

ЛИТЕРАТУРА

1. Андерсен Л., Норгаард А., Беннедсен М. // Рос. журнал гастроэнтерологии, гепатологии и колонопроктологии.— 1999.— Т. 10, № 2.— С. 22—25.
2. Детская гастроэнтерология / Под ред. А.А. Баранова, Е.В. Климанской, Г.В. Римарчук.— М., 2002.— 587 с.
3. Neimella S., Karttunen T., Kerola T. // J.Clin. Pathol.— 1995.— Vol. 48.— P. 698—701.
4. Stolte M., Eidt S. // J.Clin. Pathol.— 1989.— Vol. 42.— P. 1269—1271.
5. Пасечников В.Д., Чуков С.З. // Клин. мед.— 2000.— Т. 78, № 11.— С. 9—13.
6. Crabtree J.E. // Scand. J. Gastroenter.— 1996.— Vol. 31.— Suppl. 215.— P. 3—10.
7. Логинов А.С., Аруин Л.И., Ильченко А.А. Язвенная болезнь и *Helicobacter pylori*. Новые аспекты патогенетической терапии.— М., 1993.— С. 229.
8. Морозов И.А. // Рос. журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колонопроктологии.— 1999.— Т. 10, № 2.— С. 46—48.
9. Cammarota G., Tussi A., De Marinisi // Scand. J. Gastroenter.— 1997.— Vol. 32, № 9.— P. 869—872.

© Коллектив авторов, 2006

А.Н. Гуреев, С.С. Хромова, Л.Н. Цветкова, Н.П. Ванеева, Н.Е. Ястребова

РОЛЬ ИММУННЫХ МЕХАНИЗМОВ В РАЗВИТИИ ЯЗВЕННОЙ БОЛЕЗНИ ДВЕНАДЦАТИПЕРСТНОЙ КИШКИ У ДЕТЕЙ

Российский государственный медицинский университет, НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва

При клиническом обследовании и оценке иммунного статуса 60 детей с язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки (ЯБДК) было установлено, что воспаление и деструктивный процесс ассоциируются с высоким уровнем антител (АТ) к представителям нормальной микрофлоры, включая лактобактерии, а также превышающим норму уровнем АТ к тканевым антигенам (коллаген, эластин, структуры систем органов желудочно-кишечного тракта). Наряду с этим у больных выявлены изменения регуляторных цитокинов TGFβ1 и IL10. Результаты предполагают, что ключевую роль в развитии ЯБДК у детей играют нарушения процесса иммунорегуляции, в том числе аутоиммунного характера.

Clinical examination of 60 children with duodenal ulcer (DU) and estimation of their immune state showed that presence of inflammation and destructive process were associated with high level of antibodies (AB) to normal microflora, including Lactobacteria, and also with increased AB level to tissue antigens of gastrointestinal tract (collagen, elastin). Along with these changes patients had changes in level of regulatory cytokines TGFβ1 and IL10. Results of study suppose that disorders of immune regulation, including autoimmune reactions, plays the main role in development of pediatric DU.

При диагностическом обследовании детей с язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки (ЯБДК) отмечают развитие хронического воспаления и признаки деструктивного процесса. В 80—95% случаев развитие ЯБДК ассоциировано с течением инфекционного процесса в слизистой оболочке верхних отделов желудочно-кишечного тракта, обусловленного *Helicobacter pylori* (НР). В 95% случаев отмечается хроническое течение ЯБДК.

Известно, что в патогенез заболевания вовлекаются факторы естественного и адаптивного иммунитета. Инфекция, вызванная НР, инициирует активацию фагоцитов, распознавание лиганд патогена через TLR-рецепторы 4-го типа (TLR4) с последующим синтезом хемокина IL8 [1], усиленным хемотаксисом клеток в очаг поражения и продукцией свободных радикалов [2].

Цитотоксические Т-лимфоциты путем экспрессии перфорина/гранзима В могут вызывать апоптоз клеток и деструктивные процессы в тканях, даже независимо от НР-инфекции [3]. Повреждающий эффект связан также с действием белков НР, кодируемых генами *capA*, *vacA*, *iceA*, *babA* [4], в частности, белков-поринов [5].

