

© Коллектив авторов, 2008

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

ИММУНОРЕГУЛЯЦИЯ В РАЗВИТИИ ЯЗВЕННОЙ БОЛЕЗНИ ДВЕНАДЦАТИПЕРСТНОЙ КИШКИ У ДЕТЕЙ

ГОУ ВПО РГМУ Росздрава, ГУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва

При клиническом обследовании и оценке иммунного статуса 103 детей с язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки (ЯБДПК) было установлено, что воспаление и деструктивный процесс ассоциируются с изменениями баланса цитокинов (IL10, TGFβ1, IL12 и IFNγ). Наряду с этим у больных выявлен превышающий норму уровень антител (АТ) к тканевым антигенам (коллаген, эластин, структуры органов желудочно-кишечного тракта) и высокий уровень АТ к представителям нормальной микрофлоры, включая лактобактерии. Результаты предполагают, что ключевую роль в развитии ЯБДПК у детей играют нарушения процессов иммунорегуляции, в том числе аутоиммунного характера.

Clinical examination of 103 children with duodenal ulcer (DU) and estimation of their immune state showed that presence of inflammation and destructive process were associated with changes in functional state of cytokines (IL10, TGFβ1, IL12 and IFNγ). In addition patients had increased level of antibodies (AB) to tissues antigens (collagen, elastin, structures of gastrointestinal tract) and also with high AB level to normal microflora, including *Lactobacteria*. Results of study suggest that a disorder of immune regulation, including autoimmune reactions, plays the main role in development of pediatric DU.

Язвенная болезнь (ЯБ) двенадцатиперстной кишки (ДПК) является широко распространенным в мире заболеванием. Развитие и хроническое течение ЯБДПК в 80–95% случаев ассоциировано с течением инфекционного процесса в слизистой оболочке (СО) верхних отделов пищеварительного тракта (ВОПТ), обусловленного *Helicobacter pylori* (НР).

В настоящее время осуществляется поиск новых методов воздействия на течение ЯБДПК и одним из перспективных направлений служат исследования, направленные на изучение особенностей реагирования иммунной системы при данном заболевании [1, 2]. В патогенез ЯБДПК вовлекаются факторы естественного и адаптивного иммунитета. Под действием НР в СО ВОПТ происходят активация фагоцитирующих клеток, распознавание лигандов патогена с помощью Toll-подобных рецепторов 4-го типа (TLR4) с повышением синтеза хемокина IL8 [3], активацией продукции активных форм кислорода (АФК) и усилением хемотаксиса иммуноактивных клеток в очаг поражения [4]. Повреждающее действие НР на СО также вызвано действием белков, кодируемых *capA*, *vacA*, *iceA*, *babA*, *ureI*, белков-поринов и воздействием стимулирующего дуоденальную язву гена НР (duodenal ulcer promoting gene – *dupA*), который к тому же играет большую роль в продукции IL8 эпителиальными клетками [5–7].

Целью исследования явилось изучение роли факторов естественного и адаптивного иммунитета в развитии ЯБДПК у детей на основе оценки баланса регуляторных (IL10, TGFβ1) цитокинов и цитокинов, принимающих участие в воспалитель-

ном/иммунном ответе (IL12, IFNγ), продукции IgG-антител к органонеспецифическим (ДНК, эластин, коллаген) и органоспецифическим тканевым антигенам, включая структуры тканей желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), антигенам условно-патогенных бактерий (УПБ) представителей индигенной микрофлоры (ИМФ).

Материалы и методы исследования

Под нашим наблюдением находились 103 ребенка с ЯБДПК в возрасте от 7 до 18 лет (средний возраст 13,9±0,47 лет), из них 90 мальчиков и 13 девочек, проходивших обследование и лечение в гастроэнтерологическом отделении (зав. отделением – заслуженный врач РФ Л.В. Нечаева) Измайловской ДГКБ (главный врач – А.П. Жарков) с последующим динамическим наблюдением в период с 2004 по 2007 гг. (основная группа).

Для оценки результатов иммунологического обследования детей с ЯБДПК была создана группа сравнения, которую составили 20 детей (13 мальчиков и 7 девочек) в возрасте от 7 до 18 лет (средний возраст 12,75±1,32 лет), проходивших обследование и лечение по поводу хронических заболеваний ВОПТ без эрозивных и язвенных изменений.

Для суждения об отклонении показателей от нормы была сформирована группа контроля, состоящая из здоровых детей, не имеющих при прохождении ими диспансерного обследования заболеваний органов пищеварения.

