

Єгорова С. Ю.

*викладач кафедри мікробіології, вірусології, імунології та епідеміології
ДЗ «Дніпропетровська медична академія
Міністерства охорони здоров'я України»*

Кудрявцева В. Є.

*завідувач лабораторії мікробіології та імунології
ДУ «Інститут гастроентерології
Національної академії медичних наук України»*

Татарчук О. М.

*старший науковий співробітник лабораторії мікробіології та імунології
ДУ «Інститут гастроентерології
Національної академії медичних наук України»*

Вінник Н. В.

*молодший науковий співробітник лабораторії мікробіології та імунології
ДУ «Інститут гастроентерології
Національної академії медичних наук України»*

ВЗАЄМОЗВ'ЯЗКИ ПОКАЗНИКІВ ІМУННОГО СТАТУСУ ТА СТАНУ МІКРОФЛОРИ КИШЕЧНИКУ У ХВОРИХ НА НЕСПЕЦИФІЧНИЙ ВИРАЗКОВИЙ КОЛІТ

Анотація: Стаття присвячена дослідженню взаємозв'язків між імунологічною реактивністю та станом мікрофлори кишечника у хворих на неспецифічний виразковий коліт. Встановлено, що поглиблення дисбіотичних порушень супроводжується появою негативних кореляційних зв'язків між показниками клітинного імунітету та концентрацією представників мікрофлори кишечника.

Анотация: Статья посвящена исследованию взаимосвязей между иммунологической реактивностью и состоянием микрофлоры кишечника у больных неспецифическим язвенным колитом. Установлено, что углубление дисбиотических нарушений сопровождается появлением негативных корреляционных связей между показателями клеточного иммунитета и концентрацией представителей микрофлоры кишечника.

Summary: The article is devoted to studying the relationships between immunological reactivity and state of intestinal microflora in patients with ulcerative colitis. It was established that the deepening of dysbiosis disorders is accompanied by negative correlation links between indicators of cellular immunity and concentration of representatives of intestinal microflora.

Неспецифічний виразковий коліт (НВК) є вагомою медико-соціальною проблемою, на що вказує зростання захворюваності, безперервний рецидивуючий перебіг з прогресуючим порушенням структури і функцій слизової оболонки кишечника, зниження якості життя та інвалідизація осіб молодого віку [1].

Згідно з сучасними уявленнями порушення імунітету з дисбалансом цитокінової регуляції відіграють головну роль у патогенетичних механізмах НВК. Імунна система, асоційована з кишечником, контактує з великою кількістю антигенів, що припускає як забезпечення толерантності у відношенні до їх дії, так і передбачає високоселективну і високоспецифічну імунну відповідь. Порушення толерантності імунокомпетентних клітин до антигенів, які презентуються ентероцитами, веде до неконтрольованої відповіді на різні агенти, що в свою чергу зумовлює місцеве ушкодження тканин та розвиток локального запалення при НВК [2, 3, 4].

Кишкова мікрофлора в розвитку НВК розглядається як один із стимулів, що призводить до ініціації запалення, активуючи синтез макрофагами цитокінів, в результаті чого набуває розвитку імунологічний дисбаланс та деструкція слизової оболонки кишечника [5, 6, 7]. Дослідження сучасних авторів свідчать, що для НВК характерне порушення мікробіоценозу кишечника, що проявляється зниженням кількості біфідо- і лактобакте-

рій та повноцінної кишечної палички, зростанням вмісту умовно-патогенної мікрофлори і грибів роду *Candida* [8, 9].

Відомо, що фізіологічні і патологічні процеси в макроорганізмі залежать від стану індигенної мікрофлори, адже мікрофлора тісно інтегрована з епітеліальними клітинами. За даними багатьох авторів, дисбіотичні зміни травного каналу поглиблюють основне захворювання, впливають на тяжкість і тривалість хвороби. Від стану мікробіоценозу, як фактору посередника, залежить ефективність адаптивного процесу [10, 11, 12]. Разом з тим, причинно-наслідкові зв'язки між вторинними імунодефіцитами, дисбіозом та основним захворюванням залишаються дискусійними питаннями [13, 14]. Незважаючи на велику увагу дослідників до проблеми взаємовідносин мікрофлори і макроорганізму при НВК, механізми комунікативних зв'язків мікробіоти і макроорганізму вивчені недостатньо.

