

УДК 616.34.022.7:616.017

Маслянюк Р.П., д.б.н., професор, **Куртяк Б.М.**, д.вет.н.,**Пундяк Т.О.**, аспірант (pundyak-hiryrgto@mail.ru) ©*Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З.Гжицького.*

РОЛЬ КИШКОВОЇ АУТОФЛОРИ В ПАТОЛОГІЇ ТВАРИН

В роботі представлено сучасні дані про роль умовно-патогенної кишкової аутофлори в розвитку захворювань тварин. Обговорюється механізм толерантності імунної системи кишечника транзитної нормальної мікрофлори, транслокації бактерій та ендотоксинів у нормі та при патології, можливі шляхи розповсюдження інфекційних агентів і ендотоксинів, які спричиняють розвиток системного запалення та поліорганної патології.

Ключові слова: аутомікрофлора, ендотоксини, трансдукція бактерій, захворювання кишечника, органна патологія.

Протягом останніх років наукові уявлення про патогенез захворювань значно змінилися. Це зумовлено новими відкриттями в галузі молекулярної біології та клітинної мікробіології, пізнанням інтимних механізмів в розвитку запальних процесів, що призвело до очевидного висновку про спільність патогенезу багатьох захворювань. Початком було намагання дослідників вивчити природу найбільш вираженого стану хворого організму-сепсису та зрозуміти чому він нерідко розвивається за відсутності бактеріємії, при явних ознаках системної інфекції, чому він продовжує вбивати людей і тварин з підвищеною частотою, незважаючи на численні досягнення в його терапії. Відповідь на це непросте запитання вперше прозвучало більше 100 років тому нашим співвітчизником, лауреатом Нобелівської премії І.Мечніковим. Усі його гіпотези та передбачення стали основою для численних наукових напрямків: роль фагоцитів у неспецифічній резистентності організму, значення факторів господаря у відповіді на інфекцію та розвиток органної патології і накінець, значення аутофлори кишечника в патогенезі хвороби та смерті.

Метою даної статті було проаналізувати механізми, що є відповідальним за порушення бар'єрної функції кишечника та транслокацію бактерій і продуктів їх життєдіяльності із кишкового тракту у віддалені органи і тканини, визначити основні уразливі ланки та патологічні процеси з метою терапевтичного впливу.

Роль позитивної та негативної мікрофлори на симбіотичні процеси в організмі. Позитивну роль мікрофлори кишечника важко переоцінити: газовий обмін, його регуляція в кишечнику та інших порожнинах організму, морфо-кінетичні дії (у безмікробних тварин знижена мітотична активність ентероцитів, швидкість їх міграції по мікроворсинках); продукція ензимів, які беруть участь у метаболізмі білків, вуглеводів, ліпідів, нуклеїнових кислот; продукція

біологічно активних сполук (вітаміни, гормони, антибіотики), участь у водно-сольовому обміні та в інших життєво важливих процесах [4].

В такій же мірі, очевидна і негативна роль кишкової флори: утворення токсичних біополімерів, конкуренція з господарем за поживні речовини при масовому рості мікробів, джерело ендогенної інфекції та сховище мікробних генів. Однак існує окрема група захворювань кишечника, при яких не завжди вдається виявити певний вид збудника (виразковий коліт, ентероколіт), що характеризується рецидивуючим перебігом з серйозними ускладненнями – від артларгії та міопатії до септичного синдрому. В останні роки показана важлива роль імуногенетичного статусу організму, факторів оточуючого середовища та кишкової мікрофлори в патогенезі запальних захворювань кишечника, при чому, останній відводиться вирішальна етіологічна роль. [1, 3, 4, 24].

На тваринах – гнотобіонтах показано, що коліти не розвиваються у стерильних умовах; у людини запальні процеси в кишечнику спостерігаються у біотопах з максимальною концентрацією мікроорганізмів. Підвищена проникність слизової кишечника відіграє визначальну роль у підтримці стану хронічного запалення в наслідок генетичної передбаченності чи в результаті прямого контакту з бактеріями та їх продуктами. Основними факторами, які сприяють розвитку запальних процесів у кишечнику є відсутність толерантності до симбіотичної мікрофлори, неспроможності бар'єрної функції імунорегуляторних клітин. Всі вони взаємозв'язані і можуть бути одночасно причиною та наслідком хвороби [23].

Механізм запальних хвороб кишечника. Перш за все варто коротко зупинитися на причинах порушень мікробіоценозу кишечника. Як вже згадувалось, однією з них є надлишковий ріст бактерій, який може спостерігатися в різних ділянках (біотопах) шлунково-кишкового тракту (ШКТ). Колонізація шлунка та верхніх ділянок кишечника може здійснюватися за низхідним і висхідним шляхом. У першому випадку її причиною є надходження мікроорганізмів із ротової порожнини та носоглотки – це відбувається внаслідок порушення кислотного бар'єру шлунка, найчастіше – в результаті інфікування хелікобактеріями. У другому випадку синдром надлишкового росту мікроорганізмів у тонких кишках спричиняється порушенням кишкового кліренсу, причиною якого можуть бути дефекти перистальтики або анатомічна патологія кишечника (ускладнення після хірургічних втручань, дивертикули, фістули), що викликає механічну затримку евакуації та застій кишкового вмісту. Порушення перистальтики зв'язують з патологією нервово-м'язової системи кишечника, включаючи міопатію та невротатію, а також аутоімунні, інфекційні та ендокринні хвороби [3, 21].