Диагноз ЯБДПК устанавливали на основе клинико-эндоскопических критериев с использованием общепринятой классификации активности язвенного про-

песса. Выявление инфицированности НР у детей основной группы и группы сравнения проводили с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) содержания IgG в сыворотке крови, полимеразной цепной реакции (ПЦР) и дыхательного уреазного теста. Определение концентрации IL в сыворотке крови проводили методом ИФА с использованием тест-системы BioSource International (Бельгия). Определение содержания аутоантител IgG к органоспецифическим и органонеспецифическим антигенам и клеточным стенкам бактерий [8] проводили методом ИФА с применением коммерческих и оригинальных диагностических наборов, изготовленных в ГУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова. Оптическую плотность (ОП, 450 нм) определяли на спектрофотометре «Multyskan». Результат выражали в единицах (У).

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

Анализ инфицированности НР обследованных детей. При обследовании детей ифицированность НР была выявлена у 70% больных основной группы и 60% – группы сравнения.

Анализ содержания цитокинов IL10, IL12, IFN γ , TGF β 1 в сыворотке крови детей. Большинство исследователей основное внимание при ЯБ уделяют содержанию провоспалительных цитокинов [3, 6]. Выбор нами для исследования представленных цитокинов обусловлен тем, что, по нашему мнению, они более точно отражают состояние регуляции естественного иммунитета, а исследования по изучению их содержания у детей с ЯБДПК практически отсутствуют.

IL10 рассматривают в качестве фактора роста для популяции регуляторных Т-клеток. Этот цитокин участвует в механизме поддержания периферической толерантности и отрицательной регуляции (downregulation) патологического иммунного ответа [9–11]. В норме у здоровых доноров уровень IL10 в сыворотке крови обычно не превышает 10 пг/мл.

У детей контрольной группы концентрация IL10 составила $4,2 \pm 0,7$ пг/мл, а у детей группы сравнения – $3,7 \pm 0,4$ пг/мл ($p > 0,1$). У обследованных детей с ЯБДПК содержание IL10 в сыворотке составило $0,8 \pm 0,3$ пг/мл. У всех детей отмечалось наличие ассоциации язвенного процесса с НР-инфекцией, при этом статистическая значимость различий уровня IL10 в сыворотке крови детей основной группы с контрольной группой и группой сравнения была высокой ($p < 0,01$).

Продуцентами трансформирующего фактора роста TGF β 1 являются разные типы клеток, в том числе макрофаги и моноциты. Обоснованием к исследованию уровня TGF β 1 послужили данные об участии этого цитокина в супрессии иммунного ответа, в частности при аутоиммунных нарушениях [12–14].

В данном исследовании содержание TGF β 1 в сыворотке контрольной группы детей составило 6950 ± 1100 пг/мл, а у детей группы сравнения 9540 ± 1100 пг/мл ($p < 0,05$). У обследованных детей с обострением ЯБДК, ассоциированной с НР, были получены данные, указывающие на значительное превышение уровня этого цитокина, который составил $15\ 300 \pm 1340$ пг/мл (по сравнению с группой контроля и сравнения $p < 0,01$). При ремиссии язвенного процесса после успешной эрадикационной терапии уровень TGF β 1 статистически значимо снижался по сравнению с данными при обострении ЯБ и составил 8700 ± 800 пг/мл ($p < 0,05$). Значения TGF β 1 у детей с ремиссией ЯБДПК не отличались от значений в группе сравнения ($p > 0,1$), а их отличие от группы контроля незначительное ($p > 0,05$).

IL12, продуцентами которого являются активированные макрофаги, стимулирует на начальном этапе инфекции NK-клетки, а затем и Т-клетки в направлении синтеза IFN γ . Для продукции IL12 необходима передача сигнала через Toll-подобные рецепторы. Отсюда следует, что синтез и активность цитокинов в процессе иммунорегуляции зависит от нормальной функции фагоцитарных клеток.

Было установлено, что у детей контрольной группы концентрация IL12 составила $299 \pm 50,7$ пг/мл, а у детей группы сравнения – $280 \pm 65,7$ пг/мл ($p > 0,1$). Проведенные исследования показали, что при ЯБДПК у детей возможна ассоциация содержания IL12 с клиническими данными. В период обострения язвенного процесса содержание IL12 составило $143,9 \pm 23,7$ пг/мл, что свидетельствует о значимом снижении концентрации этого цитокина в сыворотке крови по сравнению с контрольной группой и группой сравнения ($p < 0,02$). После проведения эрадикационной терапии при контрольном обследовании через 6 месяцев у детей с ремиссией ЯБДПК отмечена тенденция к восстановлению уровня IL12 – $282,6 \pm 62,5$ пг/мл (при сравнении с контрольной группой и группой сравнения $p > 0,1$). Мы отметили некоторое различие содержания IL12 у детей с обострением и ремиссией ЯБДПК, хотя оно статистически незначимо ($p > 0,05$).

