

С.М. Попкова, Е.А. Шмелева<sup>1</sup>, С.И. Лещук, Л.В. Сердюк, Е.Л. Кичигина**ДИСБАКТЕРИОЗ КАК СЛЕДСТВИЕ НАРУШЕНИЯ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ  
ТОЛЕРАНТНОСТИ К ИНДИГЕННОЙ МИКРОФЛОРЕ***Институт эпидемиологии и микробиологии НЦ МЭ ВСНЦ СО РАМН (Иркутск)  
<sup>1</sup>Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии  
им. Г.Н. Габричевского МЗ России (Москва)*

*С помощью общепопуляционного подхода показана биологическая закономерность, проявляющаяся особенностями иммунореагирования макроорганизма на антигены бифидобактерий — доминанты кишечного микробиоценоза.*

**Ключевые слова:** микробиоценоз, иммунореактивность, нормальные антитела, популяция

**DISBACTERIOSIS AS A RESULT OF IMMUNOLOGIC DISORDER WITH REGARD  
TO SYMBIOTIC MICROFLORA**S.M. Popkova, E.A. Shmelyova<sup>1</sup>, S.I. Leschuk, L.V. Serduk, E.L. Kichigina*Institute of Epidemiology and Microbiology SCME ESSC SB RAMS, Irkutsk  
<sup>1</sup>G.N. Gabrichevsky Moscow Science Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow*

*By means of general population approach biological regularity displayed in macroorganism peculiarities of reaction to bifidobacterium flora antigens, dominating in gut microbiota, are shown.*

**Key words:** microbiocenosis, immunoreactivity, standard antibodies, population

Одной из актуальных проблем современности является рост числа и интенсивности влияния на организм человека глобальных и локальных воздействий, приводящих к перенапряжению и истощению компенсаторных резервов физиологических систем организма. К ним относится весь комплекс неблагоприятных экологических, климатогеографических, социально-психологических и других стрессовых факторов. Научные данные указывают, что одной из реакций организма на любой стресс является бактериемия, основным источником которой выступает кишечник. Очевидно, что при такой ситуации качественный и количественный состав кишечной микрофлоры будет играть существенную роль в стабилизации либо дестабилизации физиологических процессов.

Система взаимодействий макроорганизма и микробиоценозов формируется на протяжении всей жизни индивида, и наиболее тяжелое патологическое состояние проявляется на фоне выраженных изменений в ассоциациях микробов. С иммунологических позиций процесс формирования микробиоценозов начинается задолго до рождения ребенка с процесса формирования иммунологической толерантности, т.е. снижения ответственности (вплоть до неотвечаемости) иммунной системы плода на микрофлору организма матери [2, 9].

**Цель работы** — выявить общие закономерности иммунореагирования макроорганизма на антигены микробов-симбионтов человека, бифидобактерий.

В **задачи** исследований входило: исследовать содержание естественных антител к бифидобак-

териям в сыворотках крови людей, проживающих в городах Восточной Сибири с разным уровнем техногенной нагрузки; разработать иммунодиагностику на основе антигенов бифидобактерий для определения антимикробных антител в РПГА, изучить влияние естественных антител к бифидобактериям на адгезивную активность этих микроорганизмов.

**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Объектами исследований были выбраны люди, проживающие в двух промышленных городах Иркутской области с разным уровнем техногенной нагрузки: Иркутск, Усолье-Сибирское (рис. 1). Для оценки специфической (серологической) иммунологической активности были изучены 492 сыворотки крови здоровых детей в возрасте от 6 до 14 лет (Иркутск — 177, Усолье-Сибирское — 315) и взрослых в возрасте от 20 до 50 лет (Иркутск — 639, Усолье-Сибирское — 300). Всего 1431 сыворотка.

В ходе экспериментов по изучению влияния специфических антител на адгезивную активность бифидобактерий, использовали гипериммунную кроличью антисыворотку против общих антигенов бифидобактерий со средним титром 1 : 320 в реакции пассивной геммагглютинации (РПГА) и 2 пула сывороток взрослых лиц и детей 7 — 14 лет с титром естественных антител в крови против бифидобактерий 1 : 16 (по 8 проб в пуле).

