

*И.И.Саванович,
Н.Г.Зенова,
Н.В.Пучкова*

**Липополисахаридсвязывающий протеин и растворимый CD14
как показатели микрoэкологического нарушения в системе
грамотрицательная флора и макроорганизм при
функциональных заболеваниях ЖКТ у детей**

*Белорусский государственный медицинский университет, 3-я городская
детская клиническая больница, г.Минск*

В работе рассмотрены современные представления о взаимодействии липополисахарида с LPS-связывающим протеином, mCD14 и sCD14. Показана зависимость клеточного ответа на LPS от Toll-like рецептора (TLR) а именно TLR4. Изучены результаты обследования 45 больных детей и подростков с функциональной диспепсией (21 пациент) и синдромом раздраженного кишечника (24 пациента). Установлено синхронное увеличение sCD14 и LBP у 45% больных из общей группы обследованных при отсутствии лабораторных показателей воспаления. Ключевые слова: липополисахарид (LPS), липополисахарид-связывающий белок (LBP).

Общеизвестно, что микробные сообщества заселяют все наружные поверхности и полости человека, сосуществуя в виде сложных многокомпонентных сообществ – биоценозов и формируя своеобразную экологическую нишу с множеством взаимовыгодных симбиотических отношений. Специфика расселения различных микробных популяций по отдельным биотопам человека хорошо изучена. Общая численность микробных клеток, колонизирующих организм человека, достигает 10^{14} – 10^{15} , т.е. на 1 – 3 порядка больше, чем собственных клеток хозяина. При этом наиболее густо заселенной экосистемой является кишечник, в котором сконцентрировано около 60% микрофлоры человека (1,2).

Среди ее представителей значительное место занимает Грам-отрицательная флора, к которой относятся энтеробактерии, бактероиды, вейллонеллы, кишечная палочка, цитробактеры и другие (1). Основным компонентом внешней оболочки Гр — бактерий является липополисахарид (LPS), состоящий из иммуногенной полисахаридной части и консервативной липидной, именуемой липидом А, с которым связаны токсичность LPS. Но в отличие от действия других белковых токсинов (ботулоксин, дифтерийный токсин), его эффекты не связаны с необратимым подавлением различных клеточных функций и гибелью клеток. Источником LPS в организме человека, помимо внешнего заражения, является кишечник (2). Многие бактерии теряют компоненты внешней мембраны в процессе жизнедеятельности, заново синтезируя их для поддержания морфофункциональной целостности, как например *Escherichia coli*. Освобождение эндотоксина происходит и при гибели микроорганизмов. В

последние годы стало известно, что низкие концентрации эндотоксина в крови необходимы для поддержания физиологической активации иммунной системы. Поэтому их также называют физиологическими (2,3). Барьерная функция кишечника предотвращает проникновение потенциально патогенной флоры в кровотоки, однако нарушение этого барьера, что имеет место при нарушении пассажа по кишечнику, приводит к транслокации LPS, а иногда и целых бактерий, в близлежащие лимфоузлы и кровь. Установлено, что и позитивные, и негативные эффекты LPS опосредуются рецепторным комплексом, состоящим из нескольких молекул. Взаимодействует LPS в организме с LPS-связывающим протеином (LBP), мембранным кластером дифференцировки CD14 (mCD14) и растворенной формой CD14 (sCD14) (3,4,5). Комплекс LPS-LBP транспортируется в печень и связывается с mCD14 на поверхности макрофагов. Так как mCD14 не имеет внутриклеточного сигнального домена, то клеточный ответ на LPS зависит от трансмембранного Toll-like-рецептора (TLR), а именно TLR4 (4,5,6). Проведение активационного сигнала после связывания ЛПС обеспечивают внутриклеточные домены TLR-4 путем взаимодействия с внутриклеточным адаптерным белком MyD88 и фосфорилированием с участием киназ IRAK1 и IRAK4. Вслед за этим происходит активация внутриклеточного фактора TRAF6, расщепление димерного комплекса ИККа/ИККb, освобождение и транслокация в ядро транскрипционного фактора NFκB, что приводит к началу экспрессии генов цитокинов, NO-синтазы и генов других медиаторов, ферментов и регуляторных молекул воспаления. В результате происходит активация всех основных клеточных функций, связанных с развитием фагоцитоза и представлением антигенов, продукцией NO и свободных форм кислорода, синтезом низкомолекулярных медиаторов воспаления и группы провоспалительных цитокинов, к которым относятся интерлейкины (IL)-IL-1, IL-6, IL-18, фактор некроза опухолей (TNF), интерфероны I типа, хемокины. Также происходит активация цитокинов, стимулирующих дифференцировку Т-лимфоцитов хелперов I типа-IL-12, IL-23, IL-27 [6]. Последнее служит своеобразным мостиком к началу развития реакций специфического иммунитета, связанных с распознаванием антигенных структур микроорганизмов.