У большинства детей с обострением ЯБДПК уровень IFN γ в сыворотке крови в среднем составлял $0,92 \pm 0,44$ пг/мл, а при ремиссии значимо повышался до $8,2 \pm 2,4$ пг/мл ($p < 0,01$), приближаясь к показателям в контрольной группе ($7,5 \pm 1,87$ пг/мл). У детей группы сравнения уровень IFN γ соответствовал значениям $4,9 \pm 2,07$ пг/мл. Различий в группах контроля, сравнения и ремиссии язвенного процесса не выявлено ($p > 0,1$).

Известно, что IL12 продуцируется активированными макрофагами, которые индуцируют NK- и Т-клетки в направлении синтеза IFN γ . НР может служить пусковым звеном повышения или опосредованного снижения выработки ряда цитоки-

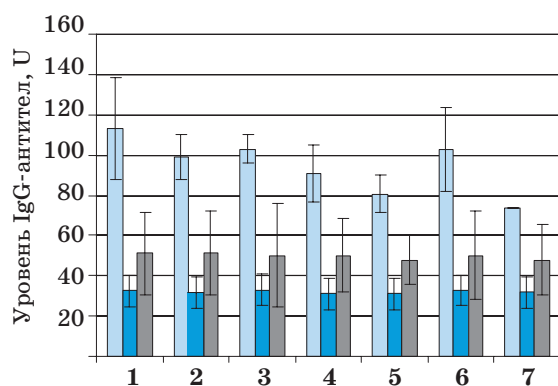


Рис. 1. Уровень IgG-антител к тканевым антигенам у обследованных детей.

Здесь и на рис. 2: ■ – больные ЯБДК, ■ – группа сравнения, ■ – отрицательный контроль; 1 – эластин, 2 – коллаген, 3 – ДНК денатурированная, 4 – поджелудочная железа, 5 – желудок (мышечная ткань), 6 – толстая кишка, 7 – тонкая кишка.

нов, в том числе IL12. Снижение по сравнению с контролем IL12 у больных ЯБДПК объясняет низкий уровень IFN γ .

Определение IgG-антител к тканевым антигенам. Нами проведено исследование концентрации IgG-антител к тканевым органоспецифическим (ДНК, эластин, коллаген) и органоспецифическим антигенам тканей ЖКТ. В качестве сравнительного контроля использовали сыворотки отрицательного контроля диагностических наборов. Полученные данные представлены на рис. 1.

При ЯБДПК у детей отмечается увеличение концентрации IgG-антител к тканевым антигенам у 3–15% больных.

Представленные изменения имели место как при обострении, так и в меньшей степени при ремиссии язвенного процесса. При обострении ЯБДПК концентрация IgG-антител была значимо повышена по сравнению с показателями отрица-

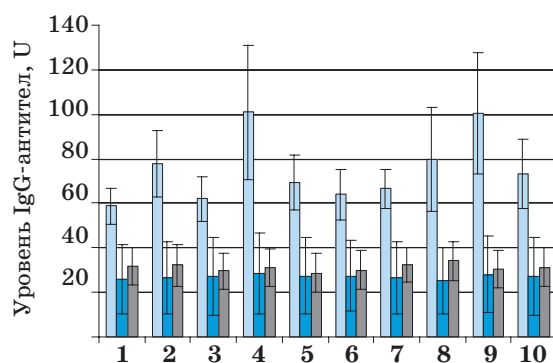


Рис. 2. Уровень IgG-антител к бактериальным антигенам у обследованных детей.

1 – *Staphylococcus aureus*, 2 – *Proteus mirabilis*, 3 – *Klebsiella pneumoniae*, 4 – *Micrococcus lysodeiteticus*, 5 – *Micrococcus luteus*, 6 – *Yersinia enterocolitica*, 7 – *Haemophilus influenzae*, 8 – *Streptococcus pneumoniae*, 9 – *Lactobacillus acidophilus*, 10 – *Lactobacillus fermentum*.

тельного контроля ($p < 0,05$) и группы сравнения ($p < 0,05$) и составила от 72,2 до 169 U. У больных с ремиссией ЯБДПК содержание антител снижалось, приближаясь к показателям отрицательного контроля ($p > 0,1$), и составило в среднем $78 \pm 3,8$ U.

Выявление повышенных уровней IgG к органоспецифическим и органоспецифическим антигенам у детей с ЯБ свидетельствует о роли аутоиммунного процесса в патогенезе заболевания.

Определение IgG-антител к бактериальным антигенам. Нами проводилось определение уровня IgG-антител к антигенам клеточных стенок бактерий. В качестве отрицательного контроля использовали сыворотки отрицательного контроля диагностических наборов. Полученные результаты представлены на рис. 2.

