

© Коллектив авторов, 2009

М.Г. Ипатова<sup>1</sup>, П.В. Шумилов<sup>1</sup>, Ю.Г. Мухина<sup>2</sup>, Л.И. Кафарская<sup>2</sup>,  
А.Н. Шкопоров<sup>2</sup>, Н.Е. Ястребова<sup>3</sup>, А.С. Потапов<sup>4</sup>

## ДИСРЕГУЛЯЦИЯ ИММУННОГО ОТВЕТА НА ИНДИГЕННУЮ МИКРОФЛОРУ У ДЕТЕЙ И ПОДРОСТКОВ С ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ КИШЕЧНИКА

<sup>1</sup>ФГУ ФНКЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии Росздрава,

<sup>2</sup>ГОУ ВПО Российский государственный медицинский университет Росздрава,

<sup>3</sup>ГУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАМН, <sup>4</sup>ГУ Научный центр здоровья детей РАМН, Москва

В работе приведены результаты клинико-иммунологического обследования 34 детей с воспалительными заболеваниями кишечника: 20 детей с неспецифическим язвенным колитом (НЯК) и 14 детей с болезнью Крона. Всем больным иммуноферментным методом определяли уровень антител (АТ) в сыворотке крови к представителям нормальной микрофлоры (лактобациллам и бифидобактериям). Для детей с НЯК была выявлена тенденция к повышению уровня АТ к лакто- и бифидобактериям, а также взаимосвязь высокого уровня АТ с высокой активностью и тотальным поражением толстой кишки. Полученные данные могут свидетельствовать о нарушении иммунологической толерантности к представителям нормальной микрофлоры.

**Ключевые слова:** воспалительные заболевания кишечника, болезнь Крона, неспецифический язвенный колит, нормальная микрофлора кишечника, нарушение иммунологической толерантности.

---

Immunological examination was performed in 34 children with inflammatory bowel diseases: 20 patients with ulcerative colitis (UC) and 14 patients with Crohn's disease. Level of serum antibodies (AB) to normal intestinal bacteria (lactobacilli and bifidus bacteria) was determined in all the patients by immunoassay method. Patients with UC demonstrated both trend to increasing of anti-lactobacilli and anti-bifidus bacteria serum antibodies and correlation of high AB level and high inflammatory activity with total bowel lesion. These data testify to disturbance of immunological tolerance to normal intestinal bacteria.

**Key words:** inflammatory bowel diseases, Crohn's disease, ulcerative colitis, normal intestinal microflora, disturbances of immunological tolerance.

Болезнь Крона (БК) и неспецифический язвенный колит (НЯК), которые объединяются термином «воспалительные заболевания кишечника

ка» (ВЗК), представляют собой одну из наиболее серьезных и нерешенных проблем в современной детской гастроэнтерологии и колопроктологии.

### **Контактная информация:**

**Ипатова Мария Георгиевна** – научный сотрудник Федерального научно-клинического центра детской гематологии, онкологии и иммунологии Росздрава

Адрес: 119571 г. Москва, Ленинский пр-т, 117/2

Тел.: (495) 936-92-74, E-mail: mariachka1@mail.ru

Статья поступила 18.09.09, принята к печати 23.09.09.

По уровню заболеваемости ВЗК уступают другим гаст-роэнтерологическим заболеваниям, но по тяжести течения, частоте осложнений и летальности они занимают одно из ведущих мест в структуре болезней желудочно-кишечного тракта (ЖКТ).

Несмотря на разную распространенность патологического процесса и глубину поражения слизистой оболочки кишки, различные морфологические признаки, БК и НЯК имеют общность патогенетических механизмов, а также сходные клинические проявления и единые подходы к лечению, что позволяет нам рассматривать эти два заболевания вместе [1].

Этиология ВЗК остается до конца неизвестной. Патогенез заболеваний представляет собой процесс крайне сложного и комплексного взаимодействия различных патофизиологических механизмов аутоиммунного воспаления, развивающихся на фоне генетической предрасположенности к неадекватному иммунному ответу как со стороны иммунной системы организма в целом, так и локальной иммунной системы ЖКТ в частности [2–4].