Метою дослідження є виявити взаємозв'язки між ступенем дисбіозу кишечника і показниками імунного статусу у хворих на неспецифічний виразковий коліт.

Об'єкт і методи дослідження. Проведено обстеження 90 хворих на НВК. Хворі перебували на стаціонарному лікуванні у відділенні захворювань кишечника ДУ «Інститут гастроентерології НАМН України». У першу групу ввійшли 27 пацієнтів із компенсованою формою дисбіозу (I ступінь дисбі-

озу), у другу групу ввійшло 22 пацієнти з субкомпенсованою формою дисбіозу (II ступінь), третю групу склав 41 пацієнт із декомпенсованою формою дисбіозу (III ступінь). Контрольну групу становили 30 практично здорових осіб.

Субпопуляційний склад лімфоцитів периферичної крові визначали методом непрямой імунофлуоресценції за допомогою моноклональних антитіл виробництва ЗАТ «Сорбент-сервіс». Вміст імуноглобулінів А, М, G у сироватці крові визначали імуноферментним методом за допомогою тест-системи ТОВ НВЛ «Гранум». ФНП-а визначали методом ІФА за допомогою тест-системи ЗАО «Вектор-Бест». Виміри проводились на імуноферментному аналізаторі «Stat Fax 303 Plus». Фагоцитарну здатність нейтрофілів периферичної крові вивчали із культурою *Staphylococcus aureus*, штам ATCC 25923. Функціональну активність нейтрофілів оцінювали в НСТ-тесті за реакцією відновлення нітросинього тетразолію.

Дослідження видового та кількісного складу мікрофлори кишечника проводили методом посіву десятикратних розведень (10⁻¹–10⁻⁹) фекалій на стандартний набір селективних та диференційно-діагностичних поживних середовищ.

Статистична обробка результатів досліджень здійснювалася методами варіаційної статистики, реалізованими стандартним пакетом прикладних програм Statistica for Windows 6.0. Для визначення ступеня взаємозв'язку між двома показниками був

проведений кореляційний аналіз із визначенням достовірних ($p < 0,05$) коефіцієнтів кореляції (r).

Результати дослідження та їх обговорення. З метою уточнення характеру взаємозв'язків між імунологічною реактивністю та станом мікрофлори кишечника у хворих на НВК був проведений кореляційний аналіз за допомогою парних кореляцій між показниками імунного статусу та кількісними показниками мікрофлори кишечника у практично здорових осіб (донорів) та хворих на НВК з різним ступенем дисбіозу. Ступінь тісноти зв'язку та достовірність між окремими парами показників у здорових осіб представлені в таблиці 1.

У групі здорових осіб виявлено позитивні кореляційні зв'язки між абсолютною кількістю лімфоцитів з фенотипом CD3⁺ (Т-лімфоцити), абсолютною кількістю CD22⁺ лімфоцитів (В-лімфоцити), рівнями імуноглобулінів А, М, G, показниками фагоцитарної активності нейтрофілів (фагоцитарний індекс (ФІ), фагоцитарне число (ФЧ) та концентрацією основних симбіонтів товстокишкового мікробіоценозу *Lactobacillus* і *Bifidobacterium*.

Дана група кореляційних взаємозв'язків відображає існуючі у здорових осіб функціональні взаємозв'язки між облигатною мікрофлорою і станом імунореактивності, адже нормальний рівень сахаролітичних анаеробних мікроорганізмів сприяє активації клітинного імунітету, нормальному рівню імуноглобулінів, фагоцитарній активності клітин.

Таблиця 1

Коефіцієнти кореляції показників імунного статусу з концентрацією основних симбіонтів кишечного мікробіоценозу здорових осіб

Показник	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Lactobacillus</i>
CD3 ⁺	0,40*	0,49*
CD22 ⁺	0,56*	0,43*
IgA	0,61*	0,60*
IgM	0,43*	0,67*
IgG	0,45*	0,40*
ФІ	0,35	0,70**
ФЧ	0,32	0,68*

Примітки: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$

Таблиця 2

Коефіцієнти кореляції показників імунного статусу з концентрацією мікроорганізмів у кишечнику хворих на НВК з I ступенем дисбіозу

Показник	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>E. coli</i> НФА	<i>Enterococcus</i>
CD3 ⁺	0,94	0,39*	-0,41	0,52
CD22 ⁺	0,56*	0,40*	0,98*	0,87
CD8 ⁺	0,17	0,25	0,98**	0,52
IgM	0,65	0,67*	0,08	0,24
ФІ	-0,24	0,69**	0,65	0,76*
ФЧ	0,15	0,71*	-0,30	-0,45
ІБН	-0,38	-0,21	0,87*	-0,61

Примітки: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$

Отримані дані свідчать, що підвищення рівня індигенної мікрофлори в кишечнику буде приводить до активації Т- і В- ланок імунітету.

