммы изокилот к сумме соответствующих неразветвленных жирных кислот (масляная, валериановая, капроновая).

Определение общих углеводов в кале проводилось по методике Бенедикта [Тодоров И.(1968)], отдельных углеводов (лактозы, ксилозы, галактозы, глюкозы) – с помощью метода хроматографии на бумаге с применением денситометра - в лаборатории питания

здорового и больного ребенка НЦЗД.

Статистическая обработка полученных результатов проведена на индивидуальном компьютере с помощью электронных таблиц «Microsoft Excel», пакета прикладных программ «Statistics for Windows» 7.0, StatSoft Inc(США). Сравнение параметрических данных проводилось с помощью критерия Стьюдента. Сравнение непараметрических показателей осуществлялось с помощью построения таблиц сопряженности признаков, а значимость различий оценивалась по критерию χ^2 , для малых выборок — критерию Фишера. Статистически значимыми считались отличия при $p < 0,05$ (95% уровень значимости) и при $p < 0,01$ (99% уровень значимости). Связь между изучаемыми показателями оценивалась по результатам корреляционного анализа с вычислением коэффициента корреляции Пирсона.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.

Изучение абсолютного и относительного содержания КЖК в кале в зависимости от степени нарушений микробиоценоза кишечника и характера вскармливания. Мы проанализировали выраженность минимальных пищевых дисфункций у детей группы А в зависимости от характера вскармливания. С этой целью была проведена оценка выраженности синдрома кишечных колик по 3 балльной системе, где: 1 балл характеризовал кишечные колики, возникающие только вечернее время, 2 балла - кишечные колики, появляющиеся после каждого кормления и сохраняющиеся в ночное время, 3 балла - кишечные колики, которые беспокоят ребенка в течение всего дня. Нами установлено, что средняя интенсивность кишечных колик в баллах у детей, находящихся на грудном и искусственном вскармливании, достоверно не отличалась друг от друга: ГВ - $1,72 \pm 0,12$ балла; ИВ - $1,72 \pm 0,13$ балла.

Выраженность синдрома срыгивания оценена по пятибалльной системе, предложенной Vandendyck Y.(1993). Частота синдрома срыгивания среди младенцев, находящихся на грудном вскармливании, составила 60% (24 ребенка), а средняя его интенсивность в этой группе детей составила $1,87 \pm 0,15$ балла. В группе младенцев, находившихся на искусственном вскармливании, частота синдрома срыгивания составила 65% (у 19 детей), а средняя интенсивность - $1,95 \pm 0,19$ балла ($p > 0,05$).

Консистенцию кала мы оценивали по Бристольской шкале форм кала [Thompson WG, Heaton K.W.(1999)]. В группе младенцев, находившихся на грудном вскармливании, средняя консистенция кала составила $6,75 \pm 0,09$ балла, во второй группе (ИВ) - $6,81 \pm 0,07$ балла ($p > 0,05$).

У детей группы А с ФН ЖКТ нормальный микробиоценоз кишечника обнаружен только у 3 детей (5%). Первая степень дисбиотических нарушений в два раза чаще выявлялась у детей, находящихся на искусственном вскармливании (ГВ 5,6% и ИВ 12,5%). У большинства детей (ГВ 88,8% и ИВ 83,3%) отмечался дисбактериоз кишечника II и III степени. Однако для детей, находящихся на грудном вскармливании, более характерными были дисбиотические нарушения кишечника III степени (52,8% детей подгруппы ГВ и 37,5% детей подгруппы ИВ).

Изучение абсолютного содержания КЖК у детей группы А с ФН ЖКТ продемонстрировало повышение их концентрации по мере усиления степени нарушений микробиоценоза кишечника. Нами установлено, что при грудном и искусственном вскармливании изменения были идентичными: $\Sigma(C_2-C_6)$ ГВ $3,53 \pm 1,32 \rightarrow 3,80 \pm 1,44 \rightarrow 4,42 \pm 1,53$ мг/г; ИВ $4,81 \pm 1,82 \rightarrow 5,31 \pm 1,91 \rightarrow 5,73 \pm 1,99$ мг/г. Представленные изменения абсолютного содержания КЖК в кале могут быть связаны с количественным и качественным изменением состава микроорганизмов, среды их обитания и нарушениями моторики.

Для объективизации полученных данных нами были рассчитаны профили ($C_n / \Sigma(C_2+C_3+C_4)$) уксусной (C2), пропионовой (C3) и масляной (C4) кислот, вносящих основной вклад в общий пул кислот. Результаты изучения данных параметров в зависимости от степени выраженности дисбактериоза представлены в таблице 2. Анализ профилей КЖК указывает на резкое снижение доли уксусной кислоты, повышение долей пропионовой и масляной кислот, отклонение значений анаэробных индексов, отражающих окислительно-восстановительный потенциал внутрипросветной среды в область резко-отрицательных значений по сравнению с нормой по мере усугубления нарушений микробиоценоза (таблица 2). Имеющиеся изменения при ФН ЖКТ можно объяснить стрессовым воздействием на эпителий кишечника, когда происходит переключение метаболизма колоноцитов с цикла Кребса на анаэробный вариант гликолиза, с активизацией

гексозомонофосфатного шунтирования. Такое изменение стратегии метаболизма приводит к тому, что меняется трофическая база колоноцитов, которые перестают всасывать и утилизировать КЖК, в первую очередь, пропионовую и масляную кислоты. Кроме того, известно, что пропионовая кислота оказывает влияние на абсорбцию воды в кишечнике через цАМФ-зависимые системы, что также может являться один из механизмов развития диареи у наблюдаемых нами детей.

