

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ПИТАНИЯ,
БИОТЕХНОЛОГИИ И БЕЗОПАСНОСТИ ПИЩИ»

На правах рукописи

Мухортых Валерий Алексеевич

**Биомаркеры клеточного и мукозального иммунитета в оценке
эффективности комплексной терапии пищевой аллергии у детей**

14.01.08 - Педиатрия

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор
Ревякина Вера Афанасьевна

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор
Сенцова Татьяна Борисовна

Москва - 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1 Современный взгляд на проблему пищевой аллергии	13
1.2 Характеристика биомаркеров воспаления при пищевой аллергии у детей	21
1.3 Состояние мукозального и клеточного иммунитета при пищевой аллергии у детей	27
1.4 Роль нарушений микробиоты кишечника в развитии пищевой аллергии у детей	30
1.5 Заключение	39
Глава 2. ОБЪЕМ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	40
2.1 Характеристика пациентов, включенных в исследование	40
2.2 Клинические методы обследования	42
2.3 Лабораторные методы исследования	43
2.4 Статистические методы обработки результатов исследования	47
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	48
3.1 Клиническая характеристика детей, включенных в исследование	48
3.2 Оценка показателей гуморального, мукозального и клеточного иммунитета у обследованных детей с пищевой аллергией	60
3.3 Оценка биомаркеров воспаления у обследованных детей с пищевой аллергией	67
3.4 Оценка микробиоты кишечника у обследованных детей с пищевой аллергией	68

Глава 4. КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ КОМПЛЕКСНОЙ ТЕРАПИИ ПИЩЕВОЙ АЛЛЕРГИИ	69
4.1 Оценка клинической эффективности комплексной терапии у детей раннего возраста с различными проявлениями пищевой аллергии	69
4.1.1 Клиническая эффективность терапии у больных с гастроинтестинальными проявлениями пищевой аллергии	71
4.1.2 Клиническая эффективность терапии у больных с кожными проявлениями пищевой аллергии	73
4.2 Оценка эффективности терапии по данным микробиоты кишечника	75
4.3 Оценка эффективности комплексной терапии пищевой аллергии по данным показателей иммунологического статуса	77
4.3.1 Оценка эффективности терапии по данным мукозального иммунитета	77
4.3.2 Оценка эффективности терапии по данным показателей клеточного иммунитета	80
4.3.3 Оценка эффективности терапии по данным показателей маркеров воспаления	88
4.4. Клинические примеры	95
Глава 5. ОБСУЖДЕНИЕ СОБСТВЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ	111
ВЫВОДЫ	124
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	126
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	127
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	129

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Пищевая аллергия (ПА) – важная медико-социальная проблема современности, характеризующаяся высокой распространенностью во всех странах мира (Savage J., 2015, Devdas J., 2018, Lopes J., 2020). Значимость данной проблемы повышается с каждым годом из-за постоянного роста числа больных этой патологией (Захарова И.Н., 2018, Ревякина В.А., 2019, Shu S., 2019). ПА возникает в раннем детском возрасте, является пусковым фактором для многих аллергических заболеваний, существенно влияет на качество жизни больных детей и членов их семей. В различных исследованиях ПА рассматривают как многофакторную патологию, в возникновении и развитии которой важную роль играет ряд наследственных и средовых факторов, что определяет многообразие ее клинических форм, с вовлечением в патологический процесс многих органов и систем (Bouse J., 2010, Балаболкин И.И., 2012, Venede S., 2016).

Механизмы развития ПА достаточно сложны и являются предметом пристального изучения многими исследователями (Боровик Т.Э., 2007, Мачарадзе Д.Ш., 2017, Schmiechen Z., 2019, Yamamoto T., 2019). В основе ПА лежат иммунологические механизмы, остающиеся пока до конца не расшифрованными. Несмотря на существенный прогресс в изучении IgE-опосредованных реакций при ПА, другие механизмы (не-IgE и клеточно-опосредованные) до конца не раскрыты. Большинство российских и зарубежных исследований по изучению иммунного ответа при ПА посвящены гуморальному иммунитету, лишь единичные работы - клеточному и мукозальному иммунитету (Chahine B., 2010, Chinthrajah R., 2016, Martino D., 2018). Практически отсутствуют исследования по выявлению значимых специфических иммунологических и воспалительных маркеров при ПА. Эффективность персонализированной терапии больных ПА,

основанная на определении биомаркеров воспаления, практически не изучена. В этой связи поиск специфических биомаркеров воспаления позволит разработать патогенетическую стратегию терапии различных проявлений ПА, тем самым существенно увеличить клиническую и экономическую эффективность проводимого лечения. Изучение различных звеньев иммунного ответа и биомаркеров воспаления при ПА с применением современных иммунологических методов является чрезвычайно актуальной задачей современной медицины. Проведение многофакторного анализа роли клинических и иммунологических факторов в развитии ПА позволит обосновать разработку новых терапевтических подходов.

Последнее время в литературе все больше внимания уделяется роли микробиоты кишечника в развитии ПА (Aitoro R., 2018, Sampson NA, 2018, Rachid R., 2019). Очевидно, что микробиота кишечника существенно влияет на становление иммунного ответа ребенка и участвует в формировании оральной толерантности (Лаврова Т.Е., 2015, Stephen-Victor E., 2019, Zhu L., 2019). Ведутся активные исследования по выявлению особенностей состава кишечной микрофлоры, и рассматриваются основные направления и возможности диетического влияния на состав биоценоза у детей с ПА (Макарова С.Г., 2014, Смирнова Г.И., 2016, Shu S., 2019, Bunyavanich S., 2019, Reiger M., 2019). Однако, характер кишечной микробиоты ребенка, формирование иммунной системы слизистых оболочек у детей, механизмы взаимодействия микробиоты и иммунной системы слизистых оболочек, возможности использования пробиотиков для профилактики и лечения ПА остаются до конца не исследованными.

Все вышесказанное определяет актуальность проводимой работы.

Степень разработанности проблемы

ПА является сложным гетерогенным заболеванием, где главную роль играет наследственная предрасположенность, реализующаяся под действием факторов

внешней среды и, прежде всего, иммунных белков пищи (Yu W., 2018, Suaini NHA., 2019, Seth D., 2020). В этой связи изучению этиологической структуры ПА посвящено большое количество работ (Pasha I., 2016, Tordesillas L., 2017, Bird J., 2018). Сложность патогенеза ПА, ее полиэтиологичность, полиморфизм клинических проявлений, увеличение резистентных форм к используемым в настоящее время методам лечения требует нового подхода к решению этой чрезвычайно важной проблемы. Для подбора эффективного лечения необходим поиск клинически значимых биомаркеров воспаления, блокировка которых будет способствовать регрессу патологических изменений. В настоящее время ведутся попытки поиска маркеров воспаления у больных аллергическими заболеваниями, но при ПА таких работ практически нет.

На формирование системного иммунитета могут оказывать влияние нарушения в микробиоме кишечника. Изменение состава микробиома кишечника диктует необходимость поиска путей его восстановления. До недавнего времени широко использовались пробиотики, содержащие один штамм микроорганизмов. Применение же пробиотиков нового поколения, имеющих в своем составе различные штаммы микроорганизмов, требует дальнейших исследований. Отсутствуют данные о влиянии пробиотиков нового поколения на биомаркеры воспаления при ПА. Проведение многофакторного анализа роли клинических и иммунологических триггеров в развитии ПА позволит обосновать разработку новых терапевтических подходов.

Цель исследования

Изучить биомаркеры клеточного и мукозального иммунитета у детей с ПА для разработки комплексной терапии и оценки ее эффективности.

Задачи исследования

1. Дать клиническую характеристику детей раннего возраста, страдающих различными формами пищевой аллергии
2. Изучить особенности гуморального (общий IgE, IgG, IgM, IgA) и мукозального иммунитета (секреторный иммуноглобулин А (sIgA)) у детей с пищевой аллергией
3. Изучить состав основных популяций лимфоцитов: Т-лимфоцитов (CD3+CD19-), В-лимфоцитов (CD3-CD19+), естественных клеток-киллеров (NK-клеток) (CD3-CD56+CD16+), NKT-клеток (CD16+CD56+CD3+), цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3+CD8+), Т-хелперов (CD3+CD4+) у детей с различными формами пищевой аллергии
4. Исследовать содержание биомаркеров воспаления - эозинофильного катионного белка (ECP), эозинофильного нейротоксина (EDN), кальпротектина в зависимости от клинических форм пищевой аллергии
5. Изучить особенности микробиоты кишечника у детей с различными формами пищевой аллергии
6. Оценить клинико-иммунологическую эффективность мультиштаммового пробиотика в рамках комплексной терапии и его влияние на состав микробиоты, биомаркеры воспаления и субпопуляционный состав лимфоцитов у детей с ПА

Научная новизна

Впервые у детей с кожными и гастроинтестинальными проявлениями ПА проведено комплексное исследование мукозального, гуморального и клеточного иммунитета. Показано, что до начала терапии у всех детей отмечался низкий уровень фекального sIgA. Уровень общего IgE был повышен у 55,2% детей при нормальных значениях сывороточных IgA, IgG, IgM. Особенностью клеточного иммунитета явилось повышенное количество Т- и В-лимфоцитов при пониженных значениях относительных показателей NK-клеток, NKT-лимфоцитов и Т-цитотоксических клеток на фоне эозинофильного воспаления.

Впервые исследованы биомаркеры воспаления: эозинофильный катионный белок в сыворотке крови и эозинофильный нейротоксин и кальпротектин в кале у детей с кожными, гастроинтестинальными и смешанными формами ПА. Установлено, что у всех детей уровни ECP и EDN были повышены при нормальных показателях кальпротектина. Эти данные могут свидетельствовать об эозинофильном типе воспаления и отсутствии нейтрофильного при ПА у детей раннего возраста.

Впервые изучены особенности микробиоты кишечника бактериологическим методом у детей с кожными и гастроинтестинальными проявлениями ПА. Обнаружены нарушения микробного пейзажа кишечника в виде преобладания условно-патогенной флоры (*Staphylococcus aureus*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, грибов рода *Candida*) и снижения уровня индигенной флоры (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*).

Впервые проведена оценка терапевтической эффективности и безопасности мультиштаммового пробиотика у детей с кожными и гастроинтестинальными проявлениями ПА. Показано существенное улучшение клинических симптомов ПА после проводимого лечения. Определены перспективы практического использования пробиотиков в терапии кожных и гастроинтестинальных форм ПА у детей раннего возраста.

Практическая и теоретическая значимость

Комплексное обследование иммунного статуса у больных различными клиническими проявлениями ПА позволяет диагностировать эозинофильный тип иммунного воспаления, оценить особенности изменений в клеточном звене иммунитета и микробиоте кишечника. Данный принцип оценки позволяет персонализировать подход к коррекции выявленных нарушений.

Выявленные нарушения в количественном и качественном составе микробиоты кишечника при ПА обосновывают оптимизацию терапии у этих больных.

Установлено, что включение в комплексную терапию мультиштаммового пробиотика больным ПА способствует положительной динамике клинических симптомов и удлинению ремиссии болезни.

Методология и методы исследования

Работа проводилась на базе клиники ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии» с 2014 по 2019 гг. В исследование включены 192 ребенка с диагнозом ПА (110 мальчиков и 82 девочек) в возрасте от 3 месяцев жизни до 3 лет.

Проведено комплексное клиничко-anamнестическое, иммунологическое, аллергологическое, микробиологическое, инструментальное обследование. Используются современные методы статистической обработки результатов исследования.

Основные положения, выносимые на защиту

Оптимизация персонализированной терапии при пищевой аллергии должна осуществляться на основе комплексной оценки клинических симптомов, биомаркеров иммунного воспаления и микробиоты кишечника, которые позволяют определить характер течения болезни и провести коррекцию выявленных нарушений.

Рекомендуется определение эозинофильного катионного белка, эозинофильного нейротоксина, фекального кальпротектина, секреторного иммуноглобулина А и субпопуляций лимфоцитов для дифференциации типов воспаления (эозинофильного или нейтрофильного), как основа для обоснования персонализированной терапии и прогноза течения болезни.

Для коррекции нарушений в микробиоте кишечника у больных различными клиническими проявлениями пищевой аллергии показано использование

мультиштаммового пробиотика, содержащего комплекс различных пробиотических микроорганизмов, что повышает эффективность терапии.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертационное исследование соответствует формуле специальности 14.01.08 - Педиатрия. Медицинские науки - и областям исследования п. №1 «рост, физическое, половое и нервно-психическое развитие, состояние функциональных систем ребенка», п. №6 «внутренние болезни детей».

Личный вклад

Автор самостоятельно разработал дизайн исследования, осуществил отбор пациентов, провел клинический осмотр больных, анализ результатов проведенных исследований, осуществил контроль за больными, получающими курс терапии, участвовал в постановке иммунологических и аллергологических методов обследования. Автором лично проведена статистическая обработка данных, подготовка и публикация статей по теме диссертации.

Степень достоверности и апробация результатов

Степень достоверности результатов исследования подтверждается достаточным количеством наблюдений, предоставленными исходными данными, применением общепринятых методов исследования и лечения, современными методами статистической обработки результатов исследования.

Основные материалы диссертации представлены на Международном Конгрессе детских гастроэнтерологов России и стран СНГ (Москва, 2016, 2017, 2019), Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2017, 2018, 2019), Всероссийском конгрессе нутрициологов и диетологов с

международным участием «Фундаментальные и прикладные аспекты нутрициологии и диетологии. Качество пищи» (Москва, 2016, 2018), Московском городском съезде педиатров. «Трудный диагноз» в педиатрии. Преодолевая барьеры. II Мультидисциплинарный подход. (Москва, 2017), Congress of the European Academy of Allergy and Clinical immunology (Италия, 2016; Финляндия, 2017; Лондон, 2017; Германия, 2018, Португалия 2019), конференции АДАИР по детской аллергологии и иммунологии для практикующих врачей (Москва, 2016), Школе молодых ученых «Основы здорового питания и пути профилактики алиментарно-зависимых заболеваний» (Москва, 2016), Московском обществе детских врачей (Москва, 2016, 2017), Российском конгрессе «Инновационные технологии в педиатрии и детской хирургии» с международным участием (Москва, 2017, 2018, 2019), 15th EADV Spring Symposium (Черногория, 2018), конгрессе детских гастроэнтерологов России и стран СНГ «Актуальные вопросы абдоминальной патологии у детей» (Москва, 2018), конгрессе АДАИР: от клинических рекомендаций к персонализации диагностики и терапии в детской аллергологии и иммунологии (Москва, 2017), 5th World Congress of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (Glasgow, 2019).

Внедрение результатов исследования

Результаты проведенной работы внедрены в лечебную и практическую деятельность отделения ОПГГИД (педиатрической гастроэнтерологии, гепатологии и диетологии) и отделения аллергологии ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии», г.Москва, а также в медицинский центр «Парацельс», г.Москва.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 30 печатных работ, из них 5 статей - в рецензируемых научных журналах, рекомендуемых ВАК Российской Федерации.

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, литературного обзора, 5 глав с изложением материалов и результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы.

Диссертация содержит 153 страницы текста, 42 таблицы, 15 рисунков, 3 фотографии. В библиографический указатель включено 229 источников, из них 13 отечественных и 229 зарубежных.

Глава 1. Обзор литературы

1.1 Современный взгляд на проблему пищевой аллергии

В последние десятилетия рост распространенности ПА стал глобальным вызовом для общественного здравоохранения. Данная патология является наиболее тяжелым проявлением аллергии и ассоциирована с риском жизнеугрожающих реакций, дебютом атопического марша в раннем детском возрасте [130; 200; 207; 218]. По официальным данным Всемирной аллергологической организации (WAO) значительный темп повышения заболеваемости ПА затронул промышленно развитые страны [2; 7; 10; 167; 199]. Так, в США частота ПА составляет 4,8-8%, что представляет самые высокие показатели в мире [78]. По данным Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) различные проявления ПА встречаются у 2,5% населения [154]. Наиболее актуальна данная проблема в раннем детском возрасте [10; 11; 22; 58; 207], согласно анамнестическим данным различные проявления ПА встречаются у 17,3% детей [154]. Распространенность доказанной ПА преобладает среди детей раннего возраста и составляет 6-8%, при этом среди детей, страдающих кожными проявлениями ПА, ее частота превышает 30% [78; 121]. ПА - мультифакториальное заболевание, генетический риск развития которого реализуется в процессе онтогенеза под воздействием ряда внешнесредовых факторов, оказывающих воздействие на индивидуума в первый год жизни [10; 206]. Эпигенетическое воздействие факторов окружающей среды может влиять на наследственную экспрессию генов и, тем самым, в старшем возрасте приводить к эндокринным, метаболическим и иммунологическим изменениям [9].

Сформулирован ряд научных гипотез, объясняющих влияние различных внешнесредовых факторов на развитие ПА у детей [2; 10; 124; 131; 180]. Многие средовые факторы могут модифицировать микробиотический ландшафт

окружающей среды и/или организма хозяина и, таким образом, оказывать влияние на реализацию атопической конституции [88; 148]. Обсуждается роль различных факторов в формировании приверженности ПА: использование пробиотиков и пребиотиков, антибиотикотерапия, отсутствие контакта с домашними животными в раннем возрасте, особенности гигиены жилых помещений [69; 110; 125; 141; 206]. Установлено, что у детей, рожденных путем кесарева сечения, возрастает риск аллергических реакций на пищевые продукты [1; 21; 128; 202; 230].

Нарушение колонизации кишечника микрофлорой также может быть одной из причин развития ПА [12; 78; 138; 194]. Так, предполагается, что дисбиоз в неонатальном периоде может служить причиной активации Th2 клеток и препятствием к формированию оральной толерантности [3; 127].

Многие факторы риска развития ПА были изучены, однако, до настоящего времени не ясно, что движет ростом распространенности заболевания. Главным фактором риска, как и при других аллергических заболеваниях, является наследственная предрасположенность. В популяционном исследовании детей в возрасте до одного года с верифицированной ПА было выявлено, что риск ПА был повышен на 40% у детей, имеющих в семейном анамнезе одного родственника с аллергическим заболеванием. В то же время у детей, имеющих несколько родственников, страдающих аллергическими заболеваниями, риск ПА возрастал на 80% по сравнению с детьми, не имеющими наследственности по аллергопатологии [10; 21; 124; 164; 180]. Расовая / этническая принадлежность и другие демографические характеристики также связаны с развитием ПА: черная этническая принадлежность [69; 88; 141; 148], азиатская принадлежность [88] и мужской пол у детей [69; 125; 141] связаны с более высоким риском ПА. В целом, эти результаты предполагают генетическую предрасположенность, однако, генетические детерминанты ПА в значительной степени не определены. Есть некоторые доказательства, указывающие на специфические гены в восприимчивости к ПА, однако данные исследования проведены в недостаточном объеме. Мутации в гене филагрина у детей, не страдающих атопическим

дерматитом (АтД), были связаны с аллергией на арахис, что указывает на то, что кожа является потенциальным путем развития сенсibilизации [206]. Таким образом, существует генетическая основа для развития ПА, но необходимы дальнейшие исследования для определения конкретных вовлеченных в данный процесс локусов.

Недостаточность витамина D также связана с повышенным риском развития ПА [110; 202; 206], однако эти данные противоречивы и требуют дальнейшего изучения, так как нормальный уровень витамина D также связан с повышенным риском аллергической сенсibilизации [21]. Атопия, включающая в себя АтД и бронхиальную астму (БА) [141] тоже ассоциируется с повышенным риском развития ПА, как и факторы окружающей среды. Существует гипотеза о том, что усиленная микробная стимуляция в младенческом возрасте может оказывать защитное действие на развитие аллергии [8; 125]. Так, дети, у которых в доме имеются домашние животные, могут иметь меньший риск развития аллергии на яйцо в возрасте 12 месяцев [128].

ПА лежит в основе многих аллергических заболеваний: АтД, крапивницы, ангионевротических отеков, гастроинтестинальных симптомов, поллиноза, аллергического ринита, БА, анафилаксии. В большинстве случаев ПА обусловлена гиперпродукцией IgE-антител с формированием хронического воспаления в шоковом органе-мишени [11; 195]. Современная классификация проявлений ПА основана на клинико-иммунологическом принципе: выделяют как IgE-опосредованные, так и не-IgE-опосредованные реакции. В обоих типах ПА лежит эозинофильное аллергическое воспаление. Согласно классификации клинических проявлений ПА, представленной в согласительном документе Европейской Академии аллергологов и клинических иммунологов (EAACI Food Allergy and Anaphylaxis Guidelines, 2014), выделяют:

1. Специфические IgE-опосредованные реакции:

- оральная аллергическая реакция - ПА, обусловленная сенсibilизацией к пыльце (проявляется зудом, слабым ограниченным отеком ротовой полости);

- крапивница/ ангионевротический отек (проявляется острой аллергической реакцией при непосредственном контакте с аллергеном);
- риноконъюнктивит/ астма (могут быть вызваны вдыханием аллергена);
- гастроинтестинальные симптомы (такие симптомы, как тошнота, рвота, боли в животе и диарея, вызванные приемом пищи);
- анафилаксия (быстро прогрессирующая системная реакция);
- анафилаксия при ПА, вызванная физической нагрузкой (когда пища вызывает анафилаксию вследствие последующей физической нагрузки) [154; 196].

В большинстве случаев ПА обусловлена IgE - опосредованными механизмами. Специфические IgE-опосредованные реакции связаны с риском серьезных или смертельных осложнений; соответственно, это наиболее охарактеризованный тип ПА. У людей, сенсibilизированных к пищевому аллергену (тех, кто подвергся воздействию аллергена и имел начальный иммунный ответ), последующее воздействие пищевого аллергена запускает IgE-опосредованную дегрануляцию эффекторных клеток - тучных клеток и базофилов, что приводит к быстрому проявлению клинических симптомов. Эпитопы, полученные из пищевых аллергенов, прикрепляются к молекулам IgE, связанными с рецепторами Fc RI на поверхности этих эффекторных клеток, затем происходит эпитопспецифическое сшивание IgE-связанных рецепторов, что приводит к высвобождению предварительно образованного гистамина и других медиаторов немедленной аллергической реакции [212]. После этой немедленной фазы ответа происходит продукция лейкотриенов, фактора активации тромбоцитов и таких цитокинов, как IL-4, IL-5 и IL-13, которые поддерживают аллергическое воспаление [212].

2. Смешанные IgE-опосредованные и не-IgE-опосредованные реакции:

- атопическая экзема/дерматит (связаны с приемом пищи);
- эозинофильная гастроинтестинальная патология (симптомы варьируют в зависимости от участка поражения желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) и степени эозинофильного воспаления).

Этот класс ПА характеризуется как IgE-зависимыми, так и не-IgE-зависимыми путями. Атопические проявления, вызванные IgE-независимыми факторами, включают отсроченный аллергический дерматит, связанный с ПА (через 6-48 часов после воздействия) [207], вызванный действием T helper 2 (Th2) [211] и эозинофильные желудочно-кишечные расстройства, такие как эозинофильный эзофагит, который часто вызывается аллергенами молока и эозинофильной инфильтрацией тканей [241]. В настоящее время ведутся дальнейшие исследования, чтобы определить возможную роль ПА в этих условиях и оценить относительный вклад IgE-зависимых и IgE-независимых путей у таких больных.

3. Не-IgE-опосредованные реакции:

- пище-индуцированные проктит, проктоколит (проявляются патологическими примесями в стуле у младенцев (слизь, кровь));
- пище-индуцированный энтероколит. Проявляется рвотой, диареей, отставанием в росте, вялостью. При повторном введении продукта после его исключения из питания симптомы возобновляются.

Большинство известных не-IgE-опосредованных пищевых реакций, в первую очередь, поражают ЖКТ, а не кожу и дыхательные пути. Например, считается, что аллергенспецифические Т-клетки играют роль в этиологии синдрома пищевого белка, вызванного энтероколитом, пищевого белка, вызванного проктоколитом и пищевой белковой энтеропатией [8]. Эти формы ПА в основном встречаются у младенцев и детей младшего возраста, которые имеют аллергию на белки коровьего молока (БКМ). Их распространенность является неопределенной из-за отсутствия диагностических тестов, а лечение заключается в предотвращении пищевых аллергенов, то есть диетотерапии.

В подавляющем большинстве случаев причинно-значимыми аллергенами при ПА являются белки пищевых продуктов, как простые, так и сложные (гликопротеины), реже - полипептиды, гаптены, которые соединяются с белками пищи [10; 154]. Практически любой пищевой продукт может вызвать

аллергическую реакцию. Выделяют так называемую «большую восьмерку» продуктов, вызывающих аллергическую реакцию: коровье молоко, куриное яйцо, арахис, орехи, рыба, морепродукты, пшеница, соя.

Доказано, что пищевые аллергены могут изменять свои антигенные свойства в процессе кулинарной обработки. Аллергию на такие продукты, как коровье молоко, куриное яйцо и пшеницу часто перерастают (пациенты приобретают толерантность), в то время как аллергия на арахис, лесные орехи и рыбу сохраняется почти в течение всей жизни [70; 136; 137; 197; 206; 214].

В зависимости от клинических проявлений выделяют несколько фенотипов ПА: гастроинтестинальный, кожный и респираторный. Следует отметить, что у людей, страдающих ПА, могут присутствовать одновременно несколько фенотипов или один фенотип может переходить в другой [11].

- *Гастроинтестинальный фенотип ПА* проявляется болями в животе, периодически рвотой, рецидивирующей диареей. У некоторых может наблюдаться потеря массы тела, патологические примеси в стуле (кровь/слизь). У ряда больных отмечается оральный аллергический синдром, характеризующийся быстро возникающим отеком губ и зудом слизистой полости рта и задней стенки глотки. Данные проявления могут вызывать любые пищевые продукты, однако чаще всего это коровье молоко, пшеница, рыба, морепродукты, соя и фрукты (особенно, у больных с поллинозом) [11].

- *Кожный фенотип ПА* проявляется АТД, крапивницей, ангионевротическим отеком. АТД является наиболее частым проявлением ПА у детей первых трех лет жизни. Клиническая картина кожного процесса АТД довольно разнообразна: в раннем возрасте на коже преобладает экссудативное воспаление, позже - лихеноидные и пруригинозные высыпания. При экспозиции пищевых аллергенов может развиваться крапивница и аллергические отеки (ангиоотек). Данные проявления могут вызвать также любые пищевые продукты, но чаще всего - коровье молоко, яйцо, рыба, соя, арахис, морепродукты, пшеница, орехи, свекла, морковь, цитрусовые, различные тропические фрукты [11].

- *Респираторный фенотип ПА* проявляется БА, риноконъюнктивальным синдромом, затрудненным носовым дыханием, ринореей, чиханием, конъюнктивитом. Вызывают яблоко, морковь, овощи, томат, свежие фрукты, морепродукты, арахис, рыба [11].

Клинический анамнез и физикальное обследование - это первый подход к диагностике ПА, который должен учитывать такие конкретные факторы риска, как наследственная предрасположенность и сопутствующая патология [48; 222]. Сопутствующие заболевания, такие как астма, аллергический риноконъюнктивальный синдром или АтД могут свидетельствовать о повышенном риске развития IgE-опосредованной ПА [58]. Важно ведение пищевого дневника, в котором родитель отмечает пищевые продукты, использованные в момент появления клинической симптоматики, и время появления первых симптомов [109], путь воздействия, характер и продолжительность симптомов, а также применимая терапия. Симптомы во время IgE-опосредованной аллергической реакции могут варьировать от легкой до тяжелой степени тяжести, с участием одного или нескольких органов или систем. Таким образом, анамнез заболевания, немедленная тяжелая аллергическая реакция с участием нескольких органов или систем после приема пищи могут указывать на возможную роль IgE-механизмов развития ПА.

При подозрении на IgE-опосредованную ПА для определения причинно-значимого аллергена рекомендуют проведение *in vitro* (измерение общего и аллергенспецифических IgE-антител) и *in vivo* - кожных скарификационных проб (КСП) [48]. Повышенные уровни специфических IgE могут указывать на пищевую сенсибилизацию. КСП провоцируют аллерген-опосредованную дегрануляцию тучных клеток в коже, что приводит к появлению волдырей и покраснению после прокалывания эпителиального барьера. Результаты оценивают через 15 минут.

Однако, уровни специфических IgE и КСП указывают только на сенсибилизацию аллергена (которая необходима, но не достаточна для

постановки диагноза ПА), а не на клинически значимую ПА. Также эти тесты связаны с высоким уровнем как ложноотрицательных, так и ложноположительных результатов, что частично связано с перекрестной реактивностью между гомологичными белками [109].

Единственный точный метод диагностики ПА - это провокационные тесты с пищевыми аллергенами, при котором возрастающие дозы потенциального пищевого аллергена вводят в организм через фиксированные промежутки времени до тех пор, пока не наблюдается аллергическая реакция или не будет достигнута его максимально переносимая доза [64; 234].

Современный подход в лечении ПА включает в себя строгое исключение потенциально опасной пищи в рационе питания; а также обучение пациента и членов его семьи в правильном распознавании и интерпретации аллергической реакции [24]. В частности, рекомендуется тщательно анализировать состав комплексных продуктов, учитывать варианты перекрестных реакций во время приготовления пищи [205]. Повышенная осведомленность о ПА среди медицинских работников, школ и общественности является приоритетным для обеспечения эффективного контроля ПА.

Согласно современным исследованиям, выдвинуты новые концепции в лечении ПА [173]. Они включают в себя раннее диетическое введение потенциально аллергенных продуктов, предварительное тестирование на родственные аллергены после выявления конкретной пищевой сенсibilизации и новые стратегии [173].

Еще одной областью интереса стала потенциальная роль пробиотиков в лечении аллергии на БКМ. Добавление в гидролизованную казеиновую смесь *Lactobacillus GG* ускорило развитие толерантности у младенцев с аллергией на коровье молоко [24; 38; 39].

Таким образом, основой диагностики ПА является тщательный сбор анамнеза и клиническая симптоматика заболевания. В то же время, отсутствуют биомаркеры ПА, особенно при не-IgE-опосредованной аллергии, в связи с чем

разработка маркеров поможет нам в диагностике ПА, определении активности воспаления в ЖКТ и в оценке эффективности проводимой терапии.

1.2 Характеристика биомаркеров воспаления при пищевой аллергии у детей

В последние десятилетия активно ведется поиск специфических маркеров воспаления, которые смогли бы спрогнозировать течение болезни, риски повторных обострений, а также эффективность персонализированной терапии. Известно, что процесс, лежащий в основе аллергических заболеваний, является воспалительной реакцией. Это воспаление как при IgE-опосредованной, так и при не-IgE-опосредованной ПА является эозинофильным. Область аллергического воспаления становится все более сложной с описанием новых путей и медиаторов. Поэтому изучение эозинофилов и их медиаторов (EDN и ECP) является перспективным в диагностике ПА, определении степени ее активности и динамическом наблюдении на фоне терапии.

Эозинофильное воспаление является одним из основных механизмов в развитии ПА у детей. Эозинофилы встречаются при многих аллергических заболеваниях, но их функциональная роль в значительной степени остается неясной [80; 83].

В частности, эозинофилы реагируют на воспалительную и аллергическую стимуляцию и транспортируются в легкие, кожу, пищевод, печень, ЖКТ и скелетные мышцы. Являясь заметными компонентами слизистой оболочки ЖКТ в гомеостазе и в ответ на острые воспалительные раздражители, эозинофилы расположены таким образом, чтобы быть способными непосредственно взаимодействовать с бактериями и бактериальными компонентами, как полученными из комменсальной микрофлоры, так и из введенных пробиотических бактерий. Эозинофилы могут выполнять презентацию антигена, реагировать на про- и противовоспалительные медиаторы и высвобождать

предварительно сформированные гранулярные белки и цитокины, которые могут модулировать местную воспалительную реакцию [20; 67; 105; 134; 135; 209]. Регулятивный потенциал эозинофилов как в врожденных, так и в адаптивных иммунных реакциях активно изучался в течение последнего десятилетия и стал мишенью для терапевтических стратегий лечения при аллергических заболеваниях [88]. Есть доказательства того, что эозинофилы могут способствовать защите от патогена, регулировать воспалительные реакции и участвовать в ремоделировании при кожных заболеваниях [69; 141].

Таким образом, терапия, направленная на эозинофилы, может помочь контролировать различные заболевания, включая атопические расстройства, такие как астма и аллергия, и заболевания, не связанные в первую очередь с эозинофилами, такие как аутоиммунитет и злокачественные новообразования. В последнее время терапия, нацеленная на эозинофилы, направлена на блокировку определенных этапов развития, миграцию и активацию эозинофилов.

Зрелые эозинофилы человека содержат кристаллоидные вторичные гранулы, которые в основном состоят из высоко заряженных основных белков, включая два основных белка: ЕСР, EDN и эозинофильную пероксидазу [95]. Отложение гранул, высвобождаемых из эозинофилов в тканях, является распространенным явлением при эозинофильных ассоциированных заболеваниях и, вероятно, способствует патогенезу заболевания [17; 63; 77; 111; 160;]. Однако, высвобождение данных белков при активации эозинофилов до сих пор не было оценено в отношении развития ПА. EDN относится к семейству гранулярных белков РНКазы, который высвобождается при взаимодействии аллергена и IgE, уничтожает чужеродные клетки и подавляет рост РНК-вирусов, оказывая цитотоксическое, антимикробное и противовирусное действие [95; 125; 236]. Таким образом, высвобождение и повышение уровня EDN в различных секретах (моча, кал, сыворотка крови) может отражать степень участия того или иного органа в аллергическом процессе [20]. EDN зарекомендовал себя как перспективный маркер эозинофильного воспаления БА [86; 117; 122; 217], а также

и других воспалительных заболеваний, таких как риносинусит, АтД, воспалительные заболевания кишечника и эозинофильные желудочно-кишечные расстройства [86; 95; 142; 186; 191; 192; 236]. Так, при АтД сывороточный EDN отражает тяжесть заболевания и может предсказывать рецидив при тяжелом непрерывно-рецидивирующем АтД [115], таким образом его можно рассматривать как клинический биомаркер для оценки активности АтД. Уровень сывороточного EDN изучался у детей с рецидивирующими хрипами и БА, который повышался только у пациентов с atopической астмой и коррелировал с тяжестью течения астмы [114; 117]. При изучении фекального EDN у детей с синдромом энтероколита, индуцированного пищевыми белками, также было отмечено повышение его уровня после употребления причинно-значимого пищевого продукта [226]. Таким образом, изменения концентрации EDN, вероятно, зависят главным образом от изменений в эозинофильном воспалении. Таким образом, мы предположили, что фекальный EDN может предсказать активность эозинофильного воспаления у детей, страдающих ПА.

Еще одним маркером эозинофильного воспаления является ECP. Это высококатионный белок с многочисленными биологическими функциями и цитотоксическим действием, который накапливается эозинофилами и нейтрофилами. Только активированные гранулоциты эозинофилов высвобождают содержимое гранул, и поэтому определение концентрации ECP является более конкретным индикатором воспаления эозинофилов, чем количество эозинофильных гранулоцитов в периферической крови. ECP связан с различными заболеваниями; наибольшее количество клинических исследований посвящено atopическим заболеваниям: астме, аллергическому риниту, АтД [23; 106; 108; 120; 172]. Повышенные уровни данного маркера пропорциональны интенсивности аллергического воспаления и указывают на острое воздействие аллергена. Кроме того, диагностическая и прогностическая роль ECP исследуется также при других заболеваниях, связанных с эозинофилами, таких как инфекционные заболевания, респираторные заболевания, воспалительные кишечные заболевания,

злокачественные новообразования с эозинофилией [55; 96; 123; 147; 169; 176]. ЕСР активно изучается как потенциальный маркер астмы, поскольку секреторная активность эозинофильных гранулоцитов, особенно высвобождение продуктов дегрануляции, является важным компонентом патофизиологии астмы. Так, у больных данным заболеванием было обнаружено, что концентрация ЕСР в тканях и жидкостях организма коррелирует с активностью заболевания, таким образом ЕСР может помочь в оценке степени тяжести астмы и в принятии решения о типе и интенсивности терапии [112; 159; 172; 213; 221]. Отслеживая изменения уровней ЕСР после начала терапии, можно оценить эффективность конкретной дозы препарата и, при необходимости, скорректировать дозировку, чтобы избежать передозировки или приступа астмы из-за слишком низкой дозы [108; 120]. В верхних дыхательных путях ЕСР и количество эозинофилов являлись сильными предикторами аллергического ринита, также они были признаны полезными для оценки эффективности лечения. Также его использовали для мониторинга эффективности сублингвальной иммунотерапии у больных аллергическим ринитом на клещей домашней пыли [61; 102; 118; 120; 189].

По сравнению с другими атопическими заболеваниями изучение сывороточного ЕСР при ПА остается ограниченным, поэтому для определения полезности ЕСР в качестве биомаркера ПА мы предположили, что уровень ЕСР в сыворотке крови может снизиться после лечения и будет коррелировать с клиническим улучшением в динамике и, возможно, с прекращением симптоматического лечения. Однако необходимы дальнейшие исследования с привлечением более крупных выборок для определения полезности ЕСР в качестве биомаркера воспаления при ПА.

По данным литературы, фекальный кальпротектин может быть одним из маркеров воспаления при ПА, который нам поможет в дифференциальной диагностике между эозинофильным и нейтрофильным воспалением. Воспаление часто определено как одна из первопричин хронических заболеваний, поражающих пациентов. Наличие биомаркера, который можно было бы

обнаружить в сыворотке, плазме, кале и моче, могло бы облегчить некоторые трудности, связанные с инвазивными процедурами наблюдения за этими пациентами.

Фекальный кальпротектин представляет собой гетеродимерный белок, принадлежащий к семейству кальцийсвязывающих белков S100. Кальпротектин присутствует в тканях и жидкостях, особенно много его в нейтрофилах и моноцитах [110]. Его можно обнаружить в кале, где он остается стабильным в течение недели. Кальпротектин обладает иммуномодулирующим, антимикробным и антипролиферативным действием, который преимущественно обнаруживается в нейтрофилах, моноцитах и макрофагах, а также (в меньшей степени) в Т- и В-лимфоцитах, является регуляторным белком при воспалительных реакциях [202]. Воспаление в ЖКТ вызывает увеличение проницаемости слизистой оболочки, которая индуцирует миграцию в просвет кишечника гранулоцитов и моноцитов. Активация и апоптоз этих клеток приводит к высвобождению большого количества кальпротектина. Таким образом, измерение уровня данного показателя является чувствительным и неинвазивным маркером, определяющим активное воспаление в ЖКТ [40; 56; 190].