Пошук кореляційних взаємозв'язків між показниками імунного статусу та кількісними показниками мікрофлори кишечника у хворих з I ступенем дисбіозу дозволив встановити, що зберігаються позитивні кореляції між рівнем CD3+ і CD22+ лімфоцитів, показниками фагоцитарної активності, рівнем IgM та концентрацією мікроорганізмів роду *Lactobacillus* (табл. 2).

Встановлено позитивні кореляційні зв'язки між *E. coli* з нормальною ферментативною активністю (*E. coli* НФА) та рівнями CD22+ і CD8+ (Т-цитотоксичні лімфоцити). Позитивні зв'язки між концентрацією *E. coli* НФА та індексом бактерицидності нейтрофілів (ІБН), концентрацією *Enterococcus* та фагоцитарним індексом свідчать про активацію фагоцитозу з підвищенням концентрації кишкової палички та ентерококів.

У хворих з II ступенем дисбіозу, який характеризується вираженим дефіцитом біфидобактерій і лактобацил, появою умовно-патогенних мікроорганізмів і гемолітичних варіантів *E. coli*, відсутні зв'язки між біфидобактеріями і лактобацилами та показниками фагоцитозу, з'являються негативні кореляційні зв'язки між показниками фагоцитарної активності і концентрацією *E. coli* НФА (табл. 3). Отже, розвиток дисбіозу у хворих на НВК супроводжується пригніченням фагоцитарної активності.

Зберігається слабкий прямиий кореляційний зв'язок між концентрацією лактобацил і рівнями CD3+ та CD22+ лімфоцитів. Також, у хворих на НВК з II ступенем дисбіозу з'являється тісний негативний зв'язок між рівнем прозапального цитокіну фактор некрозу пухлини- α (ФНП- α) і концентрацією *Bifidobacterium* та *E. coli* НФА.

У хворих з III ступенем дисбіозу встановлено сильні негативні зв'язки між концентрацією *Enterococcus* і рівнем лімфоцитів з фенотипом CD3+, CD4+, між концентрацією *E. coli* НФА та CD22+, CD95+ лімфоцитами (лімфоцити з рецепторами апоптозу) (табл. 4).

Показники фагоцитарної активності визначалися концентрацією *E. coli* НФА: ($r=0,68$; $p<0,05$) – для фагоцитарного індексу, ($r=0,71$; $p<0,05$) – для фагоцитарного числа, ($r=0,41$; $p<0,05$) – для рівня НСТ-позитивних клітин; концентрацією мікроорганізмів роду *Enterococcus*: ($r=-0,60$; $p<0,05$) – для фагоцитарного індексу, ($r=-0,79$; $p<0,05$) – для фагоцитарного числа та ($r=0,54$; $p<0,05$) – для рівня НСТ-позитивних клітин. Встановлені кореляційні зв'язки дозволяють стверджувати, що характер і виразність зрушень у фагоцитарній ланці імунітету визначають ступінь тяжкості дисбіозу кишечника у хворих на НВК. Крім того, між рівнем *E. coli* НФА і рівнем ФНП- α встановлено сильний зворотній кореляційний зв'язок.

Висновки та перспективи подальших досліджень. Таким чином, з поглибленням дисбіотичних порушень ми спостерігали зміну коре-

Таблиця 3

Коефіцієнти кореляції показників імунного статусу з концентрацією мікроорганізмів у кишечнику хворих на НВК з II ступенем дисбіозу

Показник	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>E. coli</i> НФА
CD3+	-0,71	0,30*	-0,49
CD22+	0,34	0,32*	0,70
CD4+	0,55	-0,28	0,85*
ФІ	0,58	0,56	-0,62*
ФЧ	-0,75	-0,13	-0,81*
ФНП- α	-0,99*	-0,22	-0,98*