**Методика изучения адгезивного процесса микроорганизмов.** В работе за основу был взят метод В.И. Брилис и соавт. [7]. В качестве клеточной мишени использовали формализированные эритроциты человека I(0) гр., Rh(+), поскольку

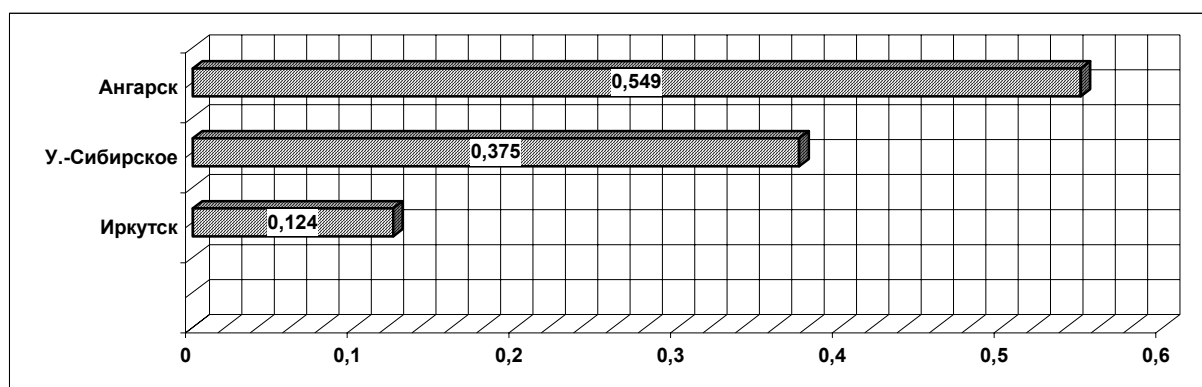


Рис. 1. Суммарный выброс загрязняющих веществ, поступивших в атмосферный воздух городов Иркутской области, рассчитанный на 1 жителя в тоннах за год (Гос. докл., 2004).

они имеют общие рецепторные характеристики с клетками слизистой кишечника для адгезии бактерий. Взвесь микроорганизмов готовили по стандарту мутности, исходя из концентрации  $10^9$  кл/мл.

Оценка адгезии проводилась по двум показателям: СПА (средний показатель адгезии) и КУЭ (коэффициент участия эритроцитов в адгезивном процессе). СПА — среднее количество микробов, прикрепившихся к 1 эритроциту. Подсчитывалось не менее 25 эритроцитов и не более 5 эритроцитов в одном поле зрения. Адгезивность считается нулевой при СПА от 0 до 1,0; низкой — при СПА от 1,01 до 2,0; средней — от 2,01 до 4,0; высокой — свыше 4. КУЭ — процент эритроцитов, имеющих на своей поверхности адгезированные микробы. Подсчет ведется на 25 (лучше на 50) эритроцитах, просматривая все предметное стекло. Вариации результатов при данном методе  $\pm 15\%$  [7].

**Торможение адгезии бифидобактерий сывороткой крови кролика и человека.** Опыты проводили в двух вариантах. В 1-м варианте сывороткой обрабатывали бифидобактерии, во 2-м — эритроциты. Для этого к 0,5 мл взвеси клеток ( $10^9$  кл/мл) добавляли 0,5 мл сыворотки и полученную смесь инкубировали при  $37^\circ\text{C}$ , периодически встряхивая, в течение 30 мин. Затем смесь центрифугировали (3 мин. при 3000 об/мин), отсасывали супернатант, осадок доводили до 1 мл фосфатным буфером. К этой смеси, т.е. клеткам, обработанным сывороткой, добавляли 0,5 мл взвеси формализированных эритроцитов человека (1-й вариант) или бифидобактерий (2-й вариант). Полученную смесь помещали в термостат при  $37^\circ\text{C}$ , периодически встряхивая, на 30 мин и 1 ч. Далее — мазки и окрашивание. В контролях вместо сыворотки с антителами применяли физиологический раствор и сыворотки с отсутствием антител. Для увеличения степени достоверности каждый опыт и контроль повторяли 3 раза.