CD14 и LPS-связывающий протеин (LBP) являются интегральными составляющими врожденного иммунного ответа на инфекцию (5,6). Среди гуморальных факторов, участвующих в устранении биологического действия LPS на организм в настоящее время включены липопротеины высокой удельной плотности (ЛПВП) сыворотки крови, способные абсорбировать LPS; антитела к глубоким структурам ядра LPS (Re-антитела), обладающие способностью купировать токсические свойства липополисахарида; белки острой фазы, синтезируемые в печени и обладающие транспортно-элиминационными и детоксицирующими функциями (7).

Среди нерешенных вопросов взаимоотношений хозяина и его микрофлоры основными на сегодняшний день являются молекулярные механизмы, управляющие связью микробиоты и организма-хозяина, оценка масштаба той

пользы, которую получает человек от этого симбиоза, а также роли факторов патогенности собственной микрофлоры при переходе системы под влиянием различных факторов от отношения симбиоза к состоянию взаимной агрессии (8).

Примером симбиоза является участие микрофлоры в обеспечении и контроле моторной активности кишечника (9). В этой связи, например, многие авторы рассматривают синдром раздраженного кишечника как метаболическое следствие синдрома избыточного бактериального роста, так как кишечная микрофлора вырабатывает нейротрансмиттеры, влияющие на энтериную систему и изменяющие тем самым секрецию и моторику кишечника, а также порог висцеральной чувствительности (9). Несмотря на то, что в русскоязычной научной литературе активно продолжается дискуссия о целесообразности использования терминов «дисбактериоз» или «синдром избыточного бактериального роста», в конечном итоге какой бы смысл и терминологические нюансы не имели эти определения-изменение количественного и видового состава микроорганизмов, феномены контаминации и транслокации изменения «микробного пейзажа» толстой кишки или изменения состава микрофлоры тонкой кишки – они не могут быть безразличными для организма хозяина (9,10,11).

Известно, что «золотым стандартом» бактериальной диагностики остается посев микрофлоры. Для диагностики синдрома избыточного бактериального роста необходима аспирация содержимого тонкой кишки с немедленным посевом аспириата на питательную среду. Но избыточный бактериальный рост может затрагивать наиболее дистальные участки тонкого кишечника (11), что находится вне пределов досягаемости инструментария. Кроме того, культура бактерий характеризуется высоким процентом ложно отрицательных результатов и плохо воспроизводима. Имеются и другие методы диагностики, как например дыхательный тест с лактулозой. Но для его проведения необходимы технические условия (11). Посев кала, использующийся в нашей стране как метод оценки микробного биоценоза кишечника, признается малоинформативным, так как даже при максимальном приближении к правилам проведения микробиологических исследований может дать представление лишь о микробном составе дистального отдела толстой кишки (9,10). Поэтому актуален поиск других методов диагностики нарушенного симбиоза, например, серологических.

В связи с выше изложенным целью настоящей работы стало изучение диагностической ценности уровней sCD14 и LBP как показателей нарушения симбиотических отношений в экосистеме грамотрицательная флора и макроорганизм человека при функциональных заболеваниях ЖКТ у детей и подростков, а также их соответствие другим маркерам активности воспалительного процесса.

Материал и методы

В ходе работы было обследовано 45 больных детей и подростков, из них с функциональной диспепсией 21 человек и 24 пациента с СРК в возрасте от 9,7 до 17,6 лет, средний возраст обследуемых составил $14,05 \pm 2,1$ года,

находившихся на стационарном лечении в гастроэнтерологическом отделении 3-ей городской клинической больницы г.Минска. Спектр жалоб при поступлении включал боли в животе у 41 пациента, метеоризм у-20, тошнота – у 11, отрыжка – у 16, нарушения аппетита – у 14, чувство раннего насыщения – у 16, запоры – у 14, поносы – у 13.