Известно, что уксусная кислота является метаболитом облигатной микрофлоры и снижение ее доли свидетельствует о снижении активности и численности молочнокислых микроорганизмов (бифидо - и лактобактерий). Увеличение доли пропионовой и масляной кислот указывает на активизацию УПФ и строгих анаэробов (бактероидов, эубактерий, фузобактерий, копрококков и др.). Результаты изучения значений АИ указывают на «анаэробизацию» среды, при которой происходит угнетение жизнедеятельности облигатных анаэробов за счет блокирования терминальных ферредоксинсодержащих ферментов и на этом фоне активизируются их факультативные и остаточные штаммы.

При изучении соотношения содержания изокислот и соотношения изовалериановой кислоты к валериановой кислоте ($iC_n, iC_5/C_5$), нами отмечено увеличение значений данных параметров. Полученные изменения свидетельствуют о повышении метаболической активности микрофлоры, обладающей протеолитической активностью (кишечные палочки, фекальные стрептококки) [Готтшалк Г. (1982), Шендеров Б.А. (1998)] и активизации «микроорганизмов - гемолитиков» (в частности гемолитических штаммов аэробов кишечной палочки, стрептококков, стафилококков и др.). Причем, данные изменения нарастают, по мере усиления степени выраженности нарушения микрофлоры кишечника.

При изучении корреляции между степенью нарушения микробиоценоза кишечника и уровнем УК в кале у детей установлено, что коэффициент корреляции при грудном вскармливании составил $r = 0,922$, и $r = 0,707$ при искусственном вскармливании.

Таким образом, изменение параметров КЖК отражает характер и выраженность изменения качественного состава микрофлоры и может быть использован для скрининговой оценки ее состояния.

Таблица 2. Профили КЖК С2-С4, анаэробные индексы, суммарного содержания отдельных изокислот (изоСn) и отдельно изоС5/С5 в фекалиях у детей с ФН ЖКТ в зависимости от степени нарушения микробиоценоза при грудном и искусственном вскармливании.

	(N)	Уксусная кислота	Пропионовая кислота	Масляная кислота	АИ (отриц)	IC5/C5	EiCn
Степень дисбактериоза	ГВ	0,894±0,005	0,073±0,004	0,033±0,003	0,119±0,011	до 2,1	0,013±0,003
	ИВ	0,792±0,05	0,148±0,007	0,060±0,006	0,262±0,014	до 2,1	0,019±0,004
I степень	ГВ	0,872±0,008*	0,087±0,005*	0,041±0,004*	0,147±0,013*	2,2±0,1	0,025±0,006*
	ИВ	0,743±0,007*	0,181±0,007*	0,076±0,006	0,346±0,018*	2,53±0,23*	0,030±0,007
II степень	ГВ	0,814±0,011*,**	0,122±0,007*,**	0,064±0,005*,**	0,230±0,019*,**	3,5±0,9*,**	0,034±0,007*
	ИВ	0,708±0,009*,**	0,202±0,009*,**	0,090±0,007*,**	0,412±0,020*,**	4,1±1,2*,**	0,034±0,008
III степень	ГВ	0,784±0,009*,**	0,141±0,009*,**	0,075±0,005*,**	0,275±0,020*,**	5,2±1,1*,**	0,039±0,007*
	ИВ	0,648±0,010*,**	0,235±0,010*,**	0,117±0,007*,**	0,543±0,022*,**	5,66±1,64*	0,038±0,008*

Примечание: M±m для p<0,05

* - p<0,05 при сравнении с группой нормы; ** - p<0,05 при сравнении первой степенью нарушения микробиоценоза

Результаты изучения КЖК у детей с ФН ЖКТ в зависимости от степени нарушения пищеварения. Всем детям первых месяцев жизни с ФН ЖКТ проводилось копрологическое исследование кала с целью оценки пищеварительных функций в зависимости от характера вскармливания. В зависимости от типа нарушения пищеварения (стеаторея 1 и 2 типов) и наличия слизи в кале, мы проанализировали спектр КЖК (таблица 3). При стеаторее 1 типа наблюдалось повышение, в основном, масляной кислоты: при грудном вскармливании до $0,091 \pm 0,008$ ед, при искусственном вскармливании - до $0,132 \pm 0,008$ ед. Данные изменения, возможно, связаны с недостаточностью липазы у детей с функциональными нарушениями пищеварения (с экзокринной недостаточностью), так как масляная кислота является одним из конечных продуктов деградации длинноцепочечных жирных кислот, которые поступают в толстый кишечник. При стеаторее 2 типа значительно повышена доля пропионовой кислоты по сравнению с нормой и со значениями при стеаторее 1 типа: при ГВ - $0,170 \pm 0,010$ ед; при ИВ - $0,216 \pm 0,010$ ед. Известно, что пропионовая кислота является продуцентом строгих анаэробов, которые принимают участие в энтерогепатической циркуляции жирных кислот, а именно: 7α -дегидроксилирования жирных кислот и ее увеличение, возможно, связано с нарушением желчеобразования и желчевыделения у детей с ФН ЖКТ.