При проведении комплекса серологических исследований в рамках данной работы были сконструированы простые и доступные эритроцитарные иммунодиагностикумы (ЭД), позволяющие оперативно выполнять большое число анализов в

реакции пассивной (непрямой) гемагглютинации (РПГА). В экспериментальных условиях с помощью новых, приоритетно используемых конъюгирующих компонентов (синтетических полимеров), было получено и использовано 25 лабораторных серий антигенных ЭД для определения антибактериальных антител к антигенам бифидобактерий. ЭД готовили по разработанной нами оригинальной методике, включающей использование в качестве связующего звена полиметакриловой кислоты (1000 кД — 0,8 мг/мл), которая позволила повысить чувствительность диагностикумов в 2–8 раз по сравнению с тест-системами, приготовленными традиционными методами, например, с применением хлорида хрома [8]. При изготовлении иммунодиагностикумов использовали эритроциты барана, сенсibilизированные антигенами целых клеток и клеточных фракций штамма *Bifidobacterium bifidum* I из коммерческих препаратов «Бифидум-бактерин». ЭД обладали высокой стабильностью, которая была обеспечена свойствами связанного с эритроцитами белка, прочностью связи между носителем и сенситином и предупреждением спонтанной агглютинации носителя [6].

Для характеристики уровня техногенной нагрузки в городах использовали индекс загрязнения атмосферного воздуха (ИЗА) [3].

Статистическую обработку материала проводили в соответствии с общепринятыми методами медицинской и биологической статистики (критерии Стьюдента, Фишера) с учетом конкретных целей решавшейся задачи [5]. Полученные результаты обрабатывались с применением прикладных программ «Excel» и «Statgraphics».

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Поскольку именно бифидофлора, с нашей точки зрения, находится в наиболее тесной зависимости от состояния макроорганизма, мы изучали уровень иммунореактивности по отношению к бифидобактериям, определяя в РПГА содержание естественных антител у лиц, проживающих в городах Иркутской области: Иркутск и Усолье-Сибирское. Города входят в первую десятку городов РФ с наиболее высоким уровнем техногенной нагрузки [3].

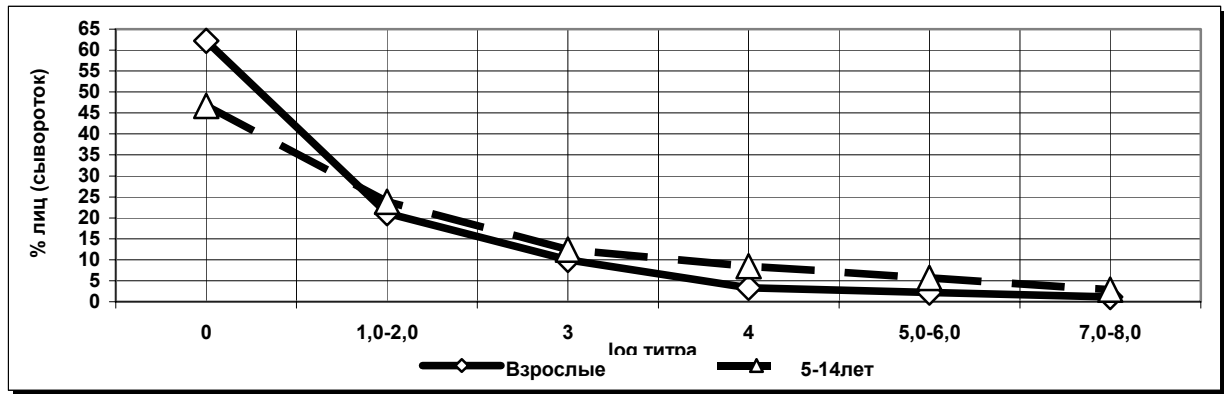


Рис. 2. Распределение индивидуальных показателей содержания противомикробных антител к бифидобактериям в разных группах населения г. Иркутск.