В данной работе мы исходили из концепции, что ключевую роль в развитии ЯБДК у детей играют нарушения процесса иммунорегуляции, в том числе аутоиммунного характера, с участием следующих механизмов:

- появление измененных тканевых антигенов (АГ) в очаге местного воспаления, их возможный транспорт из активированных фагоцитов в лимфоидные органы с последующим ответом Т-эффекторов на собственные АГ и участием Т-хелперов (Th) в продукции В-клетками аутоантител;

- дисбаланс в системе цитокинов с преобладанием провоспалительных цитокинов, что может индуцировать экспрессию на клетках тканей молекул МНС II класса (пептиды) и вызвать иммунный ответ на собственные АГ;

- отмена («срыв») толерантности к нормальной микрофлоре желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), в частности, к ее индигенной популяции.

Цель исследования состояла в изучении возможной роли аутоиммунных механизмов в развитии ЯБДК у детей на основе определения спектра антител (АТ) к бактериальным и тканевым АГ, а также уровня регуляторных цитокинов TGF β 1 и IL10.

Материалы и методы исследования

Под нашим наблюдением находились 60 детей с ЯБДК в возрасте от 7 до 16 лет, из них 51 мальчик и 9 девочек.

Диагноз ЯБДК был установлен на основании клинико-эндоскопических критериев с использованием общепринятой классификации активности язвенного процесса. НР-инфекцию идентифицировали при помощи дыхательного уреазного теста и полимеразной цепной реакции (ПЦР).

В контрольную группу были включены 20 детей, не страдающих хроническими инфекциями или патологией ЖКТ. В качестве отрицательного контроля был также использован суммарный показатель, полученный при анализе пула сывороток здоровых доноров, содержащий анализируемые АТ ниже диагностического уровня.

Методом иммуноферментного анализа (ИФА) в сыворотках крови детей определяли концентрацию цитокинов TGF β 1 и IL10, а также уровни АТ к препаратам клеточной стенки бактерий [6] и тканевым АГ (органоспецифические коммерческие препараты ДНК, эластина и коллагена; микросомальные субклеточные фракции органов, включая ткани тонкой и толстой кишки, слизистой и мышечной ткани желудка, печени, поджелудочной железы) [7].

Оптическую плотность (ОП, 450 нм) определяли на спектрофотометре «Multiskan». Результаты представляли как в значениях ОП, так и в виде условных единиц (ue/ml). Статистическую обработку данных осуществляли при помощи критерия Стьюдента с учетом таких параметров, как дисперсия выборки, эксцесс, асимметричность, уровень надежности и др.

Результаты и их обсуждение

Определение IgG-антител к бактериальным антигенам. Сыворотки больных были тестированы на присутствие АТ к структуре клеточной стенки грамположительных (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus fermentum*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Micrococcus luteus*) и грамотрицательных бактерий (*E. coli*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia enterocolitica*).

Установлено, что в сыворотках детей с ЯБДК содержатся антибактериальные АТ класса IgG, уровень которых достоверно отличается от показателей контроля. Так, АТ выявлялись примерно в 30% случаев к АГ *S. aureus*, в 20% случаев — к АГ

P. mirabilis, в 15% случаев — к АГ *M. luteus*, примерно у 13% больных были выявлены АТ к АГ *Y. enterocolitica*.

Отметим две важные характеристики этих АТ: 1) это ответ на АГ условно-патогенных бактерий, составляющих нормальную микрофлору организма; 2) это АТ IgG-класса, что указывает на вторичный ответ, причем на уровне ЖКТ. В-лимфоцитарные клетки продуцируют АТ в основном IgA-природы. Наряду с этим, у детей обнаружены АТ к НР. На основе клинических критериев и эндоскопической картины обследуемые дети были разделены на 2 группы: группа А — 29 детей с ЯБДК в стадии обострения; группа Б — 24 детей с ремиссией ЯБДК.

АТ к АГ *S. aureus* выявлены у 4 из 29 обследованных группы А в количестве от 49,12 до 64,65 ue/ml, что было достоверно выше среднего показателя в контроле (17,54 ue/ml). У детей группы Б достоверные отличия содержания этих АТ выявлены у 7 из 24 обследованных, их средний уровень составил 59,6 \pm 6,7 ue/ml.