Высокие уровни кальпротектина были описаны при различных патологиях ЖКТ, АтД [57; 60; 94; 163; 201]. Так, более высокие уровни кальпротектина в кале наблюдались у пациентов с тяжелой формой АтД, таким образом его измерение может быть полезно для оценки тяжести АтД [163; 201]. Уровни фекального кальпротектина доказали свою надежность при воспалении кишечника, обладают хорошей клинической чувствительностью и полезны при скрининге и мониторинге воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК), а также при дифференциальной диагностике между ВЗК и синдромом раздраженного кишечника (СРК). Было также установлено, что он является экономически эффективным диагностическим инструментом для диагностики ВЗК [237], а также для выявления затихающей болезни Крона [157]. Следует отметить, что

повышенный уровень кальпротектина может быть обнаружен не только при ВЗК, но и при других патологических состояниях ЖКТ, включая инфекционный колит, эозинофильный колит, колоректальный рак и другие заболевания кишечника [73; 139; 152; 231]. Понимание клеточных и молекулярных механизмов патогенеза аллергического воспаления стремительно прогрессирует с 2010 года [51]. Клинические исследования Verni et al. [40] предположили, что у детей с аллергическим колитом повышенный уровень кальпротектина кала отмечался во время активной стадии, который снижался до нормы после четырех недель скорректированной диеты. Некоторые исследователи сообщали, что у детей, страдающих ПА, концентрация фекального кальпротектина в 2 раза выше, чем у здоровых детей [227]. По мере того как желудочно-кишечные симптомы улучшались или исчезали, уровень кальпротектина в кале значительно снижался [34]. Beser et al. [42] получили аналогичные результаты, когда сравнивали младенцев с аллергией на БКМ и здоровых младенцев. Burry et al. [54] и Manz et al. [145] предположили, что обнаруженный фекальный кальпротектин может улучшить диагностику абдоминальных жалоб. Таким образом, фекальный кальпротектин представляет собой привлекательный биомаркер, который может быть использован при различных заболеваниях ЖКТ помимо ВЗК, и в настоящее время широко изучается многими исследовательскими группами с появлением значительного объема данных [53; 82; 131; 190; 219; 229]. Однако, по данным отечественной и зарубежной литературы у маленьких детей, страдающих ПА, использование фекального кальпротектина ограничено и не получило широкого признания.

Таким образом, диагностика ПА в настоящее время основывается только на тщательном сборе анамнеза и клинических данных заболевания. Осложняется отсутствием клиничко-лабораторных биомаркеров аллергического воспаления. Оценка эффективности назначенной дието- и фармакотерапии зачастую определяется эмпирическим методом без характеристики биомаркеров, определяющих прогноз течения заболевания. Поэтому использование ECP, EDN и

фекального кальпротектина может быть перспективным в плане как диагностики ПА, так и определении ее степени активности и динамическом наблюдении при терапии.

1.3 Состояние мукозального и клеточного иммунитета при пищевой аллергии у детей

Согласно современным представлениям, ПА развивается при отсутствии толерантности, либо ее утрате, что может быть вызвано различными причинами [35]. Одной из причин считается иммунологическая незрелость некоторых факторов иммунной системы, в том числе и факторов мукозального иммунитета, которая играет важную роль в сложных механизмах иммунорегуляции [5; 10; 154]. Мукозальный иммунитет (иммунитет барьерных тканей, иммунитет слизистых, кожи) привлекает особое внимание различных исследователей и врачей за счет того, что большинство иммунных ответов происходит в барьерных тканях, которые находятся под постоянной антигенной нагрузкой за счет различных попыток проникновения в организм патогенных микроорганизмов и ксенобиотиков [6].

Секреторный IgA является важнейшим фактором мукозальной иммунной системы ЖКТ, а также первой линией защиты от инородных антигенов [206]. sIgA является преобладающим иммуноглобулином в собственной пластинке кишечника [124], где он нейтрализует пищевые антигены, предотвращая их проникновение через эпителиальный барьер [148]. Физиологическая незрелость слизистого барьера ЖКТ, связанная с дефицитом sIgA у детей раннего возраста, играет важную роль в особенностях реализации иммунного ответа у детей первых лет жизни [9] и является первичным медиатором мукозального иммунитета кишечника [180]. Очевидно, что повышенная проницаемость эпителия для экзогенных антигенов является важным первичным или вторичным событием в

патогенезе многих заболеваний, включая аллергию, таким образом сниженная барьерная функция слизистой может увеличить риск развития аллергии [2]. Последние исследования показали, что повышенная проницаемость кишечника у детей с ПА коррелирует с тяжестью клинических симптомов [130]. Ключевую роль мукозального иммунитета в индукции пищевой сенсibilизации документирует тот факт, что у детей раннего возраста с дефицитом sIgA ПА встречается чаще [19]. Было высказано предположение, что частота ПА повышается у пациентов с нарушением развития системы IgA (Brandtzaeg, 2002); и основной дефицит sIgA наблюдался в мышинной модели с ПА, что подразумевает участие секреторных антител в индукции оральной толерантности (Frossardm et al., 2004). Таким образом, sIgA играет ключевую роль в индукции оральной толерантности. Другие исследования показали, что сниженный уровень sIgA в кале в младенчестве предшествует развитию астмы и аллергии, что, возможно, указывает на нарушение барьерной функции слизистой оболочки у аллергических детей [71]. Кроме того, было обнаружено, что уровень sIgA в материнском молоке значительно ниже у матерей, у детей которых развилась аллергия на БКМ, что указывает на то, что sIgA может играть решающую роль в предотвращении ранней сенсibilизации к пищевым аллергенам [100; 116]. Данных литературы о sIgA при ПА недостаточно, что требует дальнейших исследований.

Иммунные реакции, включая аллергические реакции, состоят как из гуморальных, так и из клеточных компонентов. Наличие аллергических реакций в решающей степени зависит от активности иммунных клеток, что свидетельствует о важности клеточного иммунитета, в основе которого лежат лимфоциты, которые после их созревания в костном мозге перемещаются в тимус, где происходит их окончательное созревание. В течение своей жизни лимфоциты множество раз покидают лимфоидные органы для поступления в кровь, после чего вновь возвращаются обратно. Благодаря этой мобильности данные клетки достаточно быстро могут появляться в местах воспаления. Т-

лимфоциты подразделяются на Т-киллеры, которые могут уничтожать антигены; Т-хелперы, которые первыми узнают о попадании в организм врагов и в ответ на это реагируют выработкой особых ферментов, вызывающих созревание и размножение Т-киллеров и В-клеток [4; 13; 65].

В иммунологическом отношении аллергический ответ характеризуется дисфункцией Т-клеток с преобладанием Th2 лимфоцитов с последующим включением IgE-ответа и развитием аллергического воспаления. Воспаление в «шоковом органе» при ПА зависит от взаимодействия между адаптивной (Т-лимфоцитами) и врожденной иммунной системой (к примеру, дендритными клетками). Данное взаимодействие определяется типом Т-эффекторных клеток (Th1/Th2), участвующих в развитии воспаления. Таким образом, развитие аллергических заболеваний происходит по причине дисбаланса и дисрегуляции адаптивного и врожденного иммунитета. Общими признаками этих воспалительных реакций являются так называемые аллергические или иммунные нарушения "типа 2" [158].

Клетки Th1, индуцированные против внутриклеточных паразитов, которые привлекают макрофаги, нейтрофилы, NK-клетки, цитотоксические Т-клетки, В-клетки и эффекторные клетки уничтожают их путем активации клеточно-опосредованного иммунитета [107; 178; 232]. Клетки Th2, напротив, характеризуются экспрессией IL-4, IL-5 и IL-13 в ответ на передачу сигналов IL-4. Клетки Th2, индуцированные против внеклеточных паразитов, в основном гельминтов и аллергенов, рекрутируют В-клетки для выработки IgE-антител, базофилов, эозинофилов и тучных клеток для устранения паразитов путем активации гуморальных и клеточно-опосредованных иммунных ответов. Чрезмерная активация иммунитета Th2 может привести к системным аутоиммунным воспалительным заболеваниям, таким как аллергия и АтД [150; 153; 174].

Аллергены стимулируют Th2-иммунитет, экспрессируя Th2-ассоциированные цитокины. Однако, длительная секреция цитокинов Th2 иногда

приводит к неблагоприятным аллергическим реакциям у человека, характеризующимся высоким уровнем IgE в сыворотке крови при различных аллергических заболеваниях. Таким образом, секрецию Th2-цитокинов необходимо контролировать. Идея разработки и проектирования любого лекарственного препарата основана на трех подходах: во-первых, блокировке ключевого фактора, необходимого для секреции цитокинов Th2; во-вторых, нужны сигналы, необходимые для дифференцировки и выживания Th2-иммунных клеток; и в-третьих, активация Th1-иммунитета для восстановления иммунного дисбаланса Th1/Th2. Например, эозинофилы быстро проникают в органы-мишени при воспалении, что приводит к мобилизации других иммунных клеток, таких как дендритные клетки, тучные клетки, базофилы и НКТ-клетки для обеспечения Th2-ответа. Ингибирование активности этих клеток является целью таргетной терапии Th2 иммунных заболеваний [234]. Исследования Fulya et al. показали, что подтипы НКТ-клеток значительно снижаются у пациентов с АД, что позволяет предположить, что НКТ-клетки могут играть определенную роль в патогенезе АД [81; 92; 101].

Исходя из вышеперечисленного, определение фекального секреторного IgA и субпопуляций лимфоцитов может быть перспективным в плане оценки эффективности назначенной дието- и фармакотерапии, которая зачастую определяется эмпирическим методом, непосредственно, без характеристики биомаркеров мукозального и клеточного иммунитета, определяющих прогноз течения заболевания.

1.4 Роль нарушений микробиоты кишечника в развитии пищевой аллергии у детей

В 2008 г. был запущен глобальный проект «Микробиом человека», ставивший своей целью расшифровку генома бактерий, населяющих

организм человека. В настоящее время получено полное описание состава и разнообразия микробиоты большинства локализаций человеческого организма. Наиболее изучена микробиота кишечника. Нарушения микробиома кишечника приводят к снижению количества ROR γ ⁺ Treg клеток IL10-продуцирующих регуляторных В-клеток и Th2 смещения иммунитета при взаимодействии с такими безобидными антигенами, как еда или пыльца [29; 208; 223]. Помимо воздействия на организм паразитов извне, 100 триллионов микробов колонизируют барьерные участки внутри нашего тела, причем большинство из них находятся в кишечнике. Состав микробиома динамичен и сильно зависит от внешних факторов, таких как диета, образ жизни, использование антибиотиков, способ родоразрешения, характер вскармливания, вакцинация и воздействие различных патогенов. Воздействие комменсальных бактерий начинается уже во время беременности и продолжается на протяжении всей жизни. Микробиота кишечника нестабильна во время начальной колонизации и развития кишечника в первые 2-3 года жизни. Было показано, что нарушения микробной колонизации в этот период повышают восприимчивость к заболеваниям в течение всей жизни. После трехлетнего возраста микробиота кишечника прогрессирует в направлении взрослой конфигурации и, по существу, остается стабильной, если ее не модифицировать [26; 30; 147; 170].

Интенсивный интерес к влиянию микробиома человека, в частности микробиома кишечника, на развивающуюся иммунную систему и аллергию был вызван недавней разработкой независимых от культуры инструментов для более полного измерения состава бактериальных сообществ. Однако еще до появления этих технологий исследователи постулировали, что механизмы, лежащие в основе гигиенической гипотезы, были связаны с изменениями в паттернах “нормальной” кишечной микробной колонизации младенцев [183, 233]. Небольшие исследования с использованием культурально-зависимых методов показали различия в распространенности кишечных микроорганизмов между атопическими и неатопическими младенцами [45], хотя последующие исследования не нашли

подтверждающих различий, связанных с пищевой сенсibilизацией или атопической экземой, используя культурально-зависимые оценки [16]. В 2001 году Kalliomaki et al. оценивал образцы кала из небольшой когорты новорожденных (n=76), используя как культуральные, так и культуральные бактериальные показатели. Исследование показало, что культурально-независимые подходы выявили фекальные микробные различия, которые отличали детей, у которых развилась аллергическая сенсibilизация [103]. Murray et al. использовали аналогичный подход в исследовании 33 пар детей и обнаружили, что соотношение бифидобактерий к общему количеству фекальных бактерий было ниже у детей с экземой в возрасте 4 лет [155].

Использование новых методов секвенирования значительно расширило наши знания о составе микробиоты человека и ее связи с различными болезнями. Известно, что человеческий организм состоит из 10-100 триллионов микробов и более 1000 видов бактерий [170]. Наибольшее количество микробов находится в кишечнике человека [32; 91]. Количество микробов, обнаруженных в кишечнике человека, в 10 раз превышает количество клеток, составляющих человеческий организм [184], хотя это соотношение оспаривается [27]. Исследования последних нескольких лет выявили значительную роль кишечной микробиоты в становлении иммунной системы [104; 188; 203; 241]. Микробиота кишечника участвует в развитии органов иммунной системы. Исследования, посвященные связи между иммунными заболеваниями и микробиотой кишечника показали, что различные комменсальные бактерии могут индуцировать изменения в иммунной системе [18; 32; 215], которые влияют на регуляцию метаболизма хозяина, созревание иммунной системы и развитие оральной толерантности [89; 44]. Таким образом, усилились попытки уменьшить аллергические проявления заболеваний путем корректировки разнообразия микробиоты кишечника.

Нарушение исходного состава микробиоты (дисбактериоза) связано с развитием ПА [171]. До сих пор остается не ясным, как именно дисбактериоз влияет на иммунную систему при развитии ПА, но исследования показывают, что

микробиота кишечника влияет на иммунную систему, влияя на метаболизм хозяина и на изменение адаптивного иммунитета [89; 97]. Дисбактериоз влияет на изменение состава и функции микробиоты таким образом, что он нарушает гомеостаз кишечника и способствует развитию заболеваний [26]. Изменения образа жизни, включая переезд из сельской местности в городские условия, диета с высоким содержанием белков и жиров, кесарево сечение, искусственное вскармливание влияют на состав нашей микробиоты и, следовательно, на иммунитет. Достижения в области молекулярных методов исследований, таких как секвенирование генов бактериальной 16S рРНК для филогенетической и таксономической оценки бактериального сообщества представляют важную информацию о роли некоторых бактерий в переносимости пищи.

Микробный состав, полученный из биоптатов содержимого фекалий, может быть проанализирован с помощью анализа гена 16S рРНК. Так, например, в группе из 40 шведских младенцев низкое микробное разнообразие фекалий, измеренное с помощью 16S рРНК, было связано с атопической экземой [15]. Анализ показал, что кишечная микробиота мышей и человека состоит из сотни различных филогенетических видов, которые можно классифицировать на четыре основных микробных типа: Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes and Bacteroidetes. Эти группы составляют 98% кишечной микробиоты [32; 52; 240]. Таксономический состав микробиоты также меняется с возрастом: в микробиоте кишечника новорожденных изначально преобладают Proteobacteria (например, Escherichia, Shigella), а затем Actinobacteria (например, Bifidobacterium), до созревания во взрослую микробиоту преобладают Firmicutes и Bacteroidetes [14; 42]. Это созревание отражается в соотношении между Enterobacteriaceae (Proteobacteria и Actinobacteria) и Bacteroidetes (Firmicutes и Bacteroidetes), в то время как с возрастом данное соотношение меняется: отмечается уменьшение Enterobacteriaceae и увеличение Bacteroidetes.

Существуют также противоречивые результаты о том, что у пациентов с ПА наблюдалось повышенное содержание Clostridia [84; 179; 198]. Виды Clostridia,

которые до сих пор были идентифицированы как имеющие связь с ПА-это *Clostridium* и *Ruminococcus* [33; 46; 85]. Было показано, что микробиота, особенно виды *Clostridia*, способна индуцировать выработку Tregs, которые помогают подавить аллергическое воспаление и повысить оральную толерантность [43; 62; 97; 113; 177; 185]. Вышеупомянутые доказательства обеспечивают основу для разработки инновационных стратегий в области профилактики и терапии ПА. Другие исследования также показали, что мыши, толерантные к ПА, имеют более высокое содержание *Ruminococcaceae* по сравнению с непереносимыми аналогами, что подтверждает потенциальное защитное действие *Ruminococcus* на ПА [15; 29; 30; 46].

Влияние микроорганизмов играет значительную роль начиная с периода беременности и далее во все периоды развития организма ребенка. Доказано, что младенцы, рожденные вагинально, подвергаются воздействию как материнской фекальной, так и вагинальной микробиоты, тогда как младенцы, рожденные путем кесарева сечения, подвергаются воздействию только кожной материнской микробиоты и микробов окружающей среды [119; 193]. Позже микробиота кишечника младенца претерпевает динамические изменения, приводящие к появлению взрослой микробиоты примерно к 3 годам, что соответствует времени, к которому ребенок начинает переходить на общий стол [140]. Недавние исследования между колонизацией кишечной микробиоты и пищевой сенсibilизацией у детей раннего возраста показали, что микробиом может играть определенную роль в развитии ПА [59; 87]. Младенцы, рожденные путем кесарева сечения, развивают другой паттерн колонизации кишечной микробиоты, так как они не подвергаются воздействию материнским влагалищным микробам. Таким образом, отсутствие воздействия полезных микробов, присутствующих в родовых путях, может повлиять на колонизацию микробиома кишечника ребенка и последующее развитие иммунитета. Данные анализа генов 16S рРНК показали более низкие уровни *Bacteroidetes*, более низкое разнообразие внутри типа *Bacteroidetes* и более высокий уровень разнообразия в типе *Firmicutes* (*Bacilli* и

Clostridium g4) [182]. Что интересно, более низкое разнообразие в пределах типа *Bacteroidetes*, а также более низкое общее микробное разнообразие в раннем младенчестве предшествуют развитию аллергических проявлений [32; 68; 162]. Azad M., Konya T., Guttman D. et al. выявили это низкое разнообразие кишечных микробов и повышенное соотношение E/B у детей с последующим развитием пищевой сенсибилизации [32]. Это подтверждает выводы о соотношении E/B, присутствующими в микробиоме кишечника младенцев с аллергией на БКМ, имеющих обилие *Ruminococcaceae* и *Lachnospiraceae* по сравнению с подобранными по возрасту здоровыми детьми, где преобладают *Bifidobacterium*, *Enterobacteriaceae* и *Enterococceae* [239]. Таким образом, корреляция между повышенным соотношением E/B и развитием аллергических заболеваний отмечается в различных исследованиях, однако механизмы такой связи не ясны [32; 239]. Тем не менее, эта корреляция подтверждает выводы, связывающие кесарево сечение с развитием аллергических заболеваний.

Молозиво и грудное молоко также играют немаловажную роль в развитии микробиоты кишечника во младенчестве. Ранее считалось, что грудное молоко является стерильным, однако в 12-месячном исследовании было показано, что грудные дети получали 27,7% своих кишечных бактерий из грудного молока и 10,4% из ареолярной кожи в течение первого года жизни [144]. Бактериальное разнообразие и состав микробиоты изменяется пропорционально ежедневному потреблению грудного молока дозозависимым образом, даже после введения продуктов прикорма [146]. Следовательно, грудное вскармливание может передавать микробы ребенку во время кормления грудью. sIgA в грудном молоке не только защищает от патогенов, но и способствует развитию микробиоты в организме новорожденного [76]. Также грудное молоко содержит олигосахариды человеческого молока, стимулирующие рост *Bifidobacterium* рода *bifidum* и рода *Lactobacillus* [198], которые являются основными пробиотическими организмами в кишечнике, образуя кислую среду с обогащенными короткоцепочечными жирными кислотами [132]. Следовательно, младенцы,

находящиеся на грудном вскармливании, колонизируются *Bifidobacterium* и *Lactobacillus* в отличие от младенцев, находившихся на искусственном вскармливании [15]. Микробиота может играть непосредственную роль в ингибировании толерантности, приводя к пищевой сенсibilизации и дисбактериозу.

Использование антибиотиков также изменяет и уменьшает разнообразие микробиоты. Получение антибиотиков человеком происходит не только из фармацевтических препаратов, но и из сельскохозяйственных продуктов, где антибиотики широко используются в кормлении скота, а также в следовых количествах в различных продуктах питания. Воздействие антибиотиков во время беременности может увеличить риск развития аллергических заболеваний у детей [59; 175]. К сожалению, внутриутробное применение антибиотиков увеличивается в связи с ростом частоты кесарева сечения [210]. В результате, у младенцев, рожденных от матерей, получающих антибиотики для профилактики стрептококковой инфекции группы В до родов, выявили значительные изменения в составе и в количестве микробиоты кишечника. Они обладали низким уровнем *Bacteroidetes* и высоким уровнем *Enterococcus* и *Clostridia* через 3 месяца после применения матерью антибиотиков [37]. В исследовании Love VL. et al. было продемонстрировано, что у детей, получающих пять или более антибиотиков в первый год жизни, значительно чаще диагностируется ПА [143]. Наиболее сильная корреляция была отмечена среди пациентов, получавших антибиотики цефалоспоринового и сульфаниламидных групп [210].

В нарушении состава кишечной микробиоты определенную роль играют синтетические химические вещества, так как микробный метаболизм химических веществ может вызвать нарушение кишечной микробиоты [187], что, в свою очередь, вызывает аллергическую реакцию [228; 239]. Например, пищевые добавки, как одни из синтетических химических веществ, обычно встречаются и используются в нашей пище в качестве антиоксидантов, красителей и ароматизаторов, подсластителей и консервантов [238]. Исследования на мышах

показали, что такие химические вещества связаны с повышенным риском развития ПА [228; 239]. Кроме того, было показано, что потребление нескольких пищевых добавок может увеличить риск развития ПА [239].

Исследования показывают, что факторы окружающей среды влияют на состав микробиоты, что делает ее идеальной мишенью для поиска новых методов лечения ПА [75; 129].

Вывод о том, что изменения в составе кишечной микробиоты связаны с патогенезом аллергических расстройств, повысил внимание исследователей к использованию пробиотиков с целью лечения и/или профилактики аллергических заболеваний [31]. Пробиотики в своем составе содержат культуры живых микроорганизмов, которые при приеме внутрь в достаточном количестве могут модулировать микробиоту кишечника [143; 224]. Показано, что дети с генетической предрасположенностью к аллергическим заболеваниям, которые получали пробиотики в раннем возрасте, реже страдали от их манифестации [235]. Данные о снижении заболеваемости АД на фоне лечения пробиотиками представлены в исследованиях Boyle RJ. et al. [100]. Недавний метаанализ Lee J. et al. также показал, что лечение пробиотиками значительно снижает тяжесть АД [161].

Данные исследований по эффективности тех или иных штаммов пробиотиков позволяют судить о возможности модуляции аллергического воспаления через воздействие на эпителиальные и дендритные клетки субэпителиального слоя кишечника, формирование иммунного ответа в направлении Th1, что, собственно, и обеспечивает их лечебно-профилактическое действие при применении у детей с ПА [18; 25; 37; 50; 156].

Пробиотики могут выступать в качестве стимуляторов адекватного баланса в кишечной микробиоте для предотвращения развития аллергии. Благотворное воздействие пробиотиков включает восстановление нормальной проницаемости кишечника, улучшение иммунологической барьерной функции кишечника, стимулирование выработки IgA и ингибирование высвобождения

провоспалительных цитокинов путем регуляции состава кишечной микробиоты [47; 79; 220].

Хорошо охарактеризованным пробиотиком при ПА, особенно аллергии на БКМ, является *Lactobacillus rhamnosus* GG [28]. Было обнаружено, что диетическое вмешательство с *Lactobacillus rhamnosus* GG снижает аллергические реакции на коровье молоко [28; 126; 133]. Другое исследование показало, что пероральное введение пробиотического штамма *Bifidobacterium longum* снижает специфический IgE и стимулирует созревание дендритных клеток, накопление CD103⁺ толерогенных дендритных клеток в кишечочно-ассоциированной лимфоидной ткани [66; 72]. Это, в свою очередь, увеличивало дифференцировку Tregs и подавляло Th2 реакции. В двух других исследованиях на мышах сообщалось о способности *Clostridium butyricum* снижать побочные реакции на яйца и коровье молоко [185].

Не менее актуальны и лечебно-профилактические свойства пребиотиков, к которым относятся неперевариваемые ингредиенты пищи, обеспечивающие оптимальные условия для роста и развития полезных для организма бактерий у больных с аллергическими заболеваниями. Так, в метаанализе показано, что пребиотики значительно сокращают развитие АД у детей [49]. В исследованиях Lee J. продемонстрирована эффективность пребиотиков и при лечении АД [133].

Отдельную группу составляют синбиотики, которые содержат в своем составе как про-, так и пребиотики. Предполагается, что данная комбинация может оказать потенциально более сильное влияние на микробиоту кишечника, чем пробиотики, либо пребиотики по отдельности [41; 225]. Противоречивые результаты исследований эффективности про- и пребиотиков в профилактике и лечении аллергии могут быть обусловлены большой неоднородностью используемых штаммов, разной длительностью терапии и используемых доз [90; 93]. В целом, на сегодня мы располагаем многообещающими данными по лечебно-профилактическим возможностям применения пробиотиков,

пребиотиков и/или синбиотиков при атопическом дерматите, и значимо меньшим числом исследований по эффективности у больных с ПА [36; 41; 98; 165; 168].

Таким образом, состав микробиоты кишечника уязвим к нарушениям в раннем возрасте и связанные с этим изменения в гомеостазе хозяина-микробиоты могут способствовать развитию ПА. Исследования подтверждают регуляторную роль микробиоты кишечника в проявлении ПА, особенно в раннем возрасте, однако многие вопросы остаются нерешенными, и основные механизмы еще предстоит определить [37; 76; 181; 198; 204]. Большая часть наших знаний основана на экспериментальных исследованиях на животных, и необходимы дополнительные исследования на людях, чтобы подтвердить точную роль микробиоты кишечника в развитии ПА. Появляются данные, свидетельствующие о том, что терапевтические стратегии изменения состава микробиоты кишечника полезны для профилактики и лечения ПА [93; 151; 204; 216; 220]. Необходимы дальнейшие исследования для разработки профилактических и терапевтических подходов против ПА.

1.5 Заключение

Таким образом, ПА - мультифакториальное заболевание, для понимания патогенеза которой требуется не только анализ генетической предрасположенности, но и факторов, модулирующих риск реализации атопии. Исследование роли антигенной нагрузки, опосредованной микробиотой, в патогенезе ПА будет способствовать разработке новых профилактических мероприятий и рекомендаций при аллергических заболеваниях у детей. Также необходим поиск новых путей решения проблемы ПА на основании комплексной оценки биомаркеров воспаления и методов терапии, влияющих на тип воспаления при ПА, что имеет важную научно-практическую значимость.

Глава 2. Объем и методы исследования

Работа выполнена на базе отделения аллергологии (заведующая отделением - д.м.н., профессор Ревякина В.А.) и лаборатории клинической биохимии, иммунологии и аллергологии (заведующая отделением - к.м.н. Короткова Т.Н.) клиники Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федерального исследовательского центра питания, биотехнологии и безопасности пищи» в период с 2015 по 2019 года.

Дизайн исследования представлен на Рисунке 2.1.

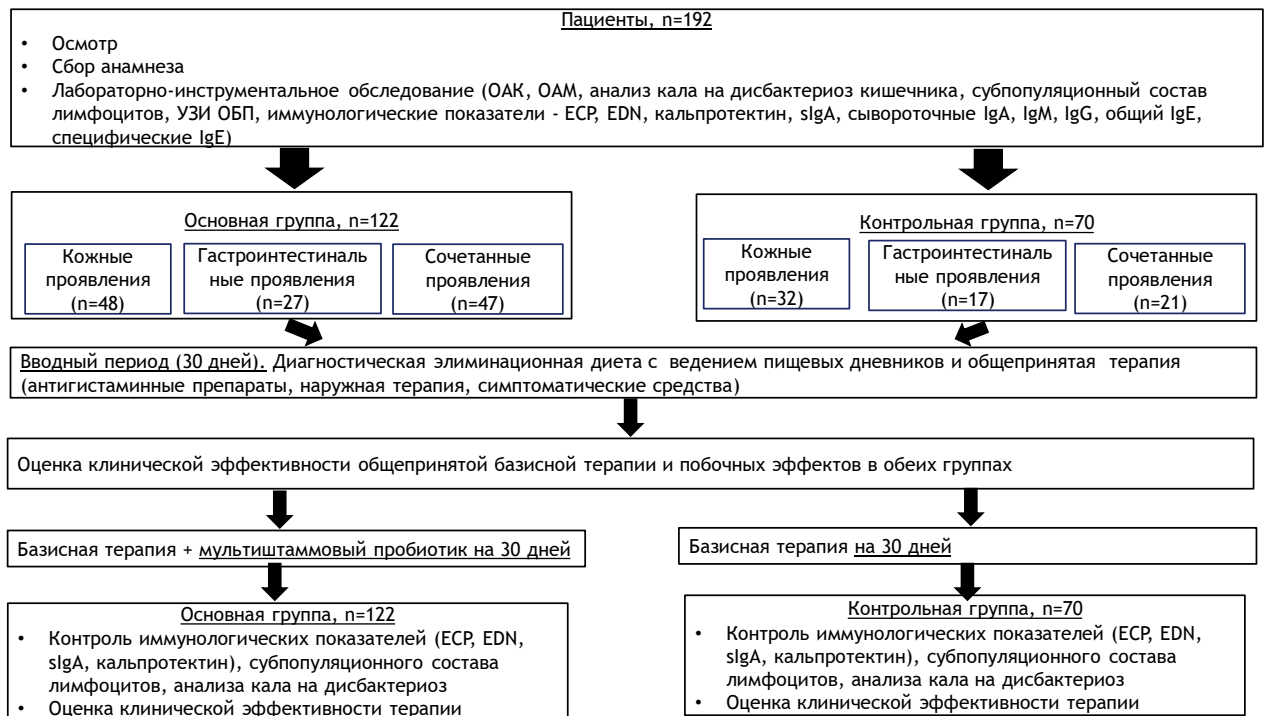


Рисунок 2.1 - Дизайн исследования

2.1. Характеристика пациентов, включенных в исследование

А). На первом этапе (А) в исследование были включены 192 ребенка в возрасте от 3 месяцев до 3-х лет с подтвержденным диагнозом ПА.

Подтверждением ПА служили: отягощенный аллергологический анамнез, связь между приемом определенных пищевых продуктов и клиническими проявлениями (кожными и гастроинтестинальными), а также положительные результаты элиминационных диет. Среди обследуемых пациентов - 110 мальчиков (57,3%) и 82 девочки (42,7%).

Б). Критериями включения были:

1. Информированное согласие от родителей (представителей) пациентов на участие в исследовании;

2. Наличие ПА;

3. Детский возраст от 3х месяцев до 3х лет;

Критерии исключения:

1. Отсутствие проявлений ПА;

2. Наличие сопутствующих соматических заболеваний;

3. Первичные иммунодефицитные состояния;

В). Дети были распределены на следующие возрастные периоды:

- грудной возраст (от 3мес до 1 года) - n=54 (28,2%)

- ранний возраст (от 1 года до 3 лет) - n=138 (71,8%).

Г). Также дети были распределены по клиническим проявлениям ПА:

- гастроинтестинальные - n=44 (22,9%)

- кожные - n=80 (41,6%)

- сочетанные (гастроинтестинальные и кожные) - n=68 (35,5%)

Д). Основными жалобами пациентов, со слов родителей, были: колики в животе, срыгивания, метеоризм, неустойчивый характер стула (разжиженный, учащенный, непереваренный) с патологическими примесями (слизь, кровь), сниженный аппетит, замедление прибавки в весе, высыпания, кожный зуд.

Е). Дети были распределены по степени тяжести проявлений ПА следующим образом: (Рисунок 2.2)

- по степени тяжести гастроинтестинальных проявлений:

- легкая ПА - n=20 (45,5%)

- среднетяжелая ПА - n=24 (54,5%)
- по степени тяжести с кожных проявлений:
 - легкая ПА - n=14 (17,5%)
 - среднетяжелая ПА - n=54 (67,5%)
 - тяжелая ПА - n=12 (15%)
- по степени тяжести сочетанных проявлений:
 - легкая ПА - n=7 (10,3%)
 - среднетяжелая ПА - n=47 (69,1%)
 - тяжелая ПА - n=14 (20,6%)

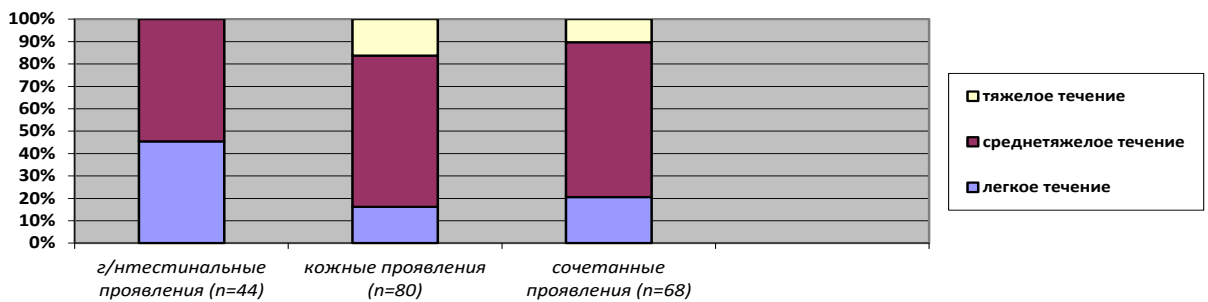


Рисунок 2.2 - Распределение детей (n=192) по степени тяжести проявлений ПА

2.2 Клинические методы обследования

1. **Общеклинические** (осмотр, оценка симптомов со стороны ЖКТ, оценка степени тяжести АД по индексу SCORAD, клинический анализ крови, общий анализ мочи, копрология).

У всех детей анализировали данные анамнеза жизни и болезни, сопутствующей патологии, наследственной предрасположенности, течение беременности у матери (токсикоз, угрозы прерывания беременности, обострения хронических заболеваний, применение лекарственных препаратов) и родов (самостоятельные, путем кесарева сечения), вид вскармливания ребенка (грудное,

смешанное, искусственное), особенности развития ребенка на первом году жизни, характер первых симптомов заболевания, установление связи начала заболевания с приемом пищевых продуктов, выявление сопутствующих заболеваний. Исследование проводилось в период обострения ПА. Объективный осмотр ребенка включал оценку состояния и функции всех органов и систем. Для оценки тяжести клинических симптомов кожных проявлений ПА использовали шкалу SCORAD, которая учитывает распространенность кожного процесса, интенсивность клинических проявлений и субъективных симптомов. Индекс SCORAD позволял объективно оценить степень тяжести процесса, а именно:

- 0-20 баллов - соответствует легкой степени АД
- 20-40 баллов - средней степени
- больше 40 баллов - тяжелой степени

2. Биохимические (АЛТ, АСТ, общий билирубин, прямой билирубин, глюкоза, общий белок);

3. Иммунологические (уровень сывороточных IgA, IgG, IgM, общего IgE, специфические IgE, ЕСР в сыворотке крови, а также уровень sIgA, фекального кальпротектина и EDN в копрофильtrate);

4. Микробиологический метод (анализ кала на дисбактериоз);

5. Метод проточной цитофлуорометрии (исследование субпопуляционного состава лимфоцитов: Т-лимфоцитов (CD3+CD19-), В-лимфоцитов (CD3-CD19+), НК-клеток (CD3-CD56+CD16+), NKT-клеток (CD16+CD56+CD3+), цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3+CD8+), Т-хелперов (CD3+CD4+);

6. Инструментальный (УЗИ органов брюшной полости);

7. Статистические: статистическая обработка данных выполнена с использованием программ IBM SPSS Statistics.

2.3 Лабораторные методы исследования

Кровь для исследования получали путем пункции локтевой вены на 2-3-и сутки стационарного лечения, а также после комплексной терапии ПА. Взятие крови осуществляли в утренние часы (8-9 часов) натощак. Для иммунофенотипирования кровь забирали в пробирку VACUTANER (BD), содержащую динатриевую соль ЭДТА объемом 2,5мл. Для исследования уровней sIgA, кальпротектина, EDN и микробиологического исследования кала использовали утреннюю порцию фекалий. Испражнения отбирались специальной ложечкой, вмонтированной в крышку стерильного пластикового одноразового контейнера в объеме, равном приблизительно ½ чайной ложки из средней части фекальной массы.

1) Определение уровня общего IgE в сыворотке крови проводили при помощи иммуноферментного (ИФА) метода (норма у детей до года 15 МЕ/мл, у детей от 1 года до 3х лет до 60 МЕ/мл).

2) Концентрацию специфических IgE к исследуемым аллергенам (БКМ, глютен, куриное яйцо) в сыворотке крови больных ПА определяли методом ИФА (норма до 0,34 МЕ/мл).

3) Определение сывороточных иммуноглобулинов в сыворотке крови проводили нефелометрическим методом. Норма - 0,19-2,2 г/л у детей до 1 года, 0,1-1,31 г/л у детей от 1года до 3х лет, нормой для сывороточного IgM считали 0,2-2,0 г/л у детей до 1 года, 0,2-1,0 г/л у детей от 1года до 3х лет, для IgG - 1,8-8,0 г/л у детей до 1 года, 5,0-13,0 г/л у детей от 1 года до 3х лет.

4) sIgA в копрофильtrate исследовали методом ИФА с использованием коммерческих тест-систем sIgA [секреторный-ИФА-Вектор-Бест, Новосибирск, РФ], норма 115,9-317,3 мкг/г.

5) Исследование биомаркеров воспаления осуществляли методом ИФА с использованием коммерческих тест-систем «ELISA Calprotectin» BUHLMANN [Англия] для фекального кальпротектина (норма 0-50 мкг/г), «Human eosinophil cationic protein (ECP) ELISA KIT» [США] для ECP в сыворотке крови (норма 0-24 нг/мл), «EDN ELISA» Immun diagnostic для фекального EDN [Германия]. Точные

референсные значения для EDN не установлены. Так, по результатам исследования Роса М. et al. были выявлены следующие нормативные показатели EDN у здоровых детей (n=172) в возрасте от 0-12 лет: от 0-12 мес - 7,4 мг/кг; от 1г до 4х лет - 2,9 мг/кг; от 4 до 12 лет - 0,2 мг/кг [186].

б) Исследование показателей клеточного иммунитета в периферической крови обследуемых выполняли на проточном цитофлуориметре FC-500 (Beckman Coulter, США) с использованием двойных комбинаций моноклональных антител производства Beckman Coulter, США. При этом оценивали количественные соотношения основных популяций лимфоцитов: Т-лимфоцитов (CD3+CD19-), В-лимфоцитов (CD3-CD19+), НК-клеток (CD3-CD56+CD16+), NKT-клеток (CD16+CD56+CD3+), цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3+CD8+), Т-хелперов (CD3+CD4+). Иммунорегуляторный индекс (IRI) выражали соотношением Т-хелперов к Т-цитотоксическим лимфоцитам. Нормативные показатели субпопуляций лимфоцитов представлены в Таблице 2.1.