Многочисленные исследования последних лет свидетельствуют о значимости дисрегуляции иммунного ответа к эндогенным бактериям ЖКТ [5]. Нормальная микрофлора играет важную роль для жизнедеятельности растущего детского организма [6]. Доказано ее благотворное воздействие на физиологию кишечника и организм в целом, что обусловлено защитными, структурными и метаболическими эффектами. Взаимодействие между энтероцитами и микроорганизмами индигенной микрофлоры приводят к формированию на поверхности интестинальных слизистых оболочек защитного биослоя, препятствующего колонизации, адгезии, инвазии и пенетрации патогенных и условно-патогенных микроорганизмов [7]. Одновременно с этим кишечная микрофлора оказывает постоянное стимулирующее воздействие низкой степени на иммунную систему кишечника, что крайне важно для созревания и нормального функционирования иммунитета и формирования иммунной толерантности к антигенам индигенной микрофлоры и пищи.

Результаты современных отечественных и зарубежных исследований указывают на значительную роль индигенной микрофлоры в патогенезе ВЗК. Предполагается, что при ВЗК барьерная функция слизистой оболочки нарушена за счет изменения межклеточных соединений и снижения продукции слизи, что позволяет антигенам свободно проникать в собственную пластинку слизистой оболочки. При изучении модели ВЗК на экспериментальных моделях неоднократно была продемонстрирована роль кишечных бактерий при данной патологии [8]. Так, в своих исследованиях R. Duchmann и соавт. [9] выявили, что в контроле мононуклеарные клетки слизистой обо-

лочки не реагировали на собственные бактерии в отличие от моделей ВЗК, у которых наблюдалась выраженная инфильтрация мононуклеарами. В исследованиях, проведенных *in vitro*, было продемонстрировано, что у пациентов с БК Т-клетки собственной пластинки кишечника реагируют на антигены индигенной микрофлоры с развитием ответа по Th1-пути, что в свою очередь также указывает на снижение толерантности к нормальной микрофлоре [10]. Исходя из этого, можно сделать вывод, что для возникновения воспаления недостаточно только нарушения со стороны иммунной системы, но и обязательно должен присутствовать микробный компонент. Однако экспериментальные исследования на животных не позволяют установить, вызывает ли нормальная микрофлора воспаление прямо или косвенно, но они четко указывают, что для развития ВЗК обязательно наличие микробного фактора.

Вопрос влияния индигенной микрофлоры на поддержание хронического воспаления в кишечнике при ВЗК изучен недостаточно, особенно в педиатрии. Работы по изучению иммунореактивности к индигенной микрофлоре у детей немногочисленны.

Целью нашей работы стало изучение иммунологической реактивности пациентов с ВЗК к лактобациллам (ЛБ) и бифидобактериям (ББ), что важно не только для понимания патогенеза ВЗК, но и необходимо для разработки терапевтических подходов, оценки эффективности и безопасности новых методов лечения.

#### Материалы и методы исследования

Были обследованы 34 ребенка с ВЗК – 13 девочек (38%) и 21 мальчик (62%) в возрасте от 5 до 17 лет (средний возраст  $11,7 \pm 5,8$  лет). Среди пациентов у 14 была диагностирована БК, у 20 – НЯК.

У всех больных диагноз ВЗК был установлен на основании стандартных методов исследования, включающих в себя клинические, лабораторные, эндоскопические и морфологические критерии.

Группу сравнения составили 16 детей, у которых фиброколоноскопию проводили с целью исключения ВЗК. В результате обследования у 12 детей был диагностирован синдром раздраженной кишки и у 4 детей – полип/полипы в сигмовидной кишке. Группа сравнения была сопоставима с исследуемой группой по возрасту и полу.

В качестве материала для исследования использовали сыворотку крови детей исследуемых групп. Забор крови осуществляли в утренние часы натощак из локтевой вены. Забор материала производили параллельно забору крови для биохимического исследования крови.

С целью изучения иммунологической реактивности к индигенной микрофлоре кишечника проводили определение антител (АТ) класса IgG к ЛБ и ББ посредством иммуноферментного анализа (ИФА).

Пробиотические штаммы *Bifidobacterium bifidum* 791 и *Lactobacillus rhamnosus* 1 культивировали в пита-

тельной среде MRS (Himedia Labs, Индия) в анаэробных условиях при температуре 37 °С. Препараты клеточных стенок были получены методом дезинтеграции и последовательного центрифугирования [11].