У 37,7% детей с ФН ЖКТ в копрологии выявлено значительное количество светлой, прозрачной слизи. Отношения изомеров кислот к кислотам с неразветвленной цепью у детей с ФН ЖКТ, у которых в кале обнаружена слизь, оказалось значительно сниженным ($p < 0,05$) по сравнению нормой (при ГВ - $0,257 \pm 0,033$ при норме $0,331 \pm 0,064$, при ИВ - $0,189 \pm 0,003$ ед при норме $0,285 \pm 0,005$ ед). Данные изменения тесно связаны с синтезом и секрецией гликопротеидов и муцинообразованием: с ухудшением вязкостных характеристик слизи, увеличением ее количества в кишечном содержимом и повышенной экскрецией с калом [Ардатская М.Д., Минушкин О.Н. (1999, 2003)], а также с активизацией некоторых видов анаэробов, активно метаболизирующих при функциональных нарушениях кишечника, обусловленных диареей, но обладающих крайне низкой способностью к протеолизу.

Таблица 3. Профили КЖК С2-С4, анаэробные индексы, суммарного содержания отдельных изокислот (ΣiCn) и отдельно iCn/Cn в фекалиях у детей с ФН ЖКТ в зависимости от степени нарушения пищеварения при грудном и искусственном вскармливании.

Группа		Уксусная кислота	Пропионовая кислота	Масляная кислота	АИ (отриц)	iCn/Cn	ΣiCn
ГВ (норма)		0,894±0,005	0,073±0,004	0,033±0,003	0,119±0,011	0,331±0,064	0,013±0,003
ИВ (норма)		0,792±0,05	0,148±0,007	0,060±0,006	0,262±0,014	0,285±0,005	0,019±0,004
Стеатореа 1	ГВ	0,796±0,007*	0,113±0,007*,**	0,091±0,008*,**	0,256±0,016*	0,297±0,054	0,033±0,009*
	ИВ	0,689±0,008*	0,179±0,009*	0,132±0,008*,**	0,454±0,020*	0,254±0,045	0,030±0,008
Стеатореа 2	ГВ	0,778±0,008*	0,170±0,010*,**	0,052±0,006*,**	0,283±0,021*	0,288±0,055	0,036±0,010*
	ИВ	0,705±0,010*	0,216±0,010*,**	0,081±0,006*	0,418±0,019*	0,247±0,036	0,035±0,008
слизь	ГВ	0,843±0,008*	0,107±0,006*	0,050±0,005*	0,186±0,013*	0,257±0,033*,**	0,005±0,003*,**
	ИВ	0,759±0,011*	0,165±0,006*	0,076±0,005*	0,317±0,016*	0,189±0,033*,**	0,009±0,003*,**

Примечание: $M \pm m$ для $p < 0,05$

* - $p < 0,05$ при сравнении с группой нормы; ** - $p < 0,05$ при сравнении между типами нарушения пищеварения

Мы обнаружили высокую степень корреляции между стеатореей 1 типа и уровнем масляной кислоты (при ГВ $r = 0,877$, при ИВ $r = 0,83$), между уровнем пропионовой кислоты и стеатореей 2 типа (при ГВ $r = 0,82$, при ИВ $r = 0,68$).

Таким образом, исследование метаболической активности микрофлоры позволяет оценить не только характер нарушения состава микрофлоры, но и пищеварения и может служить «тонким» биохимическим маркером наблюдаемых изменений.

Результаты изучения короткоцепочечных жирных кислот у детей с дисахаридазной недостаточностью. Мы изучили изменения продукции и утилизации КЖК у детей с выраженной экскрецией общих углеводов с калом (выше $0,25\text{г}/\%$) в зависимости от характера вскармливания. У детей обеих групп было выявлено недостоверное увеличение абсолютного содержания суммарных КЖК по сравнению с нормой: при грудном вскармливании $4,25 \pm 1,38$ мг/г (при норме $3,68 \pm 1,21$ мг/г); при искусственном вскармливании - $4,91 \pm 1,69$ мг/г (при норме $3,91 \pm 1,69$ мг/г). Абсолютное содержание КЖК оказалось повышенным за счет всех кислот, но больше за счет увеличения содержания пропионовой. При грудном вскармливании: уксусная кислота составила $3,36 \pm 0,75$ мг/г (при норме $3,23 \pm 0,89$ мг/г); пропионовая кислота - $0,508 \pm 0,085$ мг/г* (при норме $0,260 \pm 0,050$ мг/г) и МК $0,191 \pm 0,049$ мг/г (при норме $0,121 \pm 0,035$ мг/г). При искусственном вскармливании: уксусная кислота составила $3,501 \pm 0,98$ мг/г (при норме $3,020 \pm 0,86$ мг/г); пропионовая кислота - $0,875 \pm 0,078$ мг/г* (при норме $0,564 \pm 0,060$ мг/г) и масляная кислота - $0,337 \pm 0,074$ мг/г (при норме $0,228 \pm 0,039$ мг/г).