Таблица 2.1 - Нормативные показатели субпопуляционного состава лимфоцитов у детей

Субпопуляции лимфоцитов		Норма
Т-total cells (CD3+CD19-)	%	61,0-85,0
	абс. кол-во	946-2808
В-total cells (CD3-CD19+)	%	7,0-17,0
	абс. кол-во	111-376
NK-cells (CD3-CD56+CD16+)	%	8,0-17,0
	абс. кол-во	123-369
Th-cells (CD3+CD4+)	%	35,0-55,0
	абс. кол-во	68-702
NKT-cells (CD16+CD56+CD3+)	%	0,5-6,0
	абс. кол-во	7-165
Tcytotox-cells (CD3+CD8+)	%	19,0-35,0
	абс. кол-во	576-1336

7) Микробиологическое исследование кала проводили бактериологическим методом, что позволило выявить качественные и количественные нарушения состава кишечной микрофлоры, а также патогенную микрофлору. Для этого мы

изучали количество всех выделенных микроорганизмов с указанием референсных значений для каждого микроорганизма. Нормативные показатели представлены в Таблице 2.2.

Таблица 2.2 - Нормативные показатели микробиологического исследования кала

Микроорганизмы	Референсные значения
E.coli Lac (+)	$10^7 - 10^9$
E.coli Lac (-)	$\leq 10^7$
E.coli Гем (+)	0**
Enterococcus spp.	$10^5 - 10^6$
Enterococcus Гем (+) spp.	0**
Proteus spp.	$\leq 10^4$
Условно патогенные микроорганизмы (УПМ) суммарно*:	$\leq 10^5$
1. Klebsiella spp.	
2. Citrobacter spp.	
3. Enterobacter spp.	
4. Hafnia spp.	
5. Serratia spp.	
6. Прочие УПМ	
Pseudomonas spp.	0**
Стафилококки коагулазонегативные	$\leq 10^4$
Staphylococcus aureus	0**
Дрожжеподобные грибы	$\leq 10^4$
Лактобациллы	$\geq 10^6$
Бифидобактерии	$10^8 - 10^{10}$
Клостридии	$\leq 10^5$

Общий объем и методы исследования представлены в Таблице 2.3.

Таблица 2.3 - Объем и методы исследований

Определяемые показатели	Метод	Единица измерения	Количество исследований
Исследование сывороточных IgA, IgG, IgM, IgE	нефелометрический	IgA, IgG, IgM - г/л,	192
		IgE - МЕ/мл	384
Кальпротектин	ИФА	мкг/г	384
Эозинофильный нейротоксин	ИФА	нг/г	384
Эозинофильный катионный белок	ИФА	нг/мл	384
Секреторный IgA	ИФА	мкг/г	384

Т-лимфоциты (CD3+CD19-), В-лимфоциты (CD3-CD19+), естественные клетки-киллеры (NK-клетки)(CD3-CD56+CD16+), NKT-клетки (CD16+CD56+CD3+), цитотоксические Т-лимфоциты (CD3+CD8+), Т-хелперы (CD3+CD4+)	Проточная цитофлуорометрия	% / абс	110
Микробиологическое исследование кала	Бактериологический	абс	384

2.4 Статистические методы обработки результатов исследования

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием программы Statistica 10.0, Windows. Результаты представлены в виде средних величин ($M \pm m$), 9 медианы (Me) и интерквартильного размаха (Lower Quartile (LQ) = 25-й и Upper Quartile (UQ) = 75-й перцентили). Для оценки статистической значимости различий между группами до и после лечения применяли критерий Вилкоксона. Сравнение всех количественных признаков в двух независимых группах проводили с помощью U- критерия Манна-Уитни, в трех и более независимых группах - с помощью критерия Краскела-Уоллиса. При получении статистически значимых различий между ними применяли попарное сравнение каждого показателя с помощью U-критерия Манна-Уитни с использованием поправки Бонферрони. Для анализа качественных показателей независимых групп - метод хи-квадрат, а также точный критерий Фишера для небольших выборок. Связь между изучаемыми показателями оценивали по результатам корреляционного анализа с вычислением коэффициента корреляции Спирмена (R).

Глава 3. Результаты собственных исследований

3.1 Клиническая характеристика детей, включенных в исследование

Проведено клиническое наблюдение и лабораторно-инструментальное обследование 192 детей в возрасте от 3-х месяцев до 3-х лет: 110 мальчиков (57,6%) и 82 девочек (42,4%) с различными проявлениями ПА.

Согласно возрастной периодизации все обследованные дети были разделены на 2 группы:

- I группа (грудной возраст) - в возрасте от 3 месяцев до 1 года
- II группа (ранний возраст) - в возрасте от 1 года до 3х лет (Таблица 3.1)

Средний возраст среди пациентов первой I группы составил - $8,0 \pm 0,6$ месяцев, II группы - $1,6 \pm 0,12$ года.

Таблица 3.1 - Возрастно-половой состав обследованных детей

Группы	Возрастная категория (количество детей / %)	
	I (грудной)	II (ранний)
Все дети (n=192)	54 (28,1%)	138 (71,9%)
Мальчики (n=103)	37 (68,5%)	66 (47,8%)
Девочки (n=89)	17 (31,5%)	72 (52,2%)

Примечание: n - количество обследованных детей

Как видно из Таблицы 3.1, среди детей в возрасте до года преобладали мальчики 68,5% (n=37), среди детей II группы количество мальчиков и девочек было почти одинаковым 47,8% (n=66) и 52,2% (n=72), соответственно.

Таким образом, среди детей до года преобладали мальчики, в раннем возрасте соотношение мальчиков и девочек было одинаковым.

Наблюдаемые пациенты были распределены по клиническим проявлениям ПА: гастроинтестинальные 22,9% (n=44) (I-я группа), кожные 41,6% (n=80) (II-я группа) и сочетанные 35,5% (n=68) (III-я группа), которые в себе сочетали как гастроинтестинальные, так и кожные проявления ПА и по степени тяжести

проявлений (легкие 21,4% (n=41), среднетяжелые 65,1% (n=125) и тяжелые 13,5% (n=26) (Таблица 3.2).

Таблица 3.2 - Распределение детей по клиническим проявлениям ПА

Клинические проявления	Кожные проявления ПА	Гастроинтестинальные проявления ПА	Сочетанные проявления ПА
Количество обследуемых детей, n	80 (41,6%)	44 (22,9%)	68 (35,5%)

Примечание: n - количество обследованных детей

Как видно из Рисунка 2.2 большинство детей имели среднетяжелые проявления ПА. Тяжелые проявления ПА наблюдались у детей с кожными и сочетанными ее проявлениями (16,2% и 10,3%, соответственно).

С целью выявления факторов риска развития аллергопатологии у обследованных детей проведен ретроспективный анализ данных акушерского анамнеза, характера вскармливания, семейного анамнеза, особенностей развития в грудном и раннем возрастах.

Анализ аллергологического анамнеза позволил установить, что наследственная предрасположенность у 83,3% (n=160) детей была отягощена по различным аллергическим патологиям. Среди детей с кожными проявлениями у 92,5% (n=74) детей, с гастроинтестинальными - у 77,3% (n=34), с сочетанными проявлениями ПА - у 76,5% (n=52) обследованных пациентов родители страдали аллергическими заболеваниями (Таблица 3.3).

Таблица 3.3 - Наследственная предрасположенность по аллергологическим заболеваниям у обследованных детей

Группы детей	Аллергические болезни	
	Мать	Отец
Кожные проявления ПА (n=80)	52 (65%)	35 (43,7%)
Гастроинтестинальные проявления ПА (n=44)	26 (59%)	15 (34,1)

Смешанные проявления ПА (n=68)	38 (55,8%)	24 (35,3%)
--------------------------------	------------	------------

Примечание: n - количество обследованных детей

В группе с легким течением ПА наследственная предрасположенность по аллергопатологии отмечалась у 51,2% (n=21) детей, со среднетяжелым течением у 92% (n=115) детей, с тяжелым течением - у 100% (n=26) детей.

С одинаковой частотой у родителей обследованных детей встречались такие аллергические заболевания, как АтД (у 68,7% (n=132) пациентов), аллергический ринит (у 72,9% (n=140)), БА регистрировалась у 41,6% (n=80) родителей обследованных детей; проявления ПА у 13% (n=25), лекарственной аллергии у 24% (n=46) пациентов (Таблица 3.4).

Таблица 3.4 - Частота аллергических заболеваний у родителей обследованных пациентов

Аллергические заболевания	Общая группа (n=192)
Всего:	160 (83,3%)
АтД	132 (68,7%)
Аллергический ринит	140 (72,9%)
БА	80 (41,6%)
ПА	25 (13%)
Лекарственная аллергия	46 (24%)

Примечание: n - количество обследованных детей

При изучении антенатальных факторов риска развития аллергии, как видно из Таблицы 3.5, было установлено, что у каждой второй матери (53,1% (n=102)) отмечалась угроза прерывания беременности, у 42,7% (n=82) токсикоз в ранние сроки беременности, анемия наблюдалась у 16,7% (n=32). 23,4% (n=45) матерей были носителями внутриутробной инфекции, 25% (n=48) получали антибактериальную терапию во время беременности. У матерей, чьи дети страдали кожными проявлениями ПА достоверно чаще наблюдалась угроза прерывания беременности ($p = 0,04$) и применение антибактериальных препаратов во время беременности ($p = 0,04$); у матерей, чьи дети страдали сочетанными проявлениями ПА достоверно чаще наблюдалась анемия, в отличие от матерей, у которых дети

страдали кожными и гастроинтестинальными проявлениями ПА ($p = 0,008$ и $p = 0,04$, соответственно).

Таблица 3.5 - Антенатальные факторы риска развития аллергии

Аntenатальные факторы	Общая группа (n=192)	I группа (n=80)	II группа (n=44)	III группа (n=68)	P ₁₋₂ P ₁₋₃ P ₂₋₃
Угроза прерывания беременности	102 (53,1%)	47 (58,8%)	20 (45,5%)	35 (51,5%)	0,04 0,2 0,2
Токсикоз	82 (42,7%)	35 (43,8%)	18 (41%)	29 (42,6%)	0,4 0,5 0,4
Анемия	32 (16,7%)	9 (11,3%)	6 (13,6%)	17 (25%)	0,3 0,008 0,04
Наличие внутриутробной инфекции	45 (23,4%)	16 (20%)	10 (22,7%)	19 (27,9%)	0,4 0,1 0,3
Прием антибактериальных препаратов во время беременности	48 (25%)	18 (22,5%)	6 (13,6%)	9 (13,2%)	0,07 0,04 0,5

Примечание: n - количество обследованных детей, p - достоверность различий между группами

При анализе характера вскармливания (Таблица 3.6) установлено, что треть обследованных пациентов 35,4% (n=68) получали грудное молоко до 3 месяцев, при этом 67,2% (n=129) детям рано введены в рацион различные адаптированные смеси. 30 % (n=24) детей с кожными проявлениями ПА получали грудное вскармливание более года, что статистически длительнее, чем дети с сочетанными проявлениями ПА ($p = 0,04$). Также установлено, что дети с кожными проявлениями ПА значительно чаще, чем дети с гастроинтестинальными и сочетанными проявлениями получали грудное вскармливание до 6 месяцев ($p = 0,02$, $p = 0,01$, соответственно), но значительно реже - до 3х месяцев ($p < 0,001$).

Таблица 3.6 - Частота встречаемости различных проявлений ПА и типом вскармливания

Характер вскармливания	Общая группа (n=192)	I группа (n=80)	II группа (n=44)	III группа (n=68)	P ₁₋₂ P ₁₋₃ P ₂₋₃
Грудное вскармливание:	68 (35,4%)	17 (21,3%)	20 (45,4%)	31 (45,6%)	<0,001 <0,001
- до 3х мес	40 (20,8%)	23 (28,8%)	7 (16%)	10 (14,7%)	0,6 0,02 0,01 0,5
- до 12мес	15 (7,8%)	5 (6,3%)	3 (6,8%)	7 (10,3%)	0,6 0,2 0,3
- более года	48 (25%)	24 (30%)	11 (25%)	13 (19,1%)	0,3 0,04 0,2
Искусственное вскармливание с рождения	21 (10,9%)	11 (13,6%)	3 (6,8%)	7 (10,3%)	0,08 0,6 0,3
Получали смеси	129 (67,2%)	51 (63,8%)	30 (68,2%)	48 (70,6%)	0,3 0,2 0,4

Примечание: n - количество обследованных детей, p - достоверность различий между группами

Таким образом, установлено, что раннее искусственное вскармливание ассоциировано с развитием ПА, что, по-видимому, объясняется поступлением антигенных молекул БКМ через слизистый барьер кишечника, тем самым способствуя формированию пищевой сенсibilизации и аллергии.

При изучении сроков начала заболевания было установлено, что у 72,4% (n=139) детей заболевание дебютировало в первое полугодие жизни, у 27,6% (n=53) - в более старшем возрасте (Таблица 3.7). Установлено, что у детей с гастроинтестинальными проявлениями ПА дебют заболевания достоверно чаще отмечался во втором полугодии ($p = 0,04$), чем у детей с сочетанными проявлениями ПА.

Таблица 3.7 - Сроки начала дебюта ПА

Начало заболевания	Общая группа (n=192)	I группа (n=80)	II группа (n=44)	III группа (n=68)	P ₁₋₂ P ₁₋₃ P ₂₋₃
Первое полугодие	139 (72,4%)	59 (73,8%)	30 (68,2%)	50 (73,5%)	0,2 0,5 0,2
Второе полугодие	37 (19,3%)	14 (17,5%)	12 (27,3%)	11 (16,2%)	0,08 0,4 0,04

После года	16 (8,3%)	7 (8,7%)	2 (4,5%)	7 (10,3%)	0,2 0,5 0,1
------------	-----------	----------	----------	-----------	-------------------

Примечание: n - количество обследованных детей, p - достоверность различий между группами

Таким образом, дебют заболевания у 72,4% (n=139) детей отмечался в первые 6 месяцев, у 19,3% (n=37) в возрасте от 6 до 12 месяцев и лишь у 8,3% (n=16) - после 1 года.

Как видно из Рисунков 3.1-3.3, среднетяжелые и тяжелые проявления ПА чаще отмечались у детей в первое полугодие жизни. Так, в первое полугодие среднетяжелые проявления ПА отмечались у 50% (n=40) детей с кожными проявлениями, у 49% (n=18) и 51,5% (n=35) детей с гастроинтестинальными и сочетанными формами ПА, соответственно. Установлено, что тяжелые проявления ПА также отмечались в первое полугодие - у 13,8% и 7,4% детей с кожными и сочетанными проявлениями ПА, соответственно. Легкое течение ПА отмечалось во второе полугодие у 1,5% (n=1) ребенка с сочетанными проявлениями ПА; после года у 3,7% (n=3) и 4,5% (n=2) детей с кожными и гастроинтестинальными проявлениями пищевой аллергии.

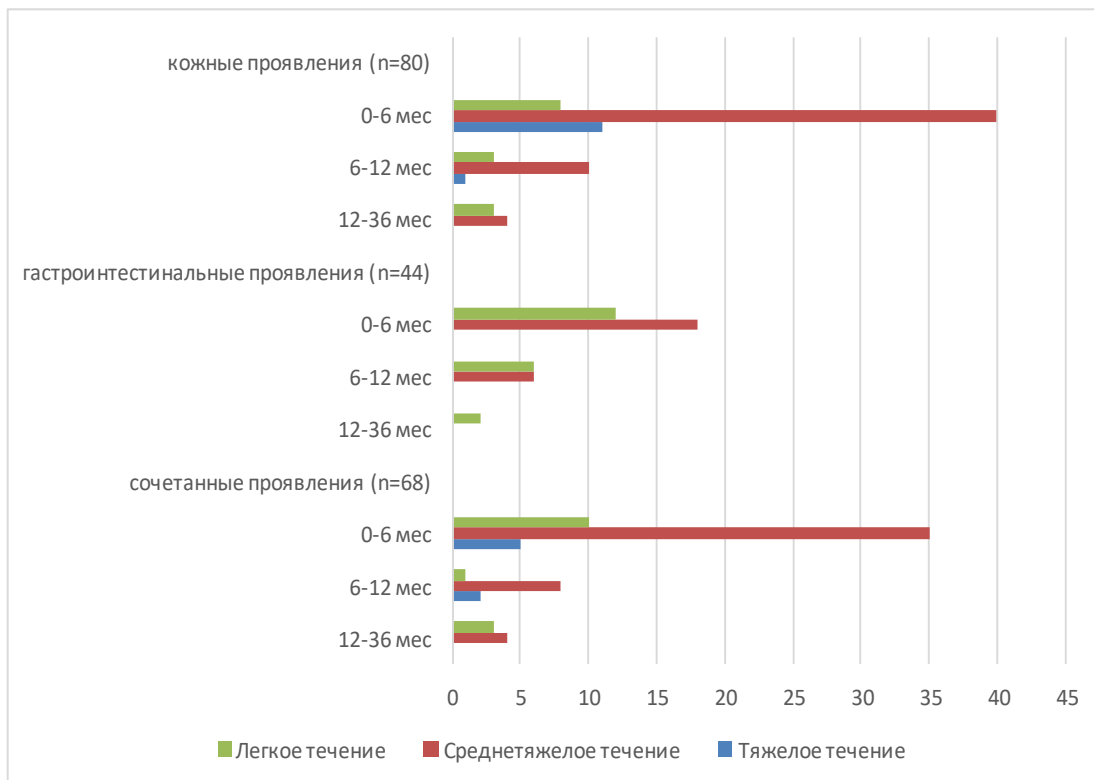


Рисунок 3.1 - Распределение детей с различными проявлениями ПА с учетом дебюта заболевания и степени тяжести проявлений ПА

Таким образом, у детей с ранним дебютом заболевания были различные проявления ПА (кожные, гастроинтестинальные и сочетанные). Гастроинтестинальные проявления (Рисунок 3.2) включали чаще всего: неустойчивый характер стула (диарея, запоры, стул с неперевааренными остатками пищи, слизью, прожилками крови) у 52,7% (n=59); жалобы на колики в животе - у 34% (n=38) пациентов; метеоризм/ вздутие живота - у 37,5% (n=42); сниженный аппетит и срыгивания у 8,9% (n=10) и 6,2% (n=7) детей, соответственно. У большинства детей наблюдались жалобы на неустойчивый характер стула, и в равной степени - метеоризм/вздутие живот и колики.

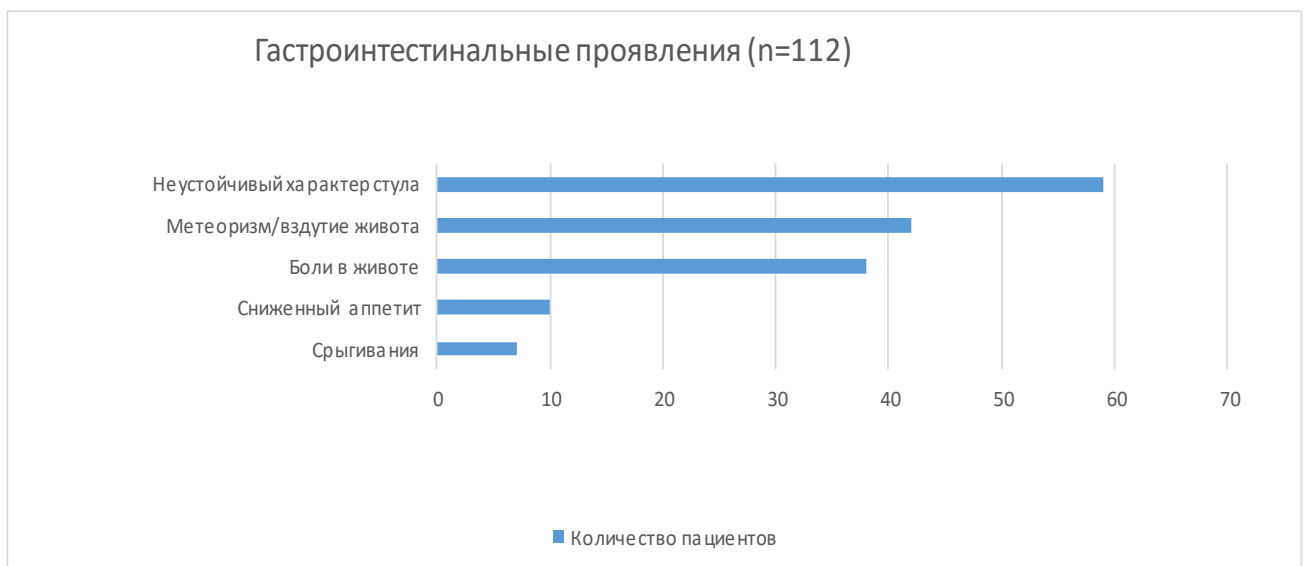


Рисунок 3.2 - Гастроинтестинальные проявления ПА

Кожные проявления ПА (Рисунок 3.3) у детей раннего возраста проявлялись сухостью кожи, полиморфными высыпаниями, локальной эритемой на коже лица, разгибательной поверхности верхних и нижних конечностей, перианальной области и кожным зудом. Кожные высыпания наблюдались у всех детей, кожный зуд у 75,7% (n=112) обследованного ребенка.

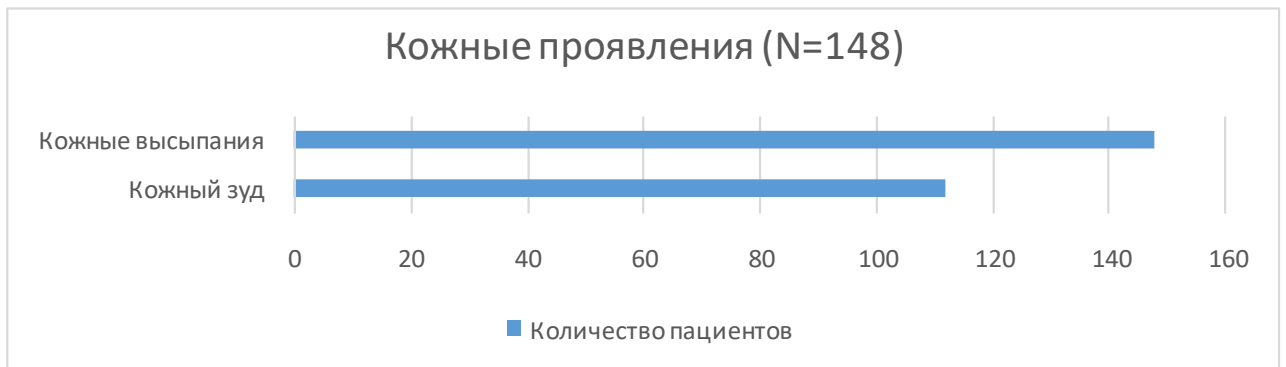


Рисунок 3.3 - Кожные проявления ПА

Сочетание гастроинтестинальных и кожных проявлений ПА на первом году жизни отмечалось у трети обследованных пациентов - 35,4% (n=68), что являлось неблагоприятным фактором для возникновения аллергической и гастроэнтерологической патологии, либо их сочетанных форм.

По данным анамнеза причиной возникновения ПА у 41,4% (n=79) обследованных детей было введение в рацион коровьего молока. Следующей причиной - другие продукты прикорма, использование матерями различных лекарственных препаратов, нарушение диеты кормящей матери (употребление различных высокоаллергенных продуктов), в 13,5% случаях причину возникновения ПА выяснить не удалось.

У детей с сочетанной формой ПА достоверно реже причиной запуска ПА явились адаптированные молочные смеси, в отличие от детей с кожными и гастроинтестинальными проявлениями ПА ($p = 0,002$ и $p = 0,02$, соответственно), но значительно чаще - куриное яйцо и куриное мясо ($p = 0,001$ и $p = 0,03$, соответственно). Коровье молоко у детей с кожной формой ПА достоверно реже являлось причиной ПА, в отличие от других форм ПА ($p = 0,002$ и $p = 0,02$, соответственно), но достоверно чаще - кисломолочные продукты ($p = 0,04$) (Таблица 3.8).

Таблица 3.8 - Частота причинно-значимых аллергенов в возникновении ПА у обследованных детей

Аллергены	Общая группа (n=192)	Кожные проявления ПА (1) (n=80)	Гастроинтестинальные проявления ПА (2) (n=44)	Сочетанные проявления ПА (3) (n=68)	P ₁₋₂ P ₁₋₃ P ₂₋₃
Молочные смеси	37 (19,3%)	21 (26,2%)	9 (20,5%)	7 (10,3%)	0,3 0,002 0,02
Молоко коровье/козье	79 (41,4%)	25 (31,2%)	23 (52,3%)	31 (45,6%)	0,002 0,02 0,2
Куриное яйцо / мясо	47 (24,5%)	13 (16,2%)	10 (22,7%)	24 (35,3%)	0,2 0,001 0,03
Кисломолочные продукты (творог, кефир, йогурт)	22 (11,5%)	13 (16,2%)	4 (9,1%)	5 (7,4%)	0,09 0,04 0,4
Причина не известна	26 (13,5%)	12 (15%)	4 (9,1%)	10 (14,7%)	0,1 0,5 0,1

Примечание: n - количество обследованных детей, p - достоверность различий между группами

Всем детям проведены дополнительные обследования на наличие другой сопутствующей неаллергологической патологии для оценки соматического статуса пациентов.

В ходе исследования было установлено, что у 70,8% (n=136) детей в общей группе были выявлены нарушения со стороны ЖКТ. Лидирующее место составили функциональные нарушения желчевыводящих путей по данным УЗИ органов брюшной полости. Данная патология была обнаружена у 43,8% (n=84) детей. Вторым по частоте у 18,8% (n=36) выявлены поражения верхних отделов ЖКТ, проявляющиеся гастроэзофагеальной рефлюксной болезнью, гастритами, гастродуоденитами, диффузными изменениями поджелудочной железы (по данным УЗИ органов брюшной полости). У 8,3% (n=16) обследованных детей выявлялись поражения нижних отделов ЖКТ (дискинезия толстого кишечника, неустойчивый стул, запоры). У 60% (n=48) детей с кожными проявлениями ПА достоверно чаще отмечались функциональные нарушения желчевыводящих путей, чем у детей с гастроинтестинальными и сочетанными формами ПА (p < 0,001). У 11,4% (n=5) детей достоверно реже наблюдались поражения верхних отделов ЖКТ (p = 0,02), в отличие от других проявлений ПА (Таблица 3.9).

Таблица 3.9 - Сопутствующие желудочно-кишечные заболевания у обследованных детей

Заболевания ЖКТ	Общая группа (n=192)	Кожные проявления ПА (1) (n=80)	Гастроинтестинальные проявления ПА (2) (n=44)	Сочетанные проявления ПА (3) (n=68)	P ₁₋₂ P ₁₋₃ P ₂₋₃
Всего:	136 (70,8%)	68 (85%)	24 (54,5%)	44 (64,7%)	0,01 <0,001 0,09
Функциональные нарушения желчевыводящих путей	84 (43,8%)	48 (60%)	16 (36,4%)	20 (29,4%)	<0,001 <0,001 0,2
Поражения верхних отделов ЖКТ	36 (18,8%)	15 (18,8%)	5 (11,4%)	16 (23,5%)	0,1 0,2 0,02
Поражения нижних отделов ЖКТ	16 (8,3%)	5 (6,3%)	3 (6,8%)	8 (11,8%)	0,5 0,1 0,2

Примечание: n - количество обследованных детей, p - достоверность различий между группами

Таким образом, клинико-anamнестический анализ показал, что у 72,4% детей заболевание дебютировало в первое полугодие жизни. Наиболее важным пусковым фактором развития ПА был алиментарный фактор - у 41,4% - это введение в рацион коровьего молока. Было отмечено, что среднетяжелые и тяжелые проявления ПА чаще отмечались у детей в первое полугодие жизни. Анализ собранного аллергологического анамнеза позволил установить, что у 83,3% детей была выявлена наследственная предрасположенность по аллергическим заболеваниям. При изучении антенатальных факторов риска развития аллергии установлено, что у каждой второй матери (53,1%) отмечалась угроза прерывания беременности, у 42,7% - токсикоз в ранние сроки беременности.

Уровень общего IgE у более чем половины детей 55,2% (n=106) был повышен; самый высокий его уровень отмечался у 75% (n=60) пациентов с кожными проявлениями ПА; у 52% (n=36) пациентов с сочетанными проявлениями ПА отмечался на границе нормы. Уровни общего IgE у детей с различными проявлениями ПА представлены на Рисунке 3.4.

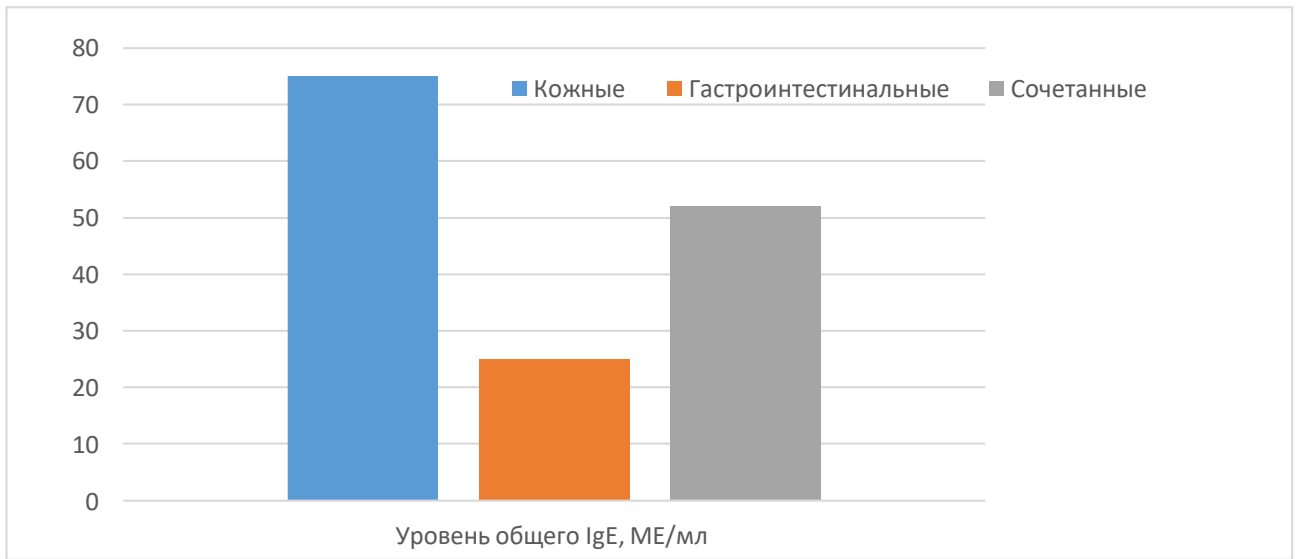


Рисунок 3.4 - Уровни общего IgE у детей с различными проявлениями ПА

При определении специфических IgE - антител у 32,3% (n=62) пациентов выявлена моновалентная сенсibilизация, у 29,2% (n=56) - поливалентная сенсibilизация, у 17,7% (n=34) - сенсibilизация к двум пищевым аллергенам, у 20,8% (n=40) обследуемых детей сенсibilизации к определяемым пищевым аллергенам (белок коровьего молока, глютен, куриное яйцо, курица, свинина, говядина, кролик, кукуруза, рис, греча, брокколи, цветная капуста, белокочанная капуста, картофель, соя) выявлено не было. Установлено, что у 54,5% (n=24) детей с гастроинтестинальными проявлениями ПА достоверно чаще сенсibilизации к пищевым аллергенам не выявлено ($p < 0,001$), реже, у 13,6% (n=6) обследуемых пациентов выявлялась моновалентная сенсibilизация, в отличие от кожных и сочетанных форм ПА ($p = 0,0012$ и $p < 0,001$, соответственно). У 25% (n=20) пациентов с кожными проявлениями ПА достоверно чаще отмечалась сенсibilизация к двум и более аллергенам ($p = 0,002$) (Таблица 3.10).

Таблица 3.10 - Частота встречаемости моно- и полисенсibilизации среди обследованных пациентов

Уровень сенсibilизации	Общая группа (n=192)	Кожные проявления ПА (1) (n=80)	Гастроинтестинальные проявления ПА (2) (n=44)	Сочетанные проявления ПА (3) (n=68)	P_{1-2} P_{1-3} P_{2-3}

Сенсибилизации не выявлено	40 (20,8%)	7 (8,7%)	24 (54,5%)	9 (13,2%)	<0,001 0,25 <0,001
Моновалентная	62 (32,3%)	26 (32,5%)	6 (13,6%)	30 (44,1%)	0,0012 0,07 <0,001
К двум аллергенам	34 (17,7%)	20 (25%)	4 (9%)	10 (14,7%)	0,002 0,06 0,1
Поливалентная	56 (29,2%)	27 (33,8%)	10 (22,9%)	19 (28%)	0,06 0,2 0,3

Примечание: n - количество обследованных детей, p - достоверность различий между группами

В Таблице 3.11 представлены наиболее часто выявляемые пищевые аллергены у обследуемых пациентов: наиболее часто отмечалась сенсибилизация к БКМ у 63,5% (n=122) ребенка, к глютену у 38,5% (n=74), к куриному яйцу у 21,4% (n=41) ребенка. Наиболее часто аллергия к БКМ выявлена у детей с кожными проявлениями ПА у 77,5% (n=62), к глютену/клейковине - с гастроинтестинальными проявлениями ПА у 72,7% (n=32). У 27,3% (n=12) детей с гастроинтестинальными проявлениями ПА достоверно реже выявлена сенсибилизация к БКМ, в отличие от детей с кожными и сочетанными формами ПА ($p < 0,001$). У 28,8% (n=23) обследуемого пациента с кожной формой ПА достоверно чаще обнаружена сенсибилизация к другим пищевым аллергенам, по сравнению с другими формами ПА ($p < 0,001$).

Таблица 3.11 - Частота встречаемости сенсибилизации к пищевым аллергенам среди обследованных пациентов

Пищевые аллергены	Общая группа (n=192)	Кожные проявления ПА (1) (n=80)	Гастроинтестинальные проявления ПА (2) (n=44)	Сочетанные проявления ПА (3) (n=68)	P_{1-2} P_{1-3} P_{2-3}
БКМ	122 (63,5%)	62 (77,5%)	12 (27,3%)	48 (70,6%)	<0,001 0,2 <0,001
Глютен/клейковина	74 (38,5%)	18 (22,5%)	32 (72,7%)	24 (35,3%)	<0,001 0,04 <0,001
Куриное яйцо	41 (21,4%)	29 (36,2%)	2 (4,5%)	10 (14,7%)	<0,001 <0,001

					0,02
Другие аллергены	34 (17,7%)	23 (28,8%)	4 (9,1%)	7 (10,3%)	<0,001 <0,001 0,5

Примечание: n - количество обследованных детей, p - достоверность различий между группами

Таким образом, при определении специфических IgE-антител у обследуемых детей выявлено, что у 32,3% пациентов выявлена моновалентная сенсibilизация, у 29,2% - поливалентная сенсibilизация; у 20,8% детей сенсibilизации к пищевым аллергенам выявлено не было, причем, у 63,5% детей наиболее часто выявлялась сенсibilизация к БКМ, у 38,5% к глютену. Наиболее часто аллергия к БКМ выявлена у детей с кожными проявлениями ПА, к глютену/клейковине - с гастроинтестинальными проявлениями ПА.

Таким образом, подробный сбор анамнеза, оценка клинических симптомов ПА на ранней стадии проявлений болезни играют роль в диагностике и прогнозировании течения ПА, подборе персонализированного алгоритма обследования и своевременном назначении адекватной терапии.

3.2 Оценка показателей гуморального, мукозального и клеточного иммунитета у обследованных детей с пищевой аллергией

Мало изученным остается вопрос участия IgE- и не-IgE-зависимых аллергических реакций в формировании различных проявлений ПА у детей раннего возраста.

Определение и оценка иммуноглобулинов других классов в сочетании с другими показателями позволяет косвенно судить о состоянии местного и гуморального иммунитета.

В данном исследовании мы изучили содержание общего IgE, IgA, IgG, IgM в сыворотке крови у обследованных детей. Полученные результаты сравнивали с нормативными показателями, которые представлены в Таблице 3.12.

Таблица 3.12 - Нормальные значения показателей гуморального иммунитета

Показатели	Возраст детей	
	до 1 года	с 1 до 3 лет
IgE, МЕ/мл	0-15	0-60
IgG, г/л	1,8-8,0	5,0-13,0
IgA, г/л	0,19-2,2	0,1-1,31
IgM, г/л	0,2-2,0	0,2-1,0

При исследовании уровней сывороточных IgA, IgG, IgM установлено, что у детей с ПА отклонений от нормы выявлено не было (Таблица 3.13). У всех детей наблюдались высокие значения эозинофилов $6,62 \pm 0,99$ % и уровня общего IgE 82 [30,7;218,47] МЕ/мл (Таблица 3.13), более высокий - у пациентов с кожными проявлениями ПА и у пациентов с сочетанными проявлениями ПА, что подтверждает атопический характер заболевания. У большинства детей с гастроинтестинальными проявлениями ПА уровень общего IgE был в пределах нормальных значений. При изучении данных показателей в зависимости от клинических проявлений ПА статистически значимых различий между группами выявлено не было (Таблица 3.13).

Таблица 3.13 - Уровни сывороточных IgA, IgG, IgM и общего IgE у детей в зависимости от клинических вариантов ПА

Группы, N	IgA, г/л	IgM, г/л	IgG, г/л	IgE, МЕ/мл
Все дети, n=192	0,63 [0,42; 0,95]	0,84 [0,51;1,1]	8,57 [7,17; 9,93]	82 [30,7;218,47]
Гастроинтестинальные проявления (1)	0,78 [0,51;1,15]	0,96 [0,52;1,2]	9,45 [7,67;10,6]	45,5 [13,5;108]
Кожные проявления (2)	0,6 [0,41;0,91]	0,77 [0,48;1,08]	8,45 [7,2;9,73]	105,5 [47;287,9]
Сочетанные проявления (3)	0,51 [0,34;0,62]	0,79 [0,53;0,81]	7,82 [6,71;9,49]	95 [31;259,5]
P _{1,2,3}	0,2	0,1	0,053	0,8

Примечание: n-число обследованных детей

При изучении показателей местного иммунитета кишечника было выявлено, что в копрофильтратах у обследованных детей с ПА отмечался низкий уровень sIgA 99,44 [72,24;122,67] мкг/г (Таблица 3.14). При анализе данного показателя у детей с различными проявлениями ПА было выявлено, что уровень sIgA был достоверно ниже у детей с гастроинтестинальными и сочетанными

проявлениями ($p < 0,001$), в отличие от детей с кожными формами ПА (Таблица 3.14).