АТ класса IgG к ББ и ЛБ определяли с помощью твердофазного варианта ИФА с сорбцией в лунках полистирольных планшетов антигенами клеточных стенок. Антигены сорбировали в фосфатно-солевом буфере в концентрации 10 мкг/мл. Отмывку иммуносорбента проводили 3 раза фосфатно-солевым буферным раствором с детергентом (твин-20). Сыворотки вносили в разведении 1:3200 с последующей инкубацией при температуре 37 °С в течение 1 ч. Не связавшиеся АТ отмывали фосфатно-солевым буферным раствором с детергентом, а затем добавляли конъюгат (АТ кроличьи против IgG человека с пероксидазой хрена) в рабочем разведении. После инкубации и отмывки в лунки планшета вносили субстратную смесь (цитратно-фосфатный буферный раствор с перекисью водорода и ТМБ). Через 22 мин после начала развития окраски останавливали добавлением двухмолярного раствора серной кислоты. Учет результатов проводили на многоканальном автоматическом фотометре «Titertech Multiscan®MC» (Flow Laboratories, Великобритания) при длине волны 492 нм.

Определение уровней IgG, IgM, IgA определяли методом радиальной иммунодиффузии по Манчини (1965) в сыворотке крови. Определение содержания ЦИК в сыворотке крови проводили методом жидкостной преципитации в 4% полиэтиленгликоле (ПЭГ-6000).

Статистическую обработку проводили с помощью стандартного пакета программ BIOSTAT и STATISTICA 6.0 с использованием критериев параметрической (Т-тест) и непараметрической (критерий Манна–Уитни и парный критерий Уилкоксона) статистики.

### Результаты и их обсуждение

У детей, страдающих ВЗК, в клинической картине преобладали жалобы на ухудшение общего самочувствия, слабость, боли в животе и изменения характера стула. При поступлении кровь в стуле отмечалась у 35% детей с НЯК и у 7% детей с БК. У остальных детей жалобы на примесь крови в стуле отсутствовали. У 28,6% детей с БК отмечался кашицеобразный стул 3–4 раза в сутки без патологических примесей, у 7% детей отмечалось учащение стула до 6–10 раз без патологических примесей. У 20 детей были жалобы на боли в животе: у 12 детей с НЯК и у 8 детей с БК, при этом у больных НЯК болевой синдром чаще локализо-

вался по ходу толстой кишки и имел связь с актом дефекации. Следует отметить, что при поступлении в клинику у 17 детей (42,5%) болевой синдром отсутствовал.

Результаты лабораторных исследований у детей, страдающих ВЗК, указывали на наличие анемии у 15% и латентного дефицита железа у 38% обследованных детей. В гемограмме у детей с ВЗК наиболее часто встречались лейкоцитоз (7%), моноцитоз (23%), тромбоцитоз (26%), ускорение СОЭ (37%). Показатели гуморального звена иммунитета характеризовались диспротеинемией за счет гипергаммаглобулинемии (37%), тенденцией к увеличению уровней IgM, IgG, ЦИК, что указывает на хроническое системное воспаление. При этом для больных НЯК характерен более высокий уровень IgG, IgM и ЦИК (см. табл. 1). Высокий уровень ЦИК при НЯК наблюдался значимо чаще, чем при БК ( $p < 0,05$ ). По данным фиброколоноскопии, у больных НЯК преобладал тотальный колит (55%) и левосторонний колит (10%). Изолированное поражение дистальных отделов толстой кишки в виде проктита и проктосигмоидита встречалось у 30% детей (по 15% случаев соответственно). У одного ребенка с НЯК эндоскопическая картина соответствовала стадии ремиссии. У детей с БК наиболее часто наблюдался тотальный колит с поражением терминального отдела подвздошной кишки (92%). У одного ребенка была выявлена БК желудка, по поводу которой была проведена резекция желудка с наложением гастроэнтеростомы.

При определении АТ к индигенной микрофлоре было выявлено, что при НЯК уровень IgG-АТ к ББ был выше в 1,6 раза ( $p < 0,05$ ), а к ЛБ – в 2,4 раза ( $p < 0,01$ ) при сопоставлении с таковыми показателями в группе сравнения. В то же время у детей с БК уровень IgG-АТ к ЛБ и ББ практически не отличался от контрольной группы (табл. 2). Проведенный нами индивидуальный анализ уровня АТ показал, что у детей с НЯК повышенный уровень IgG-АТ одновременно к ЛБ и ББ отмечался в 40% случаев, только к ЛБ – в 5%, только к ББ – в 10%, в то время как среди пациентов с БК только у одного ребенка были выявлены IgG-АТ к ББ.