АТ к АГ *P. mirabilis* достоверно отличались от контроля у 9 детей: у 6 детей с обострением ЯБДК их уровень составил 77,66 \pm 12,9 ue/ml, у 3 детей с ремиссией ЯБДК этот показатель находился в пределах от 74,56 до 105,3 ue/ml.

Уровень АТ к АГ *Y. enterocolitica* превышал показатели контроля у 7 обследованных и составил в группе А от 53,55 до 62,84 ue/ml, у детей группы Б — от 60,95 до 67,62 ue/ml.

АТ к *E. coli* были выявлены у 2 детей группы А — 47,78 и 55 ue/ml. Следует подчеркнуть, что в целом ряде случаев у детей с ЯБДК отмечена тенденция к повышению уровня исследуемых АТ относительно контроля (недостоверные отличия). Выявлены также случаи, когда показатели были ниже отрицательного контроля.

Особый интерес вызывал вопрос о продукции АТ к лактобактериям, представителям индигенной популяции нормальной микрофлоры, которые, как известно, проявляют слабо выраженную иммуногенность.

В сыворотках 50% детей с ЯБДК уровни АТ к АГ *Lactobacillus acidophilus* превышали показатель контроля. Средний уровень этих АТ составил у 12 детей с обострением ЯБДК 106,6 \pm 59 ue/ml, у 10 детей с ремиссией ЯБДК — 104,5 \pm 67 ue/ml. У некоторых детей выявлены повышенные уровни АТ, но относительно контроля отличия оказались недостоверными.

В сыворотках 20% детей с ЯБДК уровни АТ к АГ *L. fermentum* превышали показатель контроля: у 2 детей с обострением ЯБДК их уровень составил 60,9 и 72,02 ue/ml, у 7 детей с ремиссией ЯБДК их средний уровень составил 70,19 \pm 16,9 ue/ml.

Полученные данные предполагают, что при ЯБДК происходит отмена («срыв») толерантности к представителям сбалансированной индигенной микрофлоры, что ассоциируется с нарушением системы распознавания (сигнальный путь трансдукции) и селек-

тивного ответа на АГ микроорганизмов, снижением колонизационной резистентности индигенной популяции и развитием дисбиоза. Вероятно, это является признаком аутоиммунного расстройства. Однако, нельзя исключить, что данные антибактериальные АТ — это признак повышенной инфицированности, действия перекрестно-реагирующих АГ или «суперантигенов», которые вызывают поликлональную активацию и запускают иммунный ответ по ложному пути.

Определение IgG-антител к тканевым антигенам. При исследовании АТ к препарату эластина положительные реакции были выявлены у 2 детей: при ЯБДК в стадии обострения (группа А) показатель составил 94,44 ue/ml, при ремиссии ЯБДК (группа Б) — 72,22 U ue/ml.

АТ к препарату коллагена выявлены у 2 детей группы А — 100 и 116,67 ue/ml, а также у 2 детей группы Б — 102 ue/ml.

Достоверное повышение уровня АТ к препарату тонкой кишки обнаружено у одного больного с ремиссией ЯБДК, к препарату толстой кишки — у 2 детей группы А (73,61 и 113,89 ue/ml) и одного ребенка группы Б (120,54 ue/ml), к препарату мышечной ткани желудка — у 2 детей с ремиссией ЯБДК (75,00 и 76,14 ue/ml). В отличие от этого, не были выявлены достоверные отличия по сравнению с контролем при исследовании АТ к препаратам нативной и денатурированной ДНК, поджелудочной железы и печени.

Сравнительный анализ данных, полученных при обследовании одного и того же больного, показал, что у $2/3$ детей одновременно выявлялись положительные реакции с 4—7 указанными бактериальными АГ и только у $1/3$ детей — реакции с 2—3 тканевыми АГ.

У многих обследованных детей в сыворотке выявляли АТ к бактериальным и тканевым АГ, что может служить указанием на степень выраженности воспалительного и/или деструктивного процесса.