Таблица 3.14 - Показатели секреторного IgA у детей с различными формами ПА

Группа, N	sIgA, мкг/г
Все дети, n=192	99,44 [72,24;122,67]
Гастроинтестинальные проявления (1)	78,3 [64,9;93,31]
Кожные проявления (2)	120,16 [101,3;155,5]
Сочетанные проявления (3)	77,6 [59;100,6]
P _{1,2,3}	<0,001
P _{1,2}	<0,001
P _{1,3}	0,2
P _{2,3}	<0,001

Примечание: n-число обследованных детей, p - достоверность различий между группами

Согласно поставленным задачам оценивали количественные соотношения основных популяций лимфоцитов: Т-лимфоцитов (CD3+CD19-), В-лимфоцитов (CD3-CD19+), NK-клеток (CD3-CD56+CD16+), NKT-клеток (CD16+CD56+CD3+), цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3+CD8+), Т-хелперов (CD3+CD4+). Иммунорегуляторный индекс (IRI) выражали соотношением Т-хелперов к Т-цитотоксическим лимфоцитам.

Результаты показателей клеточного иммунитета сравнивали с общепринятыми возрастными нормами, представленными в Таблице 3.15.

Таблица 3.15 - Показатели субпопуляционного состава лимфоцитов у детей раннего возраста

Субпопуляции лимфоцитов		Норма	ПА
			все (n=110)
Т-total cells (CD3+CD19-)	%	61,0-85,0	70,02 [66,24;72,34]
	абс. кол-во	946-2808	3193 [2665;5022]
В-total cells (CD3-CD19+)	%	7,0-17,0	22,14 [17,04;25,87]
	абс. кол-во	111-376	1139 [853;1453]
NK-cells (CD3-CD56+CD16+)	%	8,0-17,0	6,07 [4,8;9,8]
	абс. кол-во	123-369	364 [206;535]
Th-cells (CD3+CD4+)	%	35,0-55,0	47,21 [39,01;52,71]
	абс. кол-во	68-702	2140 [1718;3546]

NKT-cells (CD16+CD56+CD3+)	%	0,5-6,0	0,47 [0,27;0,68]
	абс. кол-во	7-165	22 [16;37]
Tcytotox-cells (CD3+CD8+)	%	19,0-35,0	18,95 [17,29;23,32]
	абс. кол-во	576-1336	846 [786;1219]
IRI(Th/Tcytotox)		1,5-2,6	2,35 [1,73;2,99]

Примечание: n-число обследованных детей, p - достоверность различий между группами

Установлено, что у всех детей, страдающих ПА, показатели иммунограммы отличаются по сравнению с нормой. Так выявлен абсолютный 1139 [853;1453] и относительный 22,14 [17,04;25,87] % В-лимфоцитоз, абсолютный Т-лимфоцитоз 3193 [2665;5022] за счет повышения абсолютного содержания CD3+/CD4+ Т-хелперов 2140 [1718,5;3546]. У части детей, страдающих ПА, отмечается снижение относительного количества НК-клеток (CD3-CD56+CD16+) 6,07 [4,8;9,8] %, NKT-лимфоцитов (CD16+CD56+CD3+) 0,47 [0,27;0,68] %, которые обладают способностью секретировать цитокины, стимулирующие эффекторы Th2 ответа, а также низкий относительный уровень Т-цитотоксических клеток (CD3+CD8+) 18,95 [17,29;23,32] %. Снижение относительного содержания NKT клеток у детей может быть обусловлено их миграцией в «шоковый» орган (кожа, ЖКТ), поскольку считают, что именно эти клетки первыми реагируют на попадание в организм чужеродных белков. Иммунорегуляторный индекс при этом был повышен у 43,7% обследованных детей. Показатели субпопуляционного состава лимфоцитов представлены в Таблице 3.15.

Мы провели также исследование субпопуляционного состава лимфоцитов с учетом возраста и клинических проявлений ПА. Из Таблицы 3.16 видно, что у детей до года у 91,3% отмечался абсолютный Т-лимфоцитоз на фоне нормального их относительного содержания, у 100% абсолютный и относительный В-лимфоцитоз; относительное содержание НК-клеток у 60,9% было снижено, а их абсолютное содержание у 52,2% было повышено. У 100% абсолютное количество Th-клеток было повышено, а у 73,9% отмечалось нормальное содержание относительного их количества. Относительное количество NKT- и Т-цитотоксических клеток у 86,9% было понижено, а их абсолютное содержание у

73,9% было в пределах нормальных значений. У детей после года также у 59,4% отмечался абсолютный Т-лимфоцитоз на фоне нормального их относительного содержания, у 81,2% и 59,4% абсолютный и относительный В-лимфоцитоз, соответственно; относительное содержание НК-клеток у 59,2% было снижено на фоне их нормального абсолютного содержания у 59,4% детей. У 93,8% абсолютное количество Th-клеток было повышено, а у 68,7% отмечалось нормальное содержание относительного их количества. Абсолютное и относительное количество НКТ- и Т-цитотоксических клеток у большинства детей было в пределах нормальных значений.

По всей видимости, у ребенка первого года жизни клеточный иммунитет уже достаточно сформирован к этому возрасту, поскольку у них обнаружено высокое количество Т-клеток.

Таблица 3.16 - Показатели субпопуляционного состава лимфоцитов у детей с ПА в зависимости от возраста

Субпопуляции лимфоцитов		До года (n=23)			После года (n=32)		
		<N (%)	N (%)	>N (%)	<N (%)	N (%)	>N (%)
T-total cells (CD3+CD19-)	%	0	23 (100)	0	5 (15,6)	26 (84,4)	0
	абс. кол-во	0	2 (8,7)	21 (91,3)	0	13 (40,6)	19 (59,4)
B-total cells (CD3-CD19+)	%	0	0	23 (100)	0	13 (40,6)	19 (59,4)
	абс. кол-во	0	0	23 (100)	0	6 (18,8)	26 (81,2)
NK-cells (CD3-CD56+CD16+)	%	14 (60,9)	9 (39,1)	0	18 (59,2)	11 (31,4)	3 (9,4)
	абс. кол-во	0	11 (47,8)	12 (52,2)	0	19 (59,4)	13 (40,6)
Th-cells (CD3+CD4+)	%	0	17 (73,9)	6 (26,1)	4 (12,5)	22 (68,7)	6 (18,8)
	абс. кол-во	0	0	23 (100)	0	2 (6,2)	30 (93,8)
NKT-cells (CD16+CD56+CD3+)	%	20 (86,9)	3 (13,1)	0	13 (40,6)	17 (53,1)	2 (6,2)
	абс. кол-во	4 (17,4)	17 (73,9)	2 (8,7)	0	27 (84,4)	5 (15,6)
Tcytotox-cells (CD3+CD8+)	%	20 (86,9)	3 (13,1)	0	1 (31,4)	18 (59,2)	3 (9,4)
	абс. кол-во	2 (8,7)	17 (73,9)	4 (17,4)	3 (9,4)	23 (71,8)	6 (18,8)
IRI(Th/Tcytotox)		0	7 (30,4)	16 (69,6)	6 (18,8)	18 (56,2)	8 (25)

Примечание: n-число обследованных детей

При изучении данных показателей в зависимости от клинических проявлений ПА, статистически значимых различий между группами выявлено не было (Таблица 3.17).

Таблица 3.17 - Показатели субпопуляционного состава лимфоцитов у детей в зависимости от клинических проявлений ПА

Субпопуляции лимфоцитов		Проявления ПА			P _{1,2,3}
		г/интест (n=11) (1)	Кожные (n=30) (2)	Смешанные (n=14) (3)	
T-total cells (CD3+CD19-)	%	70,25 [69,82;71,7]	70,14 [67,53;76,36]	68,25 [65,17;70,24]	0,2
	абс. кол-во	3040 [2665;6258]	3776 [2557;5299]	3035 [2996;3374]	0,2
B-total cells (CD3-CD19+)	%	23,1 [18,05;25,87]	18,08 [17,04;24,56]	27,65 [18,06;28,08]	0,6
	абс. кол-во	868 [749;1907]	1141 [749;1521]	1212 [1073;1277]	0,2
NK-cells (CD3- CD56+CD16+)	%	8,01 [3,98;9,29]	6,85 [4,94;9,8]	5,65 [3,73;10,43]	0,3
	абс. кол-во	256 [196,5;716]	407 [292;496]	266 [163;708]	0,4
Th-cells (CD3+CD4+)	%	43,34 [42,33;52,15]	47,69 [42,64;52,23]	43,98 [38,09;53,69]	0,4
	абс. кол-во	1946,5 [1656;4331]	2765,5 [1904;3546]	1938 [1929;2603]	0,2
NKT-cells (CD16+CD56+C D3+)	%	0,49 [0,21;0,55]	0,33 [0,27;0,65]	0,48 [0,37;0,96]	0,1
	абс. кол-во	21,0 [20,0;22,0]	23,5 [12;37]	22,0 [16,0;52,0]	0,09
Tcytotox-cells (CD3+CD8+)	%	22,61 [18,02;23,82]	18,95 [17,29;22,5]	17,4 [16,34;18,63]	0,07
	абс. кол-во	826 [708;1202]	869 [786;1416]	934,0 [782,0;1052,0]	0,8
IRI(Th/Tcytotox)		2,14 [1,73;2,35]	2,49 [1,96;3,06]	2,36 [2,08;3,08]	0,06

Примечание: n-число обследованных детей, p - достоверность различий между группами

Установлено (Таблица 3.18), что у всех детей с различными проявлениями ПА отмечено повышенное количество абсолютных показателей Т-хелперов (CD3+CD4+); у детей с гастроинтестинальными и сочетанными проявлениями ПА в 100% случаях, у детей с кожными проявлениями в 93,3% (n=28) случаях.

Исследование абсолютных показателей Т-цитотоксических лимфоцитов (CD3+CD8+) показало, что у 81,8% детей с гастроинтестинальными и у 100% детей с смешанными проявлениями ПА их показатели были в норме, в отличие от детей с кожными проявлениями, среди которых лишь 56,7% имели нормальные абсолютные показатели.

Дисбаланс в субпопуляциях Т-лимфоцитов был обусловлен повышением иммунорегуляторного индекса (Th/Tcytotox) у 40% детей с кожными и у 51,7%

детей с смешанными проявлениями ПА, что было достоверно чаще, чем у детей с гастроинтестинальными проявлениями. Отмечено, что иммунорегуляторный индекс был повышен у детей грудного возраста (69,6%), в отличие от детей раннего возраста (25%).

При исследовании естественных киллеров (NK-cells) выявлено пониженное количество относительных показателей у детей с кожными (60,0%) и смешанными (71,4%) проявлениями ПА, при нормальном их значении у детей с гастроинтестинальными проявлениями.

Таблица 3.18 - Показатели субпопуляционного состава лимфоцитов у детей в зависимости от клинических проявлений ПА

Субпопуляции лимфоцитов		Проявления ПА								
		г/интест (n=11)			Кожные (n=30)			Смешанные (n=14)		
		<N	N	>N	<N	N	>N	<N	N	>N
T-total cells(CD3+CD19-)	%	0	11 (100)	0	4 (13,3)	26 (86,7)	0	2 (14,3)	12 (85,7)	0
	абс. кол-во	0	5 (45,5)	6 (54,5)	0	10 (33,3)	20 (66,7)	0	0	14 (100)
B-total cells (CD3-CD19+)	%	0	3 (27,3)	8 (72,7)	0	8 (26,7)	22 (73,3)	0	2 (14,3)	12 (85,7)
	абс. кол-во	0	2 (18,2)	9 (81,8)	0	5 (16,7)	25 (83,3)	0	0	14 (100)
NK-cells (CD3-CD56+CD16+)	%	5 (45,5)	6 (54,5)	0	18 (60,0)	10 (33,3)	2 (6,7)	10 (71,4)	2 (14,3)	2 (14,3)
	абс. кол-во	0	8 (72,7)	3 (27,3)	0	14 (46,7)	16 (53,3)	0	8 (57,1)	6 (42,9)
Th-cells (CD3+CD4+)	%	0	11 (100)	0	4 (13,3)	19 (63,3)	7 (23,4)	0	10 (71,5)	4 (28,5)
	абс. кол-во	0	0	11 (100)	0	2 (6,7)	28 (93,3)	0	0	14 (100)
NKT-cells (CD16+CD56+CD3+)	%	6 (54,5)	5 (45,5)	0	16 (53,3)	12 (40,0)	2 (6,7)	8 (57,1)	6 (42,9)	0
	абс. кол-во	0	11 (100)	0	3 (10,0)	24 (80,0)	3 (10,0)	0	10 (71,5)	4 (28,5)
Tcytotox-cells (CD3+CD8+)	%	3 (27,3)	8 (72,7)	0	15 (50,0)	12 (40,0)	3 (10,0)	12 (85,7)	2 (14,3)	0
	абс. кол-во	0	9 (81,8)	2 (18,2)	5 (16,7)	17 (56,7)	8 (26,6)	0	14 (100)	0
IRI(Th/Tcytotox)		2 (18,2)	7 (63,6)	2 (18,2)	5 (16,7)	13 (43,3)	12 (40,0)	0	6 (42,9)	8 (57,1)

Примечание: n-число обследованных детей

Таким образом, особенностью клеточного иммунитета у больных ПА явилось повышенное количество Т- и В-лимфоцитов при пониженных значениях относительных показателей NK- и NKT- и Т-цитотоксических клеток.

3.3 Оценка биомаркеров воспаления у обследованных детей с пищевой аллергией

В начале исследования все наши пациенты имели высокие уровни ЕСР в сыворотке крови 30,45 [27,78;35,3] нг/мл по сравнению с нормальными показателями (Таблица 3.19).

При изучении его содержания у детей с различными проявлениями ПА установлено, что наибольшее его значение было отмечено у детей с кожными проявлениями ПА, однако статистически значимой разницы между группами выявлено не было (Таблица 3.19).

Таблица 3.19 - Показатели ЕСР в сыворотке крови у детей с ПА

Группы, N	ЕСР, нг/мл
Все дети, n=192	30,45 [27,78;35,3]
Гастроинтестинальные проявления (1)	27,18 [19,8;37,4]
Кожные проявления (2)	32,2 [26,5;41,45]
Сочетанные проявления (3)	29,95 [17,6;40,6]
P _{1,2,3}	0,2

Примечание: n-число обследованных детей,

При анализе маркеров воспаления у детей с различными проявлениями ПА было выявлено, что уровень EDN был выше у детей с гастроинтестинальными 1571,2 [940,45;1890,8] нг/г и сочетанными 1125,8 [750,5;1511,8] нг/г проявлениями ПА, чем у детей с кожными ее проявлениями 363 [177;565,1] нг/г ($p < 0,001$). При изучении уровня кальпротектина в зависимости от клинических проявлений ПА статистически значимых различий между группами выявлено не было (Таблица 3.23).

При изучении показателей маркеров воспаления установлено, что в копрофильтратах у детей с ПА отмечался высокий EDN 816,53 [314,1;1420,8] нг/г при нормальных показателях кальпротектина 17,6 [12,26;35,86] мкг/г, что подтверждало эозинофильный характер воспаления и исключало нейтрофильный характер воспаления (Таблица 3.20).

Таблица 3.20 - Уровни фекального EDN и кальпротектина у детей с различными проявлениями ПА

Группы, N	EDN, нг/г	Кальпротектин, мкг/г
Все дети, n=192	816,53 [314,1;1420,8]	17,6 [12,26;35,86]
Гастроинтестинальные проявления (1)	1571,2 [940,45;1890,8]	17,52 [11,26;31,3]
Кожные проявления (2)	363 [177;565,1]	19,77 [12,31;43,8]
Сочетанные проявления (3)	1125,8 [750,5;1511,8]	16,04 [11,33;40,5]
P _{1,2,3}	<0,001	0,7
P _{1,2}	<0,001	
P _{1,3}	0,04	
P _{2,3}	<0,001	

Примечание: n-число обследованных детей, p - достоверность различий между группами

Таким образом, у детей с различными формами ПА имеет место эозинофильное воспаление, о чем свидетельствуют высокие уровни ECP и EDN.

3.4 Оценка микробиоты кишечника у обследованных детей с пищевой аллергией

У всех обследованных больных ПА выявили нарушения микробного пейзажа кишечника в виде преобладания условно-патогенной флоры (*Staphylococcus aureus*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, грибов рода *Candida*) и сниженного уровня индигенной флоры (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *E. coli*). Результаты исследования микробиоты кишечника представлены на Рисунке 3.5.

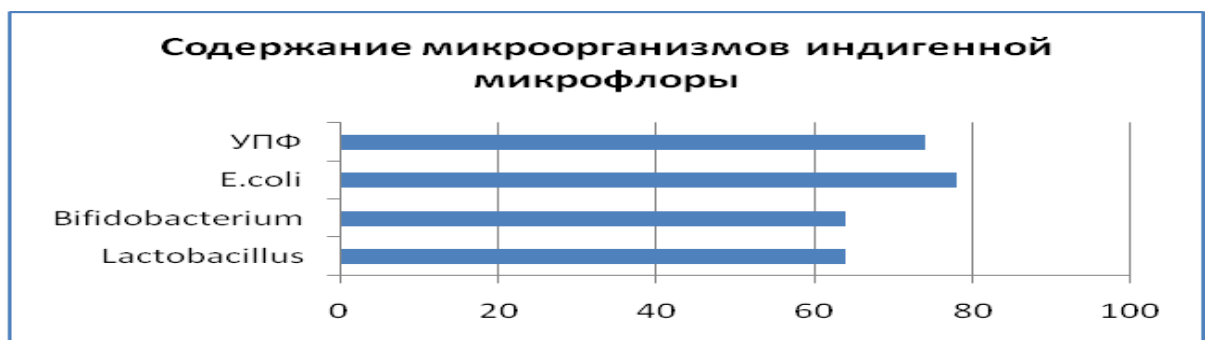


Рисунок 3.5 - Содержание микроорганизмов индигенной микрофлоры у детей с различными проявлениями ПА

Глава 4. Клинико-иммунологическая оценка эффективности терапии пищевой аллергией

4.1 Оценка эффективности комплексной терапии пищевой аллергии у детей раннего возраста с различными проявлениями пищевой аллергии

Адекватная терапия больных ПА основана на элиминации из рациона питания выявленных причинно-значимых аллергенов. Однако эффективность терапии повышается при комплексном применении препаратов, воздействующих на различные звенья патогенеза ПА. Соответственно, коррекция дисбиотических нарушений у детей с ПА возможна только в составе комплексной терапии, включающей элиминационную диетотерапию. В этой связи представляется перспективным назначение в комплексе с диетотерапией мультиштаммового пробиотика, состоящего из лиофилизированных пробиотических и молочнокислых культур (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum*), а также фруктоолигосахаридов из инулина.

Для этого препарат назначали по 1 саше 1 раз в день во время еды курсом до 1 месяца.

Оценка эффективности мультиштаммового пробиотика у больных ПА проводили с учетом клинических симптомов в динамике, показателей микробиоты кишечника, клеточного, мукозального иммунитета, а также маркеров воспаления до и после его приема.

В ходе проводимого исследования наблюдаемые пациенты были рандомизированы случайным образом в основную (1-я группа) и контрольную (2-я) группы. В каждой группе выделены три подгруппы: IA - АД, IB - больные гастроинтестинальными проявлениями ПА, IIB - дети с сочетанными проявлениями ПА. Во второй группе: в ПА подгруппу вошли больные с АтД, ПА

подгруппу составили больные с гастроинтестинальными проявлениями ПА, ШВ группу составили дети с сочетанными проявлениями ПА. Распределение больных показано на Рисунке 4.1 и 4.2. Для всех пациентов был предусмотрен вводный период в течение 1 месяца, во время которого проводили: общеклинические (осмотр, оценка симптомов со стороны ЖКТ, оценка степени тяжести АтД по индексу SCORAD, клинический анализ крови, копрология), иммунологические (уровень специфических IgE, общего IgE, sIgA, сывороточных IgA, IgG, IgM, EDN, кальпротектин, ECP), исследование субпопуляционного состава лимфоцитов и микробиологические обследования. Всем больным в вводном периоде назначали диагностическую элиминационную диету с ведением пищевых дневников и общепринятую терапию (антигистаминные препараты, наружная терапия, симптоматические средства). К концу вводного периода проводили оценку клинической эффективности общепринятой базисной терапии в обеих группах. Далее, детям основной группы к базисной терапии добавлялся мультиштаммовый пробиотик по 1 саше в день во время приема пищи. Дети контрольной группы продолжали получать базисную терапию. Длительность терапии составляла 30 дней. По окончании терапии у детей обеих групп вновь проводили оценку клинической эффективности, мукозального и клеточного иммунитета у детей обеих групп.

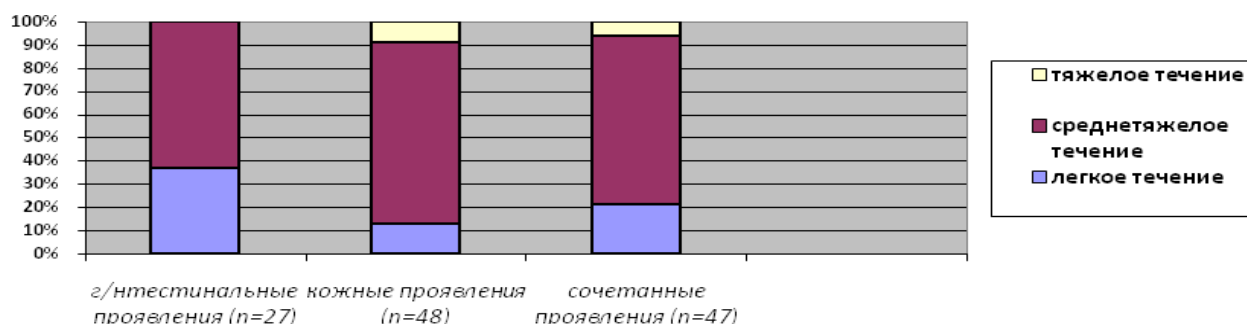


Рисунок 4.1 - Распределение больных основной группы (n=122)

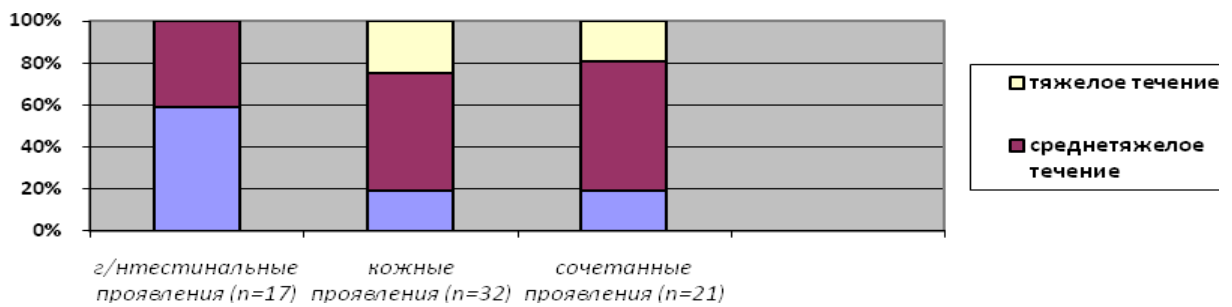


Рисунок 4.2 - Распределение больных контрольной группы (n=70)

4.1.1 Клиническая эффективность терапии у больных с гастроинтестинальными проявлениями пищевой аллергии

На момент начала терапии в основной и контрольной группах все дети имели различные степени тяжести (от легких до среднетяжелых) гастроинтестинальные проявления ПА. Тяжесть симптомов оценивали по клинической симптоматике ребенка (колики, срыгивания, метеоризм, характер стула). К концу вводного периода на фоне диетотерапии с исключением причинно-значимых аллергенов и базисной терапии у 51,4% (n=38) детей в основной группе отмечалось улучшение гастроинтестинальных симптомов (уменьшение частоты срыгиваний у 80%, колик у 43,3%, урежение частоты стула при сохранении жалоб на наличие непереваренных остатков пищи и слизи у 34,7%). В контрольной группе у 65% (n=13) детей также отмечалось улучшение гастроинтестинальных симптомов (уменьшение частоты срыгиваний у 50%, колик - 50%, улучшение характера стула - 30%). После назначения детям основной группы мультиштаммового пробиотика через 30 дней терапии у 95,9% (n=71) отмечалось значимое улучшение всех гастроинтестинальных симптомов (купирование срыгиваний, колик, нормализация частоты стула; у 4,1% (n=3) пациентов, на фоне снижения жалоб со стороны ЖКТ, эпизодически сохранялись

редкие включения слизи в стуле) (Рисунок 4.3). В контрольной группе через 30 дней у 73,3% (n=30) отмечалось улучшение всех гастроинтестинальных симптомов со стороны ЖКТ, у 26,7% (n=8) сохранялись эпизодические жалобы на разжиженный стул с примесью слизи и непереваренных остатков пищи (Рисунок 4.4). Родители всех пациентов основной группы отмечали хорошую переносимость и отсутствие тех или иных побочных реакций при применении мультиштаммового пробиотика.

Таким образом, включение в комплексное лечение детей с гастроинтестинальными проявлениями ПА мультиштаммового пробиотика обеспечило повышение эффективности общепринятой терапии и улучшение клинического течения заболевания у 96% обследованных детей с гастроинтестинальными проявлениями.

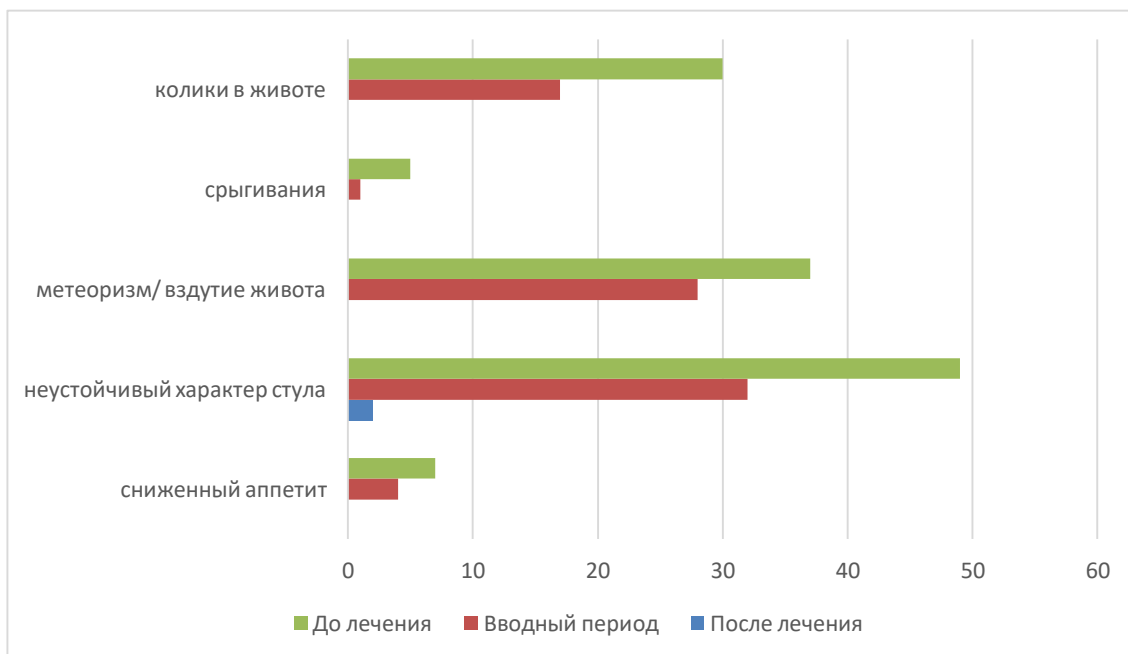


Рисунок 4.3 - Динамика гастроинтестинальных проявлений у детей с ПА (основная группа, n=74)

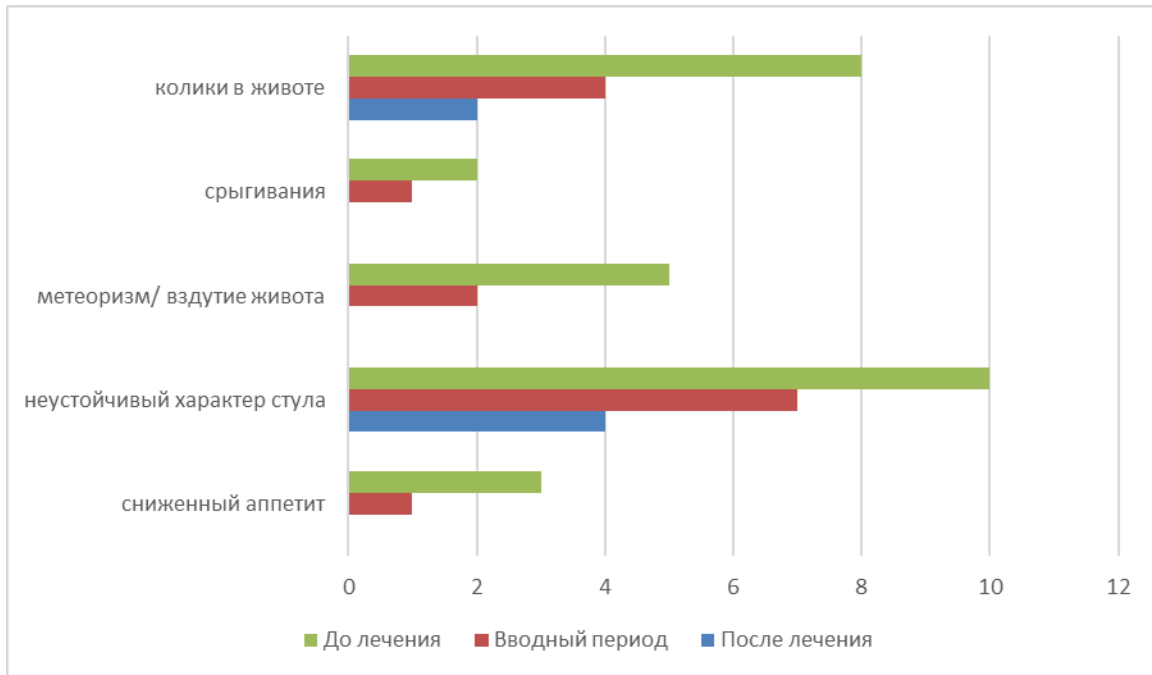


Рисунок 4.4 - Динамика гастроинтестинальных проявлений у детей с ПА (контрольная группа, n=38)

4.1.2 Клиническая эффективность терапии у больных с кожными проявлениями пищевой аллергии

На момент начала терапии в основной группе наблюдалось 95 детей, страдающих кожными проявлениями ПА, при этом, у 7,4% (n=7) детей имели тяжелое течение заболевания (индекс SCORAD составил $58,34 \pm 2,62$), у 73,6% (n=70) - среднетяжелое (индекс SCORAD $32,04 \pm 1,42$), у 19% (n=18) детей отмечались легкие кожные проявления ПА (индекс SCORAD $12,34 \pm 1,48$). Контрольную группу составили 53 ребенка, при этом, у 22,6% (n=12) детей - тяжелое течение заболевания (индекс SCORAD $53,21 \pm 1,78$), 58,5% (n=31) - среднетяжелое (SCORAD $34,44 \pm 2,02$), у 18,9% (n=10) отмечались легкие кожные проявления ПА (индекс SCORAD $11,04 \pm 1,01$). Распределение больных с кожными проявлениями ПА по степени тяжести в основной и контрольной группах представлено на Рисунке 4.4.

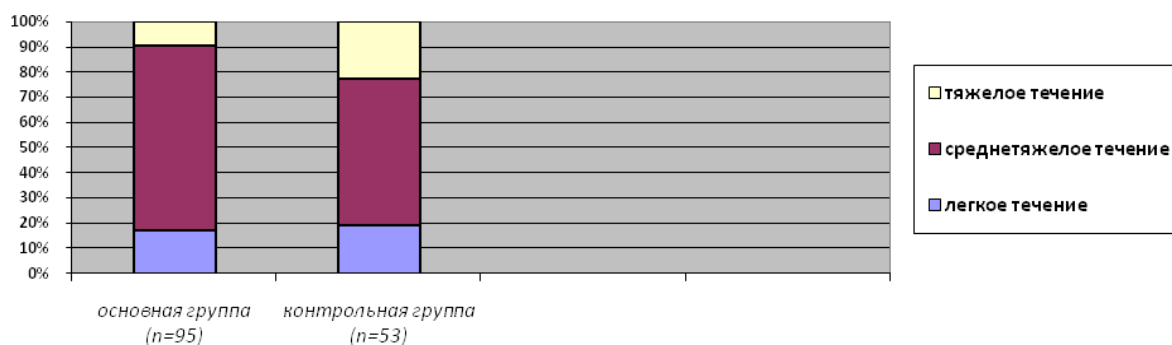


Рисунок 4.4 - Распределение больных основной (n=95) и контрольной (n=53) группы по степени тяжести проявлений АтД

После назначения детям пробиотика через 30 дней терапии ремиссия заболевания была достигнута у 89,5% (n=85) пациентов основной группы (SCORAD составил $6,9 \pm 0,5$), у 10,5% (n=10) сохранялись жалобы на периодически возникающие новые высыпания. В контрольной группе через 30 дней улучшение кожных симптомов ПА была достигнута у 75,5% (n=40) пациентов контрольной группы (индекс SCORAD составил $7,3 \pm 0,4$), у 24,5% (n=13) - сохранялись кожные проявления ПА (индекс SCORAD $14,1 \pm 0,8$). Родители обследованных детей основной группы отмечали хорошую переносимость и отсутствие тех или иных побочных реакций при применении мультиштаммового пробиотика.

Таким образом, включение в комплексное лечение детей с кожными проявлениями ПА мультиштаммового пробиотика сопровождалось клиническим улучшением эффективности общепринятой терапии.

Динамика кожных проявлений у детей с ПА в основной и контрольных группах представлены на Рисунке 4.5.

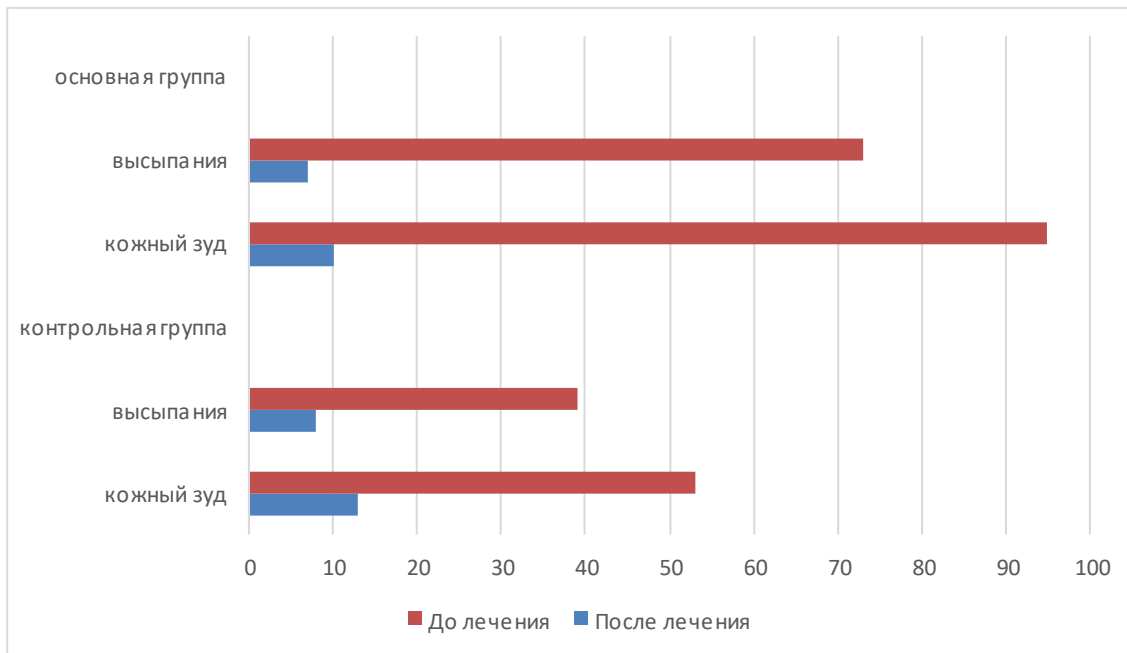


Рисунок 4.5 - Динамика клинических проявлений у детей с кожными проявлениями ПА в основной и контрольной группах

4.2 Оценка эффективности терапии по данным микробиоты кишечника

Результаты проведенных бактериологических исследований показали, что у всех больных основной и контрольной групп до начала лечения были выявлены нарушения микробного пейзажа кишечника в виде преобладания условно-патогенной флоры (*Staphylococcus aureus*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, грибов рода *Candida*) и сниженного уровня индигенной флоры (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *E. coli*). После окончания курса лечения мультиштаммовым пробиотиком содержание микроорганизмов индигенной микрофлоры в фекалиях значительно возросло (*Bifidobacterium*: до 10^8 КОЕ/мл у 75%, *Lactobacillus*: до 10^6 КОЕ/мл у 62,5%; *E. coli*: до 10^8 КОЕ/мл у 54% пациентов) ($p < 0,05$), а количество условно-патогенных микроорганизмов у 70,2% уменьшилось (Рисунок 4.6). Таким образом, к концу первого месяца лечения мультиштаммовым пробиотиком наблюдалось увеличение количества

Bifidobacterium, *Lactobacillus* и *E. coli*, что свидетельствует о постепенном восстановлении собственной нормальной микрофлоры.

Результаты бактериологических исследований в контрольной группе пациентов, не получавших мультиштаммовый пробиотик, показали, что содержание микроорганизмов индигенной микрофлоры в фекалиях возросло у меньшего числа больных (*Bifidobacterium*: до 10^8 КОЕ/мл у 11,8%; *Lactobacillus*: до 10^6 КОЕ/мл у 26,7%; *E. coli*: до 10^8 КОЕ/мл у 28,4% пациентов), а количество условно-патогенных микроорганизмов снизилось у 37,5% (Рисунок 4.7).

Таким образом, терапия мультиштаммовым пробиотиком способствовала изменению микробиоценоза кишечника у детей с ПА, что коррелировало с клиническим улучшением всех гастроинтестинальных (купирование срыгиваний, колик, нормализация частоты стула) и кожных (SCORAD составил $6,9 \pm 0,5$) симптомов заболевания ($r=+0,56$ и $r=+0,68$).