При анализе полученных результатов было установлено, что у 62% детей с НЯК с повышенным уровнем IgG-АТ к ББ и ЛБ отмечалось обострение основного заболевания, и лишь 38,5% детей находились в ремиссии. У 54% детей повышенный

Таблица 1

Средние показатели гуморального звена иммунитета у наблюдаемых детей

Группы больных	IgG, мг% (N 1099±16 мг%)	IgM, мг% (N 107±3 мг%)	ЦИК, мВ (N 109 – 352 мВ)
НЯК (n=20)	1258,8±262,6	160,5±79,7	880,3±483,1
БК (n=14)	1031,0±373,5	126,2±66,8	773,4±393,1
Группа сравнения (n=16)	745,0±325,0	125,3±49,2	536,7±140,1

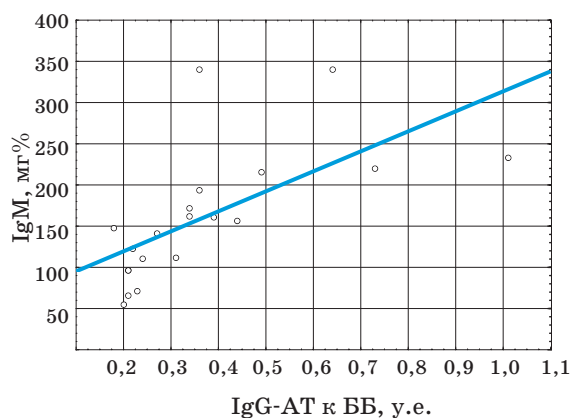


Рис. 1. Корреляционная диаграмма IgM и IgG-АТ к ББ сыворотки крови у детей с НЯК.

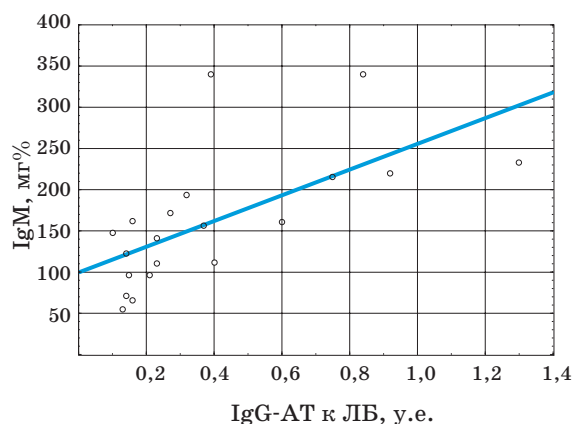


Рис. 2. Корреляционная диаграмма IgM и IgG-АТ к ЛБ сыворотки крови у детей с НЯК.

Таблица 2

Средний уровень IgG-АТ к ББ и ЛБ у детей исследуемых групп

Группы больных	IgG-АТ к ББ, у.е.	IgG-АТ к ЛБ, у.е.
НЯК (n=20)	0,369±0,211 *	0,391±0,326 **
БК (n=14)	0,264±0,132	0,195±0,127
Группа сравнения (n=16)	0,235±0,048	0,160±0,061

\* $p < 0,05$  и \*\* $p < 0,01$  по сравнению с группой сравнения.

уровень IgG-АТ к ЛБ и ББ сочетался с тотальным колитом, который был диагностирован при проведении эндоскопического обследования. В 23% случаев повышение уровня АТ к ББ и ЛБ отмечалось при локализованных формах поражения.

При анализе показателей иммунограммы повышение уровня IgM было выявлено у 19 детей (56%) с ВЗК. Показатели IgG были повышены у 18 детей (53%) и значительно снижены у 5 детей с ВЗК (15%). Повышение количества ЦИК отмечалось у 27 детей с ВЗК (79%). При исследовании показателей иммунограммы было выявлено, что средние показатели IgG, IgM и ЦИК были повышены у детей с ВЗК. IgG и IgM, играющие главную роль в формировании гуморального иммуни-

тета, были выше у детей с НЯК по сравнению с детьми, страдающими БК. Значения ЦИК также были выше у пациентов с НЯК по сравнению с БК (см. табл. 1), однако статистически значимых различий выявлено не было. Средний уровень IgG с учетом возрастных норм у детей с БК был значительно ниже по сравнению с его уровнем у детей с НЯК. В 43% случаев уровень IgG был ниже нормальных показателей. При НЯК повышение уровня IgG встречалось в 65% случаев, в отличие от детей с БК, у которых повышение уровня IgG отмечалось в 36% случаев. Уровень IgM был повышен в 65% случаев при НЯК, тогда как при БК его повышение отмечалось в 42%. Количество ЦИК было примерно одинаковым как у пациентов с БК, так и НЯК.