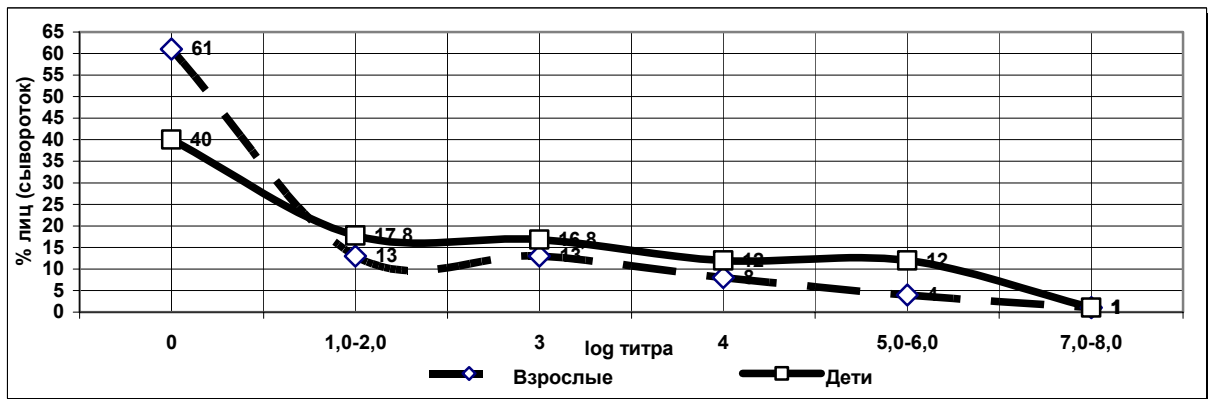


Рис. 3. Распределение индивидуальных показателей содержания противомикробных антител к бифидобактериям в разных группах населения г. Усолье-Сибирское.

Анализ спектров иммунореагирования на антигены бифидобактерий в человеческой популяции показал, что в большинстве сывороток антитела к бифидобактериям в РПГА не определялись (около 70 % лиц) или определялись в небольших концентрациях (13 – 20 % обследованных). Построенные вариационные кривые распределения титров антител в популяции как для сывороток людей из Иркутска (рис. 2), так и Усолья-Сибирского (табл. 1, рис. 3) были подобны друг другу и подчинялись закону Пуассона. Кривые распределения титров отличались по признакам, не входящим в модальную группу, что может быть связано с «... особенностями среды обитания» [10, 12, 13]. Очевидно по этой причине в г. Усолье-Сибирское с более высоким по сравнению с Иркутском уровнем техногенной нагрузки (рис. 1), кривая имеет «лихорадочный» вид, обусловленный повышенным удельным весом лиц с наличием антител против бифидобактерий (рис. 4).

На основании наших данных, а также исследований других авторов [1, 8], мы сформулировали свое видение данной ситуации. В ходе коэволюции макроорганизма (человеческой популяции) и данного микроба – симбионта сложился определенный тип симбиоза, **мутуализм**, и выработался строго обусловленный уровень реагирования иммунной

системы на антигены бифидобактерий, который можно, с определенной долей допустимости, представить как взаимоотношения иммунной системы организма с антигенами своих собственных органов (не случайно генофонд всех индигенных микроорганизмов называют сейчас вторым геномом человека). Иными словами, **иммунологическая толерантность** по отношению к доминанте кишечного микробиоценоза, бифидобактериям, – эволюционно закрепленный признак. Поэтому увеличение в популяции доли лиц с высокими титрами антител против бифидобактерий свидетельствует о повышенном экологическом прессинге на популяцию людей в целом. Для отдельных индивидуумов это может быть показателем риска развития устойчивого дисбактериоза.

В процессе исследований нас, несомненно, интересовал вопрос о механизме влияния нормальных антител на жизнедеятельность микроорганизмов. Вполне естественно, мы обратили внимание на одну из важнейших компонент существования микроорганизмов – адгезию, поскольку адгезия на эпителиальных и слизистых оболочках рассматривается как пререквизит для успешной колонизации, а значит, и для способности выполнять генетически заложенные функции. Структуры, ответственные за адгезию (так называемые адгези-