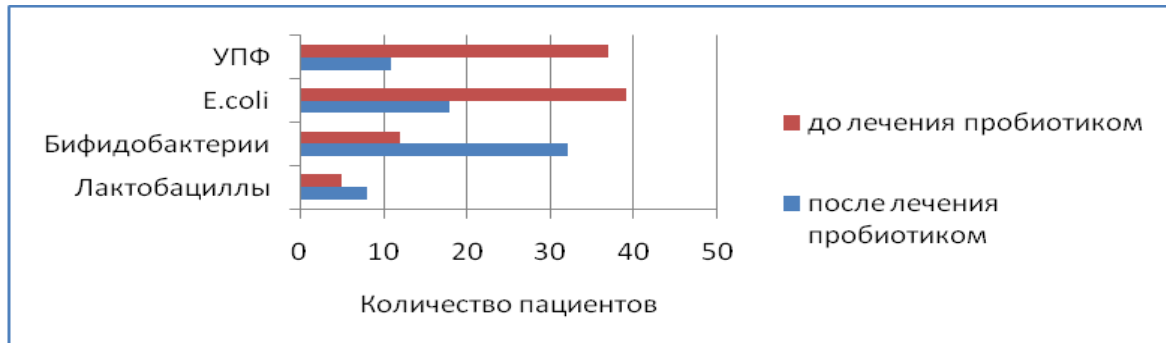


Рисунок 4.6 - Содержание микроорганизмов индигенной микрофлоры у детей основной группы на фоне лечения мультиштаммовым пробиотиком (n=122)

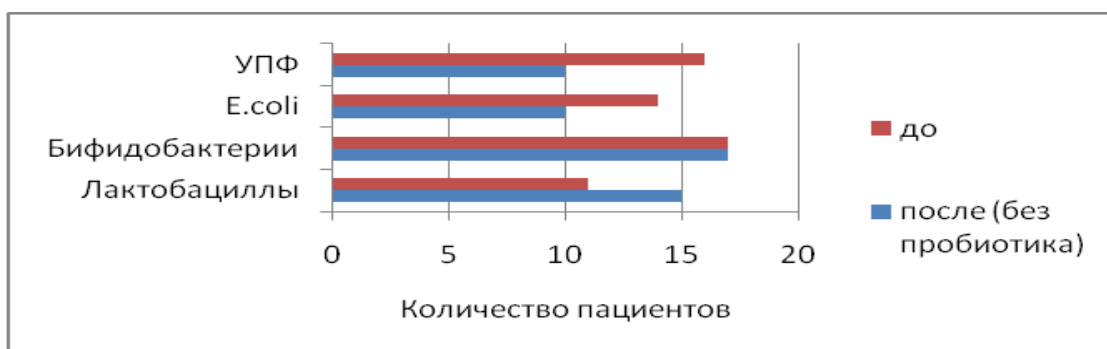


Рисунок 4.7 - Содержание микроорганизмов индигенной микрофлоры у детей контрольной группы на фоне базисной терапии (n=70)

4.3 Оценка эффективности комплексной терапии пищевой аллергии по данным показателей иммунологического статуса

4.3.1 Оценка эффективности терапии по данным мукозального иммунитета кишечника

Оценка эффективности комплексной терапии у детей с ПА включала также изучение в динамике уровней sIgA в основной и в контрольной группах, а также в зависимости от клинических проявлений ПА в соответствующих группах.

Таблица 4.1 - Показатели sIgA в основной и контрольной группах у детей с ПА, мкг/г, Me [LQ; UQ]

Группы, N	sIgA (до лечения)	sIgA (после лечения)
Основная группа (n=122) (1)	98,62 [75,45;118,98]	120,2 [85,6;135,6]
Контрольная группа (n=70) (2)	100,1 [69,6;126,4]	101,0 [70,3;126,2]
P _{1,2}	0,049	0,06

Примечание: n-число обследованных детей, p - достоверность различий между группами

Как видно из Таблицы 4.1 у всех детей до лечения отмечался низкий уровень sIgA 98,62 [75,45;118,98] и 100,1 [69,6;126,4] мкг/г, соответственно; статистически ниже он отмечался в основной группе (p =0,049). На фоне лечения с применением мультиштаммового пробиотика в основной группе уровень sIgA был в пределах нормальных значений 120,2 [85,6;135,6] мкг/г, в контрольной же группе без применения пробиотика отмечался низкий уровень sIgA 101,0 [70,3;126,2] мкг/г. Статистически значимой разницы между обследованными группами после лечения не выявлено (p = 0,06).

Таблица 4.2 - Показатели sIgA в основной и контрольной группах у детей с ПА до и после лечения, мкг/г, Me [LQ; UQ]

Исследуемый показатель	sIgA	
	Основная группа (n=122)	Контрольная группа (n=70)
Группы, N		
До лечения	98,62 [75,45;118,98]	100,1 [69,6;126,4]
После лечения	120,2 [85,6;135,6]	101,0 [70,3;126,2]
P _{1,2}	<0,001	0,6

Примечание: n-число обследованных детей, p - достоверность различий между группами

Как видно из Таблицы 4.2 лечение мультиштаммовым пробиотиком способствовало достоверному повышению sIgA у детей основной группы ($p < 0,001$) до нормальных значений 120,2 [85,6;135,6] мкг/г, по сравнению с данным показателем у детей контрольной группы ($p = 0,6$), где он сохранялся ниже нормальных значений 101,0 [70,3;126,2] мкг/г.

Таблица 4.3 - Показатели sIgA в контрольной и основной группах у детей с различными проявлениями ПА, мкг/г, Me [LQ; UQ]

Исследуемый показатель	sIgA			
	Основная группа (n=122)		Контрольная группа (n=70)	
Группы, N				
Лечение	До лечения	После лечения	До лечения	После лечения
Гастроинтестинальные проявления (1)	78,65 [61,25;101,0]	116,58 [85,4;135,64]	77,95 [68,52;85,62]	78,94 [64,35;88,52]
Кожные проявления (2)	113,95 [96,35;135,62]	120,33 [96,65;142,3]	126,36 [106,26;175,45]	126,25 [104,26;156,35]
Сочетанные проявления (3)	91,91 [75,64;101,01]	118,66 [85,65;132,65]	64,185 [42,35;100,26]	63,170 [38,632;101,0]
P _{1,2,3}	<0,001	0,7	<0,001	<0,001
P _{1,2}	<0,001		<0,001	<0,001
P _{1,3}	0,1		0,5	0,5
P _{2,3}	<0,001		<0,001	<0,001

Примечание: n-число обследованных детей, p - достоверность различий между группами

Как видно из Таблицы 4.3, в основной группе до лечения у всех детей с различными проявлениями ПА отмечался низкий уровень sIgA. При этом у детей с гастроинтестинальными и сочетанными проявлениями его уровень был достоверно ниже ($p < 0,001$), чем у детей с кожными проявлениями ПА. В контрольной группе

исходно у детей с гастроинтестинальными и сочетанными проявлениями ПА также отмечался низкий уровень sIgA 77,95 [68,52;85,62] и 64,185 [42,35;100,26] мкг/г, соответственно, в отличие от кожных ее проявлений, где он был достоверно выше ($p < 0,001$). После лечения (диетотерапии с применением мультиштаммового пробиотика) в основной группе статистической разницы между обследованными группами не обнаружено ($p = 0,7$), а уровень sIgA был в пределах нормальных значений. В контрольной группе после лечения (диетотерапии без применения мультиштаммового пробиотика) у детей с гастроинтестинальными и сочетанными проявлениями ПА уровень sIgA был достоверно ниже 78,94 [64,35;88,52] и 63,170 [38,632;101,0] мкг/г ($p < 0,001$), в отличие от детей с кожными проявлениями, где он был в пределах нормальных значений 126,25 [104,26;156,35] мкг/г.

Лечение мультиштаммовым пробиотиком способствовало достоверному повышению sIgA у детей с гастроинтестинальными и сочетанными проявлениями ПА по сравнению с данными показателями у детей контрольной группы ($p = 0,04$). Повышение sIgA статистически коррелировало с клиническим улучшением кожных и гастроинтестинальных симптомов у больных основной группы по сравнению с контрольной ($r=+0,74$) (Таблица 4.4).

Таблица 4.4 - Показатели sIgA в контрольной и основной группах у детей с различными проявлениями ПА до и после лечения, мкг/г, Me [LQ; UQ]

Основная группа (n=122)			
Лечение/Клинические проявления	Изолированные г/э (n=28)	Изолированные кожные (n=48)	Смешанные проявления (n=46)
До лечения	78,65 [61,25;101,0]	113,95 [96,35;135,62]	91,91 [75,64;101,01]
После лечения	116,58 [85,4;135,64]	120,33 [96,65;142,3]	118,66 [85,65;132,65]
P _{1,2}	0,04	0,2	0,04
Контрольная группа (n=70)			
До лечения	77,95 [68,52;85,62]	126,36 [106,26;175,45]	64,185 [42,35;100,26]
После лечения	78,94 [64,35;88,52]	126,25 [104,26;156,35]	63,170 [38,632;101,0]
P _{1,2}	0,6	0,7	0,4

Примечание: n-число обследованных детей, p - достоверность различий между группами

Таким образом, низкие значения sIgA свидетельствуют о нарушениях в системе мукозального иммунитета и снижении барьерных функций слизистой

оболочки ЖКТ. Проведенное исследование показало, что включение мультиштаммового пробиотика в комплексную терапию у детей с гастроинтестинальными и сочетанными проявлениями ПА способствовало повышению sIgA и, тем самым, влияя на аллергическое воспаление.

4.3.2 Оценка эффективности терапии по данным клеточного иммунитета

С целью оценки эффективности комплексной терапии у детей с ПА мы изучали показатели клеточного иммунитета: основные популяции лимфоцитов (Т-лимфоцитов (CD3+CD19), В-лимфоцитов (CD3-CD19+), НК-клеток (CD3-CD56+CD16+), НКТ-клеток (CD16+CD56+CD3+), цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3+CD8+), Т-хелперов (CD3+CD4+) и иммунорегуляторный индекс). Данные показатели были изучены до и после лечения в основной и в контрольной группах у детей, а также в зависимости от клинических проявлений ПА в соответствующих группах.

В исследование было включено 55 детей, которых разделили случайным образом на основную (n=35) и контрольную (n=20) группы. Для всех пациентов был предусмотрен вводный период в течение 1 месяца, во время которого проводили изучение основных популяций лимфоцитов методом проточной цитофлуорометрии. Всем больным в вводном периоде назначали диагностическую элиминационную диету с ведением пищевых дневников и общепринятую терапию (антигистаминные препараты, наружная терапия, симптоматические средства). К концу вводного периода проводили оценку клинической эффективности общепринятой базисной терапии в обеих группах. Далее, детям основной группы к базисной терапии добавлялся мультиштаммовый пробиотик по 1 саше в день во время приема пищи. Дети контрольной группы продолжали получать базисную терапию. Длительность терапии составляла 30 дней. По окончании терапии (мультипробиотиком в основной группе и базисной -

в контрольной) повторно оценивали показатели клеточного иммунитета у пациентов.

Таблица 4.5 - Показатели субпопуляционного состава лимфоцитов у обследованных детей с ПА, Me [LQ; UQ]

Субпопуляции лимфоцитов		До лечения (А)		После лечения (В)		P _{1,2} (А)	P _{1,2} (В)
		1-я группа (основная, n=35)	2-я группа (контрольная, n=20)	1-я группа (основная, n=35)	2-я группа (контрольная, n=20)		
T-total cells (CD3+CD19-)	%	69,96 [66,07;71,73]	70,22 [67,24;72,35]	70,15 [64,62;73,58]	68,95 [63,82;73,35]	0,8	0,5
	абс. кол-во	3374 [2557;5299]	3116,5 [2843;4762,5]	2865,5 [1980; 3868]	3047,5 [2483;3746,5]	0,9	0,5
B-total cells (CD3-CD19+)	%	21,32 [16,54;25,55]	23,21 [17,75;26,88]	21,68 [17,23;25,37]	22,98 [19,66;27,16]	0,1	0,3
	абс. кол-во	1123 [749;1521]	1176,5 [919;1365]	844,5 [420;1198]	899,5 [722,5;1209,5]	0,6	0,5
NK-cells (CD3-CD56+CD16+)	%	6,07 [4,78;9,8]	6,535 [4,595;9,545]	7,01 [4,38; 9,5]	7,475 [4,595;9,585]	0,9	0,7
	абс. кол-во	364 [256;535]	354 [201;526,5]	279 [161;374]	296 [193,5;371]	0,9	0,7
Th-cells (CD3+CD4+)	%	47,43 [42,33;53,96]	44,03 [38,55;50,91]	44,94 [40,8;49,78]	43,15 [38,24;48,23]	0,2	0,3
	абс. кол-во	2590 [1656;3759]	2100,5 [1775;3301,5]	1650,5 [1233;2761]	1551,5 [1252,5;2622]	0,8	0,9
NKT-cells (CD16+CD56+CD3+)	%	0,48 [0,27;0,96]	0,35 [0,21;0,49]	0,64 [0,28;3,31]	0,435 [0,225;0,995]	0,1	0,1
	абс. кол-во	23 [18;52]	21 [11,5;25]	28,5 [16;82]	17 [7;35]	0,056	0,07
Tcytotox-cells (CD3+CD8+)	%	18,69 [16,34;23,4]	18,99 [17,6;23,275]	20,89 [17,87;24,42]	20,495 [16,595;23,46]	0,7	0,5
	абс. кол-во	846 [750;1221,0]	869 [796,5;1130,5]	816,0 [630,0;1043,0]	797 [616,5;1023]	0,9	0,7
IRI(Th/Tcytotox)	%	2,36 [1,73;3,08]	2,335 [1,685;2,790]	2,11 [1,77;3,08]	2,150 [1,785;2,595]	0,5	0,9

Примечание: n-число обследованных детей, p - достоверность различий между группами

Как видно из Таблицы 4.5 статистически достоверной разницы между основной и контрольной группами до и после комплексного лечения ПА выявлено не было. У всех детей в обследованных группах отмечался абсолютный

Т-лимфоцитоз, абсолютный и относительный В-лимфоцитоз, сниженное количество относительных показателей НК-клеток и повышенное количество абсолютных показателей Th-клеток. В основной и контрольной группах до лечения, а также в основной после лечения обнаружено снижение относительных показателей НКТ-клеток, в отличие от основной группы, где на фоне лечения количество НКТ-клеток было в пределах нормальных значений 0,64 [0,28;3,31] %.

Таблица 4.6 - Показатели субпопуляционного состава лимфоцитов у обследованных детей с ПА до и после комплексного лечения в основной и контрольной группах, Ме [LQ; UQ]

Субпопуляции лимфоцитов		Основная группа, n=35 (A)		Контрольная группа, n=20 (B)		P _{1,2} (A)	P _{1,2} (B)
		До лечения (1)	После лечения (2)	До лечения (1)	После лечения (2)		
T-total cells (CD3+CD19-)	%	69,96 [66,07;71,73]	70,15 [64,62;73,58]	70,22 [67,24;72,35]	68,95 [63,82;73,35]	0,7	1,0
	абс. кол-во	3374 [2557;5299]	2865,5 [1980;3868]	3116,5 [2843;4762,5]	3047,5 [2483;3746,5]	<0,001	0,01
B-total cells (CD3-CD19+)	%	21,32 [16,54;25,55]	21,68 [17,23;25,37]	23,21 [17,75;26,88]	22,98 [19,66;27,16]	0,3	0,8
	абс. кол-во	1123 [749;1521]	844,5 [420;1198]	1176,5 [919;1365]	899,5 [722,5;1209,5]	0,03	0,01
NK-cells (CD3-CD56+CD16+)	%	6,07 [4,78;9,8]	7,01 [4,38;9,5]	6,535 [4,595;9,545]	7,475 [4,595;9,585]	0,3	0,5
	абс. кол-во	364 [256;535]	279 [161;374]	354 [201;526,5]	296 [193,5;371]	0,06	0,3
Th-cells (CD3+CD4+)	%	47,43 [42,33;53,96]	44,94 [40,8;49,78]	44,03 [38,55;50,91]	43,15 [38,24;48,23]	0,3	0,8
	абс. кол-во	2590 [1656;3759]	1650,5 [1233;2761]	2100,5 [1775;3301,5]	1551,5 [1252,5;2622]	<0,001	<0,001
NKT-cells (CD16+CD56+CD3+)	%	0,48 [0,27;0,96]	0,64 [0,28;3,31]	0,35 [0,21;0,49]	0,435 [0,225;0,995]	0,2	0,3
	абс. кол-во	23 [18;52]	28,5 [16;82]	21 [11,5;25]	17 [7;35]	0,7	0,8
Tcytotox-cells (CD3+CD8+)	%	18,69 [16,34;23,4]	20,89 [17,87;24,42]	18,99 [17,6;23,275]	20,495 [16,595;23,46]	0,2	0,8
	абс. кол-во	846 [750;1221,0]	816,0 [630,0;1043,0]	869 [796,5;1130,5]	797 [616,5;1023]	0,01	0,01

IRI(Th/Tcytox)	%	2,36 [1,73;3,08]	2,11 [1,77;3,08]	2,335 [1,685;2,790]	2,150 [1,785;2,595]	0,2	0,8
----------------	---	---------------------	---------------------	------------------------	------------------------	-----	-----

Примечание: n-число обследованных детей, p - достоверность различий между группами

Как видно из Таблицы 4.6, у детей основной и контрольной групп отмечалось достоверное снижение количества абсолютных показателей B-total cells ($p = 0,03$ и $p = 0,01$), Th-cells ($p < 0,001$), T cytox-cells ($p = 0,01$ и $p = 0,01$) и T-total cells ($p < 0,001$ и $p = 0,01$).

Таким образом, включение мультиштаммового пробиотика в комплексную терапию ПА способствовало уменьшению количества абсолютных показателей T-total cells, B-total cells, Th-cells и T-cytox-cells.

Также мы оценивали эффективность комплексной терапии ПА с применением пробиотика в основной группе и без его применения в контрольной группе у детей с различными проявлениями ПА с учетом уровней субпопуляционного состава лимфоцитов в сыворотке крови в динамике.

Таблица 4.7 - Показатели субпопуляционного состава лимфоцитов у детей основной группы с различными проявлениями ПА, Me [LQ; UQ]

Субпопуляции лимфоцитов		Гастроинтестинальные проявления (1)		Кожные проявления (2)		Сочетанные проявления (3)		P _{1,2,3} (A) P _{1,2,3} (B)	P _{1,2} (B) P _{1,3} (B) P _{2,3} (B)
		A	B	A	B	A	B		
T-total cells (CD3+CD19-)	%	70,69 (66,07; 71,7)	70,11 (56,5; 73,58)	70,02 (67,53; 76,36)	70,69 (69,78; 74,55)	68,35 (65,17; 70,74)	63,12 (59,7; 67,2)	0,6 0,005	0,2 0,3 <0,001
	абс. кол- во	3040 (1966; 6258)	2883 (2672; 5259)	3776 (2383; 5299)	3028 (1971,5; 4033,5)	3193 (2996; 4870)	2556 (1788; 3146)	0,9 0,5	
B-total cells (CD3-CD19+)	%	23,1 (16,5; 25,87)	22,28 (17,31; 29,9)	18,05 (16,54; 23,32)	20,26 (12,23; 24,47)	22,14 (18,06; 28,08)	23,72 (20,15; 29,34)	0,4 0,2	
	абс. кол- во	868 (727; 1907)	854 (629; 1401)	1139 (687; 1521)	788 (405; 1138,5)	1212 (1073; 1277)	888 (688; 1286)	0,7 0,4	
NK-cells (CD3-CD56+CD16+)	%	8,01 (3,98; 9,29)	7,94 (3,98; 9,29)	6,7 (4,8; 9,8)	5,76 (3,89; 7,77)	5,65 (3,73; 10,43)	8,25 (7,99; 12,91)	0,9 0,04	
	абс. кол- во	256 (196; 716)	365 (163; 468)	382 (292; 496)	215 (136; 343)	274 (163; 708)	317 (199; 647)	0,8 0,09	
Th-cells (CD3+CD4+)	%	42,66 (39,01; 52,15)	40,8 (37,48; 48,19)	47,69 (43,7; 54,18)	45,76 (42,26; 50,89)	48,82 (38,09; 55,36)	43,5 (39,34; 45,66)	0,4 0,1	
	абс. кол- во	1832 (1159; 4331)	1671 (1211; 3696)	2730 (1653; 3546)	1815,5 (1238; 2810)	2140 (1929; 3759)	1473 (1233; 2168)	0,8 0,8	
NKT-cells	%	0,5 (0,21; 0,46 (0,02;	0,41	0,88	0,48	0,71	0,7		

(CD16+CD56+CD3+)		0,68)	0,56)	(0,27; 0,83)	(0,41; 3,47)	(0,37; 2,25)	(0,24; 4,08)	0,2	
	абс. кол- во	21,0 (20,0; 26,0)	16,0 (2,0; 23,0)	29 (18; 52)	40 (23; 89,5)	23 (16; 183)	41 (7; 91)	0,6 0,09	
Tcytotox-cells (CD3+CD8+)	%	23,23 (18,02; 24,62)	22,05 (15,63; 26,63)	18,95 (17,29; 23,4)	23,36 (19,86; 24,61)	17,4 (16,14; 18,63)	16,8 (16,47; 20,1)	0,2 0,06	
	абс. кол- во	826 (708; 1202)	1013 (632; 1177)	846 (750; 1416)	801,5 (644; 1097)	934 (782; 1219)	773 (467; 871)	0,9 0,4	
IRI(Th/Tcytotox)	%	2,01 (1,64; 2,35)	2,19 (1,65; 2,55)	2,48 (1,96; 3,06)	1,98 (1,77; 2,55)	2,99 (2,08; 3,33)	2,49 (2,23; 2,64)	0,4 0,05	

Примечание: n-число обследованных детей, p - достоверность различий между группами

Таблица 4.8 - Показатели субпопуляционного состава лимфоцитов у детей контрольной группы с различными проявлениями ПА до (А) и после (В) комплексного лечения, Ме [LQ; UQ]

Субпопуляции лимфоцитов		Гастроинтестинальные проявления (1)		Кожные проявления (2)		Сочетанные проявления (3)		P _{1,2,3} (A) P _{1,2,3} (B)
		A	B	A	B	A	B	
T-total cells (CD3+CD19-)	%	70,24 (69,82; 75,69)	70,11 (56,5; 73,12)	70,26 (69,32; 72,36)	70,69 (67,89; 73,66)	67,245 (62,36; 69,245)	65,16 (60,56; 67,725)	0,2 0,2
	абс. кол- во	3040 (2665; 6258)	2883 (1886; 5259)	3776 (2971; 5022)	3313 (2467; 3868)	3015,5 (2927,5; 3114)	3125 (2552,5; 3114)	0,6 0,9
B-total cells (CD3-CD19+)	%	23,1 (18,05; 25,87)	22,28 (17,23; 29,9)	22,5 (17,44; 25,55)	22,24 (19,91; 25,37)	27,865 (22,855; 28,195)	23,7 (21,915; 26,53)	0,3 0,9
	абс. кол- во	868 (749; 1907)	854 (420; 1401)	1261 (1139; 1453)	1138 (757; 1198)	1226,5 (1091; 1259)	859,5 (759,5; 899,5)	0,5 0,7
NK-cells (CD3-CD56+CD16+)	%	8,01 (3,98; 9,29)	7,94 (3,81; 13,57)	7,0 (5,62; 9,8)	5,76 (4,43; 9,5)	4,9 (3,655; 13,605)	8,24 (7,62; 13,915)	0,8 0,4
	абс. кол- во	256 (196; 716)	365 (163; 468)	449 (308; 461)	226 (188; 284)	214,5 (162; 700,5)	312,5 (253,5; 492,5)	0,6 0,5
Th-cells (CD3+CD4+)	%	44,08 (42,33; 52,15)	42,8 (39; 48,19)	47,69 (42,64; 52,2)	45,47 (42,06; 50,79)	41,035 (37,095; 46,4)	41,42 (38,3; 44,22)	0,5 0,6
	абс. кол- во	2061 (1656; 4331)	1671 (1152; 3696)	2801 (2061; 3471)	1630 (1366; 2761)	1933,5 (1823,5; 2039)	1372,5 (1252,5; 1601)	0,4 0,9
NKT-cells (CD16+CD56+CD3+)	%	0,48 (0,12; 0,55)	0,46 (0,02; 0,56)	0,27 (0,17; 0,33)	0,41 (0,26; 1,27)	0,425 (0,29; 0,72)	0,44 (0,215; 1,54)	0,2 0,8
	абс. кол- во	21 (11; 22)	16 (2; 23)	18 (7; 24)	24 (11; 39)	19 (12,5; 37)	14,5 (7; 56,5)	0,8 0,5
Tcytotox-cells (CD3+CD8+)	%	21,98 (18,02; 23,82)	22,05 (15,63; 23,5)	18,95 (17,8; 21,5)	20,89 (19,16; 23,42)	18,015 (16,87; 20,975)	18,41 (16,595; 21,29)	0,5 0,8
	абс.	826 (708; 1202)	845 (475; 1177)	892	772 (630; 1097)	875,5 (766,5; 1219)	672 (519; 871)	0,6

	кол-во	1202)	1033)	(798; 1416)	938)	993)	807,5)	0,6
IRI(Th/Tcytox)	%	2,27 (1,73; 2,62)	2,19 (1,82; 2,55)	2,5 (2,32; 2,96)	2,03 (1,87; 2,65)	2,22 (1,855; 2,675)	2,235 (1,99; 2,44)	0,7 0,9

Примечание: n-число обследованных детей, p - достоверность различий между группами

Как видно из Таблицы 4.7, у детей основной группы до комплексного лечения статистически значимых различий между группами выявлено не было. На фоне комплексного лечения относительные показатели T-total cells были достоверно выше у детей с сочетанными проявлениями ($p < 0,001$), чем у детей с кожными проявлениями ПА; между остальными субпопуляциями лимфоцитов статистически значимых различий между обследованными группами выявлено не было.

В контрольной группе уровни субпопуляций лимфоцитов статистически не отличались (Таблица 4.8).

Нами была поставлена задача оценить эффективность комплексной терапии ПА с применением пробиотика в основной группе и без его применения в контрольной группе у детей с различными проявлениями ПА по динамике уровней субпопуляций лимфоцитов в сыворотке крови.

Таблица 4.9 - Показатели субпопуляционного состава лимфоцитов у детей основной и контрольной группы с гастроинтестинальными проявлениями ПА до и после комплексного лечения, Me [LQ; UQ]

Субпопуляции лимфоцитов		До (1)	После лечения (2)	P _{1,2}	До (1)	После лечения (2)	P _{1,2}
		Основная группа			Контрольная группа		
T-total cells (CD3+CD19-)	%	70,69 (66,07; 71,7)	70,11 (56,5; 73,58)	1,0	70,24 (69,82; 75,69)	70,11 (56,5; 73,12)	1,0
	абс. кол-во	3040 (1966; 6258)	2883 (2672; 5259)	0,449	3040 (2665; 6258)	2883 (1886; 5259)	0,1
B-total cells (CD3-CD19+)	%	23,1 (16,5; 25,87)	22,28 (17,31; 29,9)	1,0	23,1 (18,05; 25,87)	22,28 (17,23; 29,9)	1,0
	абс. кол-во	868 (727; 1907)	854 (629; 1401)	1,0	868 (749; 1907)	854 (420; 1401)	0,4
NK-cells (CD3- CD56+CD16+)	%	8,01 (3,98; 9,29)	7,94 (3,98; 9,29)	1,0	8,01 (3,98; 9,29)	7,94 (3,81; 13,57)	1,0
	абс. кол-во	256 (196; 716)	365 (163; 468)	1,0	256 (196; 716)	365 (163; 468)	1,0
Th-cells	%	42,66 (39,01;	40,8 (37,48;	1,0	44,08 (42,33;	42,8 (39; 48,19)	1,0

(CD3+CD4+)		52,15)	48,19)		52,15)		
	абс. кол-во	1832 (1159; 4331)	1671 (1211; 3696)	0,449	2061 (1656; 4331)	1671 (1152; 3696)	0,1
NKT-cells	%	0,49 (0,21; 0,68)	0,46 (0,02; 0,56)	1,0	0,48 (0,12; 0,55)	0,46 (0,02; 0,56)	1,0
(CD16+CD56+ CD3+)	абс. кол-во	21,0 (20,0; 26,0)	16,0 (2,0; 23,0)	0,449	21 (11; 22)	16 (2; 23)	0,4
Tcytotox-cells	%	23,23 (18,02; 24,62)	22,05 (15,63; 26,63)	1,0	21,98 (18,02; 23,82)	22,05 (15,63; 23,5)	1,0
(CD3+CD8+)	абс. кол-во	826 (708; 1202)	1013 (632; 1177)	1,0	826 (708; 1202)	845 (475; 1033)	0,4
IRI(Th/Tcytotox)	%	2,01 (1,64; 2,35)	2,19 (1,65; 2,55)	1,0	2,27 (1,73; 2,62)	2,19 (1,82; 2,55)	1,0

Примечание: n-число обследованных детей, p - достоверность различий между группами

Между обследованными группами у детей с гастроинтестинальными проявлениями ПА статистических различий не выявлено. У детей основной и контрольной групп до комплексного лечения обнаружено повышенное количество абсолютных показателей T-total cells, Th-cells, абсолютных и относительных показателей B-total cells и сниженного количества относительных показателей NKT-cells. На фоне лечения отмечалась тенденция к нормализации показателей клеточного иммунитета (Таблица 4.9).

Таблица 4.10 - Показатели субпопуляционного состава лимфоцитов у детей основной и контрольной группы с кожными проявлениями ПА до и после комплексного лечения, Me [LQ; UQ]

Субпопуляции лимфоцитов		До (1)	После лечения (2)	P _{1,2}	До (1)	После лечения (2)	P _{1,2}
		Основная группа (n=21)			Контрольная группа (n=9)		
T-total cells (CD3+CD19-)	%	70,02 (67,53; 76,36)	70,69 (69,78; 74,55)	1,0	70,26 (69,32; 72,36)	70,69 (67,89; 73,66)	1,0
	абс. кол-во	3776 (2383; 5299)	3028 (1971,5; 4033,5)	0,01	3776 (2971; 5022)	3313 (2467; 3868)	0,04
B-total cells (CD3-CD19+)	%	18,05 (16,54; 23,32)	20,26 (12,23; 24,47)	0,7	22,5 (17,44; 25,55)	22,24 (19,91; 25,37)	1,0
	абс. кол-во	1139 (687; 1521)	788 (405; 1138,5)	<0,001	1261 (1139; 1453)	1138 (757; 1198)	0,04
NK-cells (CD3- CD56+CD16+)	%	6,7 (4,8; 9,8)	5,76 (3,89; 7,77)	0,008	7,0 (5,62; 9,8)	5,76 (4,43; 9,5)	0,04
	абс. кол-во	382 (292; 496)	215 (136; 343)	0,003	449 (308; 461)	226 (188; 284)	0,04
Th-cells (CD3+CD4+)	%	47,69 (43,7; 54,18)	45,76 (42,26; 50,89)	0,4	47,69 (42,64; 52,2)	45,47 (42,06; 50,79)	0,5
	абс. кол-во	2730 (1653; 3546)	1815,5 (1238; 2810)	0,01	2801 (2061; 3471)	1630 (1366; 2761)	0,007
NKT-cells (CD16+CD56+)	%	0,41 (0,27; 0,83)	0,88 (0,41; 3,47)	0,2	0,27 (0,17; 0,33)	0,41 (0,26; 1,27)	0,04
	абс.	29 (18; 52)	40 (23; 89,5)	1,0	18 (7; 24)	24 (11; 39)	0,5

CD3+)	КОЛ-ВО						
Tcytotox-cells	%	18,95 (17,29; 23,4)	23,36 (19,86; 24,61)	0,08	18,95 (17,8; 21,5)	20,89 (19,16; 23,42)	0,5
(CD3+CD8+)	абс. КОЛ-ВО	846 (750; 1416)	801,5 (644; 1097)	0,01	892 (798; 1416)	772 (630; 938)	0,007
IRI(Th/Tcytotox)	%	2,48 (1,96; 3,06)	1,98 (1,77; 2,55)	0,2	2,5 (2,32; 2,96)	2,03 (1,87; 2,65)	0,5

Примечание: n-число обследованных детей, p - достоверность различий между группами

При исследовании субпопуляций лимфоцитов у детей основной и контрольной групп с кожными проявлениями ПА до и на фоне комплексного лечения отмечалось достоверное снижение количества абсолютных показателей T-total cells ($p = 0,01$ и $p = 0,04$), B-total cells ($p < 0,001$ и $p = 0,04$), Th-cells ($p = 0,01$ и $p = 0,007$), T cytotox cells ($p = 0,01$ и $p = 0,007$), относительных ($p = 0,008$ и $p = 0,04$) и абсолютных ($p = 0,003$ и $p = 0,04$) показателей NK-cells (Таблица 4.10). У детей контрольной группы отмечалось достоверное повышение количества ($p = 0,04$) относительных показателей NKT-cells. Таким образом, на фоне комплексного лечения отмечалась тенденция к нормализации показателей клеточного иммунитета по данным абсолютных показателей NK-cells, относительных показателей T-cytotox cells в основной и контрольной группах и нормализация относительных показателей NKT-cells в основной группе у детей с кожными проявлениями ПА.

Таблица 4.11 - Показатели субпопуляционного состава лимфоцитов у детей основной и контрольной группы с сочетанными проявлениями ПА до и после комплексного лечения, Me [LQ; UQ]

Субпопуляции лимфоцитов		До (1)	До лечения (2)	P _{1,2}	До (1)	После лечения (2)	P _{1,2}
		Основная группа (n=7)			Контрольная группа (n=4)		
T-total cells (CD3+CD19-)	%	68,35 (65,17; 70,74)	63,12 (59,7; 67,2)	0,1	67,245 (62,36; 69,245)	65,16 (60,56; 67,725)	1,0
	абс. КОЛ-ВО	3193 (2996; 4870)	2556 (1788; 3146)	0,1	3015,5 (2927,5; 3114)	3125 (2552,5; 3114)	0,6
B-total cells (CD3-CD19+)	%	22,14 (18,06; 28,08)	23,72 (20,15; 29,34)	0,5	27,865 (22,855; 28,195)	23,7 (21,915; 26,53)	0,6
	абс. КОЛ-ВО	1212 (1073; 1277)	888 (688; 1286)	0,1	1226,5 (1091; 1259)	859,5 (759,5; 899,5)	0,1
NK-cells (CD3- CD56+CD16+)	%	5,65 (3,73; 10,43)	8,25 (7,99; 12,91)	0,1	4,9 (3,655; 13,605)	8,24 (7,62; 13,915)	0,6
	абс. КОЛ-ВО	274 (163; 708)	317 (199; 647)	1,0	214,5 (162; 700,5)	312,5 (253,5; 492,5)	0,6
Th-cells	%	48,82 (38,09; 55,36)	43,5 (39,34; 45,66)	0,4	41,035 (37,095; 46,4)	41,42 (38,3; 44,22)	0,6

(CD3+CD4+)	абс. кол-во	2140 (1929; 3759)	1473 (1233; 2168)	0,1	1933,5 (1823,5; 2039)	1372,5 (1252,5; 1601)	0,1
NKT-cells	%	0,48 (0,37; 2,25)	0,71 (0,24; 4,08)	0,4	0,425 (0,29; 0,72)	0,44 (0,215; 1,54)	0,6
(CD16+CD56+ CD3+)	абс. кол-во	23 (16; 183)	41 (7; 91)	1,0	19 (12,5; 37)	14,5 (7; 56,5)	0,6
Tcytotox-cells	%	17,4 (16,14; 18,63)	16,8 (16,47; 20,1)	1,0	18,015 (16,87; 20,975)	18,41 (16,595; 21,29)	0,6
(CD3+CD8+)	абс. кол-во	934 (782; 1219)	773 (467; 871)	0,4	875,5 (766,5; 993)	672 (519; 807,5)	0,6
IRI(Th/Tcyto x)	%	2,99 (2,08; 3,33)	2,49 (2,23; 2,64)	1,0	2,22 (1,855; 2,675)	2,235 (1,99; 2,44)	0,6

Примечание: n-число обследованных детей, p - достоверность различий между группами

Как видно из Таблицы 4.11, статистических различий между обследованными группами у детей с сочетанными проявлениями ПА выявлено не было. На фоне комплексного лечения обнаружена тенденция к нормализации показателей клеточного иммунитета у детей с сочетанными проявлениями ПА по данным количества относительных показателей NK-cells в основной и контрольной группах и относительных показателей NKT-cells в основной группе.

Таким образом, исследование показало, что включение мультиштаммового пробиотика в комплексную терапию ПА с различными ее проявлениями способствовало нормализации количества относительных показателей NKT-cells у детей с кожными и сочетанными проявлениями ПА. У детей с кожными проявлениями ПА отмечалось достоверное снижение количества абсолютных показателей T-total cells, B-total cells, Th-cells, T-cytotox cells, относительных и абсолютных показателей NK-cells как в основной группе, так и в контрольной, без применения мультиштаммового пробиотика.

4.3.3 Оценка эффективности терапии по данным показателей маркеров воспаления

Нашей задачей была оценка эффективности комплексной терапии у детей с ПА с учетом маркеров воспаления в динамике. Для выполнения задачи мы изучали уровень кальпротектина и EDN в копрофильtrate и уровни ECP, эозинофилов, общего IgE в сыворотке крови до и после лечения в основной и в

контрольной группах у всех обследованных детей. Параллельно мы проводили оценку этих параметров в зависимости от клинических вариантов ПА.

Таблица 4.12 - Показатели маркеров воспаления в основной и контрольной группах у детей, Me [LQ; UQ]

Группы, N	Кальпротектин, мкг/г (до лечения)	Кальпротектин, мкг/г (после лечения)
Основная группа (n=122) (1)	16,2 [12,3;29,9]	19,8 [13,7;22,6]
Контрольная группа (n=70) (2)	18,5 [12,3;42,0]	20,9 [16,5;24,4]
P _{1,2}	0,6	0,4
	EDN, нг/г (до лечения)	EDN, нг/г (после лечения)
Основная группа (n=122) (1)	609,4 [300,25;1101,97]	456,36 [151,06;886,96]
Контрольная группа (n=70) (2)	1023,65 [327,96;1739,54]	1025,36 [325,62;1820,36]
P _{1,2}	0,01	<0,001
	ЕСР, нг/мл (до лечения)	ЕСР, нг/мл (после лечения)
Основная группа (n=122) (1)	29,67 [25,43;32,75]	19,12 [14,6;22,54]
Контрольная группа (n=70) (2)	31,23 [30,12;37,78]	29,33 [25,12;33,01]
P _{1,2}	0,7	<0,001

Примечание: n-число обследованных детей, p - достоверность различий между группами

Как видно из Таблицы 4.12, у обследуемых детей отмечались высокие уровни EDN в обеих группах до и после лечения, статистически выше в контрольной группе ($p = 0,01$ и $p < 0,001$). Уровень фекального кальпротектина во всех обследуемых группах был в пределах нормы, что исключало нейтрофильный характер заболевания. Статистически значимых различий между обследованными группами выявлено не было. Уровни ЕСР в сыворотке крови до лечения в основной группе и в контрольной группах были выше референсных значений (29,67 [25,43;32,75] и 31,2 [30,12;37,78] нг/мл, соответственно). Статистически значимой разницы между обследованными группами выявлено не было ($p = 0,7$).

Уровень ЕСР в сыворотке крови после лечения в контрольной группе был повышен 29,33 [25,12;33,01] нг/мл по сравнению с основной группой, в которой

он был в пределах нормы 19,12 [14,6;22,54] нг/мл. Таким образом, уровень ЕСР после лечения был статистически выше в контрольной группе ($p < 0,001$).