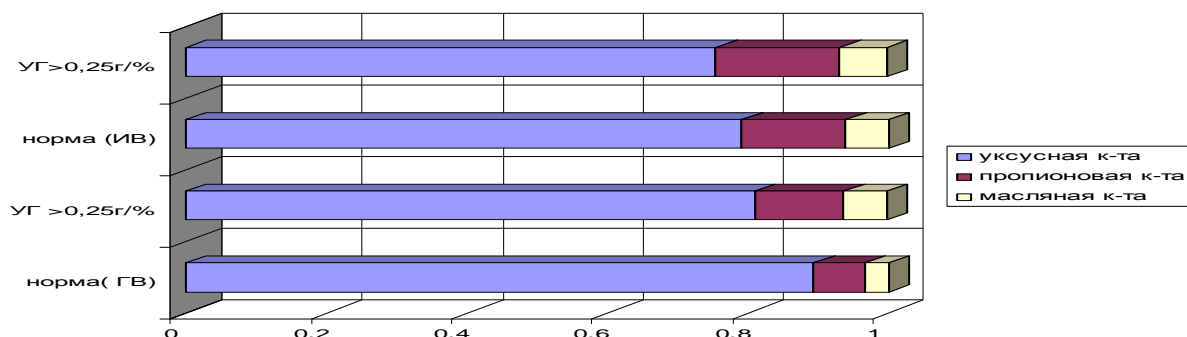


Рисунок 1. Относительное содержание КЖК в кале у детей с дисахаридазной недостаточностью.

В профиле C2-C4 кислот были выявлены следующие изменения. Относительное содержание уксусной кислоты в пуле общих кислот оказалось сниженным по сравнению с нормой. В кале детей, находящихся на грудном вскармливании содержание УК составило $0,811 \pm 0,008$ ед (норма $0,894 \pm 0,005$ ед), на искусственном вскармливании $0,755 \pm 0,007$ ед (норма $0,792 \pm 0,005$ ед). Доля пропионовой кислоты в общем пуле кислот оказалась достоверно повышенной у детей обеих групп, причем увеличение было более выраженным при грудном вскармливании: ГВ $0,126 \pm 0,007$ ед при норме $0,073 \pm 0,004$ ед; ИВ - $0,176 \pm 0,011$ ед при норме $0,148 \pm 0,007$ ед. Профиль масляной кислоты был в 2 раза увеличен по сравнению с нормой при грудном вскармливании ($0,062 \pm 0,005$ ед при норме $0,033 \pm 0,003$ ед) и незначительно повышен при искусственном вскармливании ($0,68 \pm 0,005$ ед при норме $0,060 \pm 0,005$ ед). Анаэробный индекс оказался смещенным в область резко отрицательных значений при грудном и искусственном вскармливаниях (ГВ $-0,247 \pm 0,014$; ИВ - $0,368 \pm 0,020$; $p < 0,05$).

Для того чтобы определить, экскреция именно какого углевода увеличена у детей с ФН ЖКТ, мы проводили селективное исследование углеводов кала методом хроматографии на бумаге у 38 детей (22 ребенка из группы ГВ и 16 детей группы ИВ).

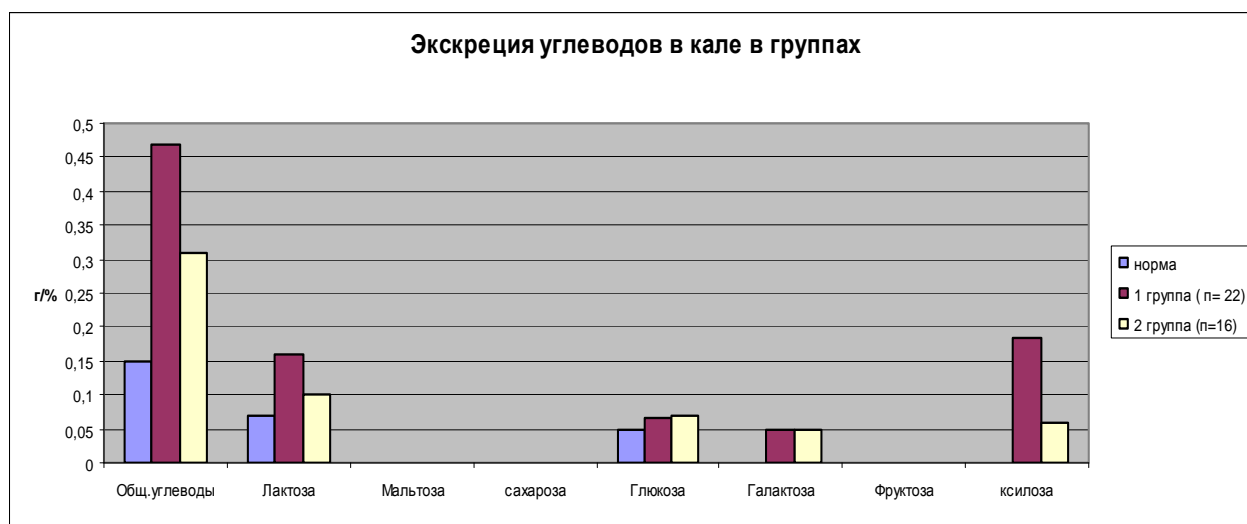


Рисунок 2. Экскреция углеводов в зависимости от характера вскармливания

Нами обнаружено достоверное увеличение экскреции общих углеводов с калом у детей обеих групп, более выраженное у детей, находящихся на грудном вскармливании: (ГВ $0,47 \pm 0,087$ г/%)