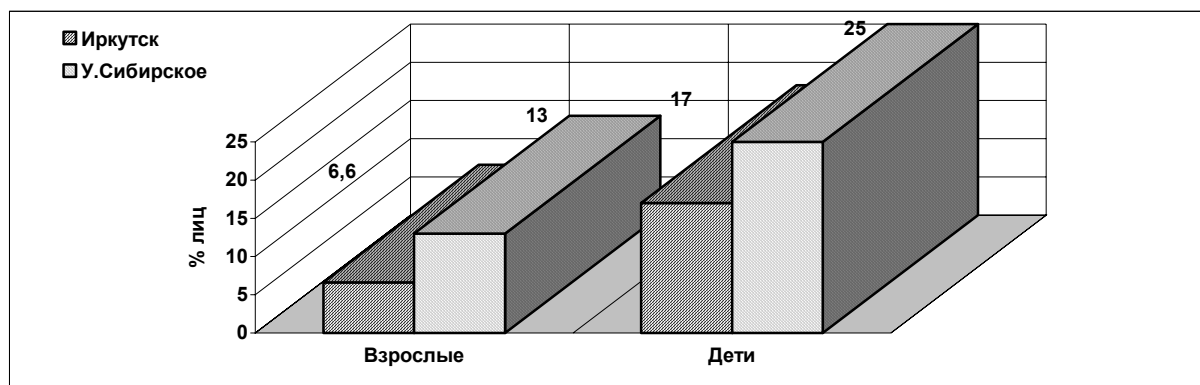


Рис. 4. Частота выявления лиц с высоким и средним уровнями антител против бифидобактерий у населения гг. Иркутск и Усолье-Сибирское.

Таблица 1

Распределение показателей титров в виде ранжированного взвешенного вариационного ряда по классам по уровню антител к бифидобактериям (г. Усолье-Сибирское)

Граница классов, log титра (титр)	0 (0)	1-2 (1:2-1:4)	3 (1:8)	4 (1:16)	5-6 (1:32-1:64)	7-8 (1:128-1:256)
Класс	1	2	3	4	5	6
Взрослые (n = 300)	183* (61)	39 (13)	36 (13)	24 (8)	12 (4)	3 (1)
Дети (5-14 лет) (n = 315)	126 (40)	56 (17,8)	53 (16,8)	38 (12)	38 (12)	3 (1)

Примечание: \* – кол-во лиц, () – % лиц.

ны или факторы колонизации) на молекулярном уровне выполняют функцию распознавания мембранного рецептора, на клеточном уровне обеспечивают микробу прикрепление, а на популяционном — колонизацию [4]. Для бифидобактерий механизмы адгезии аналогичны таковым патогенной и потенциально патогенной микрофлоры. Поэтому мы полагали, что и естественные антитела против поверхностных структур бифидобактерий могут оказывать влияние на адгезивную активность бактерий.

В эксперименте *in vitro* было установлено, что естественные антитела к бифидобактериям, выявляемые в сыворотке крови, как детей, так и взрослых лиц достаточно заметно достоверно (на 40–50 %) тормозили адгезию бифидобактерий (табл. 2). Причем степень ингибиции адгезии естественными антителами была сопоставима с показателями адгезии (СПА, КУЭ), полученными нами в экспериментах с иммунной кроличьей антисывороткой, имеющей более высокий титр антител к бифидобактериям по сравнению с уровнем естественных антител в сыворотках крови людей. Таким образом, результаты эксперимента свидетельствуют о возможном участии естественных антител в торможении колонизационной активности индигенной микрофлоры на слизистой кишечника. Мы полагаем, что это обстоятельство может быть патогенетической компонентой развития кишечного дисбактериоза.

Итак, по нашим представлениям, индукция иммунологической толерантности по отношению

к индигенной микрофлоре хозяина происходит по достаточно сложному, «синтетическому сценарию», в основе которого могут лежать разные механизмы, в том числе предложенные как D. Van der Waaij (1996), так и Б.А. Шендеровым (1998) [11, 14]. При нормальном течении беременности во внутриутробном периоде развития ребенок находится в стерильных условиях. Немедленно после рождения он начинает колонизоваться микроорганизмами. Так как основная микрофлора не является патогенной, эта колонизация не вызывает болезни. В последующем экспозиция патогенных микроорганизмов, с которыми ребенок не встречался в первые часы — дни после рождения вызывает развитие соответствующей инфекционной болезни. Каждый контакт с патогеном приводит к расширению иммунологической памяти и формирует долговременный иммунитет. Иные взаимоотношения складываются у новорожденного с индигенной микрофлорой, к которой организм толерантен. Если сразу после рождения, в адаптивном периоде (для человека это 3–5 дней после рождения), не происходит полноценного заселения кишечника ребенка бифидо-, лактобактериями, нормальной кишечной палочкой, в иммунной системе организма происходит настройка против антигенов нормальной микрофлоры кишечника так же, как и против обычных чужеродных данному организму антигенов. Однако известно, что для индукции толерантности важно не только раннее попадание антигена в организм человека или млекопитающего, но еще