Таблица 4.13 - Динамика маркеров воспаления в основной и контрольной группах у детей с ПА до и после лечения, Me [LQ; UQ]

Группы, N	Основная группа (n=122)	Контрольная группа (n=70)
Кальпротектин, мкг/г		
До лечения (1)	16,2 [12,3;29,9]	18,5 [12,3;42,0]
После лечения (2)	19,8 [13,7;22,6]	20,9 [16,5;24,4]
P _{1,2}	0,057	0,5
EDN, нг/г		
До лечения (1)	609,4 [300,25;1101,97]	1023,65 [327,96;1739,54]
После лечения (2)	456,36 [151,06;886,96]	1025,36 [325,62;1820,36]
P _{1,2}	<0,001	0,004
ЕСР, нг/мл		
До лечения (1)	29,67 [25,43;32,75]	31,23 [30,12;37,78]
После лечения (2)	19,12 [14,6;22,54]	29,33 [25,12;33,01]
P _{1,2}	<0,001	0,8
Эозинофилы, %		
До лечения (1)	6,90±1,15	6,35±0,83
После лечения (2)	3,11±1,20	6,12±0,67
P _{1,2}	<0,001	0,5
Общий IgE, МЕ/мл		
До лечения (1)	76,5 [24,8;205,2]	86,2 [38;191,2]
После лечения (2)	44,5 [34,3;105,4]	64,2 [38;102,2]
P _{1,2}	0,04	0,06

Примечание: n-число обследованных детей, p - достоверность различий между группами

Как видно из Таблицы 4.13 лечение мультиштаммовым пробиотиком способствовало достоверному снижению EDN в копрофильtrate и ЕСР в сыворотке крови ($p < 0,001$), по сравнению с данными показателями у детей контрольной группы. Уровень EDN после лечения в контрольной группе был достоверно выше, чем в группе до лечения ($p = 0,004$). При изучении кальпротектина в основной и контрольной группах статистически значимой разницы до и на после лечения не обнаружено ($p = 0,057$ и $p = 0,5$). У детей основной группы наблюдалось статистически значимое снижение эозинофилов в периферической крови и уменьшение концентрации общего IgE в сыворотке крови по сравнению с группой контроля ($p < 0,05$).

В дальнейшем мы изучали взаимосвязь маркеров воспаления и клинических проявлений ПА до и после лечения у детей с ПА. Полученные данные по уровню кальпротектина представлены в Таблице 4.16.

Таблица 4.14 - Показатели кальпротектина в основной и контрольной группах у детей с различными проявлениями ПА до и после лечения, мкг/г, Ме [LQ; UQ]

Исследуемый показатель	Кальпротектин			
	Основная группа (n=122)		Контрольная группа (n=70)	
Группы, N	До лечения	После лечения	До лечения	После лечения
Лечение				
Гастроинтестинальные проявления (1)	16,63 [12,26;26,65]	18,96 [10,74;23,7]	18,41 [10,26;36,02]	15,84 [10,5;38,02]
Кожные проявления (2)	19,31 [12,36;40,99]	16,82 [10,34;25,03]	20,24 [12,26;46,62]	24,26 [12,63;42,36]
Сочетанные проявления (3)	14,56 [10,13;35,68]	19,65 [10,26;30,08]	17,526 [12,528;45,265]	18,654 [10,66;40,265]
P _{1,2,3}	0,7	0,7	0,9	0,9

Примечание: n-число обследованных детей, p - достоверность различий между группами

Установлено, что в основной и контрольной группах до и после лечения уровень кальпротектина оставался в пределах нормы у всех детей с различными проявлениями ПА. Статистической разницы между обследованными группами выявлено не было (Таблица 4.14).

Таблица 4.15 - Показатели EDN в основной и контрольной группах у детей с различными проявлениями ПА до и после лечения, нг/г, Ме [LQ; UQ]

Исследуемый показатель	EDN			
	Основная группа (n=122)		Контрольная группа (n=70)	
Группы, N	До лечения	После лечения	До лечения	После лечения
Лечение				
Гастроинтестинальные проявления (1)	1022,3 [609,4;1256,95]	550,62 [177,7;995,75]	2120,1 [1271,5;2524,62]	2057,36 [1253,63;2469,36]
Кожные проявления (2)	405,1 [197,17;666,9]	322,04 [125,63;552,63]	320,8 [156,83;463,	305,63 [163,4;542,26]

	3]		25]	
Сочетанные проявления (3)	744,02 [250,31;1268,95]	467,96 [183,21;986,36]	1507,61 [1250,69;1754,62]	1560,9 [1200,85;1956,32]
P _{1,2,3}	<0,001	0,06	<0,001	<0,001
P _{1,2}	<0,001		<0,001	<0,001
P _{1,3}	0,1		0,049	0,09
P _{2,3}	0,02		<0,001	<0,001

Примечание: n-число обследованных детей, p - достоверность различий между группами

Как видно из Таблицы 4.15 у всех обследуемых детей уровень EDN был повышен. Исходно, до лечения, в основной и контрольной группах была выявлена статистически значимая разница между группами ($p < 0,001$), где уровень EDN был ниже у детей с кожными проявлениями, в отличие от детей с гастроинтестинальными и сочетанными проявлениями ПА ($p < 0,001$).

После лечения в основной группе статистически значимой разницы между обследованными группами не обнаружено ($p = 0,6$). В контрольной группе после лечения уровень EDN был ниже у детей с кожными проявлениями, в отличие от детей с гастроинтестинальными и сочетанными проявлениями ПА ($p < 0,001$).

Третьим исследуемым маркером воспаления был ECP в сыворотке крови. Таблица 4.16 - Показатели ECP в основной и контрольной группах у детей с различными проявлениями ПА до и после лечения, нг/мл, Me [LQ; UQ]

Исследуемый показатель	ECP			
	Основная группа (n=122)		Контрольная группа (n=70)	
Группы, N				
Лечение	До лечения	После лечения	До лечения	После лечения
Гастроинтестинальные проявления (1)	28,5 [20,0;34,3]	19,1 [11,93;20,1]	26,3 [19,9;40,9]	27,4 [20,6;37,5]
Кожные проявления (2)	29,5 [23,5;40,2]	20,3 [14,0;28,6]	35,3 [29,9;43,1]	29,4 [25,8;39,3]
Сочетанные проявления (3)	29,9 [20,5;43,5]	23,9 [12,7;28,4]	30,4 [21,0;38,0]	27,5 [23,5;40,3]
P _{1,2,3}	0,7	0,7	0,7	0,6

Примечание: n-число обследованных детей, p - достоверность различий между группами

Как видно из Таблицы 4.16, у детей с различными проявлениями ПА после лечения в основной группе уровень ЕСР был в пределах нормы, у всех остальных детей он был повышен, однако статистической разницы между обследованными группами выявлено не было ($p = 0,7$).

В дальнейшем оценивали эффективность комплексной терапии ПА с применением пробиотика в основной группе и без его применения в контрольной группе у детей с различными проявлениями ПА по данным маркеров воспаления: кальпротектина, EDN и ЕСР (Таблица 4.17-4.19) в динамике.

Таблица 4.17 - Показатели кальпротектина в контрольной и основной группах у детей с различными проявлениями ПА до и после лечения, мкг/г, Ме [LQ; UQ]

Основная группа (n=122) Кальпротектин			
Лечение/Клинические проявления	Изолированные гастроинтестинальные (n=28)	Изолированные кожные (n=48)	Смешанные проявления (n=46)
До лечения (1)	16,63 [12,26;26,65]	19,31 [12,36;40,99]	14,56 [10,13;35,68]
После лечения (2)	18,96 [10,74;23,7]	16,82 [10,34;25,03]	19,65 [10,26;30,08]
P _{1,2}	0,06	0,2	0,9
Контрольная группа (n=70) Кальпротектин			
До лечения (1)	18,41 [10,26;36,02]	20,24 [12,26;46,62]	24,26 [12,63;42,36]
После лечения (2)	15,84 [10,5;38,02]	17,526 [12,528;45,265]	18,654 [10,66;40,265]
P _{1,2}	0,8	0,3	1,0

Примечание: n-число обследованных детей, p - достоверность различий между группами

Как видно из Таблицы 4.17, уровень кальпротектина в обследованных группах сохранялся в пределах нормы до и после лечения. Статистической разницы между обследованными группами выявлено не было ($p > 0,05$).

Таблица 4.18 - Показатели EDN в контрольной и основной группах у детей с различными проявлениями ПА до и после лечения, нг/г, Ме [LQ; UQ]

Основная группа (n=122) EDN			
Лечение/Клинические проявления	Изолированные г/э (n=28)	Изолированные кожные (n=48)	Смешанные проявления (n=46)
До лечения (1)	1022,3 [609,4;1256,95]	405,1 [197,17;666,93]	744,02 [250,31;1268,95]

После лечения (2)	550,62 [177,7;995,75]	322,04 [125,63;552,63]	467,96 [183,21;986,36]
P _{1,2}	<0,001	0,051	<0,001
Контрольная группа (n=70) EDN			
До лечения (1)	2120,1 [1271,5;2524,62]	320,8 [156,83;463,25]	1507,61 [1250,69;1754,62]
После лечения (2)	2057,36 [1253,63;2469,36]	305,63 [163,4;542,26]	1560,9 [1200,85;1956,32]
P _{1,2}	0,08	0,7	0,051

Примечание: n-число обследованных детей, p - достоверность различий между группами

Лечение мультиштаммовым пробиотиком способствовало достоверному снижению EDN в копрофильtrate у детей с гастроинтестинальными и сочетанными проявлениями ПА по сравнению с данным показателем у детей контрольной группы ($p < 0,001$). Достоверных различий между обследованными группами у детей с кожными проявлениями ПА выявлено не было, хотя наблюдалась тенденция к его снижению. При этом снижение EDN статистически коррелировало с клиническим улучшением кожных и гастроинтестинальных симптомов у больных основной группы по сравнению с контрольной ($r=+0,55$).

Таблица 4.19 - Показатели ЕСР в контрольной и основной группах у детей с различными проявлениями ПА до и после лечения, нг/мл, Me [LQ; UQ]

Основная группа (n=122) ЕСР			
Симптомы	Гастроинтестинальные (n=28)	Кожные (n=48)	Смешанные проявления (n=46)
После лечения (1)	28,5 [20,0;34,3]	29,5 [23,5;40,2]	29,9 [20,5;43,5]
После лечения (2)	19,1 [11,93;20,1]	20,3 [14,0;28,6]	23,9 [12,7;28,4]
P _{1,2}	0,005	0,03	0,03
Контрольная группа (n=70) ЕСР			
После лечения (1)	26,3 [19,9;40,9]	35,3 [29,9;43,1]	30,4 [21,0;38,0]
После лечения (2)	27,4 [20,6;37,5]	29,4 [25,8;39,3]	27,5 [23,5;40,3]
P _{1,2}	0,6	0,08	0,2

Примечание: n-число обследованных детей, p - достоверность различий между группами

При изучении уровней ЕСР в сыворотке крови было установлено, что лечение мультиштаммовым пробиотиком способствовало достоверному снижению значений ЕСР после лечения у детей основной группы ($p < 0,05$).

Достоверных различий между обследованными группами у детей контрольной группы выявлено не было ($p > 0,05$).

Таким образом, повышенные уровни EDN и ECP указывают на наличие эозинофильного воспаления у детей с ПА. Снижение показателей EDN и ECP на фоне применения мультиштаммового пробиотика свидетельствует о его влиянии на аллергическое воспаление у больных ПА. Нормальные значения кальпротектина свидетельствуют об отсутствии нейтрофильного типа воспаления у обследованных больных. Включение в комплексное лечение детей с ПА мультиштаммового пробиотика для контроля воспаления способствует купированию симптомов со стороны кожи и ЖКТ. Эффективность терапии в основной группе больных была выше по сравнению с группой контроля. Учитывая вышесказанное, специфические и чувствительные биомаркеры воспаления являются важными инструментами в выявлении типа воспаления, выборе адекватного лечения и оценки его эффективности.

4.4 Клинические примеры

Клинический пример 1. (ПА, кожная форма)

Пациентка М., возраст 6 месяцев, поступила в отделение аллергологии ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии» с жалобами, со слов матери, на генерализованные кожные высыпания, выраженный кожный зуд, беспокойный сон.

Анамнез жизни: Наследственность по аллергическим заболеваниям отягощена: у матери аллергический ринит (на цветение деревьев), у бабушки по материнской линии - бронхиальная астма. Ребёнок от 4 беременности (1,3- замершая, 2- м/а), протекавшей с угрозой прерывая в течении всей беременности, получала препарат прогестерона. Роды 1е, самостоятельные, в срок. Вес при рождении 2970г; рост 50 см. Грудное вскармливание в течении первой недели

жизни, затем, в связи с гиполактацией переведен на искусственное вскармливание молочными смесями. Прикорм ввели в 4 месяца (начат с каши). Профилактические прививки: БЦЖ в родильном зале, побочных реакций отмечено не было. Перенесенные заболевания: ОРВИ, фарингит, энтеровирусная инфекция.

Анамнез заболевания: С 3 недель жизни высыпания на коже лица, зуд кожи, мокнутие (питание - Нан комфорт). Получал сорбенты и антигистаминные препараты - без положительного эффекта. В дальнейшем, высыпания распространились на кожу туловища и конечности, мокнутие и зуд сохранялись. В возрасте 2 месяцев проведено аллергообследование: выявлена сенсibilизация к аллергенам плесневых грибов и БКМ. Назначено: смесь Нутрилон пепти аллергия и наружная терапия (1% р-р метиленового синего, стероид-содержащие мази) - с временным незначительным положительным эффектом. В дальнейшем отмечалось тяжелое, непрерывно рецидивирующее течение заболевания с явлениями вторичного инфицирования, в связи с чем девочка неоднократно была госпитализирована в стационар по месту жительства - проводилась инфузионная терапия глюкокортикостероидами (на момент госпитализации было проведено 8 курсов - 6 в/в и 2 курса per os), инфузионная терапия антигистаминными препаратами (4 курса в/в + per os систематически), коррекция питания (использование смесей на основе козьего молока, глубоких гидролизатов БКМ), наружная терапия (1% раствор метиленового синего, различные стероид-содержащие мази), ферментные препараты. Во время проведения терапии глюкокортикостероидами отмечалось улучшение состояния кожных покровов, однако через 2-3 дня после их отмены - ухудшение. Также ухудшение состояния отмечалось при введении прикорма (кукуруза, яблоко). Однократно в виде коррекции рациона ребенок был полностью переведен на безмолочную рисовую кашу ХИПП - без эффекта. На момент госпитализации в наш стационар ребенок получал смесь Фрисопеп, безмолочную рисовую кашу, кабачок.

Объективный статус: Состояние средней степени тяжести по основному заболеванию. Температура 36,6. Положение ребенка активное. Вес 8300 г. Рост 68 см. ИМТ 17,9 кг/м². Z-Score ИМТ/возраст = 0,66, рост/возраст = 0,48, масса/возраст = 0,77, вес/рост = 0,75. Состояние питания достаточное. Кожные покровы гиперемированы, множественные нумулярные эритематозные высыпания с явлениями вторичного инфицирования в виде мокнутия, желтых корочек, множественных расчесов и выраженной сухости кожи. Индекс SCORAD - 38,4 баллов. Слизистые оболочки чистые. Зев спокоен. Подкожно-жировая клетчатка развита достаточно. Лимфатические узлы не увеличены. Тонус мышц физиологический. Движения в суставах в полном объеме. Дыхание через нос не затруднено. В лёгких дыхание пуэрильное, хрипов нет, ЧДД 32 в мин. Тоны сердца ритмичные, ЧСС 122 уд/мин. Живот мягкий, безболезненный при пальпации. Печень по краю реберной дуги. Консистенция эластичная. Селезенка не пальпируется. Стул регулярный, оформленный. Дизурии нет. Менингеальная и очаговая симптоматика на момент осмотра отсутствуют.

Пациенту был выставлен диагноз: «Атопический дерматит, распространенная форма, тяжелое непрерывно-рецидивирующее течение, период обострения. Пищевая аллергия». Рекомендовано: симптоматическая терапия (антигистаминные препараты) и коррекция рациона: замена смеси на глубокий казеиновый гидролизат и попытка расширения рациона за счет мяса (индейка) и каш (гречневая безмолочная).

Данные лабораторных и инструментальных исследований:

- 1). Общий анализ крови: эритроциты — $4,474 \times 10^{12}/л$, гемоглобин — 111,5 г/л, лейкоциты — $10,6 \times 10^9/л$, эозинофилы 2,7%, моноциты — 9,8%, лимфоциты — 51,8%, тромбоциты — $372,8 \times 10^9/л$, СОЭ 4 мм/ч;
- 2). Биохимический анализ крови: показатели в пределах возрастных норм;
- 3). Общий анализ мочи: без воспалительных изменений;
- 4). Иммунологические исследования: общий IgE — 1 МЕ/мл (норма 0—100 МЕ/мл), сывороточные IgA - 0,21 г/л (норма - 0,1-1,31), IgG - 3,19 г/л (норма - 3,0-

10,0 г/л), IgA - 0,56 г/л (норма 0,2-1,0 г/л), sIgA-101 мкг/г (норма 115,9-317,3 мкг/г), ЕСР - 11 нг/мл (норма 0-24 нг/мл), EDN - 250,31 нг/г, кальпротектин - 6,3 мкг/г (норма 0-50 мкг/г), специфические IgE-антитела к грече, казеину, индейке, кролику - 0 класс аллергии, к а-лактальбумину, в-лактглобулину, рису - 2й класс аллергии.

5). ДНК вирусов ЦМВ, ВЭБ, ВПГ 1,2 и 6 типов в моче не обнаружены;

6). Кал на дисбактериоз: Увеличено количество: E. coli Lac (+), Enterococcus spp. Снижено количество: Lactobacillus spp;

7). УЗИ органов брюшной полости, почек и мочевого пузыря: УЗИ-признаки вторичных изменений поджелудочной железы;

8). Исследование клеточного иммунитета

	%/абс, до лечения
T-total cells (CD3+CD19-)	67,29 / 3035
норма	61,0-85,0 / 946-2808
B-total cells (CD3-CD19+)	28,31 / 1277
норма	7,0-17,0 / 111-376
NK-cells (CD3-CD56+CD16+)	3,58 / 161
норма	8,0-17,0 / 123-369
Th-cells (CD3+CD4+)	38,09 / 1718
норма	35,0-55,0 / 68-702
NKT-cells (CD16+CD56+CD3+)	0,48 / 22
норма	0,5-6,0 / 7-165
Tcytotox-cells (CD3+CD8+)	23,32 / 1052
норма	19,0-35,0 / 576-1336
IRI (Th/Tcytotox)	1,63
Норма	1,5-92,6

Лечение в отделении: антигистаминные препараты, наружная терапия (1% р-р метиленового синего, эмоленты, стероид-содержащие мази), замена смеси Фрисопеп на Фрисопеп АС, в рацион введена безмолочная гречневая каша, начато

введение мяса индейки. На фоне проведенной терапии отмечается положительная динамика в виде купирования обострения АД, уменьшения зуда и сухости кожных покровов.

На повторном осмотре через 30 дней отмечена положительная динамика - обострения кожного процесса не отмечено, индекс SCORAD составил 8 баллов (Фото 1,2). Рекомендован курс мультиштаммового пробиотика на 30 дней, после чего была вновь произведена оценка мукозального и клеточного иммунитета.

Иммунологические исследования (после лечения): sIgA-142,0 мкг/г (норма 115,9-317,3 мкг/г), ECP - 16 нг/мл (норма 0-24 нг/мл), EDN - 467,9 нг/г (норма - нг/г), кальпротектин - 11,3 мкг/г (норма 0-50 мкг/г)

Исследование клеточного иммунитета (после лечения)

	%/абс, после лечения
T-total cells (CD3+CD19-)	68,25 / 2556
норма	61,0-85,0 / 946-2808
B-total cells (CD3-CD19+)	23,72 / 888
норма	7,0-17,0 / 111-376
NK-cells (CD3-CD56+CD16+)	8,23 / 308
норма	8,0-17,0 / 123-369
Th-cells (CD3+CD4+)	39,34 / 1473
норма	35,0-55,0 / 68-702
NKT-cells (CD16+CD56+CD3+)	2,44 / 91
норма	0,5-6,0 / 7-165
Tcytotox-cells (CD3+CD8+)	22,48 / 848
норма	19,0-35,0 / 576-1336
IRI (Th/Tcytotox)	1,75
Норма	1,5-92,6

Кал на дисбактериоз (после лечения): Увеличено количество: E. coli Lac (+)

Таким образом, включение в комплексное лечение ребенку с кожными проявлениями ПА мультиштаммового пробиотика обеспечило повышение

эффективности общепринятой терапии, о чем свидетельствует улучшение показателей клеточного и мукозального иммунитета, а также микробиоценоза кишечника. Родителями отмечена хорошая переносимость данного пробиотика, побочных реакций зафиксировано не было.



Фото 1 - До лечения



Фото 2 - После лечения

Клинический пример 2. (ПА, сочетанная форма)

Пациент Д., возраст 2 года, поступил в отделение с жалобами, со слов матери, на высыпания на коже, сопровождающиеся зудом, колики в животе, метеоризм, неоформленный разжиженный стул с примесями крови и слизи.

Из анамнеза: Наследственность по аллергическим заболеваниям не отягощена. Ребёнок от 1 беременности, протекавшей физиологически, 1 срочных, самостоятельных родов. Грудное вскармливание проводилось до 1 года 6 мес. С рождения у ребенка отмечались колики, метеоризм, эпизодически - разжиженный стул, что изначально расценивали как лактазную недостаточность. При попытке введения в питание лактазы беби (в возрасте 2-3 мес) у ребенка появился пенистый, учащенный стул. В дальнейшем к терапии был добавлен бактериофаг, что сопровождало ухудшение проявлений со стороны ЖКТ. В 1 год 3 мес впервые

появились эритематозные высыпания на коже локтевых и коленных сгибов, щеках, что было расценено как АД. Течение имело рецидивирующий характер, максимальная ремиссия была 2 месяца (в весенний период). Эффекта элиминации не отмечалось. Терапия - антигистаминные препараты, энтеросорбенты, наружно - стероид-содержащие средства - с временным эффектом. Четкой связи с приемом тех или иных продуктов, за исключением реакции на введение манной каши, мать не отмечала. В 1 год 11 мес появились жалобы на неоформленный стул с примесью слизи и крови. По кожным скарификационным пробам (молоко, пшеничная мука, белок куриного яйца) - отрицательный результат. Жалобы на колики в животе, проблемы со стулом, высыпания на коже с нарастающим по интенсивности зудом сохранялись, в связи с чем мать самостоятельно отменила молочные продукты и отметила улучшение как со стороны кожи, так и со стороны ЖКТ, хотя полного регресса симптомов достигнуто не было. На момент первичного осмотра в отделении аллергологии ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии» длительность безмолочной диеты была 3 недели.

Объективный статус: Состояние ребенка средней степени тяжести. Вес - 12,5кг, рост - 88,5см; z-score ИМТ к возрасту = 0,16; z-score рост к возрасту = 0,15; z-score массы тела к возрасту = 0,21; z-score массы тела к росту = 0,14. Кожные покровы бледные, эритематозные высыпания на верхних и нижних конечностях, в сгибах, гиперемия лица, шеи, перианальной области; множественные расчесы, сухость всего кожного покрова. Индекс SCORAD - 45 баллов. Слизистые - чистые. Подкожно-жировая клетчатка развита достаточно. Лимфатические узлы - не увеличены. По органам и системам - без особенностей. Живот - мягкий, умеренно вздут, безболезненный, урчание по ходу кишечника в левой подвздошной области. Стул - неоформленный, с неперевавленными комочками, иногда с примесью большого количества слизи.

Данные лабораторных исследований:

- 1). Общий анализ крови: эритроциты — $4,279 \times 10^{12}/\text{л}$, гемоглобин — 120 г/л , лейкоциты — $7,82 \times 10^9/\text{л}$, эозинофилы 3,3%, моноциты — 7,2%, лимфоциты — 61,5%, тромбоциты — $254,2 \times 10^9/\text{л}$, СОЭ 5 мм/ч;
- 2). Биохимический анализ крови: показатели в пределах возрастных норм;
- 3). Общий анализ мочи: без изменений;
- 4). Копрология - нейтральный жир, слизь и йодофильная флора - в небольшом количестве;
- 5). Панкреатическая эластаза в кале - в пределах нормы;
- 6). Аутоантитела к трансклутаминазе и эндомицию (IgA, IgG) - не обнаружены;
- 7). Иммунологические исследования: общий IgE — 102 МЕ/мл (норма 0—60 МЕ/мл), сывороточные IgA - 0,28 г/л (норма - 0,19-2,2), IgG - 7,03 г/л (норма - 5,0-13,0 г/л), IgA - 0,6 г/л (норма 0,2-2,0 г/л), sIgA - 51,0 мкг/г (норма 115,9-317,3 мкг/г), ЕСР - 26,4 нг/мл (норма 0-24 нг/мл), EDN- 127,4 нг/г, кальпротектин - 10,1 мкг/г (норма 0-50 мкг/г), аллергенспецифические IgE антитела к пищевым аллергенам - выявлены: средняя степень сенсibilизации к пшенице (1,54 кUA/I), умеренно высокий уровень сенсibilизации к БКМ (3,92 кUA/I), к клейковине (5,17 кUA/I), отсутствие сенсibilизации к яйцу;
- 8). Кал на дисбактериоз: Снижено количество - *Enterococcus spp*, *Bifidumbacterium spp*, *Lactobacillus spp*.
- 9). УЗИ органов брюшной полости, почек и мочевого пузыря: УЗИ-признаки вторичных изменений поджелудочной железы;
- 10). Исследование клеточного иммунитета:

	%/абс
T-total cells (CD3+CD19-)	71,6 / 2971
норма	61,0-85,0 / 946-2808
B-total cells (CD3-CD19+)	18,05 / 749
норма	7,0-17,0 / 111-376
NK-cells (CD3-CD56+CD16+)	9,8 / 407

норма	8,0-17,0 / 123-369
Th-cells (CD3+CD4+)	49,67 / 2061
норма	35,0-55,0 / 68-702
NKT-cells (CD16+CD56+CD3+)	0,04 / 2
норма	0,5-6,0 / 7-165
Tcytotox-cells (CD3+CD8+)	18,95 / 786
норма	19,0-35,0 / 576-1336
IRI (Th/Tcytotox)	2,62
Норма	1,5-92,6

Тактика лечения: Пациенту предложено продолжить безмолочную диету, а также назначена диагностическая элиминационная диета с исключением глютенсодержащих продуктов сроком на 3-4 недели; проведена коррекция наружной терапии.

На втором визите ввиду улучшения состояния кожных покровов (индекс SCORAD-27 баллов) и уменьшения проявлений со стороны ЖКТ (уменьшение болевого синдрома, метеоризма, появление более оформленного стула, урежение частоты патологических примесей в стуле) пациенту продолжена безмолочная и безглютеновая диета сроком на 3-6 месяцев; проведена коррекция наружной терапии; отменен антигистаминный препарат; в терапию включен мультиштаммовый пробиотик курсом на 30 дней.

Иммунологические исследования (после лечения): sIgA - 91,9 мкг/г (норма 115,9-317,3 мкг/г), ECP - 5,21 нг/мл (норма 0-24 нг/мл), EDN - 37,85 нг/г, кальпротектин - 7,1 мкг/г (норма 0-50 мкг/г)

Исследование клеточного иммунитета (после лечения):

	%/абс
T-total cells (CD3+CD19-)	73,12 / 1442
норма	61,0-85,0 / 946-2808
B-total cells (CD3-CD19+)	17,23 / 335

норма	7,0-17,0 / 111-376
NK-cells (CD3-CD56+CD16+)	9,67 / 188
норма	8,0-17,0 / 123-369
Th-cells (CD3+CD4+)	43,74 / 851
норма	35,0-55,0 / 68-702
NKT-cells (CD16+CD56+CD3+)	3,31 / 64
норма	0,5-6,0 / 7-165
Tcytotox-cells (CD3+CD8+)	23,42 / 455
норма	19,0-35,0 / 576-1336
IRI (Th/Tcytotox)	1,87
Норма	1,5-92,6

Кал на дисбактериоз (после лечения): Увеличение количества *E. coli* Lac (+)

Таким образом, включение в терапию мультиштамового пробиотика способствовало более быстрому достижению ремиссии АтД у ребенка, при этом уже на 7 день приема препарата была отменена терапия наружными стероидами. На 3 неделе терапии купировались симптомы со стороны ЖКТ (стул стал оформленным, без патологических примесей, боли и явления метеоризма не беспокоили). На третьем визите ввиду значимого улучшения состояния пациенту продлили безглютеновую диету до 6 мес и рекомендовано постепенное введение в рацион молочного белка. Таким образом, через 3 месяца безмолочной диеты в рацион постепенно был возвращен молочный белок с хорошей переносимостью. Данные катамнеза свидетельствовали о формировании длительной ремиссии АтД (более 6 месяцев) и гастроинтестинальных проявлений, что сохранялось на фоне расширения диеты (сначала за счет молочных продуктов, а затем и глютенсодержащих). Отмечено улучшение показателей клеточного и мукозального иммунитета, микробиоценоза кишечника, что коррелировало с клиническим улучшением состояния пациента.

Клинический пример №3 (ПА, гастроинтестинальная форма).

Пациент В. 2 года 11 мес. поступил в отделение аллергологии ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии» с жалобами на метеоризм, непереваренный учащенный разжиженный стул с примесью слизи, колики в животе, боли во время акта дефекации, отсутствие прибавки в весе и росте.

Из анамнеза: Наследственность по аллергическим заболеваниям не отягощена. Ребёнок от 1 беременности, протекавшей физиологически, 1 срочных родов путем кесарева сечения. Грудное вскармливание проводилось до 1 месяца, с 1 до 4 мес - смешанное вскармливание (молочная смесь «Фрисовом»), с 4-х мес - искусственное вскармливание (молочная смесь «Фрисовом»). Прикорм вводили с 4,5 мес. С рождения у ребенка отмечались колики, разжиженный стул с зеленью, метеоризм, что врачи расценивали как функциональные нарушения и назначали смесь «Фрисовом», однако симптомы сохранялись с разной степенью интенсивности. При введении прикормов клинического ухудшения не отмечали, по мере уменьшения объема молочной смеси (за счет введения прикормов) гастроинтестинальные проявления уменьшались. С года до 2-х лет отмечалось улучшение состояния, однако жалобы со стороны ЖКТ сохранялись, в связи с чем по рекомендации гастроэнтеролога в рационе ограничивался молочный белок (получал кисломолочные продукты). В 2 года перенес ротавирусную инфекцию, на фоне которой гастроинтестинальные симптомы усилились - возобновился болевой синдром, метеоризм и учащенный разжиженный стул со слизью, появилась стеаторея и отставание в весе и росте. Гастроэнтерологом по месту жительства назначена строгая безмолочная диета, которую ребенок соблюдал в течение 11 месяцев - без эффекта. По месту жительства проводилось многократное обследование на дисбиоз. Терапия - энтеросорбенты, ферменты, бактериофаги - без положительного эффекта.

Объективный статус: Вес - 11,5кг. Рост - 91см. z-score ИМТ к возрасту = -1,07; z-score роста к возрасту = -1.12; z-score массы тела к возрасту = -1,40; z-score массы тела к росту = -1,15 - дефицит массы тела легкой степени тяжести. Состояние тяжелое. Кожные покровы бледные, сухие, чистые от сыпи, снижен

тургор. Слизистые - чистые. Подкожно-жировая клетчатка - снижена. Лимфатические узлы - не увеличены. По органам без особенностей. Язык густо обложен беловатым налетом. Живот вздут, болезненный при пальпации в эпигастральной области, левой подвздошной области, урчание по ходу кишечника. Стул - разжиженный, учащенный до 3-4-х раз в сутки с большим количеством слизи.

Данные лабораторных исследований:

- 1). Общий анализ крови: эритроциты — $4,372 \times 10^{12}/л$, гемоглобин — 109 г/л, лейкоциты — $7,72 \times 10^9/л$, эозинофилы 3,5%, моноциты — 7,8%, лимфоциты — 59,5%, тромбоциты — $274,2 \times 10^9/л$, СОЭ 7 мм/ч;
- 2). Биохимический анализ крови: умеренное снижение общего белка и снижение альбумина;
- 3). Общий анализ мочи: без воспалительных изменений;
- 4). Копрология - переваренные мышечные волокна, неперевариваемая растительная клетчатка, соли жирных кислот - в небольшом количестве, нейтральный жир, слизь, йодофильная флора и дрожжеподобные грибы - в большом количестве;
- 5). Кровь на антитела к гельминтам и простейшим - отрицательные;
- 6). Панкреатическая эластаза в кале - в пределах нормы;
- 7). Аутоантитела к трансклутаминазе и эндомицию (IgA, IgG) - не обнаружены;
- 8). Иммунологические исследования: общий IgE - 45 МЕ/мл (норма 0—60 МЕ/мл), сывороточные IgA - 0,38 г/л (норма - 0,19-2,2), IgG - 7,73 г/л (норма - 5,0-13,0 г/л), IgA - 0,72 г/л (норма 0,2-2,0 г/л), sIgA - 60,2 мкг/г (норма 115,9-317,3 мкг/г), ЕСР - 10,08 нг/мл (норма 0-24 нг/мл), EDN - 257,4 нг/г, кальпротектин - 12,3 мкг/г (норма 0-50 мкг/г), аллергенспецифические IgE антитела к пищевым аллергенам - выявлены: средний уровень сенсibilизации к клейковине (3,4 кUА/л), отсутствие сенсibilизации к яйцу, БКМ;
- 9). Кал на дисбактериоз: Снижено количество *Enterococcus spp*, *Bifidumbacterium spp*, *Lactobacillus spp*, обнаружены *Staphylococcus aureus*, дрожжеподобные грибы;

10). УЗИ органов брюшной полости, почек и мочевого пузыря: УЗИ- признаки дисфункции желчевыводящих путей, вторичных изменений поджелудочной железы;

11). Исследование показателей клеточного иммунитета:

	%/абс
T-total cells (CD3+CD19-)	63,24/6470
норма	61,0-85,0 / 946-2808
B-total cells (CD3-CD19+)	26,11/2671
норма	7,0-17,0 / 111-376
NK-cells (CD3-CD56+CD16+)	9,29/951
норма	8,0-17,0 / 123-369
Th-cells (CD3+CD4+)	42,33/4331
норма	35,0-55,0 / 68-702
NKT-cells (CD16+CD56+CD3+)	0,21/22
норма	0,5-6,0 / 7-165
Tcytotox-cells (CD3+CD8+)	18,02/1843
норма	19,0-35,0 / 576-1336
IRI (Th/Tcytotox)	2,3
Норма	1,5-92,6

Лечение в стационаре: Пациенту назначена диагностическая элиминационная диета с исключением глютенодержащих продуктов на 3-4 недели и отменена безмолочная диета.

На втором визите ввиду улучшения состояния (купирование болевого синдрома, уменьшения метеоризма, урежение частоты стула и появление более оформленного стула с меньшим содержанием слизи) пациенту продолжена безглютеновая диета до 3-6 месяцев и назначен мультиштаммовый пробиотик курсом на 30 дней.

Иммунологические исследования (после лечения): sIgA - 126,3 мкг/г (норма 115,9-317,3 мкг/г), ECP - 5,21 нг/мл (норма 0-24 нг/мл), EDN - 125,65 нг/г, кальпротектин - 14,1 мкг/г (норма 0-50 мкг/г)

Исследование клеточного иммунитета (после лечения):

	%/абс
T-total cells (CD3+CD19-)	54,77/5546
норма	61,0-85,0 / 946-2808
B-total cells (CD3-CD19+)	29,9/3028
норма	7,0-17,0 / 111-376
NK-cells (CD3-CD56+CD16+)	14,18/1436
норма	8,0-17,0 / 123-369
Th-cells (CD3+CD4+)	36,5/3696
норма	35,0-55,0 / 68-702
NKT-cells (CD16+CD56+CD3+)	0,02/2
норма	0,5-6,0 / 7-165
Tcytotox-cells (CD3+CD8+)	15,63/1583
норма	19,0-35,0 / 576-1336
IRI (Th/Tcytotox)	2,3
Норма	1,5-92,6

Кал на дисбактериоз (после лечения): патологии не выявлено.

Результаты лечения - Включение в терапию мультиштамового пробиотика способствовало более быстрому купированию всех гастроинтестинальных симптомов и улучшению показателей клеточного и мукозального иммунитета. Так уже на 10 день применения пробиотика отмечалось отсутствие колик и метеоризма; на 3-ей неделе терапии нормализовался стул, исчезли патологические примеси (фото 3). После окончания курсового лечения впервые была отмечена прибавка в весе (+450 г). По данным катамнеза у пациента наблюдалась длительная устойчивая ремиссия всех гастроинтестинальных проявлений ПА с нормализацией показателей крови (гемоглобин, общий белок, альбумин),

копрограммы, а также быстрой прибавкой массы тела (2 кг за 6 мес) и в росте (2 см за 6 мес). Так, антропометрия показала, что масса тела составила - 14 кг, рост - 93 см.; z-score ИМТ = 0.74; z-score роста к возрасту = -0,58; z-score массы тела к возрасту = 0,17; z-score массы тела к росту = 0,64, что свидетельствовало в пользу нормализации массо-ростовых показателей.



Фото 3 - Характер стула до лечения/ после лечения

Глава 5. Обсуждение собственных результатов

Среди аллергических заболеваний одно из ведущих мест занимает ПА. В большинстве случаев она возникает у детей раннего возраста, характеризуется полиморфизмом клинических проявлений и сложными иммунологическими механизмами. Высокую распространенность ПА в детском возрасте связывают с функциональной незрелостью органов пищеварения, особенностями мукозального, гуморального и клеточного иммунитета. ПА является сложным гетерогенным заболеванием, где немаловажную роль играет наследственная предрасположенность, реализующаяся под действием факторов внешней среды и прежде всего иммунных белков пищи. Сложность патогенеза ПА, ее полиэтиологичность, полиморфизм клинических проявлений, увеличение тяжелых, резистентных к терапии форм заболевания, требует нового подхода к решению этой чрезвычайно важной проблемы. В течение последних десятилетий активно ведутся исследования, основанные на поиске специфических маркеров воспаления, позволяющими прогнозировать течение болезни и риски повторных обострений. В этой связи особый интерес вызывают биомаркеры иммунного воспаления, к которым относятся цитокины Th2 клеток, в том числе катионные белки эозинофилов - ECP и EDN. Среди биомаркеров в дифференциальной диагностике характера воспаления рассматривают кальпротектин. Роль катионных белков эозинофилов и кальпротектина в механизмах развития ПА у детей остается практически не изученной. Проблема подбора эффективной персонифицированной терапии для больных ПА, основанная на выявлении биомаркеров воспаления, до настоящего времени практически не изучена. В этой связи поиск специфических биомаркеров воспаления позволит разработать патогенетическую стратегию терапии различных проявлений ПА и тем самым существенно увеличить клиническую и экономическую эффективность проводимого лечения.