При анализе показателей иммунограммы у детей с НЯК было выявлено, что средний уровень IgM был выше у детей с повышенным уровнем IgG-АТ к ББ и ЛБ по сравнению с теми детьми, у которых уровень АТ не превышал данных значений в контрольной группе. Средний показатель уровня IgM у детей с нормальным уровнем IgG-АТ к ЛБ и ББ был в пределах нормы. Показатели IgG были незначительно повышены у детей с повышенным уровнем IgG-АТ к ББ и ЛБ. Значения ЦИК были значительно выше у пациентов с повышенным уровнем АТ к ББ и ЛБ и в 2,5 раза превышали нормальные значения. Однако при корреляционном анализе у детей с НЯК (табл. 3) статистически

Таблица 3

Корреляционная связь показателей гуморального иммунитета и IgG-АТ к ЛБ и ББ у детей с НЯК

Показатели	IgG-АТ к ББ	IgG-АТ к ЛБ	IgM	IgG	ЦИК
IgG-АТ к ББ		0,96*	0,71*	0,34	0,10
IgG-АТ к ЛБ	0,96*		0,71*	0,35	0,05
IgM	0,71*	0,71*		0,19	-0,16
IgG	0,34	0,35	0,19		0,57*
ЦИК	0,10	0,05	-0,16	0,57*	

\*  $p < 0,05$ .



значимые сильные связи были выявлены только между уровнем IgM и IgG-АТ к ББ (рис. 1), а также уровнем IgM и IgG-АТ к ЛБ (рис. 2).

При анализе связи уровня IgG-АТ к ЛБ и ББ с предшествующей терапией значимых зависимостей выявлено не было, так как у большинства детей с ВЗК имеются указания в анамнезе на применение антибактериальных препаратов и пробиотиков.

### Заключение

Таким образом, в результате нашего исследования было выявлено, что для детей с НЯК характерна продукция АТ класса IgG к структурам

клеточных стенок ЛБ и ББ, входящих в состав нормальной микрофлоры ЖКТ. Полученные данные могут свидетельствовать о нарушении иммунологической толерантности к представителям нормальной микрофлоры. Повышение уровня IgG-АТ к ЛБ и ББ коррелирует с распространенностью и активностью патологического процесса при НЯК и чаще сочетается с высокой активностью и тотальным поражением толстой кишки. Поэтому исследование титра IgG-АТ к ЛБ и ББ может быть использовано в качестве критерия активности и распространенности патологического процесса у детей с НЯК.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Рачкова Н.С., Хавкин А.И. Воспалительные заболевания кишечника. Проблемы дифференциальной диагностики и лечения. Детская гастроэнтерология и нутрициология. 2006; 14 (3): 154–159.
2. Адлер Г. Болезнь Крона и язвенный колит: Пер. с нем. М.: ГЭОТАР-МЕД, 2001.
3. Лоранская И.Д. Неспецифические колиты и синдром раздраженной толстой кишки: патогенетические механизмы воспаления, диагностика и прогноз: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. М., 2001.
4. Gaffney PP, Gaffney AA. Ulcerative colitis: The pathogenesis thus far. Gastroenterol. 1997; 112 (Suppl. 4): 978.
5. Duchmann R, Kaiser I, Hermann E et al. Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD). Clin. Exp. Immunol. 1995; 102: 448–455.
6. Gianfrilli PM. Normal intestinal flora in children and their changes in pathological conditions. Ann. Ist. Super Sanita. 1986; 22 (3): 783–789.
7. Копанев Ю.А. Значение кишечной микрофлоры для здоровья человека. Роль пробиотиков и пребиотиков для коррекции и профилактики нарушений микробиоценоза. Трудный пациент, 2008; 11: 39–43.
8. Landers CJ, Cohavy O, Misra R et al. Selected loss of tolerance evidenced by Crohn's disease associated immune responses to auto- and microbial antigens. Gastroenterology. 2002; 123: 689–699.
9. Duchmann R, Kaiser I, Hermann E et al. Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD). Clin. Exp. Immunol. 1995; 102: 104–108.
10. Hart AL, Stagg AJ, Frame M et al. Review article: the role of the gut flora in health and disease, and its modification as therapy. Aliment Pharmacol. Ther. 2002; 16: 1383–1393.
11. Ястребова Н.Е., Ванеева Н.П., Цветкова Н.В. Характеристика скринингового иммуноферментного теста для определения антител к условно-патогенным бактериям. Аллергия, астма и клин. иммунол. 1999; 9: 148–151.