Больным проводился комплекс клинико-лабораторных и инструментальных исследований в соответствии с Отраслевыми стандартами обследования и лечения детей в стационарных условиях Министерства здравоохранения Республики Беларусь, включающих эзофагогастродуоденоскопию с биопсией и морфологическим исследованием биоптатов, копрологическое обследование, по показаниям ирригоскопию или колоноскопию. Кал на дисбактериоз исследовали небольшой группе пациентов, поэтому его результаты в данной работе не рассматриваются. Диагнозы устанавливали по классификационным критериям, принятым Международным конгрессом гастроэнтерологов в Сиднее, дополненных в Хьюстоне в 1994 году, а также «Римским критериям II». Из исследования были исключены пациенты, у которых серологически или морфологически был идентифицирован *H. Pylori*, являющийся как известно Грам-отрицательным возбудителем. Липополисахаридсвязывающий протеин (LPB), sCD14 и С-реактивный белок определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) в сыворотке крови. Сыворотку крови пациентов получали по стандартной методике и замораживали при $t=-200$ С. В работе были использованы диагностические коммерческие наборы фирмы HyCult biotechnology b.v. для LPB и sCD14 (Human LPB ELISA Kit, НК 314; Human sCD14 ELISA Kit, НК 320). При этом, согласно инструкциям, уровень для LPB в сыворотке здоровых пациентов составляет до 10 $\mu\text{g/ml}$, для sCD14 соответственно 2-4 $\mu\text{g/ml}$. Для определения уровня CRP использовались коммерческие наборы фирмы IBL (ID 591 51), при этом уровень у здоровых составляет до 5 $\mu\text{g/ml}$. Статистическую обработку результатов исследования проводили с помощью программного комплекса Microsoft XP.

Результаты и обсуждение

Согласно верифицированным диагнозам пациенты были распределены на группы (табл. 1). Так среди обследованных с функциональной диспепсией у 4 установлен дисмоторный вариант, у 14-неспецифический вариант, у 3 больных неспецифический вариант и долихосигма. В группе больных с синдромом раздраженного кишечника 13 имели СРК с поносами, 10-СРК с запорами и один больной СРК с болями.

Таблица 1

Распределение больных по диагнозам в зависимости от уровней LPB и sCD14

Диагнозы	Количество больных (%)	Количество больных с нормальным уровнем LPB	Количество больных с повышенным уровнем LPB	Количество больных с нормальным уровнем sCD14	Количество больных с повышенным уровнем sCD14
Функциональная диспепсия дисмоторный вариант	4 (8,9)	1	3	1	3
Функциональная диспепсия, неспецифический вариант	14 (31.1)	4	10	6	8
Функциональная диспепсия, неспецифический вариант. Долихосигма	3 (6,7)	2	1	0	3
СРК с болями	1 (2,2)	0	1	0	1
СРК с поносами	13 (28.9)	8	5	5	8
СРК с запорами	10 (22.2)	3	7	6	4
Всего	45 (100)	18	27	18	27

Анализ уровней LPB установил, что его содержание в пределах референтных значений имели 18 из общей группы 45 обследованных, при этом уровни LPB выше диагностических отмечались у 14 пациентов с ФД и у 13 пациентов с СРК. В пределах таких же цифровых значений распределились пациенты по уровню sCD14, то есть у 18 уровень sCD14 не превышал 4 µg/ml, а 14 больных с ФД и 13 с СРК имели уровни растворимого CD14 выше диагностически значимых (таблица 2). Синхронное увеличение и sCD14 и LPB отмечено у 20 больных (11 с ФД и 9 с СРК).

Таблица 2

Распределение больных с повышенными уровнями LPB и sCD14 по диагнозам

	ФД, дисмоторный вариант (n=число больных)	ФД, неспецифический вариант (n=число больных)	ФД, неспецифический вариант. Долихосигма (n=число больных)	СРК с запорами (n=число больных)	СРК с поносами (n=число больных)	СРК с болями (n=число больных)
LBP	16,2±0,51 (n=3)	14,8±0,91 (n=10)	12,5 (n=1)	25,6±2,39 (n=7)	19,95±2,39 (n=5)	29,1 (n=1)
sCD14	11,13±5,14 (n=3)	10,73±5,4 (n=8)	9,06±2,61 (n=3)	13,7±4,6 (n=4)	10,28±5,25 (n=8)	12 (n=1)

С теоретической и практической точки зрения важно было выяснить, насколько иммунологические изменения сопряжены с активностью воспалительного процесса.

При этом только у 1 пациента из группы с СРК и у 1 пациента с ФД отмечалось повышение CRP(0,9 µg/ml и 1,1 µg/ml соответственно) одновременно с повышением уровня LPS-связывающий протеин до 13,2 и 18,1 µg/ml соответственно. Концентрация же sCD14 у данной подгруппы была в пределах нормы. Показатели же гемограммы, т.е. общее содержание лейкоцитов, лейкоцитарная формула и СОЭ, уровни гемоглобина, эритроцитов, тромбоцитов, эритроцитарные индексы, были в пределах нормы у всех 45 обследуемых. Интересно при этом отметить, что через 6 месяцев пациент с СРК был прооперирован по поводу терминального илеита. На сегодняшний день LBP относят к острофазовым белкам I класса, продуцируется он преимущественно клетками печени и в сыворотке