($p=0,01$); ИВ $0,31\pm 0,065$ г/% ($p=0,02$). Экскреция лактозы с калом у детей подгруппы ГВ составила $0,16\pm 0,02$ г/% ($p=0,02$ по сравнению с нормой), в подгруппе ИВ - $0,10\pm 0,03$ г/%.

Экскреция глюкозы и галактозы с калом в обеих группах детей была одинаковой. Достоверно выше по сравнению с нормой оказалась экскреция галактозы у детей подгруппы ГВ. Обращает на себя внимание выраженная экскреция ксилозы у детей, которые вскарммливались грудным молоком ($0,185\pm 0,05$ г/%). При искусственном вскармливании также зарегистрирована умеренно выраженная экскреция ксилозы $0,06\pm 0,02$ г/% ($p=0,07$).

Мы установили прямую зависимость между степени нарушения микробиоценоза и экскрецией углеводов с калом (таблица 4).

Таблица 4.

Экскреция углеводов в зависимости от степени нарушения микробиоценоза кишечника при грудном и искусственном вскармливании.

Степень дисбактериоза (ГВ и ИВ)		Общие углеводы	Лактоза	Глюкоза	Галактоза	Ксилоза
Норма		$0,15\pm 0,02$	$0,07\pm 0,02$	$0,05\pm 0,02$	0	0
I степень	ГВ	$0,38\pm 0,08^*$	$0,28\pm 0,06^*$	$0,04\pm 0,03$	0	$0,04\pm 0,04$
	ИВ	$0,35\pm 0,09^*$	$0,13\pm 0,08$	$0,03\pm 0,01$	$0,05\pm 0,02^{**,*}$	$0,10\pm 0,09$
II степень	ГВ	$0,67\pm 0,19^{**}$	$0,21\pm 0,04^*$	$0,11\pm 0,03^*$	$0,07\pm 0,02^*$	$0,24\pm 0,14^*$
	ИВ	$0,40\pm 0,06^*$	$0,12\pm 0,05$	$0,07\pm 0,03$	$0,04\pm 0,02^*$	$0,09\pm 0,05^*$
III степень	ГВ	$0,59\pm 0,09^{**}$	$0,08\pm 0,02^{**}$	$0,06\pm 0,03$	$0,07\pm 0,03^{**,*}$	$0,30\pm 0,08^{**,*}$
	ИВ	$0,41\pm 0,11^*$	$0,25\pm 0,14^*$	$0,03\pm 0,01$	0	$0,05\pm 0,04$

* $p\leq 0,05$ показатель достоверный по сравнению с нормой, ** $p\leq 0,05$ показатель достоверный между степенями нарушения микробиоценоза.

Полученные изменения КЖК в зависимости от нарушения переваривания углеводов можно обсудить следующим образом. Мы исследовали спектр КЖК в кале у детей в зависимости от экскреции общих углеводов. В обеих группах детей, по мере увеличения экскреции углеводов, было обнаружено повышение уровней пропионовой и масляной кислот, наиболее выраженное у детей при грудном вскармливании, а, следовательно, и пропионовокислого и

маслянокислого брожения. При этом доминировало пропионовокислое брожение, так как оказалось повышенным не только относительное, но и абсолютное содержание пропионовой кислоты. По мере усиления степени нарушения микробиоценоза кишечника, мы выявили увеличение содержания моносахаров при грудном вскармливании и уменьшение экскреции лактозы. При ферментации моносахаров вырабатываются не только КЖК, но и газы, скопление которых в кишечнике приводит к растяжению кишечной стенки и возникновению колик.

Таким образом, мы можем констатировать активное участие кишечной микрофлоры в развитии и поддержании нарушений углеводного обмена у детей с ФН ЖКТ, маркерами этих изменений может служить параметры КЖК.

Результаты комплексного обследования детей группы В на фоне антибактериальной терапии. С целью уточнения влияния антибактериальной терапии на микрофлору кишечника и разработки схем профилактики антибиотик - ассоциированных диарей, под нашим наблюдением находились 74 ребенка раннего возраста. Все пациенты с первого дня госпитализации получали антибактериальную терапию парентерально. Большинство детей (64,9%) получали антибактериальные препараты из группы пенициллинов, 32,4% - из группы цефалоспоринов, по одному ребенку из первой (4%) и третьей (4,8%) подгруппы получали линкомицин. Средние сроки развития диареи от начала антибактериальной терапии составили: во второй группе $3,07 \pm 0,15$ суток, в третьей группе - $4,53 \pm 0,72$ дня.