Примітка: * – $p<0,05$

Таблиця 4

Коефіцієнти кореляції показників імунного статусу з концентрацією мікроорганізмів у кишечнику хворих на НВК з III ступенем дисбіозу

Показник	<i>E. coli</i> НФА	<i>Enterococcus</i>
CD3+	0,64*	-0,60*
CD22+	-0,72*	0,66*
CD4+	0,57	-0,59*
CD95+	-0,73**	0,16
ФІ	0,68*	-0,60*
ФЧ	0,71*	-0,79*
НСТ	-0,41*	0,54*
ФНП- α	-0,875*	0,465

Примітки: * – $p<0,05$; ** – $p<0,01$

ляційних зв'язків з позитивних на негативні між показниками клітинного імунітету та концентрацією представників мікрофлори кишечника. Поява нових негативних кореляційних зв'язків свідчить про перенапруження імунної системи, зумовлене антигенним навантаженням. Отримані результати дають змогу зробити висновок, що підвищення ан-

тигенного навантаження на макроорганізм сприяє розвитку неадекватних імунних реакцій, що в свою чергу поглиблює патологічні зміни.

Перспективи подальших досліджень полягають в удосконаленні методів діагностики і прогнозування ризику поглиблення дисбіозу кишечника та перебігу неспецифічного виразкового коліту.

ЛІТЕРАТУРА:

1. Inflammatory Bowel Disease diagnostic and therapeutic strategies / G. Adler, C. Focchi, L.B. Lazebnik, G.I. Vorobiev. – Springer, 2007. – 237 p.
2. Румянцев В.Г. Язвенный колит: руководство для врачей / В.Г. Румянцев. – М.: Медицинское информационное агентство, 2009. – 424 с.
3. Гастроэнтерология: национальное руководство / под. ред. В. Т. Ивашкина, Т. Л. Лапиной. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 704 с.
4. Дранник Г. Н. Иммунная система слизистых, физиологическая микрофлора и пробиотики / Дранник Г. Н., Курченко А. И., Дранник А. Г. – К.: ООО «Полиграфплюс», 2009. – 143 с.
5. Дегтярева И. И. Дуфалак. Классическое применение и перспективы / И. И. Дегтярева, С. В. Скопиченко – К.: ЗАО «Атлант ЮэмСи», 2003. – 233 с.
6. Титов В. Н. Экзогенные и эндогенные патологические факторы (патогены) как причина воспаления / В. Н. Титов // Клини. лаб. диагностика. – 2004. – № 5. – С. 3–9.
7. Gunning J.H. Intestinal bacteria and ulcerative colitis / J.H. Gunning, G.T. Macfarlane, S. Macfarlane // *Curr. Issues Intest. Microbiol.* – 2003. – № 4(1). – P. 9–20.
8. Халиф И. Л. Воспалительные заболевания кишечника (неспецифический язвенный колит и болезнь Крона): клиника, диагностика и лечение. / И. Л. Халиф, И. Д. Лоранская – М: Миклош, 2004. – 88 с.
9. Характеристика кишечной микрофлоры у больных язвенным колитом / И. А. Лягина, Т. К. Корнева, О. В. Головенко [и др.] // *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии.* – 2008. – № 2. – С. 48–54.
10. Воеводин Д. А. Дисбактериоз и иммунопатологический процесс / Д. А. Воеводин, Г. Н. Розанова, М. А. Степина // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии.* – 2005. – № 2. – С. 89–92.
11. Sartor R. B. Probiotic therapy of intestinal inflammation and infections / R. B. Sartor // *Curr. Opin. Gastroenterol.* – 2005. – N 21. – P. 44–50.
12. Захаренко С. М. Дисбиоз кишечника: от науки первого уровня к науке взаимоотношений / С. М. Захаренко, Н. В. Сафонова // *Гастроэнтерология Санкт-Петербурга.* – 2006. – № 1–2. – С. 5–10.
13. Янковский Д. С. Пробиотики – лекарства XXI столетия / Д. С. Янковский, Г. С. Дымент // *Здоров'я України.* – 2006. – № 7(140). – С. 1–11.
14. Hatoum O. A. The intestinal microvasculature as a therapeutic target in inflammatory bowel disease / A. O. Hatoum, Jan Heidemann, G. Binion David // *Annals of the New York Academy of Sciences.* – 2006. – Vol. 1072. – P. 78–97.