Вместе с тем, несмотря на существенный прогресс в изучении IgE-опосредованных реакций при ПА, другие механизмы (не-IgE- и клеточно-опосредованные) до конца не ясны. Большинство российских и зарубежных исследований по изучению иммунного ответа при ПА посвящены гуморальному иммунитету, лишь единичные работы - клеточному и мукозальному иммунитету [Chahine B., 2010, Chinthrajah R., 2016, Martino D., 2018]. Изучение различных звеньев иммунного ответа и биомаркеров воспаления при ПА с применением современных иммунологических методов является чрезвычайно актуальной задачей современной медицины.

На формирование системного иммунитета могут оказывать влияние нарушения в микробиоме кишечника. Изменения состава микробиома кишечника диктуют необходимость поиска путей его восстановления. До недавнего времени широко использовались пробиотики, содержащие один штамм микроорганизмов. Применение же пробиотиков нового поколения, имеющих в своем составе различные штаммы микроорганизмов, требует дальнейших исследований. Отсутствуют данные о влиянии пробиотиков нового поколения на биомаркеры воспаления при ПА. Проведение многофакторного анализа роли клинических и иммунологических триггеров в развитии ПА позволит обосновать разработку новых терапевтических подходов.

В связи с этим целью настоящего исследования явилось изучение биомаркеров клеточного и мукозального иммунитета у детей с ПА для разработки комплексной терапии и оценки ее эффективности.

Для осуществления поставленной цели нами были изучены клинические проявления и различные возрастные периоды, проведены исследования гуморального иммунитета (иммуноглобулины А, G, М, Е), мукозального иммунитета (sIgA), клеточного иммунитета (субпопуляционный состав основных популяций лимфоцитов: Т-лимфоцитов (CD3+CD19-), В-лимфоцитов (CD3-CD19+), NK-клеток (CD3-CD56+CD16+), NKT-клеток (CD16+CD56+CD3+), цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3+CD8+), Т-хелперов (CD3+CD4+)) и

маркеров воспаления (кальпротектин и EDN в копрофильtrate, ECP в сыворотке крови) у детей с различными проявлениями ПА. Одной из задач исследования была оценка эффективности мультиштаммового пробиотика в рамках комплексной терапии и его влияние на биомаркеры воспаления у детей с различными проявлениями ПА.

Для выполнения поставленных задач было обследовано 192 ребенка в возрасте от 3 месяцев до 3х лет с подтвержденным диагнозом ПА. Подтверждением ПА служили: отягощенный аллергологический анамнез, связь между приемом определенных пищевых продуктов и клиническими проявлениями (как кожными, так и гастроинтестинальными), а также положительные результаты элиминационных диет. Среди обследуемых пациентов - 110 мальчиков (57,3%) и 82 девочек (42,7%). Согласно возрасту все обследованные дети были разделены на 2 группы: I группа (грудной возраст) - в возрасте от 3 месяцев до 1 года; II группа (ранний возраст) - в возрасте от 1 года до 3х лет. Среди детей в возрасте до года преобладали мальчики 68,5% (n=37), среди детей II группы количество мальчиков и девочек было практически одинаковым (47,8% и 52,2%, соответственно).

В зависимости от клинических проявлений дети были распределены в 3 группы: гастроинтестинальные - 22,9% (n=44) ребенка, кожные - 41,6% (n=80) и сочетанные (гастроинтестинальные и кожные) - 35,5% (n=68). Каждая группа была распределена по степени тяжести клинических проявлений: среди детей с гастроинтестинальными проявлениями 45,5% (n=20) - легкие проявления ПА, 54,5% (n=24) - среднетяжелые проявления ПА; среди детей с кожными проявлениями 17,5% (n=14) - легкие проявления ПА, 67,5% (n=54) - среднетяжелые проявления ПА, 15% (n=12) - тяжелые проявления ПА; среди детей с сочетанными проявлениями: 10,3% (n=7) - легкие проявления ПА, 69,1% (n=47) - среднетяжелые проявления ПА, 20,6% (n=14) - тяжелые проявления ПА.

Анализ собранного аллергологического анамнеза позволил установить, что наследственная предрасположенность у 83,3% (n=160) детей была отягощена по

различным аллергическим патологиям. Среди детей с кожными проявлениями у 92,5% (n=74) детей, с гастроинтестинальными - у 77,3% (n=34), с сочетанными проявлениями ПА - у 76,5% (n=52) пациентов родители страдали различными аллергическими заболеваниями, особенно по материнской линии ($p < 0,05$), чем по отцовской. Причем частота встречаемости наследственной предрасположенности возрастала с тяжестью течения ПА: при легкой степени она встречалась у 51,2% (n=21) детей, при среднетяжелой у 92% (n=115) и у 100% (n=26) детей с тяжелой формой ПА. Среди аллергических заболеваний чаще родители больных детей страдали аллергическим ринитом (72,9%) и АтД (68,7%), тогда как БА встречалась в 2 раза реже (41,6%) и еще реже ПА (13%).

При изучении антенатальный факторов риска развития аллергии было установлено, что у каждой второй матери (53,1%, n=102) отмечалась угроза прерывания беременности, у 42,7% (n=82) токсикоз в ранние сроки беременности, анемия наблюдалась у 16,7%, n=32. 23,4% (n=45) матерей были носителем внутриутробной инфекции, 25% (n=48) получали антибактериальную терапию во время беременности. У матерей, чьи дети страдали кожными проявлениями ПА, достоверно чаще наблюдалась угроза прерывания беременности и применение антибактериальных препаратов во время беременности ($p < 0,05$); у матерей, чьи дети страдали сочетанными проявлениями ПА достоверно чаще наблюдалась анемия ($p < 0,05$), в отличие от матерей, у которых дети страдали кожными и гастроинтестинальными проявлениями ПА.

При анализе характера вскармливания установлено, что треть обследованных пациентов - 35,4% (n=68) получали грудное молоко до 3 месяцев, при этом 67,2% (n=129) детям рано вводили в рацион различные адаптированные смеси.

При изучении сроков начала заболевания было установлено, что в 72,4% (n=139) случаев ПА проявлялась в первое полугодие жизни, у 27,6% (n=53) - в более старшем возрасте. Установлено, что у детей с гастроинтестинальными

проявлениями ПА дебют заболевания достоверно чаще отмечался во второе полугодие ($p < 0,05$), чем у детей с кожными и сочетанными проявлениями ПА.

Причем, среднетяжелые и тяжелые проявления различных форм ПА почти в равной доле встречались именно в первое полугодие жизни: кожные - у 50% ($n=40$), гастроинтестинальные у 49% ($n=18$) и сочетанные у 51,5% ($n=35$). Наиболее тяжелое течение ПА также отмечалось в первое полугодие - у 13,8% ($n=11$) и 7,4% ($n=5$) детей с кожными и сочетанными проявлениями ПА, соответственно. После 6 месяцев жизни отмечалось легкое течение ПА - у 1,5% ($n=1$) детей с сочетанными проявлениями, у 3,7% ($n=3$) и 4,5% ($n=2$) детей с кожными и гастроинтестинальными проявлениями ПА, соответственно.

Гастроинтестинальные проявления ПА (диарея, колики в животе, запоры, стул с неперевавленными кусочками пищи, примесью слизи, прожилками крови) наблюдались у 52,7% ($n=59$) детей; колики в животе - у 34% ($n=38$); метеоризм/вздутие живота - у 37,5% ($n=42$); сниженный аппетит и срыгивания - реже (8,9% ($n=10$) и 6,2% ($n=7$), соответственно). Таким образом, у большинства детей наблюдались жалобы на неустойчивый характер стула, и в равной степени - метеоризм/вздутие живот и колики в животе.

Кожные проявления ПА у детей раннего возраста проявлялись сухостью кожи, полиморфными высыпаниями, локальной эритемой на коже лица, разгибательной поверхности верхних и нижних конечностей, перианальной области и кожным зудом, эксфолиациями. Наиболее характерные симптомы АД (кожные высыпания и зуд) отмечались в 100% и 75,7% случаев, соответственно.

Сочетание гастроинтестинальных и кожных проявлений ПА на первом году жизни выявлено у трети обследованных пациентов ($n=68$, 35,4%).

Причиной возникновения ПА у 41,4% ($n=79$) обследованных детей являлось введение в рацион БКМ. Следующей по частоте причиной запуска ПА было введение в рацион ребенка продуктов прикорма (24,5%, $n=47$). Среди других факторов дебюта преобладали: использование матерями различных лекарственных препаратов (16,7%, $n=32$), нарушение диеты кормящей матери

(употребление различных высокоаллергенных продуктов) (18,2%, n=35), в 13,5% случаях причина возникновения ПА была не ясна. Установлено, что у детей с сочетанной формой достоверно реже начало развития ПА связывали с введением адаптированных молочных смесей, в отличие от детей с кожными и гастроинтестинальными проявлениями ПА, но значительно чаще - куриного яйца, мяса курицы.

У 70,8 % (n=136) детей была выявлена сопутствующая патология ЖКТ: функциональные нарушения желчевыводящих путей были обнаружены у 43,8% (n=84) детей, поражения верхних отделов ЖКТ у 18,8% (n=36) пациентов, у 8,3% (n=16) обследованных детей выявлялись поражения нижних отделов. У 60% (n=48) детей с кожными проявлениями ПА достоверно чаще диагностировались функциональные нарушения желчевыводящих путей, чем у детей с гастроинтестинальными и сочетанными формами ПА ($p < 0,05$). У 11,4% (n=5) детей достоверно реже наблюдались поражения верхних отделов ЖКТ, в отличие от других проявлений ПА.

Оценка содержания общего IgE в сыворотке крови показала, у более чем половины детей 55,2% (n=106) он был повышен; самое высокое его значение отмечалось у 75% (n=60) пациентов с кожными проявлениями ПА; у 52% (n=36) пациентов с сочетанными проявлениями ПА отмечался на границе нормы.

При определении аллергенспецифических IgE - антител у обследуемых детей выявлено, что у 32,3% (n=62) пациентов отмечалась моновалентная сенсibilизация, у 29,2% (n=56) - поливалентная сенсibilизация, у 17,7% (n=34) - сенсibilизация к двум пищевым аллергенам, у 20,8% (n=40) обследуемых детей сенсibilизации к определяемым пищевым аллергенам не обнаружено. Установлено, что 54,5% (n=24) детей с гастроинтестинальными проявлениями ПА не имели сенсibilизацию к пищевым аллергенам, реже, у 13,6% (n=6) обнаружена моновалентная сенсibilизация, в отличие от кожных и сочетанных форм ПА. У 25% (n=20) пациентов с кожными проявлениями ПА достоверно чаще отмечалась сенсibilизация к двум и более аллергенам ($p < 0,05$). Среди них

преобладала сенсibilизация к БКМ - 63,5% (n=122), к глютену у 38,5% (n=74), к куриному яйцу у 21,4% (n=41). Наиболее часто аллергия к БКМ выявлена у детей с кожными проявлениями ПА ($p < 0,05$), к глютену/клейковине - с гастроинтестинальными проявлениями ПА ($p < 0,05$).

При сравнительном анализе уровней сывороточных IgA, G, M у детей с различными клиническими проявлениями ПА достоверных различий не выявлено ($p > 0,05$).

Одним из иммуноглобулинов, играющим важную роль в мукозальном иммунитете ЖКТ является sIgA, который обеспечивает первую линию защиты слизистой оболочки от чужеродных антигенов/аллергенов.

С низкой продукцией sIgA связывают снижение барьерной функции слизистых оболочек ЖКТ, что повышает риск развития ПА (Лусс Л.В., 2011, Verin MC, Mayer L., 2013). При анализе мукозального иммунитета ЖКТ у детей с различными проявлениями ПА установлено, что уровень sIgA был достоверно ниже у детей как с кожными проявлениями, так и с гастроинтестинальными и сочетанными проявлениями ПА ($p < 0,05$).

При исследовании субпопуляций лимфоцитов у детей, страдающих ПА, выявлен абсолютный и относительный В-лимфоцитоз, абсолютный Т-лимфоцитоз за счет повышенного количества относительных показателей CD3+/CD4+ Т-хелперов. У 58,2% детей, страдающих ПА, отмечалось снижение количества относительных показателей NK-клеток (CD3-CD56+CD16+), у 63,3% - NKT-лимфоцитов (CD16+CD56+CD3+), которые обладают способностью секретировать цитокины, стимулирующие эффекторы Th2-ответа, а также низкое количество относительных показателей Т-цитотоксических клеток (CD3+CD8+). IRI при этом был повышен у 43,7% обследованных детей. У 73,9% (n=17) детей до года чаще отмечалось нормальное количество Т-хелперов (CD3+CD4+). Выявлен высокий уровень Т-клеток, что может указывать на уже достаточно сформированный ответ клеточного иммунитета. В зависимости от клинической формы ПА в обследованных группах достоверных различий в субпопуляционном

составе лимфоцитов не было. Однако, было выявлено, что у всех детей с различными проявлениями ПА отмечено повышенное количество абсолютных показателей Т-хелперов (CD3+CD4+). У детей с гастроинтестинальными проявлениями ПА в 100% случаях, у детей с кожными проявлениями - 93,3% (n=28), с сочетанными проявлениями ПА в 100% случаях. Нормальное содержание абсолютных показателей цитотоксических лимфоцитов (CD3+CD8+) отмечалось у детей с гастроинтестинальными (81,8%) и смешанными (100%) проявлениями ПА, в отличие от детей с кожными проявлениями, где только у 56,7% детей данные показатели были в норме. Сниженное количество относительных показателей НКТ клеток (CD16+CD56+CD3+) у детей может быть обусловлено их миграцией в «шоковый» орган (кожа, ЖКТ), поскольку эти клетки первыми реагируют на попадание в организм чужеродных белков. Дисбаланс в субпопуляциях Т-лимфоцитов был обусловлен повышением иммунорегуляторного индекса (Th/Tcytotox) у детей с кожными (40,0%) и смешанными (57,1%) проявлениями ПА, что было достоверно чаще ($p < 0,05$), чем у детей с гастроинтестинальными проявлениями (18,2%). Отмечено, что IRI был повышен у детей грудного возраста (69,6%), в отличие от детей раннего возраста (25%). При исследовании естественных киллеров выявлено снижение количества относительных показателей у детей с кожными (60,0%) и сочетанными (71,4%) формами ПА при нормальном их значении у детей с гастроинтестинальными проявлениями. У всех детей было отмечено повышенное количество как относительных, так и абсолютных показателей В-лимфоцитов (CD3+CD19+). Таким образом, особенностью иммунных нарушений у детей раннего возраста, страдающих различными проявлениями ПА, явилось повышенное количество Т- и В- лимфоцитов при пониженном количестве относительных показателей НК-, НКТ- и Т-цитотоксических клеток на фоне аллергического воспаления.

Результаты исследования микробиоты кишечника у всех обследованных больных ПА выявили нарушения микробного пейзажа кишечника в виде преобладания условно-патогенной флоры (*Staphylococcus aureus*, *Enterobacter*,

Citrobacter, Klebsiella, Proteus, грибов рода Candida) и сниженного уровня индигенной флоры (Bifidobacterium, Lactobacillus, E. coli) ($p < 0,05$).

При оценке маркеров воспаления выявлены следующие изменения: все пациенты имели повышенный уровень ESR в сыворотке крови по сравнению с нормой (0-24 нг/мл) независимо от клинических форм ПА, хотя при кожной форме отмечалась тенденция к его повышению.

Обнаружено повышение уровней EDN при нормальных значениях кальпротектина, что подтверждало эозинофильный тип воспаления и исключало нейтрофильный тип. Кроме того, уровень EDN был достоверно выше у детей с гастроинтестинальными и сочетанными проявлениями ПА ($p < 0,05$), по сравнению с детьми с кожными проявлениями. Статистических различий кальпротектина между различными клиническими формами ПА выявлено не было.

Эффективность нового мультиштаммового пробиотика, содержащего в своем составе 7 пробиотических штаммов в титре 10^9 (Lactobacillus casei, Lactobacillus rhamnosis, Streptococcus thermophilus, Lactobacillus acidophulus, Bifidobacterium breve, Bifidobacterium infantis, Bifidobacterium longum), а также фруктоолигосахариды из инулина оценивали у всех, включенных в исследование детей по данным клинических симптомов, показателей микробиоты кишечника, гуморального, клеточного, мукозального иммунитета, а также маркеров воспаления в динамике (до и после терапии).

В ходе проводимого исследования наблюдаемые пациенты были рандомизированы случайным образом в основную (1-я группа) и контрольную (2-я) группы. В каждой группе выделены три подгруппы: IA - АтД, IB - больные гастроинтестинальными проявлениями ПА, IIB - дети с сочетанными проявлениями ПА. Во второй группе: в IA подгруппу вошли больные с АтД, IB подгруппу составили больные с гастроинтестинальными проявлениями ПА, IIB группу составили дети с сочетанными проявлениями ПА. Распределение больных показано на Рисунке 4.1 и 4.2. Для всех пациентов был предусмотрен вводный

период в течение 1 месяца, во время которого проводили: общеклинические (осмотр, оценка симптомов со стороны ЖКТ, оценка степени тяжести АтД по индексу SCORAD, клинический анализ крови, копрология), иммунологические (уровень специфических IgE, общего IgE, sIgA, сывороточных IgA, IgG, IgM, EDN, кальпротектин, ЕСР), исследование субпопуляционного состава лимфоцитов и микробиологические обследования. Всем больным в вводном периоде назначали диагностическую элиминационную диету с ведением пищевых дневников и общепринятую терапию (антигистаминные препараты, наружная терапия, симптоматические средства). К концу вводного периода проводили оценку клинической эффективности общепринятой базисной терапии в обеих группах. Далее, детям основной группы к базисной терапии добавлялся мультиштаммовый пробиотик по 1 саше в день во время приема пищи. Дети контрольной группы продолжали получать базисную терапию. Длительность терапии составляла 30 дней. По окончании терапии у детей обеих групп вновь проводили оценку клинической эффективности, мукозального и клеточного иммунитета у детей обеих групп.

В основной группе с легким течением ПА было 23% (n=28), среднетяжелым 71,3% (n=87), тяжелым 5,7% (n=7) больных. В контрольной группе больных с легким течением было 28,6% (n=20), среднетяжелым 54,3% (n=38), тяжелым 17,1% (n=12) (Рисунок 4.1, 4.2). Индекс SCORAD в основной группе у детей с легкими кожными проявлениями ПА составлял $12,34 \pm 1,48$, среднетяжелыми - $32,04 \pm 1,42$, тяжелыми - $58,34 \pm 2,62$, соответственно. В контрольной группе индекс SCORAD у детей в соответствии с тяжестью кожного процесса составил $53,21 \pm 1,78$; $34,44 \pm 2,02$; $11,04 \pm 1,01$, соответственно.

На фоне применения мультиштаммового пробиотика через 30 дней терапии у большинства детей основной группы выявлена положительная динамика клинических симптомов: у 92,5% больных гастроинтестинальными проявлениями значимое улучшение всех гастроинтестинальных симптомов: полное купирование срыгиваний, колик в животе, нормализация частоты стула; у 7,5% пациентов на

фоне снижения жалоб со стороны ЖКТ сохранялась небольшая слизь в кале. Значительное уменьшение кожных высыпаний документировано у 89,6% больных основной группы (индекс SCORAD составил $6,9 \pm 0,5$), у остальных 10,4% детей сохранялись кожные высыпания на фоне проводимой терапии. В группе с сочетанными проявлениями ПА у 74,5% отмечалась регрессия кожных симптомов (индекс SCORAD $5,71 \pm 0,35$), нормализация стула, купирование колик в животе, срыгиваний. У 6,4 % детей периодически появлялись высыпания и колики. В контрольной группе положительная динамика клинических симптомов отмечалась у 82,4% больных с гастроинтестинальными проявлениями, у 62,5% - кожными и у 47,6% детей с сочетанными проявлениями ПА. Эффективность терапии у детей основной группы, получавших комплексную терапию (в сочетании с мультиштаммовым пробиотиком) была выше по сравнению с контрольной группой больных. Общая эффективность терапии у больных основной группы составляла 92,7% против 74,4% у детей в группе контроля ($p < 0,05$).

На фоне проводимого лечения мультиштаммовым пробиотиком у детей основной группы отмечалось достоверное повышение sIgA, снижение EDN и ECP по сравнению с показателями детей контрольной группы ($p < 0,05$).

Повышение sIgA и снижение EDN коррелировало с клиническим улучшением кожных и гастроинтестинальных симптомов у детей основной группы по сравнению с детьми контрольной группой ($r=+0,74$ и $r=+0,55$, соответственно). У детей основной группы обнаружено статистически значимое снижение эозинофилов в периферической крови и уменьшение концентрации общего IgE в сыворотке крови по сравнению с группой контроля ($p < 0,05$). Переносимость мультиштаммового пробиотика была хорошей. Побочных реакций не отмечено.

При анализе показателей клеточного иммунитета у всех обследованных детей обнаружено статистически значимое повышение количества относительных и абсолютных показателей (CD3-CD19+) В-лимфоцитов при нормальных

значениях относительных показателей и повышенного количества абсолютных показателей (CD3+CD19-) Т- лимфоцитов. Относительные показатели (CD3+/CD4+) Т-хелперов не отличались от нормы, а их абсолютные значения - выше нормы. У детей основной и контрольной групп отмечалось снижение количества относительных показателей естественных киллеров НК-клеток (CD3-CD56+CD16+), относящихся к клеткам-эффекторам, ответственным за противоопухолевый, противовирусный и трансплантационный иммунитет. Как известно, НК- клетки обеспечивают первый уровень защиты против различных патогенов/анигенов до включения специфических иммунных механизмов, способных секретировать цитокины и стимулировать эффекторы Th2 ответа. Низкое количество НК- клеток у больных ПА указывают на снижении защитных реакций организма. Пониженное количество Т-цитотоксических клеток (CD3+CD8+) может свидетельствовать о гипореактивности иммунной системы, в частности, иммунном ответе на различные антигены.

После окончания курса лечения мультиштаммовым пробиотиком содержание микроорганизмов индигенной микрофлоры в фекалиях значительно возросло (*Bifidobacterium*: до 10^8 КОЕ/мл у 75%, *Lactobacillus*: до 10^6 КОЕ/мл у 62,5%; *E. coli*: до 10^8 КОЕ/мл у 54% пациентов), а количество условно-патогенных микроорганизмов у 70,2% уменьшилось (рис.4.6, 4.7). Напротив, увеличение количества *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* и *E. coli* к концу первого месяца лечения мультиштаммовым пробиотиком у больных ПА является одним из маркеров, подтверждающих эффективность лечения.

Результаты бактериологических исследований в контрольной группе пациентов, не получавших мультиштаммовый пробиотик, показали, что содержание микроорганизмов индигенной микрофлоры в кале возросло у меньшего числа (22,3%) больных (*Bifidobacterium*: до 10^8 КОЕ/мл у 11,8%; *Lactobacillus*: до 10^6 КОЕ/мл у 26,7%; *E. coli*: до 10^8 КОЕ/мл у 28,4% пациентов), а количество условно-патогенных микроорганизмов снизилось у 37,5%.

Проведенное исследование подтверждает, что восстановление нарушенного микробиома кишечника требует обязательного использования препаратов, содержащих пробиотические микроорганизмы, на фоне адекватно подобранной диетотерапии.

Таким образом, ПА характеризуется полиморфизмом клинических проявлений и сложными механизмами развития. Повышение уровней EDN и ECP у детей с ПА указывает на наличие эозинофильного воспаления у этих больных. Низкие значения sIgA свидетельствуют о нарушениях в системе мукозального иммунитета и снижении барьерных функций слизистой оболочки ЖКТ. Нормальные показатели кальпротектина в кале связаны, по-видимому, с отсутствием нейтрофильного воспаления в кишечнике у обследованных больных. Все вышесказанное подтверждает тот факт, что специфические биомаркеры воспаления являются важными инструментами в выявлении типа воспаления, выборе адекватного лечения и оценки его эффективности.

Включение в комплексное лечение детей с ПА мультиштаммового пробиотика способствует купированию симптомов со стороны кожи и ЖКТ. Повышение sIgA и снижение показателей EDN, ECP на фоне применения мультиштаммового пробиотика свидетельствует о его влиянии на аллергическое (иммунное) воспаление у больных ПА. Проведенное исследование подтверждает клиническую пользу включения в комплексное лечение детей с ПА мультиштаммового пробиотика и позволяет рассматривать данный подход как один из способов повышения эффективности терапии ПА у детей раннего возраста.

ВЫВОДЫ

1. Установлен полиморфизм клинических проявлений пищевой аллергии у детей раннего возраста, среди которых преобладают кожные и сочетанные (кожно-гастроинтестинальные) проявления, которые отмечаются у 41,7% и 35,4% больных, соответственно. Гастроинтестинальные проявления наблюдаются реже (22,9%)

2. Выявлен эозинофильный тип воспаления у всех больных пищевой аллергией на основании повышенных значений эозинофилов и эозинофильного катионного белка в крови, а также эозинофильного нейротоксина в кале при нормальных значениях фекального кальпротектина. Это позволяет выбрать персонифицированный подход к дието- и фармакотерапии болезни

3. Установлена клиническая значимость биомаркеров тяжести пищевой аллергии - низкие концентрации sIgA в кале и естественных киллеров (NK-клеток) в крови. Наиболее низкие значения этих показателей обнаружены у большинства больных (82%) с сочетанными кожно-гастроинтестинальными проявлениями пищевой аллергии

4. Выявлены особенности изменений в клеточном звене иммунитета у больных пищевой аллергией в виде повышения относительного и абсолютного числа CD3+/CD19-, CD3-/CD19+ лимфоцитов, снижения относительного количества NK-клеток, NKT-лимфоцитов, T-цитотоксических клеток, что, возможно, отягощает течение болезни и требует подбора корректирующей терапии

5. При исследовании количественного и качественного состава микробиоты кишечника у всех больных пищевой аллергией обнаружено изменение микробиоты (низкие значения *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *E.coli* на фоне повышения количества условно-патогенной флоры *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, грибов рода *Candida*), что требует коррекции выявленных нарушений

6. Включение в комплексную терапию пищевой аллергии мультиштаммового пробиотика способствует улучшению клинических проявлений и уменьшению воспалительного процесса за счет повышения sIgA и снижения эозинофильного нейротоксина и эозинофильного катионного белка ($p < 0,05$) у наблюдаемых больных по сравнению с группой контроля

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Комплексное обследование иммунного статуса у больных различными клиническими проявлениями ПА позволяет диагностировать эозинофильный тип иммунного воспаления, оценить особенности изменений в клеточном звене иммунитета и микробиоте кишечника. Данный принцип оценки позволяет персонализировать подход к коррекции выявленных нарушений.

2. Выявленные нарушения в количественном и качественном составе микробиоты кишечника при ПА обосновывают оптимизацию терапии у этих больных.

3. Установлено, что включение в комплексную терапию мультиштаммового пробиотика больным ПА способствует положительной динамике клинических симптомов и удлинению ремиссии болезни.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ПА - пищевая аллергия

ИФА - иммуноферментный анализ

ПЦР - полимеразная цепная реакция

IgM - иммуноглобулин класса М

IgA - иммуноглобулин класса А

IgG - иммуноглобулин класса G

IgE - иммуноглобулин класса E

НК-клетки - естественные киллеры

АтД - атопический дерматит

TTh1, Th2 - субпопуляции CD4⁺ Т-лимфоцитов (хелперов) 1 и 2 типа

IL10, 5, 4, 9, 13 - интерлейкины 10, 5, 4, 9, 13

TNF-а - фактор некроза опухолей

С3 - третий компонент комплемента

С4 - четвертый компонент комплемента

FcεRI, FcεRII - рецепторы для IgE на лимфоцитах

EDN - эозинофильный нейротоксин

SIgE - секреторный иммуноглобулин класса E

ЕСР - эозинофильный катионный белок

АГ - антиген

АТ - антитело

SCORAD - Scoring of Atopic Dermatitis

БКМ - белки коровьего молока

ЖКТ - желудочно-кишечный тракт

Me - медиана

Q25-Q75 - интерквартильный размах

КСП - кожные скарификационные пробы

БА - бронхиальная астма

R - коэффициент Спирмена

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андерсен Л. Клеточный иммунный ответ на инфекцию *Helicobacter pylori*// Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. М., 1999. - №2. - С.22-26
2. Балаболкин И.И., Ревякина В.А. //Пищевая аллергия у детей. М.: Издательство «Династия», 2010, с.190
3. Белоусова Т.В. Становление иммунной системы у детей в различных условиях внутриутробного развития и неонатальном периоде// Лекции по педиатрии. М., 2010. -Т. 9. - С.80-105
4. Вельтищев Ю.Е., Длин В.В. Развитие иммунной системы у детей / М., 2005. – С.78
5. Ивашкин В.Т. Основные понятия и положения фундаментальной иммунологии // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. М., 2008. - №4. - С.4-13
6. Козлов И.Г. Микробиота, мукозальный иммунитет и антибиотики: тонкости взаимодействия // Русский медицинский журнал. М., 2018 №8 (1), С.19-27
7. Лусс Л.В. Пищевая аллергия и пищевая непереносимость. Возможности эффективного лечения и профилактики у детей и взрослых// Российский аллергологический журнал. М., 2007; Приложение: С.46.
8. Макарова С.Г., Лаврова Т.Е., Вишнева Е.А., Турти Т.В., Акоев Ю.С. Первичная профилактика как эффективный ответ на эпидемию аллергических болезней// Педиатрическая фармакология. М.,2015, Т.12, №1, С. 67-74
9. Мухортых В.А., Ларькова И.А., Ревякина В.А. Современные возможности коррекции микробиоценоза кишечника у детей с пищевой аллергией // Вопросы детской диетологии. М, 2018. - Т.87, №5 - С.146-147
10. Намазова-Баранова Л.С. Аллергия у детей: от теории к практике. М.: Союз педиатров России. М., 2010-2011. 668 с.

11. Ревякина В.А. и др. Фенотипы пищевой аллергии. М.: Вопросы питания. М., 2016, т. 85, №1, С.75-79
12. Титова Н.Д. Развитие системы иммунитета плода, новорожденного и детей раннего возраста // Иммунология, Аллергология, Инфектология. М., 2007. - №4. - С.38-46
13. Фрейдлин И.С. Регуляторные Т-клетки: происхождение и функции// Медицинская иммунология. М., 2005; 7(4): 347-354
14. Abdel-Gadir A, Stephen-Victor E, Gerber GK, Noval Rivas M, et al. Microbiota therapy acts via a regulatory T cell MyD88/ROR γ t pathway to suppress food allergy. *Nat Med.* 2019;25(7):1164-1174
15. Abrahamsson TR, Jakobsson HE, Andersson AF, Bjorksten B, Engstrand L, Jenmalm MC. Low diversity of the gut microbiota in infants with atopic eczema. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;129(2):434-440
16. Adlerberth I, Strachan DP, Matricardi PM, et al. Gut microbiota and development of atopic eczema in 3 European birth cohorts. *J Allergy Clin Immunol.* 2007 Aug;120(2):343–350
17. Ahlstrom-Emanuelsson CA, Greiff L, Andersson M, Persson CG, Erjefalt JS. Eosinophil degranulation status in allergic rhinitis: observations before and during seasonal allergen exposure. *Eur. Respir. J.* 2004;24:750-757
18. Aitoro R, Paparo L, Amoroso A. et al. (2017a) Gut microbiota as a target for preventive and therapeutic intervention against food allergy. *Nutrients* 9(7):pii: E672
19. Akktn K.J., Martin P.E. Clinical aspects of pediatrics food allergy and failed immune tolerance. *J. Gastroenterol.* 2010, v. 44 (6), p. 391-401
20. Akuthota P., Wang H., Weller P. F. (2010) Eosinophils as antigen-presenting cells in allergic upper airway disease. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 10, 14-19
21. Allen KJ, Koplin JJ, Ponsonby AL, et al. Vitamin D insufficiency is associated with challenge-proven food allergy in infants. *J Allergy Clin Immunol.* 2013 Apr;131(4):1109-1116

22. Allen KJ, Koplin JJ. Prospects for prevention of food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* 2016;4:215-22
23. Alvarez A, Sanchez C, Garrido-Garrido G, Guevara M, Riaño A, Varona P, Rodriguez JM. The eosinophil cationic protein (ECP) characteristics and its use as a marker of the eosinophil activation in inflammatory pathological processes. *Acta Farm Bonaerense.* 2005;24(4):601-609
24. Anagnostou K, Stiefel G, Brough H, et al. Active management of food allergy: an emerging concept. *Arch Dis Child.* 2015;100:386- 90
25. Arpaia N, Campbell C (2013) Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T cell generation. *Nature* 504:451-455
26. Arrieta M-C, Stiemsma LT, Amenyogbe N, Brown EM, Finlay B. The intestinal microbiome in early life: health and disease. *Front Immunol.* 2014;5:427
27. Arruda L.K., Santos A.B. Immunologic responses to common antigens in helminthic infections and allergic disease. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2005;5:399-402
28. Asarat M, Apostolopoulos V, Vasiljevic T, Donkor O. Short-chain fatty acids regulate cytokines and Th17/Treg cells in human peripheral blood mononuclear cells in vitro. *Immunol Invest.* 2016;45(3):205-222
29. Atarashi K, Tanoue T, Oshima K, Suda W, Nagano Y et al. Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. *Nature* . 2013;500(7461):232-236
30. Atarashi K, Tanoue T, Shima T, Imaoka A, Kuwahara T, et al. Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species. *Science.* 2011;331(6015):337-341
31. Azad M, Konya T, Persaud RR, Guttman DS, Chari RS, et al, the CHILD Study Investigators (2016) Impact of maternal intrapartum antibiotics, method of birth and breastfeeding on gut microbiota during the first year of life: a prospective cohort study. *BJOG Int J Obstet Gynaecol* 123(6): 983-993

32. Azad MB, Konya T, Guttman DS, Field CJ, Sears MR, et al, the CHILD Study Investigators (2015) Infant gut microbiota and food sensitization: associations in the first year of life. *Clin Exp Allergy* 45(3):632-643
33. Backhed F et al (2005) Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 307(5717):1915-1920
34. Baldassarre ME, Laforgia N, Fanelli M, Laneve A, Grosso R, Lifschitz C. Lactobacillus GG improves recovery in infants with blood in the stools and presumptive allergic colitis compared with extensively hydrolyzed formula alone. *J Pediatr*. 2010;156:397-401
35. Berin M.C., Mayer L. Can we produce true tolerance with food allergy? *J. Allergy Clin. Immunol.* 2013, v. 131 (1), p. 14-22
36. Berni Canani R, Di Costanzo M, Bedogni G, et al. Extensively hydrolyzed casein formula containing Lactobacillus rhamnosus GG reduces the occurrence of other allergic manifestations in children with cow's milk allergy: 3-year randomized controlled trial. *J Allergy Clin Immunol.* 2017;139(6):1906-1913
37. Berni Canani R, Gilber JA, Nagler CR (2015) The role of the commensal microbiota in the regulation of tolerance to dietary allergens. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 15:243-249
38. Berni Canani R, Nocerino R, Terrin G, et al. Effect of lactobacillus GG on tolerance acquisition in infants with cow's milk allergy: a randomized trial. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;129:580-2
39. Berni Canani R, Nocerino R, Terrin G, et al. Formula selection for management of children with cow's milk allergy influences the rate of acquisition of tolerance: a prospective multicenter study. *J Pediatr.* 2013;163:771-7
40. Berni Canani R, Rapacciuolo L, Romano MT, et al. Diagnostic value of faecal calprotectin in paediatric gastroenterology clinical practice. *Dig Liver Dis.* 2004;36:467-470
41. Berni Canani R, Sangwan N, Stefka AT, Nocerino R, Paparo L, Aitoro R, Calignano A, Khan AA, Gilbert JA, Nagler CR. Lactobacillus rhamnosus GG-

supplemented formula expands butyrate-producing bacterial strains in food allergic infants. *ISME J.* 2016;10(3):742-750

42. Beşer OF, Sancak S, Erkan T, Kutlu T, Cokuğraş H, Cokuğraş FÇ. Can Fecal Calprotectin Level Be Used as a Markers of Inflammation in the Diagnosis and Follow-Up of Cow's Milk Protein Allergy? *Allergy Asthma Immunol Res.* 2014 Jan;6(1):33-8

43. Besten G, van Eunen K, Groen AK, Venema K, Reijngoud D-J, Bakker BM. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *J Lipid Res.* 2013;54(9):2325-2340

44. Bisgaard H, Li N, Bonnelykke K, Chawes BLK, Skov T, Paludan-Muller G, Stokholm J, Smith B, Krogfelt KA. Reduced diversity of the intestinal microbiota during infancy is associated with increased risk of allergic disease at school age. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;128(3):646—652

45. Bjorksten B, Sepp E, Julge K, Voor T, Mikelsaar M. Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life. *J Allergy Clin Immunol.* 2001 Oct;108(4):516–520

46. Blazquez AB, Berin MC (2017) Microbiome and food allergy. *Transl Res* 179:199-203

47. Borchers AT, Keen CL, Gershwin ME (2002) The influence of yogurt/Lactobacillus on the innate and acquired immune response. *Clin Rev Allergy Immunol* 22:207-230

48. Boyce JA, et al. Guidelines for the diagnosis and management of food allergy in the United States: report of the NIAID-sponsored expert panel. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2010;126:S1-58

49. Boyle RJ, Bath-Hextall FJ, Leonardi-Bee J, Murrell DF, Tang ML. Probiotics for treating eczema. *Cochrane Database Syst Rev.* 2008;(4):CD006135

50. Braat H, van den Brande J, van Tol E et al (2004) *Lactobacillus rhamnosus* induces peripheral hyporesponsiveness in stimulated CD4+ T cells via modulation

Targeting Food Allergy with Probiotics of dendritic cell function. *Am J Clin Nutr* 80:1618-1625

51. Broide DH, Finkelman F, Bochner BS, Rothenberg ME. Advances in mechanisms of asthma, allergy, and immunology in 2010. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;127:689-95

52. Bunyavanich S, Shen N, Grishin A, Wood R, Burks W, Dawson P, Jones SM, Leung DYM, Sampson H, Sicherer S, Clemente JC. Early-life gut microbiome composition and milk allergy resolution. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;138(4):1122-1130

53. Burri E, Manz M, Rothen C, Rossi L, Beglinger C, Lehmann FS. Monoclonal antibody testing for fecal calprotectin is superior to polyclonal testing of fecal calprotectin and lactoferrin to identify organic intestinal disease in patients with abdominal discomfort. *Clin Chim Acta*. 2013;416:41-47