Мы оценили продолжительность диспептического и абдоминального синдромов в зависимости от сроков введения жидкого синбиотика Нормофлорина Д. В первой подгруппе детей, получавших Нормофлорин Д с начала антибактериальной терапии, продолжительность диарейного синдрома составила $1,42 \pm 0,2$ дня ($p < 0,05$ по сравнению со 2-ой и 3-ей подгруппами), во второй подгруппе - $2,22 \pm 0,11$ дня, а в третьей - $4,64 \pm 0,68$ дня. Нами установлено, что коррекция антибиотик-ассоциированного дисбактериоза кишечника с первого дня антибактериальной терапии способствовала сокращению продолжительности абдоминального синдрома (в 1-ой подгруппе – до $1,25 \pm 0,25$ дня, во 2-ой - $1,60 \pm 0,16$ дня и в 3-ей - $3,5 \pm 0,5$ дня), а также синдрома метеоризма (в 1-ой подгруппе $1,66 \pm 0,16$ дня, во 2-ой - $2,0 \pm 0,12$ дня и в 3-ей - $3,2 \pm 0,42$

дня).

Нами было проведено исследование КЖК в кале у детей всех групп на фоне антибактериальной терапии. Детям первой подгруппы с профилактической целью был назначен Нормофлорин Д с первых дней антибактериальной терапии. Результаты изменения параметров КЖК мы сравнили с результатами у детей 3-ей подгруппы. Исходно у детей обеих подгрупп было выявлено снижение абсолютного содержания КЖК, повышение долей пропионовой кислоты (до $0,222 \pm 0,009$ ед. и $0,219 \pm 0,009$ ед. в 1-ой и 3-ей подгруппах, соответственно) и масляной кислоты (до $0,103 \pm 0,006$ ед. и $0,108 \pm 0,007$ ед. в 1-ой и 3-ей подгруппах, соответственно). Отмечено выраженное снижение относительного содержания уксусной кислоты (до $0,675 \pm 0,011$ ед. и $0,673 \pm 0,010$ ед. в 1-ой и 3-ей подгруппах, соответственно). Значения АИ смещены в область резко отрицательных значений по сравнению с нормой [$-0,481 \pm 0,014$ ед. (первая подгруппа) и $-0,486 \pm 0,015$ ед. (третья подгруппа) при норме $-0,302 \pm 0,012$ ед.].

У пациентов обеих групп исходно отмечалось недостоверное повышение суммарного относительного содержания изокислот (первая подгруппа $0,039 \pm 0,004$; третья подгруппа $0,040 \pm 0,004$).

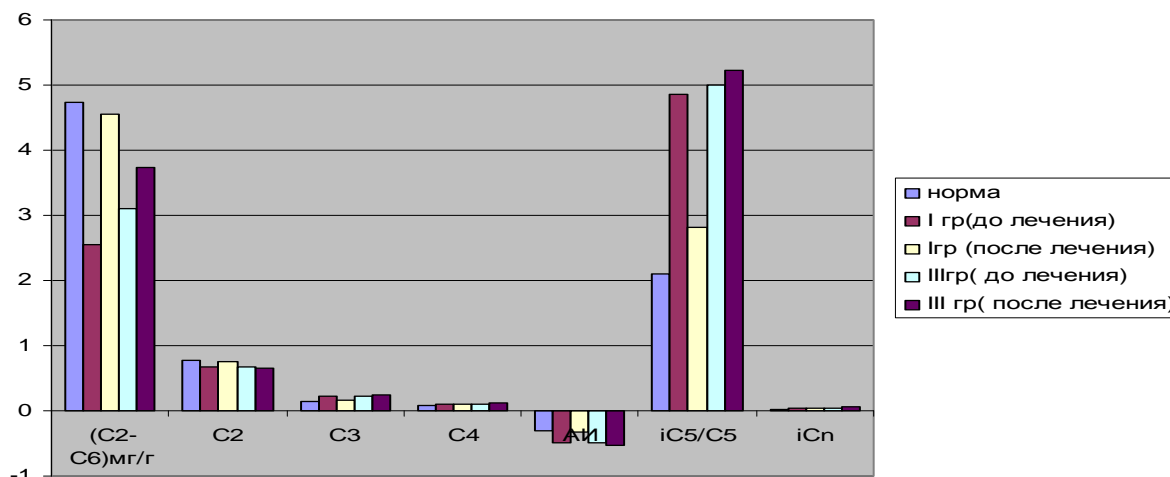


Рисунок 3. Относительное содержание КЖК на фоне антибактериальной терапии у детей первой и третьей подгрупп.

Через три недели в группе детей, получивших Нормофлорин Д с профилактической целью, отмечалось формирование нормопрофиля C2-C4 кислот с тенденцией нормализации значения анаэробного индекса и восстановления нормального уровня изокислот, что

связано стабилизацией (а в ряде случаев с восстановлением) качественного состава микроорганизмов и снятием негативного воздействия антибактериальной терапии. В третьей подгруппе детей измененные параметры КЖК усугубились, что объясняется усилением дисбиотических нарушений вследствие антибактериальной терапии.