У больных ЯБДПК нами выявлено повышение уровня IgG-антител к бактериальным антигенам (в 12% случаев к *Staphylococcus aureus*, в 9% – к *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* и *Micrococcus lysodeiteticus*, в 7% – к *Yersinia enterocolitica* и *Haemophilus influenzae*, в 5% – к *Streptococcus pneumoniae*). Уровень IgG-антител у больных соответствовал значениям 60–130 U и был значимо ($p < 0,05$) выше, чем в группе сравнения и в отрицательном контроле. Нами отмечено повышение у детей с ЯБДПК уровня антител к компонентам ИМФ: к *Lactobacillus acidophilus* – у 21% и к *Lactobacillus fermentum* – у 10% больных.

Полученные данные о повышении уровня IgG к бактериальным антигенам у больных ЯБДПК предполагают отмену при этой патологии иммунологической толерантности к представителям ИМФ, что ассоциируется с расстройством системы распознавания и селективного ответа на антигены микроорганизмов, снижением колонизационной резистентности индигенной популяции и развитием дисбиоза. Полученные данные являются признаком аутоиммунного расстройства, но могут свидетельствовать о повышенной инфицированности СО ЖКТ, действию перекрестно-реагирующих антигенов или «суперантигенов», вызывающих поликлональную активацию и запускающих иммунный ответ по ложному пути.

Заключение

Цитокиновый профиль сыворотки периферической крови у детей с ЯБДПК свидетельствует о нарушении в системе цитокинов IL10 и TGF γ , продуцентами которых являются Т-регуляторные клетки Treg CD4+CD25+ и Treg1/Th3, а также о дисбалансе цитокинов, связанных с активацией макрофагов (IL12), Т- и NK-клеток (IFN γ). При ЯБДПК у детей установлена продукция антител класса IgG к структурам клеточных стенок УПБ, являющихся представителями нормальной микрофлоры ЖКТ, что может свидетельствовать об отмене толерантности к нормальной микрофлоре при язвенном процессе. Выявленная у детей с ЯБДПК продукция антител класса IgG к структу-

рам тканей организма и антигенам тканей ЖКТ может служить указанием на развитие аутоиммунного процесса при данной патологии.

Таким образом, развитие ЯБДПК у детей протекает с нарушением процессов иммунорегуля-

ции, проявляющимся формированием расстройства цитокинового статуса, отменой толерантности к компонентам нормальной микрофлоры и развитием аутоиммунного процесса с повреждением СО ВОПТ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лазебник Л.Б., Царегородцева Т.М., Парфенов А.И. и др. Иммунная система и болезни органов пищеварения. Тер. архив. 2004; 12: 5–9.
2. Царегородцева Т.М., Серова М.В., Соколова Г.Н. и др. Иммунный статус при болезнях органов пищеварения. Мед. иммунология. 2005; 2–3: 2–3.
3. Yamaoka Y, Kikuchi S, El-Zimaity HM et al. Importance of *Helicobacter pylori* in clinical presentation, gastric inflammation, and mucosal interleukin 8 production. Gastroenterol. 2002; 123: 414–424.
4. Shimoyama T, Fukida S, Liu Q et al. Production of chemokines and reactive oxygen species by human neutrophils stimulated by *Helicobacter pylori*. Helicobacter. 2002; 7(8): 170–174.
5. Lu H, Hsu P-I, Graham DY, Yamaoka Y. Duodenal ulcer promotion gene of *Helicobacter pylori*. Gastroenterology. 2005; 128: 833–848.
6. Ernst PB, Takayashi H, Grove SE. *Helicobacter pylori* infection as a model for gastrointestinal immunity and chronic inflammatory diseases. Dig. Dis. 2001; 19: 104–111.
7. Tufano MA, Rossano F, Catalanotti P et al. Immunobiological activities of *Helicobacter pylori* porins. Infect. Immun. 1994; 4: 1392–1399.
8. Ястребова Н.Е., Ванеева Н.П., Цветкова Н.В. Характеристика скрининг-иммуноферментного теста для определения антител к условно-патогенным бактериям. Аллергия, астма и клинич. иммунол. 1999; 9: 148–151.
9. Asserman C, Powrie F. Interleukin 10 is a growth factor for a population of regulatory T-cell. Gut. 1998; 42: 157–158.
10. Groux H, O'Garra A, Bigler M et al. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. Nature. 1997; 389: 737–741.
11. Jason J, Byrd M, Jarvis W et al. Comparison of serum and cell-specific cytokines in humans. Clinic. Diagn. Lab. Immunol. 2001; 8(6): 1097–1103.
12. Flanders KC, Burmester JK. Medical application of transforming growth factor-beta. Clin. Med. Res. 2003; 1(1): 13–20.
13. Хаитов Р.М., Игнатьева Г.А., Сидорович И.Г. Иммунология. М.: Медицина, 2000.
14. Ярулин А.А. Система цитокинов и принципы ее функционирования в норме и патологии. Иммунология. 1997; 5: 7–13.