Таблица 2

Показатели адгезии бифидобактерий после их преинкубации с сыворотками крови разных групп населения

Варианты обработки микроорганизмов до постановки адгезии	Показатели адгезии ( $M \pm m$ )	
	СПА	КУЭ (%)
1. Бифидобактерии+сыворотка крови взрослых с отсутствием антител	1,225 ± 0,047	61,6 ± 5,9
2*. Бифидобактерии+сыворотка крови взрослых с наличием антител	( $p \leq 0,01$ ) 0,67 ± 0,07	( $p < 0,05$ ) 41,7 ± 0,8
3. Бифидобактерии +сыворотка крови детей с отсутствием антител	2,0 ± 0,14	80,0 ± 4,2
4*. Бифидобактерии +сыворотка крови детей с наличием антител	( $p \leq 0,01$ ) 1,155 ± 0,12	( $p \leq 0,05$ ) 67,0 ± 3,95
5. Контроль (бифидобактерии+физ.р-р)	1,39 ± 0,02	62,8 ± 4,1



Рис. 5. Концептуальная схема «порочного круга» формирования устойчивых дисбактериозов кишечника на примере взаимоотношений организма с бифидобактериями. \* – дефицит бифидобактерий ведет к снижению колонизационной резистентности макроорганизма, способствуя проявлению оппортунистических инфекций, проникновению в кровь УПМ.

крайне важно количество антигенного материала. Количество должно быть большим, т.е. «индукция толерантности определяется массивностью антигенной дозы» [8]. При нормальной реактивности и физиологичном течении процессов в макроорганизме отсутствуют антитела к индигенной микрофлоре. Однако многие патологические состояния (стресс, инфекция, травмы и др.) могут привести макроорганизм (прежде всего это касается женщин детородного возраста) к ситуации дефицита кишечной индигенной микрофлоры, и тогда антигенная доза полезной микрофлоры при родах не достигает необходимого «кворума», или «массивности», способной индуцировать у новорожденного иммунологическую толерантность по отношению к антигенам представителей индигенной микрофлоры. Нормальные антитела к этим антигенам в процессе развития организма будут постоянно синтезироваться, и они будут

приобретать патогенетическое значение в развитии кишечного дисбиоза. Уровень этих естественных антител может достигать достаточно высоких значений, чтобы «вымывать» бактерии из кишечника. Антитела, путем связывания рецепторов (адгезинов) бифидобактерий, могут блокировать адгезины индигенной микрофлоры, тем самым ингибировать адгезию микроорганизмов к клеткам слизистой кишечника. Следовательно, может нарушаться один из механизмов аутостабилизации, присущий всем эволюционно сложившимся микробиоценозам.

Поэтому количественный дефицит индигенной микрофлоры в кишечнике матери, в последний период беременности, и главное – в момент родов – может привести к «срыву иммунологической толерантности» у новорожденного к антигенам индигенной микрофлоры, т.е. специфические микробиоэкологические нарушения у того

или иного лица могут быть детерминированы дефектами микрофлоры матери в период, предшествующий беременности, или во время беременности. Тогда отсутствие антител к антигенам бифидобактерий — отражение нормальных физиологических взаимоотношений макроорганизма с бифидобактериями, где механизмы ауторегуляции иммунного ответа не допускают интенсивного синтеза антител при нормальном функционировании кишечного микробиоценоза. Наоборот, высокие концентрации антител к бифидобактериям являются показателем дисбиотического состояния.