Во второй подгруппе детей нами проведена оценка изменений КЖК в кале на фоне развившейся диареи и лечения жидким синбиотиком Нормофлорином Д. При этом исходно в профиле кислот нами отмечены разнонаправленные изменения:

- увеличение профиля уксусной кислоты, снижение профиля пропионовой и масляной кислот с отклонением значений АИ менее отрицательную область, повышение уровня изокилот указывает на «аэробизацию» внутрикишечной среды (I тип);
- снижение профиля уксусной кислоты, повышение профилей пропионовой и масляной кислот, отклонение значений АИ в область резко-отрицательных значений, снижение уровня изокилот свидетельствует об активизации анаэробов (II тип).

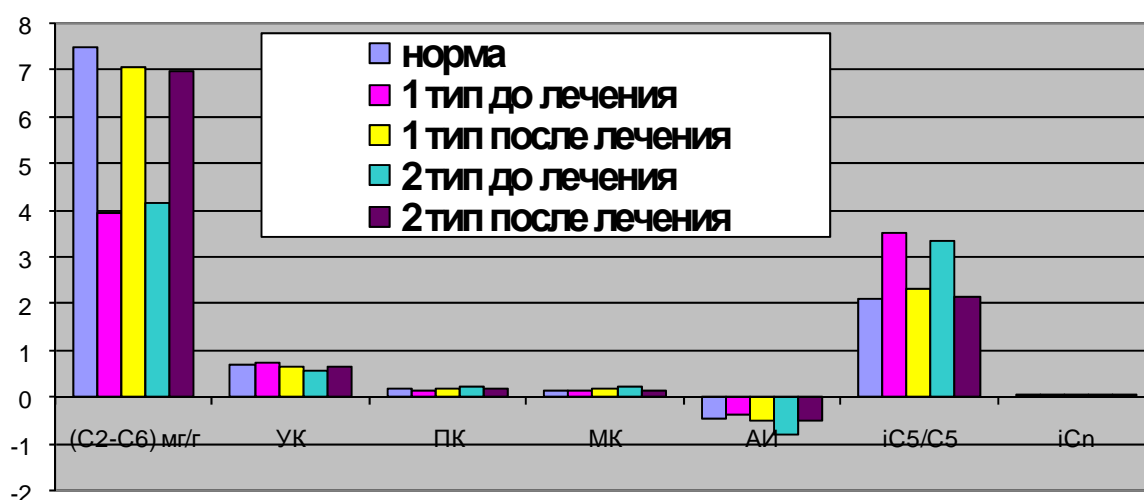


Рисунок 4. Относительное содержание КЖК у детей второй подгруппы до и после лечения.

После проведения коррекции нарушений кишечного микробиоценоза, отмечалась тенденция к нормализации измененных показателей, что подтвердило эффективность жидкого синбиотика Нормофлорина Д. Надо отметить, что у части детей (около 60%), отмечалось сохранение измененных показателей, в частности, уровня изокилот, что говорит о сохраняющихся изменениях со стороны микрофлоры, в частности обладающей протеолитической

активностью. Эти дети требуют длительного наблюдения и, возможно, им необходимо проводить повторные курсы коррекции микробиоценоза кишечника. Таким образом, измененные параметры КЖК может служить объективным маркером эффективности терапии.

ВЫВОДЫ.

1. Частота и выраженность ФН ЖКТ у детей первого года жизни, находящихся на ГВ и ИВ, существенно не отличаются друг от друга [интенсивность кишечных колик оказалась одинаковой в обеих группах, срыгивания выявлены более чем у половины детей в каждой группе, консистенция кала по Бристольской шкале составила $6,75 \pm 0,09$ и $6,81 \pm 0,08$ балла в группе ГВ и ИВ (соответственно)]. У детей с ФН ЖКТ в кале выявляются качественные и количественные изменения, характеризующие дисбиотические нарушения. У большинства детей выявлены нарушения микробиоценоза кишечника II-III степени (у 80% детей - ГВ, у 68,9% детей - ИВ).
2. Метод ГЖХ - анализа с определением абсолютного и относительного содержания КЖК в фекалиях позволяет в короткие сроки оценить структурные изменения и метаболическую активность микрофлоры кишечника. По мере усиления выраженности нарушений кишечного микробиоценоза, проявляющегося диареей, в кале снижается доля уксусной и повышается содержание масляной и пропионовой кислот, значения анаэробного индекса отклоняется в резко-отрицательную область, повышается отношение содержания изомеров кислот к кислотам неразветвленной цепью.
3. У детей раннего возраста с ФН ЖКТ, независимо от характера вскармливания, определяются нарушения расщепления и переваривания жиров. Стеаторея 1 типа характеризуется выраженным увеличением абсолютной и относительной концентрации масляной кислоты, стеаторея 2 типа – пропионовой кислоты. Обнаружение повышенного содержания слизи в кале у детей с ФН ЖКТ коррелирует со снижением соотношения изокилот к кислотам с неразветвленной цепью.