здоровых людей обнаруживается в концентрации 5-10 $\mu\text{g/ml}$. Во время острой фазы его концентрация может увеличиваться в 10-30 раз и более. В этой связи его рассматривают как новый многообещающий маркер в диагностике сепсиса и мониторинге терапии воспаления. Это же касается и sCD14, который относят ко второму типу белков острой фазы и в норме его содержание не превышает 4 $\mu\text{g/ml}$. В наших исследованиях не было продемонстрировано четкой взаимосвязи между повышенными уровнями LBP и sCD14 с изменениями в лейкоцитарной формуле и СОЭ, а также уровнем CRP, которые также характеризуют воспаление. В этой связи есть основания рассматривать увеличение липополисахарид связывающего протеина и растворимого CD 14 как показателей нарушения симбиоза между макроорганизмом и грамотрицательной флорой при СРК и функциональной диспепсии у детей и подростков с одной стороны, а с другой стороны, учитывая опыт пациента с болезнью Крона, – шире ставить показания для проведения колоноскопии. Полученные данные согласуются с мнением И.В.Домарадского и соавторов о противоречивости микроэкологии и о том, что развитие конфликта между хозяином и его микрофлорой может привести как к тяжелым осложнениям с множественным полисистемным поражением внутренних органов организма, так и к развитию пограничных состояний, когда выраженной патологии нет, но есть совокупность функциональных нарушений, которые держат организм в состоянии, далеком от нормы и готовым патологически реагировать на действие триггеров. Эти проявления характеризуют сегодня как синдром хронической эндогенной интоксикации, что может быть, к примеру, результатом перенесенных кишечных инфекций, воздействия лекарственных препаратов, пищевой непереносимости или проявлением иммунологической недостаточности, связанной с дефицитом классов и субклассов IgA или IgG, а также воспалительных заболеваний кишечника. Дисбиотические сдвиги усугубляют нарушения и нейроэндокринной регуляции, приводя к функциональным и воспалительным заболеваниям желудочно-кишечного тракта, психосоматическим нарушениям, а также другой патологии (12,13).

Литература

1. Янковский, Д.С. Состав и функции микробиоценозов различных биотопов человека *Здоровье женщины* 4(16)/2003 – С. 145-158.
2. Alexander, C., and Rietschel, E. T. (2001). Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *J Endotoxin Res* 7, 167-202.
3. Medzhitov, R., and Janeway, C., Jr. (2000). Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev* 173, 89-97.
4. Bazil, V., and Strominger, J. L. (1991). Shedding as a mechanism of down-modulation of CD14 on stimulated human monocytes. *J Immuno* 147, 1567-74.
5. Chow, J. C., Young, D. W., Golenbock, D. T., Christ, W. J., and Gusovsky, F. (1999). Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J Biol Chem* 274, 10689-92.
6. Durieux, J. J., Vita, N., Popescu, O., Guette, F., Calzada-Wack, J., Munker, R., Schmidt, R. E., Lupker, J., Ferrara, P., Ziegler-Heitbrock, H. W., and et al. (1994).

The two soluble forms of the lipopolysaccharide receptor, CD14: characterization and release by normal human monocytes. *Eur J Immunol* 24, 2006-12.

7. Волчкова, Е.В., Пак, С.Г., Умбетова, К.Т. Гуморальные и клеточные адаптационные механизмы при развитии интоксикационного синдрома к больных острыми вирусными гепатитами «Терапевтический архив».-2004.- №11.-С. 61-65.

8. Белобородова, Н.В. О микрофлоре хозяина и ее участии в ответе на инфекцию Антибиотики и химиотерапия 1998-№9, С. 44-48.

9. Василенко, В.В. Дисбактериоз-синдром раздраженного кишечника: эссе-анализ проблемы. *Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол., колопроктол.* 2000; 6: 10-3.

10. Ардатская, М.Д. Диагностическое значение содержания короткоцепочечных жирных кислот при синдроме раздраженного кишечника. *Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол. и колопроктол.* 2000; X (3): 36-41.

11. Singh, VV, Toskes, PP Small Bowel Bacterial Overgrowth: Presentation, Diagnosis, and Treatment. *Curr Treat Options Gastroenterol.* 2004 Feb;7(1):19-28.

12. Бабин, В.Н, Минушкин, О.Н., Дубинин, А.В. и др. Молекулярные аспекты симбиоза в системе хозяин-микрофлора. *Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол., колопроктол.* 1998; 6: 76-82.

13. Домарадский, И. В., Хохоев, Т.Х., Кондракова, О.А., Дубинин, А.В., Вострухов, С.В., Бабин, В.Н. *Российский химический журнал*, 2002, 46(3), 80-89