54. Burri E, Manz M, Schroeder P, Froehlich F, Rossi L, Beglinger C, Lehmann FS. Diagnostic yield of endoscopy in patients with abdominal complaints: incremental value of faecal calprotectin on guidelines of appropriateness. *BMC Gastroenterol*. 2014;14:57

55. Byström J, Amin K, Bishop-Bailey D. Analysing the eosinophil cationic protein - a clue to the function of the eosinophil granulocyte. *Respiratory Research* 2011;12:10

56. Canani RB, de Horatio LT, Terrin G, Romano MT, Miele E, et al. Combined use of noninvasive tests is useful in the initial diagnostic approach to a child with suspected inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2006;42:9-15

57. Caviglia GP, Ribaldone DG, Rosso C, Saracco GM, Astegiano M, Pellicano R. Fecal calprotectin: beyond intestinal organic diseases. *Panminerva Med*. 2018 Mar;60(1):29-34

58. Chafen JJS, Newberry SJ, Riedl MA, et al. Diagnosing and Managing Common Food Allergies. *JAMA*. 2010;303(18):1848

59. Chen CC, Chen KJ, Kong MS, Chang HJ, Huang JL (2016) Alterations in the gut microbiotas of children with food sensitization in early life. *Pediatr Allergy Immunol* 27(3):254-262
60. Chen CC, Huang JL, Chang CJ, Kong MS. Fecal calprotectin as a correlative marker in clinical severity of infectious diarrhea and usefulness in evaluating bacterial or viral pathogens in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2012 Nov;55(5):541-7
61. Cheng KJ, Xu YY, Liu HY, Wang SQ. Serum eosinophil cationic protein level in Chinese subjects with nonallergic and local allergic rhinitis and its relation to the severity of disease. *Am J Rhinol Allergy.* 2013;27:8-12
62. Chinthrajah RS, Hernandez JD, Boyd SD, Galli SJ, Nadeau KC (2016) Molecular and cellular mechanisms of food allergy and food tolerance. *J Allergy Clin Immunol* 137(4):984-997
63. Chung HL, et al. Deposition of eosinophil-granule major basic protein and expression of intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in the mucosa of the small intestine in infants with cow's milk-sensitive enteropathy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1999;103:1195-1201
64. Commins SP, Satinover SM, Hosen J, et al. Delayed anaphylaxis, angioedema, or urticaria after consumption of red meat in patients with IgE antibodies specific for galactose- α -1, 3-galactose. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2009;123(2):426-433
65. Culley F.J. Natural killer cells in infection and inflammation of the lung *Immunology*, 128 (2) (2009), pp. 151-163
66. Dang D, Zhou W, Lun ZJ, Mu X, Wang DX, Wu H. Meta-analysis of probiotics and/or prebiotics for the prevention of eczema. *J Int Med Res.* 2013;41(5):1426-1436
67. Davoine F., Lacy P. (2014) Eosinophil cytokines, chemokines, and growth factors: emerging roles in immunity. *Front. Immunol.* 5, 570

68. Diesner SC, Bergmayr C, Pfitzner B, Assmann V, Krishnamurthy D, et al. A distinct microbiota composition is associated with protection from food allergy in an oral mouse immunization model. *Clin Immunol*. 2016;173:10-18
69. Du Toit G, Roberts G, Sayre PH, et al. Identifying infants at high risk of peanut allergy: the Learning Early About Peanut Allergy (LEAP) screening study. *J Allergy Clin Immunol*. 2013 Jan;131(1):135-143
70. Du Toit G, Roberts G, Sayre PH, et al; LEAP study team. Randomised trial of peanut consumption in infants at risk for peanut allergy. *N Engl J Med*. 2015;372:803-13
71. Dzidic M, Abrahamsson TR, Artacho A, Björkstén B, Collado MC, Mira A, Jenmalm MC. Aberrant IgA responses to the gut microbiota during infancy precede asthma and allergy development. *J Allergy Clin Immunol*. 2017 Mar;139(3):1017-1025
72. Eigenmann PA. Evidence of preventive effect of probiotics and prebiotics for infantile eczema. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2013;13(4):426-431
73. Fagerberg UL, Löf L, Myrdal U, Hansson LO, Finkel Y. Colorectal inflammation is well predicted by fecal calprotectin in children with gastrointestinal symptoms. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2005;40:450-5
74. Fazlollahi M, Chun Y, Grishin A, Wood RA, Burks AW, Dawson P, Jones SM, Leung DYM, Sampson HA, Sicherer SH, Bunyavanich S (2018) Early-life gut microbiome and egg allergy. *Allergy* 73(7):1515-1524
75. Feary J, Britton J, Leonardi-Bee J. Atopy and current intestinal parasite infection: a systematic review and meta-analysis. *Allergy*. 2011; 66(4) 569-578
76. Fieten KB, Totté JEE, Levin E, Reyman M, Meijer Y, Knulst A, et al.. Fecal microbiome and food allergy in pediatric atopic dermatitis: a cross-sectional pilot study. *Clin Allergol*. (2018) 175:77-84
77. Filley WV, Holley KE, Kephart GM, Gleich GJ. Identification by immunofluorescence of eosinophil granule major basic protein in lung tissues of patients with bronchial asthma. *Lancet*. 1982;2:11-16

78. Fiocchi A, Brozek J, Schnemann H, Bahna SL, von Berg A, Beyer K, et al. World Allergy Organization (WAO) Diagnosis and Rationale for Action against Cow's Milk Allergy (DRACMA) Guidelines. *World Allergy Organ J.* 2010 Apr;3(4):57-161
79. Flinterman AE, Knol EF, van Ieperen AG et al (2007) Probiotics have a different immunomodulatory potential in vitro versus ex vivo upon oral administration in children with food allergy. *Int Arch Allergy Immunol* 143:237-244
80. Fulkerson PC, et al. Targeting eosinophils in allergy, inflammation and beyond. *Nat Rev Drug Discov.* 2013 Feb;12(2):117-29
81. Fulya Ilhan, Basak Kandi, Handan Akbulut, Dilara Turgut, Demet Cicek. Atopic dermatitis and $\alpha 24+$ natural killer T cells. *Skinmed* Sep-Oct 2007;6(5):218-20
82. Furman DL, Cash BD. The role of diagnostic testing in irritable bowel syndrome. *Gastroenterol Clin North Am.* 2011;40:105-119
83. Furuta, G. T., Atkins, F. D. , Lee, N. A. , Lee, J. J. (2014) Changing roles of eosinophils in health and disease. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 113, 3-8
84. Geuking MB, Cahenzli J, Lawson MAE, Ng DCK, Slack E, Hapfelmeier S, McCoy KD, Macpherson AJ (2011) Intestinal bacterial colonization induces mutualistic regulatory T cell responses. *Immunity* 34(5):794-806
85. Gill SR, Pop M, DeBoy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS, Gordon JI, Relman DA, Fraser-Liggett CM, Nelson KE (2006) Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science* 312(5778):1355-1359
86. Goto T. Urinary eosinophil-derived neurotoxin concentrations in patients with atopic dermatitis: a useful clinical marker for disease activity. *Allergol. Int.* 2007;56(4):433-438
87. Guo L, Bai H, Dong Y, Huang D, Zhang X, Gong S, Zhao X, Fei P. Comparative analysis of fecal microbiota in 5-8-year-old children with and without cow milk protein allergy. *Iran J Pediatr.* 2016;26(6):6397

88. Gupta RS, Springston EE, Warrier MR, et al. The prevalence, severity, and distribution of childhood food allergy in the United States. *Pediatrics*. 2011 Jul;128(1):9-17
89. Hand TW, Vujkovic-Cvijin I, Ridaura VK, Belkaid Y. Linking the microbiota, chronic disease, and the immune system. *Trends Endocrinol Metab*. 2016;27(12):831-843
90. Hardy H, Harris J, Lyon W et al (2013) Probiotics, prebiotics and immunomodulation of gut mucosal defences: homeostasis and immunopathology. *Nutrients* 5:1869-1912
91. Harmsen HJ, Wildeboer-Veloo AC, Raangs GC, Wagendorp AA, Klijn N, Bindels JG, Welling GW. Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2000;30(1):61-67
92. Haworth O., Cernadas M., Levy B.D. NK cells are effectors for resolvin E1 in the timely resolution of allergic airway inflammation *J Immunol*, 186 (11) (2011), pp. 6129-6135
93. Heine RG (2018) Food allergy prevention and treatment by targeted nutrition. *Ann Nutr Metab* 72:27-39
94. Herrera OR, Christensen ML, Helms RA. Calprotectin: Clinical Applications in Pediatrics. *J Pediatr Pharmacol Ther*. 2016 Jul-Aug;21(4):308-321
95. Hogan S.P. Eosinophils: biological properties and role in health and disease. *Clin. Exp. Allergy*. 2008;38(5):709-750
96. Hogan SP, Rothenberg ME. Eosinophil function in eosinophil-associated gastrointestinal disorders. *Curr Allergy Rep* 2006;6:65-71
97. Ipci K, Altintoprak N, Muluk NB, Senturk M, Cingi C. The possible mechanisms of the human microbiome in allergic diseases. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2017;274(2):617-626
98. Isolauri E, Arvola T, Sutas Y et al (2000) Probiotics in the management of atopic eczema. *Clin Exp Allergy* 30:1604-1161

99. Jarvinen KM, Laine ST, Jarvenpaa AL, Suomalainen HK. Does low IgA in human milk predispose the infant to development of cow's milk allergy? *Pediatr Res.* 2000;48 (4):457-462
100. Jin YN, Bursley J, Dover H, Gangur V, Rockwell CE. The effect of the common food additive tBHQ in OVA-elicited food allergy. *J Immunol.* 2018;200(1):104.4
101. Jira M. , Antosova E. , Vondra V. , Strejcek J. , Mazakova H. , Prazakova J. Natural killer and interleukin-2 induced cytotoxicity in asthmatics. I. Effect of acute antigen-specific challenge *Allergy*, 43 (4) (1988), pp. 294-298
102. Jung YG, Kim KH, Kim HY, Dhong HJ, Chung SK. Predictive capabilities of serum eosinophil cationic protein, percentage of eosinophils and total immunoglobulin E in allergic rhinitis without bronchial asthma. *J Int Med Res.* 2011;39:2209-16
103. Kalliomaki M, Kirjavainen P, Eerola E, Kero P, Salminen S, Isolauri E. Distinct patterns of neonatal gut microflora in infants in whom atopy was and was not developing. *J Allergy Clin Immunol.* 2001 Jan;107(1):129–134
104. Kamal S.M., El Sayed Khalifa K. Immune modulation by helminthic infections: Worms and viral infections. *Parasite Immunol.* 2006;28:483-496
105. Kambayashi, T., Laufer, T. M. (2014) Atypical MHC class II-expressing antigen presenting cells: can anything replace a dendritic cell? *Nat. Rev. Immunol.* 14, 719-730
106. Kämpe M, Stolt I, Lampinen M, Janson C, Stålenheim G, Carlson M. Patients with allergic rhinitis and allergic asthma share the same pattern of eosinophil and neutrophil degranulation after allergen challenge. *Clin Mol Allergy* 2011;9:3
107. Kapsenberg M.L. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat. Rev. Immunol.* 2003;3:984-993
108. Kato M, Yamada Y, Maruyama K, Hayashi Y. Serum eosinophil cationic protein and 27 cytokines/chemokines in acute exacerbation of childhood asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 2010;152(Suppl 1):62-6

109. Kattan JD, Wang J. Allergen component testing for food allergy: ready for prime time? *Curr. Allergy Asthma Rep.* 2013;13:58-63
110. Keet CA, Matsui EC, Savage JH, et al. Potential mechanisms for the association between fall birth and food allergy. *Allergy.* 2012 Jun;67(6):775-782
111. Kephart GM, et al. Marked deposition of eosinophil-derived neurotoxin in adult patients with eosinophilic esophagitis. *Am. J. Gastroenterol.* 2010;105:298-307
112. Khakzad MR, Mirsadraee M, Sankian M, Varasteh A, Meshkat M. Is serum or sputum eosinophil cationic protein level adequate for diagnosis of mild asthma? *Iran J Allergy Asthma Immunol.* 2009;8:155-60
113. Khan AR, Hams E, Floudas A, Sparwasser T, Weaver CT, Fallon PG. PD-L1hi B cells are critical regulators of humoral immunity. *Nat Commun.* 2015;6:5997
114. Kim CK, Callaway Z, Fletcher R, Koh YY. Eosinophil-derived neurotoxin in childhood asthma: correlation with disease severity. *J Asthma.* 2010;47:568-573
115. Kim HS, Kim JH, Seo YM, Chun YH, Yoon JS, Kim HH, Lee JS, Kim JT. Eosinophil-derived neurotoxin as a biomarker for disease severity and relapse in recalcitrant atopic dermatitis. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2017 Nov;119(5):441-445
116. Kim JS, Nowak-Węgrzyn A, Sicherer SH, et al. Dietary baked milk accelerates the resolution of cow's milk allergy in children. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;128:125-31
117. Kim K.W. Serum eosinophil-derived neurotoxin (EDN) in diagnosis and evaluation of severity and bronchial hyperresponsiveness in childhood asthma. *Lung.* 2007;185(2):97-103
118. Kim ST, Han DH, Moon IJ, et al. Clinical and immunologic effects of sublingual immunotherapy on patients with allergic rhinitis to house-dust mites: 1-year follow-up results. *Am J Rhinol Allergy* 2010; 24:271-275
119. Koenig JE et al (2011) Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proc Natl Acad Sci* 108(Supplement 1):4578-4585
120. Koh GC, Shek LP, Goh DY, et al. Eosinophil cationic protein: is it useful in asthma? A systematic review. *Respir Med* 2007; 101:696-705

121. Koletzko S, Niggemann B, Arato A, Dias JA, et al. Diagnostic approach and management of cow's-milk protein allergy in infants and children: ESPGHAN GI Committee practical guidelines. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2012 Aug;55(2):221-9
122. Koller D.Y. Assessment of eosinophil granule proteins in various body fluids: is there a relation to clinical variables in childhood asthma? *Clin. Exp. Allergy.* 1999;29(6):786-793
123. Koller DY, Nilsson M, Enander I, Venge P, Eichler I. Serum eosinophil cationic protein, eosinophil protein X and eosinophil peroxidase in relation to pulmonary function in cystic fibrosis. *Clin Exp Allergy* 1998;28:241-8
124. Koplin JJ, Allen KJ, Gurrin LC, et al. The impact of family history of allergy on risk of food allergy: a population-based study of infants. *Int J Environ Res Public Health.* 2013 Nov;10(11):5364-5377
125. Koplin JJ, Dharmage SC, Ponsonby AL, et al. Environmental and demographic risk factors for egg allergy in a population-based study of infants. *Allergy.* 2012 Nov;67(11):1415-1422
126. Kuitunen M. Probiotics and prebiotics in preventing food allergy and eczema. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2013;13(3):280-286
127. Kulig M, Bergmann R, Klettke U, Wahn V, Tacke U, Wahn U. Natural course of sensitization to food and inhalant allergens during the first 6 years of life. *J Allergy Clin Immunol.* 1999 Jun;103(6):1173-1179
128. Kusunoki T, Mukaida K, Morimoto T, et al. Birth order effect on childhood food allergy. *Pediatr Allergy Immunol.* 2012 May;23(3):250-254
129. Lack G. Epidemiologic risks for food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2008; 121 (6): 1331-1336
130. Lack G. Update on risk factors for food allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2012 May; 129(5):1187-97
131. Langhorst J, Junge A, Rueffer A, et al. Elevated human beta-defensin-2 levels indicate an activation of the innate immune system in patients with irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol.* 2009;104:404-410

132. Lee E, Kim BJ, Kang MJ, Choi KY, Cho HJ, Kim Y, et al. (2016) Dynamics of gut microbiota according to the delivery mode in healthy Korean infants. *Allergy, Asthma Immunol Res* 8(5):471-477
133. Lee J, Seto D, Bielory L. Meta-analysis of clinical trials of probiotics for prevention and treatment of pediatric atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;121:116-121
134. Lee, J. J., Jacobsen, E. A. , McGarry, M. P. , Schleimer, R. P. , Lee, N. A. (2010) Eosinophils in health and disease: the LIAR hypothesis. *Clin. Exp. Allergy* 40, 563-575
135. Lee, J.J., Lee, N.A. (2005) Eosinophil degranulation: an evolutionary vestige or a universally destructive effector function? *Clin. Exp. Allergy* 35, 986-994
136. Lemon-Mulé H, Sampson H. Immunologic changes in children with egg allergy ingesting extensively heated egg. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;122:977-83
137. Leonard SA, Sampson HA, Sicherer SH, et al. Dietary baked egg accelerates resolution of egg allergy in children. *J Allergy Clin Immunol*. 2012 Aug;130(2):473-80.e1
138. Levy Y, Segal N, Garty B, Danon YL. Lessons from the clinical course of IgE-mediated cow milk allergy in Israel. *Pediatr Allergy Immunol*. 2007 Nov;18(7):589-593
139. Licata A, Randazzo C, Cappello M, Calvaruso V, Butera G, Florena AM, et al. Fecal calprotectin in clinical practice: a noninvasive screening tool for patients with chronic diarrhea. *J Clin Gastroenterol*. 2012;46:504-8
140. Ling Z, Li Z, Liu X, Cheng Y, Luo Y, Tong X, Yuan L, Wang Y, Sun J, Li L, Xiang C. Altered fecal microbiota composition associated with food allergy in infants. *Appl Environ Microbiol*. 2014;80(8):2546-2554
141. Liu AH, Jaramillo R, Sicherer SH, et al. National prevalence and risk factors for food allergy and relationship to asthma: results from the National Health and Nutrition Examination Survey 2005-2006. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;126(4):798-806

142. Long H. A player and coordinator: the versatile roles of eosinophils in the immune system. *Transfus. Med. Hemotherapy*. 2016;43(2):96-108
143. Love BL et al (2016) Antibiotic prescription and food allergy in young children. *Allergy Asthma Clin Immunol* 12(1):41
144. Ma JY, Zhang J, Li QH, Shi ZL, Wu HJ, Zhang HQ, Tang LP, Yi R, Su H, Sun X. Oral administration of a mixture of probiotics protects against food allergy via induction of CD103(+) dendritic cells and modulates the intestinal microbiota. *J Funct Foods*. 2019;55:65-75
145. Manz M, Burri E, Rothen C, Tchanguizi N, Niederberger C, Rossi L, Beglinger C, Lehmann FS. Value of fecal calprotectin in the evaluation of patients with abdominal discomfort: an observational study. *BMC Gastroenterol*. 2012;12:5
146. Martin R, Nauta A, Ben Amor K, Knippels L, Knol J, Garssen J (2010) Early life: gut microbiota and immune development in infancy. *Benefic Microbes* 1(4):367-382
147. Martinelli-Kläy CP, Mendis BRRN, Lombardi T. Eosinophils and oral squamous cell carcinoma: A short review. *J Oncology* 2009;2009:310132
148. McGowan EC, Keet CA. Prevalence of self-reported food allergy in the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2007-2010. *J Allergy Clin Immunol*. 2013 Nov;132(5):1216-1219
149. Metsälä J, Lundqvist A, Virta LJ, Kaila M, Gissler M, Virtanen SM (2015) Prenatal and post-natal exposure to antibiotics and risk of asthma in childhood. *Clin Exp Allergy* 45(1):137-145
150. Min B., Prout M., Hu-Li J., Zhu J., Jankovic D., Morgan E.S., Urban J.F., Jr., Dvorak A.M., Finkelman F.D., LeGros G., et al. Basophils produce IL-4 and accumulate in tissues after infection with a Th2-inducing parasite. *J. Exp. Med*. 2004;200:507-517
151. Miqdady M., Al Mistarihi J., Azaz A., Rawat D. Prebiotics in the Infant Microbiome: The Past, Present, and Future. *Pediatr Gastroenterol. Hepatol. Nutr*. 2020;23:1-14

152. Montalto M, Gallo A, Santoro L, D'Onofrio F, Landolfi R, Gasbarrini A. Role of fecal calprotectin in gastrointestinal disorders. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2013;17:1569-82
153. Murakami R., Denda-Nagai K., Hashimoto S., Nagai S., Hattori M., Irimura T. A unique dermal dendritic cell subset that skews the immune response toward Th2. *PLoS ONE.* 2013;8:e73270
154. Muraro A, Werfel T, Hoffmann-Sommergruber K, Roberts G, Beyer K, et al.; EAACI Food Allergy and Anaphylaxis Guidelines Group. EAACI food allergy and anaphylaxis guidelines: diagnosis and management of food allergy. *Allergy.* 2014 Aug;69(8):1008-25
155. Murray CS, Tannock GW, Simon MA, et al. Fecal microbiota in sensitized wheezy and non-sensitized non-wheezy children: a nested case-control study. *Clin Exp Allergy.* 2005 Jun;35(6):741–745
156. Nagata Y, Yamamoto T, Hayashi M, Hayashi S, Kadowaki M. Improvement of therapeutic efficacy of oral immunotherapy in combination with regulatory T cell-inducer kakkonto in a murine food allergy model. *PLoS ONE.* 2017;12(1):e0170577
157. Naismith GD, Smith LA, Barry SJ, Munro JI, Laird S, Rankin K, Morris AJ, Winter JW, Gaya DR. A prospective evaluation of the predictive value of faecal calprotectin in quiescent Crohn's disease. *J Crohns Colitis.* 2014;8:1022-9
158. Nakanishi K. Basophils as APC in Th2 response in allergic inflammation and parasite infection. *Curr. Opin. Immunol.* 2010;22:814-820
159. Niimi A, Amitani R, Suzuki K, Tanaka E, Murayama T, Kuze Serum eosinophil cationic protein as a marker of eosinophilic inflammation in asthma. *F.Clin Exp Allergy.* 1998 Feb;28(2):233-40
160. Noguchi H, Kephart GM, Colby TV, Gleich GJ. Tissue eosinophilia and eosinophil degranulation in syndromes associated with fibrosis. *Am. J Pathol.* 1992;140:521-528
161. Noval Rivas M, Burton OT, Wise P, Charbonnier L-M, Georgiev P, Oettgen HC, Rachid R, Chatila TA. Regulatory T cell reprogramming toward a Th2-cell-like

lineage impairs oral tolerance and promotes food allergy. *Immunity*. 2015;42(3):512-523

162. Nuriel-Ohayon M, Neuman H, Koren O (2016) Microbial changes during pregnancy, birth, and infancy. *Front Microbiol* 7:1031

163. Orivuori L, Mustonen K, de Goffau MC et al. High level of fecal calprotectin at age 2 months as a marker of intestinal inflammation predicts atopic dermatitis and asthma by age 6. *Clin Exp Allergy*. 2015 May;45(5):928-939

164. Osborne N.J., Koplin J.J., Martin P.E., Gurrin L.C., et al. Prevalence of challenge-proven IgE-mediated food allergy using population-based sampling and predetermined challenge criteria in infants. *J. Allergy Clin. Immunol*. 2011;127

165. Pan SJ, Kuo CH, Lam KP (2010) Probiotics and allergy in infants -an update review. *Pediatr Allergy Immunol* 21: 659-666

166. Pannaraj PS, Li F, Cerini C, Bender JM, Yang S, Rollie A, Adisetiyo H, Zabih S, Lincez PJ, Bittinger K, Bailey A, Bushman FD, Sleasman JW, Aldrovandi GM (2017) Association between breast milk bacterial communities and establishment and development of the infant gut microbiome. *JAMA Pediatr* 171:647-654

167. Panzani R: Cypress and food allergy: was it suspected in antiquity? *J Asthma* 1985;22; 223-226

168. Paparo L, Nocerino R, Bruno C, Di Scala C, Cosenza L, Bedogni G, Di Costanzo M, Mennini M, D'Argenio V, Salvatore F, Berni Canani R. Publisher correction: randomized controlled trial on the influence of dietary intervention on epigenetic mechanisms in children with cow's milk allergy: the EPICMA study. *Sci Rep*. 2019;9(1):9504

169. Park YJ, Oh EJ, Park JW, Kim M, Han K. Plasma eosinophilic cationic protein, interleukin-5 and ECP/Eo count ratio in patients with various eosinophilic diseases. *Ann Clin Lab Sci* 2006;36:262-6

170. Pelly V.S., Kannan Y., Coomes S.M., Entwistle L.J., Ruckerl D., Seddon B., MacDonald A.S., McKenzie A., Wilson M.S. IL-4-producing ILC2s are required for the

differentiation of TH2 cells following *Heligmosomoides polygyrus* infection. *Mucosal Immunol.* 2016;9:1407-1417

171. Penders J, Stobberingh EE, van den Brandt PA, Thijs C. The role of the intestinal microbiota in the development of atopic disorders. *Allergy.* 2007;62(11):1223-1236

172. Peona V, De Amici M, Quaglini S, Bellaviti G, Castellazzi AM, Marseglia G, Ciprandi G. Serum eosinophilic cationic protein: Is there a role in respiratory disorders? *J Asthma* 2010;47:131-4

173. Perkin MR, Logan K, Tseng A, et al; EAT study team. Randomised trial of introduction of allergenic food in breast-fed infants. *N Engl J Med.* 2016;374:1733-43

174. Perrigoue J.G., Saenz S.A., Siracusa M.C., Allenspach E.J., Taylor B.C., Giacomini P.R., Nair M.G., Du Y., Zaph C., van Rooijen N., et al. MHC class II-dependent basophil-CD4+ T cell interactions promote T(H)2 cytokine-dependent immunity. *Nat. Immunol.* 2009;10:697-705

175. Persaud RR, Azad MB, Chari RS, Sears MR, Becker AB, Kozyrskyj AL, the CHILD Study Investigators (2015) Perinatal antibiotic exposure of neonates in Canada and associated risk factors: a population-based study. *J Matern Fetal Neonatal Med* 28(10):1190-1195

176. Peterson GB, Eklund E, Yesuf T, Yngve R, Carlson M. A new method for quantification of neutrophil and eosinophil cationic protein in feces: Establishment of normal levels and clinical application in patients with inflammatory bowel diseases. *Am J Gastroenterol* 2002;97:1755-61

177. Petrus NCM, Henneman P, Venema A, Mul A, van Sinderen F, Haagmans M, Mook O, Hennekam RC, Sprickelman AB, Mannens M. Cow's milk allergy in Dutch children: an epigenetic pilot survey. *Clin Transl Allergy.* 2016;6:16

178. Ple C., Barrier M., Amniai L., Marquillies P., Bertout J., Tsicopoulos A., et al. Natural killer cells accumulate in lung-draining lymph nodes and regulate airway eosinophilia in a murine model of asthma *Scand J Immunol*, 72 (2) (2010), pp. 118-127

179. Plunkett CH, Nagler CR (2017) The influence of the microbiome on allergic sensitization to food. *J Immunol* 198(2):581-589
180. Prescott S, Allen K. Food allergy: riding the second wave of the allergy epidemic. *Pediatr Allergy Immunol*. 2011 Mar;22(2):155-60
181. Prince BT, Mandel MJ, Nadeau K et al (2015) Gut microbiome and the development of food allergy and allergic disease. *Pediatr Clin North Am* 62:1479-92
182. Rachid RA, Gerber G, Li N, Umetsu DT, Bry L, Chatila TA. Food allergy in infancy is associated with dysbiosis of the intestinal microbiota. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;137(2):235
183. Rautava S, Ruuskanen O, Ouwehand A, Salminen S, Isolauri E. The hygiene hypothesis of atopic disease--an extended version. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2004 Apr;38(4):378-388
184. Rimoldi M., Chieppa M., Salucci V., Avogadri F., Sonzogni A., Sampietro G.M., Nespoli A., Viale G., Allavena P., Rescigno M. Corrigendum: Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells. *Nat. Immunol*. 2015;16:326
185. Rios-Covian D, Ruas-Madiedo P, Margolles A, Gueimonde M, de Los Reyes-Gavilan CG, Salazar N. Intestinal short chain fatty acids and their link with diet and human health. *Front Microbiol*. 2016;7:185
186. Roca M., Rodriguez Varela A., Donat E., Cano F., Hervas D., Armisen A., Vaya M.J., Sjölander A., Ribes-Koninckx C. Fecal Calprotectin and Eosinophil-derived Neurotoxin in Healthy Children Between 0 and 12 Years. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr*. 2017;65(4):394-398
187. Rogier EW, Frantz AL, Bruno MEC, Wedlund L, Cohen DA, Stromberg AJ, Kaetzel CS (2014) Secretory antibodies in breast milk promote long-term intestinal homeostasis by regulating the gut microbiota and host gene expression. *Proc Natl Acad Sci* 111(8):3074-3079
188. Romagnani S. T-cell subsets (Th1 versus Th2) *Ann. Allergy Asthma Immunol*. 2000;85:9-18

189. Rondon C, Fernandez J, Canto G, Blanca M. Local allergic rhinitis: concept, clinical manifestations, and diagnostic approach. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2010;20:364-71
190. Roon AC, Karamountzos L, Purkayastha S, et al. Diagnostic precision of fecal calprotectin for inflammatory bowel disease and colorectal malignancy. *Am J Gastroenterol.* 2007;102:803-813
191. Rosenberg H.F., Dyer K.D., Foster P.S. Eosinophils: changing perspectives in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 2013;13(1):9-22
192. Rothenberg M.E. Eosinophilic gastrointestinal disorders (EGID) *J. Allergy Clin. Immunol.* 2004;113(1):11-28
193. Round JL, Mazmanian SK. Inducible Foxp3+ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010;107(27):12204-12209
194. Saarinen KM, Pelkonen AS, Makela MJ, Savilahti E. Clinical course and prognosis of cow's milk allergy are dependent on milk-specific IgE status. *J Allergy Clin Immunol.* 2005 Oct;116(4):869-875
195. Sackesen C, Sekerel BE, Orhan F, Kocabas CN, Tuncer A, Adalioglu G. The Etiology of Different Forms of Urticaria in Childhood. *Pediatr Dermatol.* 2004;21(2):102-108
196. Sampson HA, et al. Second symposium on the definition and management of anaphylaxis: summary report — Second National Institute of Allergy and Infectious Disease/Food Allergy and Anaphylaxis Network symposium. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2006;117:391-397
197. Santos AF, et al. Basophil activation test discriminates between allergy and tolerance in peanut-sensitized children. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2014;134:645-652
198. Savage JH, Lee-Sarwar KA, Sordillo J, Bunyavanich S, et al. (2018) A prospective microbiome-wide association study of food sensitization and food allergy in early childhood. *Allergy* 73(1):145-152

199. Schadewaldt H: Geschichte der Allergie. Deisenhofen, Dustri, 1983, vol 1, pp 403- 404
200. Schadewaldt H: Magen-Darmallergie; in Schadewaldt H (ed): Geschichte der Allergie. Deisenhofen, Dustri, 1983, vol 4, pp 37-51
201. Seo SC, Ahn SH, Ri S, Yoon Y, Byeon JH, Kim SH, Yoon W, Yoo Y.. Elevated fecal calprotectin levels are associated with severity of atopic dermatitis in children. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 2018 Jun;36(2):82-87
202. Sharief S, Jariwala S, Kumar J, Muntner P, Melamed ML. Vitamin D levels and food and environmental allergies in the United States: results from the National Health and Nutrition Examination Survey 2005-2006. *J Allergy Clin Immunol.* 2011 May;127(5):1195-1202
203. Shinoda K., Hirahara K., Nakayama T. Maintenance of pathogenic Th2 cells in allergic disorders. *Allergol. Int. Off. J. Jpn. Soc. Allergol.* 2017;66:369-376
204. Sicherer SH, Sampson HA (2018) Food allergy: a review and update on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, prevention, and management. *J Allergy Clin Immunol* 141:41-48
205. Sicherer SH, Sampson HA. Food allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125:S116-25
206. Sicherer SH, Sampson HA. Food allergy: Epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *J Allergy Clin Immunol.* 2014 Feb;133(2):291-307
207. Sidbury R, et al. Guidelines of care for the management of atopic dermatitis: section 4. Prevention of disease flares and use of adjunctive therapies and approaches. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2014;71:1218-1233
208. Smaldini PL, Orsini Delgado ML, Fossati CA, Docena GH. Orally-induced intestinal CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg controlled undesired responses towards oral antigens and effectively dampened food allergic reactions. *PLoS ONE.* 2015;10(10):e0141116

209. Soccol C. R., Prado M. R. M., Garcia L. M. B., Rodrigues C., Medeiros A. B. P., Soccol V. T. (2014) Current developments in probiotics. *J. Microb. Biochem. Technol.* 7, 11-20
210. Song H, Yoo Y, Hwang J, Na YC, Kim HS (2016) Faecalibacterium prausnitzii subspecies-level dysbiosis in the human gut microbiome underlying atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 137(3):852-860
211. Spergel JM. Non immunoglobulin e-mediated immune reactions to foods. *Allergy Asthma Clin. Immunol.* 2006;2:78-85
212. Stone KD, Prussin C, Metcalfe DD. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2010;125:S73-S80
213. Sugai T, Sakiyama Y, Matumoto S. Eosinophil cationic protein in peripheral blood of pediatric patients with allergic diseases. *Clin Exp Allergy.* 1992;22:275-81
214. Suratannon N, Ngamphaiboon J, Wongpiyabovorn J, Puripokai P, Chatchatee P. Component-resolved diagnostics for the evaluation of peanut allergy in a low-prevalence area. *Pediatr. Allergy Immunol.* 2013;24:665-670
215. Tamburini S, Shen N, Wu HC, Clemente JC. The microbiome in early life: implications for health outcomes. *Nat Med.* 2016;22(7):713-722
216. Tang M.L., Lahtinen S.J., Boyle R.J. Probiotics and prebiotics: Clinical effects in allergic disease. *Curr. Opin. Pediatr.* 2010;22:626-634
217. Taniuchi S. Serum eosinophil derived neurotoxin may reflect more strongly disease severity in childhood atopic dermatitis than eosinophil cationic protein. *J. Dermatol. Sci.* 2001;26(1):79-82
218. Thomsen SF. Epidemiology and natural history of atopic diseases. *Eur. Clin. Respir. J.* 2015;2:24642
219. Tibble JA, Sigthorsson G, Foster R, Forgacs I, Bjarnason I. Use of surrogate markers of inflammation and Rome criteria to distinguish organic from nonorganic intestinal disease. *Gastroenterology.* 2002;123:450-460
220. Toit G, Sampson HA, Plaut M et al (2016) Prevention of food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 137:998-1010

221. Tomassini M, Tsicopoulos A, Tai PC, Gruart V, Tonnel AB, Prin L, et al. Release of granule proteins by eosinophils from allergic and nonallergic patients with eosinophilia on immunoglobulin-dependent activation. *J Allergy Clin Immunol.* 1991;88:365-75
222. Tuano KS, Davis CM. Utility of component-resolved diagnostics in food allergy. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 2015;15:32
223. Van de Veen W, Stanic B, Wirz OF, Jansen K, Globinska A, Akdis M. Role of regulatory B cells in immune tolerance to allergens and beyond. *J Allergy Clin Immunol.* 2016;138(3):654-665
224. Velmurugan G. Gut microbiota in toxicological risk assessment of drugs and chemicals: the need of hour. *Gut Microbes.* 2018;9(5):465-468
225. Viljanen M., Savilahti E., Haahtela T. et al. Probiotics in the treatment of atopic eczema/dermatitis syndrome in infants: a double-blind placebo-controlled trial. *Allergy.* 2005; 60(4): 494-500
226. Wada T., Toma T., Muraoka M., Matsuda Y., & Yachie A. (2014). Elevation of fecal eosinophil-derived neurotoxin in infants with food protein-induced enterocolitis syndrome. *Pediatric Allergy and Immunology*, 617-619
227. Waligora-Dupriet AJ, Campeotto F, Romero K, Mangin I, et al. Diversity of gut Bifidobacterium species is not altered between allergic and non-allergic French infants. *Anaerobe.* 2011;17:91-6
228. Walker WA, Iyengar RS. Breast milk, microbiota, and intestinal immune homeostasis. *Pediatr Res.* 2015;77(1-2):220-228
229. Waugh N, Cummins E, Royle P, et al. Faecal calprotectin testing for differentiating amongst inflammatory and non-inflammatory bowel diseases: systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess.* 2013;17:xv-xix. 1-211
230. Weisse K, Winkler S, Hirche F, et al. Maternal and newborn vitamin D status and its impact on food allergy development in the German LINA cohort study. *Allergy.* 2013 Feb;68(2):220-228

231. Widlak MM, Thomas CL, Thomas MG, Tomkins C, Smith S, O'Connell N, et al. Diagnostic accuracy of faecal biomarkers in detecting colorectal cancer and adenoma in symptomatic patients. *Aliment Pharmacol Ther.* 2017;45:354-63
232. Wingett D., Nielson C.P. Divergence in NK cell and cyclic AMP regulation of T cell CD40L expression in asthmatic subjects. *J Leukoc Biol*, 74 (4) (2003), pp. 531-541
233. Wold AE. The hygiene hypothesis revised: is the rising frequency of allergy due to changes in the intestinal flora? *Allergy.* 1998;53(46 Suppl):20–25
234. Woo Y., Jeong D., Chung D.H., Kim H.Y. The roles of innate lymphoid cells in the development of asthma. *Immune Netw.* 2014;14:171-181
235. Wright BL, et al. Component-resolved analysis of IgA, IgE, and IgG4 during egg OIT identifies markers associated with sustained unresponsiveness. *Allergy.* 2016;71:1552-1560
236. Yamashita H, Matsuhara H, Miotani S, Sako Y, Matsui T, Tanaka H, Inagaki N. Artificial sweeteners and mixture of food additives cause to break oral tolerance and induce food allergy in murine oral tolerance model for food allergy. *Clin Exp Allergy.* 2017;47(9):1204-1213
237. Yang D. Eosinophil-derived neurotoxin (EDN), an antimicrobial protein with chemotactic activities for dendritic cells. *Blood.* 2003;102(9):3396-3403
238. Yang Z, Clark N, Park KT. Effectiveness and cost-effectiveness of measuring fecal calprotectin in diagnosis of inflammatory bowel disease in adults and children. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2014;12:253-62
239. Yoshioka H, Iseki K, Fujita K. Development and differences of intestinal flora in the neonatal period in breast-fed and bottle-fed infants. *Pediatrics.* 1983;72(3):317-321
240. Zhang J, Su H, Li Q, Wu H, Liu M, Huang J, Zeng M, Zheng Y, Sun X. Oral administration of *Clostridium butyricum* CGMCC0313-1 inhibits beta-lactoglobulin-induced intestinal anaphylaxis in a mouse model of food allergy. *Gut Pathog.* 2017;9:11

241. Zhong H., Fan X.L., Yu Q.N., Qin Z.L., Chen D., Xu R., Chen D.H., Lin Z.B., Wen W., Fu Q.L. Increased innate type 2 immune response in house dust mite-allergic patients with allergic rhinitis. *Clin. Immunol.* 2017;183:293-299

242. Zuo L, Rothenberg ME. Gastrointestinal eosinophilia. *Immunol. Allergy Clin. North Am.* 2007;27:443-455