4. Независимо от характера вскармливания, у младенцев первых месяцев жизни определяется достоверное увеличение экскреции углеводов с калом, более выраженное у детей, находящихся на грудном вскармливании (за счет лактозы и ксилозы, а у детей на искусственном вскармливании - за счет лактозы). У детей, находящихся на грудном вскармливании, по мере усиления степени нарушений микробиоценоза кишечника, снижается экскреция лактозы и увеличивается экскреция ксилозы. У детей, находящихся на искусственном вскармливании, наоборот, с усилением степени нарушений микробиоценоза кишечника увеличивается экскреция лактозы и уменьшается экскреция ксилозы.
5. Профилактика антибиотик - ассоциированной диареи жидкими синбиотиками приводит к сокращению частоты и продолжительности абдоминального и диарейного симптомов, восстановлению кишечного микробиоценоза. Если коррекция ААД проводится после возникновения диареи, у части детей (около 60%) не формируется нормальный микробный пейзаж и сохраняется протеолитическая активность микрофлоры кишечника. Эффективность коррекции может быть отслежена по параметрам короткоцепочечных жирных кислот.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.

1. При отсутствии грудного молока возможно использование для вскармливания современных адаптированных смесей, применение которых не приводит к росту минимальных пищеварительных дисфункций со стороны ЖКТ.
2. Способ определения метаболитов толстокишечной микрофлоры (КЖК) методом ГЖХ-анализа в кале относится к скрининговым методам исследования и позволяет определить степень и глубину структурных и функциональных нарушений кишечного микробиоценоза.
3. Быстрота получения результатов позволяет использовать КЖК в качестве оценки выраженности ФН ЖКТ у детей раннего возраста, обусловленных нарушением расщепления и эмульгирования жиров.
4. Исследование кала на углеводы методом хроматографии на бумаге позволяет дифференцированно выявить нарушения

расщепления или всасывания углеводов, что позволяет определить терапевтическую тактику.

5. При назначении ребенку антибактериальной терапии необходимо с первых дней проводить коррекцию микробиоценоза кишечника жидкими синбиотиками, содержащими моно- и дикарбоновые кислоты.

Список научных работ, опубликованных по теме диссертации

1. Малиновская В.В., Коровина Н.А., Захарова И.Н., Сугян Н.Г. Коррекция нарушений местного иммунитета при дисбиозе кишечника у детей.//Русский медицинский журнал.-2006.- т.14.- № 1.-с.57-60.
2. Захарова И.Н., Лыкина Е.В., Сугян Н.Г. Лактазная недостаточность у младенцев первых месяцев жизни./ Материалы XIII Конгресса детских гастроэнтерологов России «Актуальные проблемы абдоминальной патологии у детей». - Москва, 2006.- с.69-70.
3. Сугян Н.Г., Ваулина О.В. Жидкие синбиотики нормофлорины в лечении лактазной недостаточности у детей.//Поликлиника.- 2006.-№1.-с.66-37.
4. Захарова И.Н., Коровина Н.А., Сугян Н.Г. Нарушения местного иммунитета при дисбиозе кишечника у детей и их коррекция./ Сборник лекций участников юбилейной конференции, посвященной 60-летию кафедры госпитальной педиатрии КГМУ «Актуальные проблемы педиатрии». Казань, 2006.-с.40-44.
5. **Захарова И.Н., Сугян Н.Г. Коррекция пробиотиками функциональных нарушений желудочно-кишечного тракта у детей грудного возраста.//Вопросы современной педиатрии.- 2007.-т. 6.- № 3.-с. 48-51.**
6. Захарова И.Н., Сугян Н.Г. Кишечные младенческие колики и их коррекция.// Консилиум медикум.-2007.-№2.- с.87-90.
7. Захарова И.Н., Сугян Н.Г. Кишечные младенческие колики и их коррекция.//Консилиум Медикум Украина.-2008.-т. 2.-№7.-с.38-41.
8. **Захарова И.Н., Сугян Н.Г. Антибиотик - ассоциированные диареи у детей и их профилактика.//Российский вестник перинатологии и педиатрии.-2009.- т. 54.- № 5.-с.44-52.**

9. Захарова И.Н., Дмитриева Ю.А., Сугян Н.Г. Антибиотик-ассоциированные диареи: лечение и профилактика.//Консилиум медикум. Педиатрия.-2009.-№2.-с.7-10.
10. Захарова И.Н., Сугян Н.Г., Андрюхина Е.Н., Дмитриева Ю.А. Тактика педиатра при младенческих кишечных коликах.//Русский медицинский журнал. -2010.-т.18.- № 1.-с.11-15.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.

- ААД - антибиотик - ассоциированная диарея
АИ - анаэробный индекс
ГВ - грудное вскармливание
ГЖХ - газо-жидкостная хроматография
ИВ - искусственное вскармливание
КЖК - короткоцепочечные жирные кислоты
МК - масляная кислота
ОРВИ - острая респираторная вирусная инфекция
ПК - пропионовая кислота
УК - уксусная кислота
ФН ЖКТ – функциональные нарушения желудочно-кишечного тракта
С2 -уксусная кислота
С3 - масляная кислота
С4 - пропионовая кислота
iС5 - изо-валериановая кислота
С5 - валериановая кислота
iС - индекс изокислот