При сопоставлении клинических и иммунологических данных отмечено следующее: 1) положительные тесты на присутствие НР (дыхательный уреазный тест и ПЦР) ассоциируются с выработкой АТ к *Lactobacillus*; 2) эрозивные процессы (эзофагит, гастрит, бульбит) сопровождаются выработкой АТ к широкому спектру бактериальных АГ; 3) АТ к структуре коллагена, АГ тонкой и толстой кишки, мышечной ткани желудка выявлены у подростка 15 лет с ЯБДК в стадии ремиссии и полипом желудка.

Определение концентрации цитокинов TGFβ1 и IL10. Обоснованием выбора для исследования этих цитокинов послужил тот факт, что при язвенной болезни в основном обращают внимание на уровни провоспалительных цитокинов [1, 4], данные о регуляторных факторах практически отсутствуют.

Продуцентами трансформирующего фактора роста TGFβ1 являются разные типы клеток, в том числе макрофаги и моноциты. Особая роль этого цитокина состоит в супрессии аутоиммунных процессов и подавлении провоспалительных интерлейкинов [8].

Цитокин IL10, продуцентами которого являются Т_H-субпопуляция регуляторных Т-лимфоцитов [9], подавляет синтез провоспалительных цитокинов.

В данном исследовании установлено, что при ЯБДК у детей уровень TGFβ1 значительно превышает норму и составляет от 12 800 до 22 000 пкг/мл. У детей контрольной группы уровень этого цитокина в сыворотке крови также был достаточно высоким по сравнению с нормой взрослых лиц и составил около 6 000 пкг/мл.

Концентрация IL10 у детей контрольной группы была на очень низком уровне и соответствовала показателю менее 1 пкг/мл. Однако на фоне выраженного воспаления у значительной группы детей с ЯБДК уровень этого цитокина был снижен и лишь в отдельных случаях достигал значения 5 пкг/мл. Как продуцент регуляторных Т_H-клеток, IL10 демонстрирует недостаточность регуляторного звена иммунной системы, что ассоциируется с нарушением механизмов иммунорегуляции при ЯБДК у детей и развитием деструктивного процесса аутоиммунного характера.

Заключение

Таким образом, выявление АТ к препаратам клеточных стенок бактерий, которые составляют нормальную микрофлору организма, в том числе к структурам *Lactobacillus*, ассоциируется у обследованных больных с продукцией АТ к тканевым АГ, что указывает на возможные нарушения аутоиммунного характера.

Наряду с этим, повышение уровня супрессирующего фактора TGFβ1, сдерживающего аутоиммунные процессы, а также в ряде случаев и регуляторного фактора IL10, антагониста провоспалительных цитокинов, отражает функциональную активность факторов защиты детского организма, что может быть использовано в диагностических целях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Yamaoka Y., Kikuchi S., El-Zimaity H.M.T. et al. // *Gastroenterol.*— 2002.— Vol. 123.— P. 414—424.
2. Shimoyama T., Fukuda S., Liu Q. et al. // *Helicobacter.*— 2002.— Vol. 7, № 8.— P. 170—174.
3. Ohara T., Morishita T., Suzuki H. et al. // *Hepatogastroenter.*— 2003.— Vol. 50, № 54.— P. 1774—1779.
4. Ernst P.B., Takaishi H., Grove S.E. // *Dig.Dis.*— 2001.— Vol. 19.— P. 104—111.
5. Tufano M.A., Rossano F., Catalanotti P. et al. // *Infect. Immun.*— 1994.— Vol. 4.— P. 1392—1399.
6. Ястребова Н.Е., Ванеева Н.П., Цветкова Н.В. // *Аллергия, астма и клинич. иммунол.*— 1999.— № 9.— С. 148—151.
7. Ястребова Н.Е., Ванеева Н.П., Романова Р.Ю. // *Ж. микроб.*— 1996.— № 6.— С. 67—68.
8. Flanders K.C., Burmester J.K. // *Clin. Med. Res.*— 2003.— Vol. 1, № 1.— P. 13—20.
9. Asserman C., Powrie F. // *Gut.*— 1998.— Vol. 42.— P. 157—158.