Вышесказанное на примере взаимоотношений с бифидобактериями, доминантой кишечного микробиоценоза, графически иллюстрирует концептуальная схема «порочного круга» устойчивых кишечных дисбактериозов (рис. 5).

Таким образом, предлагаемая концепция «срыва иммунологической толерантности» по отношению к индигенной микрофлоре кишечника **патогенетически** обосновывает мероприятия по профилактике кишечных дисбактериозов путем максимального насыщения кишечника матери пробиотическими микроорганизмами (продуктами, обогащенными симбиотическими микроорганизмами) вплоть до родов и некоторое время после родов, что позволит избежать синтеза антител, способных ингибировать адгезивный процесс симбиотических микроорганизмов к слизистой кишечника.

### ВЫВОДЫ

1. Проживание в условиях экологического неблагополучия является фактором риска развития иммунореактивности к симбионтной микрофлоре.

2. Установлено участие естественных антител в ингибции адгезии бифидобактерий, что может повлечь за собой торможение колонизационной активности индигенной кишечной микрофлоры.

3. Синтез антител против бифидобактерий может быть патогенетической компонентой развития устойчивого кишечного дисбактериоза.

4. Биологическая коррекция (профилактика) дисбактериоза у новорожденного ребенка подразумевает максимальное насыщение кишечника матери пробиотическими микроорганизмами вплоть до родов и некоторое время после родов с тем, чтобы при рождении иммунная система ребенка еще в адаптивном периоде получила информацию о наличии достаточного количества антигенного материала.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Вершинина В.И. Характеристика общих антигенов некоторых представителей микрофлоры кишечника человека (бифидобактерии, энтерококки, энтеробактерии): Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Москва. — 1982. — 20 с.
2. Воеводин Д.А. Дисбактериоз и иммунопатологический процесс / Д.А. Воеводин, Г.Н. Розанова, М.А. Стенина // Журн. микробиол. — 2005. — № 2. — С. 89—92.
3. Государственный доклад о состоянии окружающей природной среды Иркутской области. — Иркутск, 1998—2004.
4. Езенчук Ю.В. Патогенность как функция биомолекул / Ю.В. Езенчук. — М., 1985.
5. Зайцев Т.М. Методика биометрических расчетов / Т.М. Зайцев. — М.: Наука, 1973.
6. Лещук С.И. Новые подходы к совершенствованию методов иммунохимического анализа с помощью синтетических полимеров для ряда возбудителей инфекционной патологии: Дис. ... докт. биол. наук / Улан-Удэ. — 2002. — 35 с.
7. Методика изучения адгезивного процесса микроорганизмов / В.И. Брилис, Т.А. Брилене, Х.П. Ленцнер, А.А. Ленцнер // Лаб. дело. — 1986. — № 4. — С. 210—212.
8. Система лимфоидной ткани пищеварительного тракта животных и перорально индуцированная иммунологическая толерантность / Б.Б. Першин, А.Б. Гелиев, Д.В. Толстов, Л.В. Ковальчук // Иммунология. — 2001. — № 6. — С. 10—19.
9. Способ приготовления эритроцитарного антигенного диагностикума с применением бактериальных антигенов бифидо- и лактобактерий и полимерных кислот: Патент 2202801 (РФ) / В.В. Анненков, С.И. Лещук, С.М. Попкова, В.И. Круглова, Н.Я. Мазяр, Е.А. Шмелева; Оpubл. 20.04.03, Бюл.
10. Шварц С.С. Эволюционная экология животных / С.С. Шварц. — Свердловск, 1969. — 198 с.
11. Шендеров Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание / Б.А. Шендеров. — М.: Издательство ГРАНТЪ, 1998. — Т. 1—3.
12. Шилов И.А. Популяционный гомеостаз у животных / И.А. Шилов // Бюлл. Моск. об-ва испытат. природы. Отд. Биол. — 1982. — № 4. — С. 23—32.
13. Шилов И.А. Экология / И.А. Шилов. — М.: Высш. шк., 2001. — 512 с.
14. Van der Waaij D. Colonisation resistance of the digestive tract: An importance first barrier of defense to opportunistic infections in man and animals / D. Van der Waaij // Abstr. XII Intern. Sympos. Gnotobiology. — Honolulu, June 23—28, 1996.