Описані зміни на організміному рівні можуть привести не лише до синдрому надлишкового росту в тонких кишках, але й до порушення толерантності до резидентної нормальної мікрофлори, що тягне за собою незворотні наслідки на клітинному та молекулярному рівнях – запалення слизових оболонок, порушення бар'єрної функції, транслокація бактерій та

ендотоксинів із просвіту кишок у лімфовузли, лімфу, в системний кровотік з летальними наслідками за типом перитоніту чи сепсису.

Механізми толерантності та бактеріальної толерантності. Однією з групи резидентних мікроорганізмів кишечника є грамнегативні бактерії, ендотоксин (ЛПС), які знаходяться на поверхневій оболонці бактерій. У грампозитивних мікроорганізмів, зокрема, у біфідобактерій і лактобактерій, поки не вдалося виявити фактори патогенності [1]. Тому припускають, що механізм толерантності до умовно – патогенних ентеробактерій визначається толерантністю до їх ендотоксину [2]. Цей феномен є найбільш значущим для формування стійкого мікробіоценозу а в цей же час найменш вивченим. На лабораторних тваринах толерантність до ендотоксину можна відтворити щоденними ін'єкціями нетоксичних доз ЛПС – у тому випадку формується рання, перехідна фаза толерантності. Пізня фаза толерантності більш тривала і настає через 72 години: вона специфічна для гомологічного ендотоксину, може бути індукована ін'єкцією бактерій або ЛПС та перенесена від імунізованої тварини до неімунізованої за допомогою окремих білкових фракцій. Ця пізня толерантність основна на формуванні антитіл до О-специфічних ланцюгів ЛПС. При щоденній експозиції ЛПС (цей процес відбувається в кишечнику з моменту народження організму), обидві фази толерантності існують одночасно [7]. Рання фаза не залежить від серологічних механізмів імунної відповіді і є наслідком міжклітинних взаємодій. Первинна ін'єкція ЛПС провокує вивільнення цитокінів. Ця реакція практично відсутня при наступних ін'єкціях ЛПС чутливим лабораторним тваринам і людині. Встановлення толерантності характеризується пригніченням синтезу фактору некрозу пухлин (ФНП) α та інтерлейкіну -1 (ІЛ-1) – основних медіаторів патогенного протизапального впливу ендотоксину [5]. На епітеліальних клітинах кишечника (ентероцитах) показано, що хронічна дія ЛПС пригнічує продукцію ІЛ-8 – основного хемоатрактанта, що індукує запальну реакцію у відповідь на стимуляцію ФНО і ІЛ-1, і що цей процес не вимагає участі Toll-рецепторів, здатних розпізнавати ендотоксин [34]. Встановлено, що ЛПС не впливає на інші запальні шляхи, що функціонують незалежно від ІЛ-8, зокрема, на секрецію ІЛ-6 і наступну індукцію трансепітеліальної міграції нейтрофілів у відповідь на ін'єкцію сальмонел. В дійсності, епітеліальні клітини кишечника продукують ІЛ-6, але майже не синтезують ІЛ-1 та ФНП. Крім цього, переважну дію має трансформуючий фактор росту (ТФР), володіючий вираженими толерогенними властивостями та здатністю регулювати продукцію IgA, який вносить свій вклад у затримку розвитку процесу запалення [4,20].

Чисельні дослідження свідчать про важливий імунологічний дисбаланс при запаленнях кишечника – посилення продукції прозапальних цитокінів (ФНП- α , ІФН- γ Н), ІЛ-1, ІЛ-6, ІЛ-12), відсутніх в умовах природної толерантності, та зниження синтезу антизапальних цитокінів (ІЛ-4, ІЛ-10, ІЛ-11), що веде до вираженої імунної відповіді на нормальну кишкову мікрофлору [10, 16, 22].

Відносно генетичних факторів, які відіграють важливу роль при ентеропатіях, то ця проблема знаходиться на початкових етапах досліджень. Є дані про те, що чутливість організму людини до хвороби Крона зв'язана з фенотипом CARD-15 і мутацією гена NOD-2, результатом якої є дефект синтезу IL-10 моноцитами крові у відповідь на стимуляцію Toll-рецепторів бактеріальними імуномодуляторами, що опосередковує неконтрольоване запалення [19, 29].

Найбільш уразливою ланкою в забезпеченні епітеліального кишкового бар'єру є стан клітинних контактів. Це повністю енергозалежний процес, який визначається структурно-функціональною стабільністю мітохондрій, поставляючи енергію у формі АТФ при окисному фосфорилуванні. Препарати, що роз'єднують окислювальне фосфорилування у мітохондріях є стресовими, провокуючими факторами, здатні дестабілізувати білки цитоскелету, що беруть участь у формуванні контактів. У резекційних зразках тканин при хворобі Крона, а також у лабораторних тварин (гризунів), що піддавалися метаболічному стресу, було виявлено порушення мітохондріальних структур, зниження рівня АТФ у запальних тканинах і підвищення чутливості до роз'єднувальних агентів у тканинах хворих з відсутністю гістологічних ознак запалення [27].

У розвитку запальних реакцій на мікробні антигени беруть участь різні типи імунокомпетентних клітин слизової оболонки кишечника: макрофаги, Т- і В- лімфоцити, НК-клітини (природні кілери). НК-клітини та макрофаги є первинними мішенями при бактеріальній стимуляції. Їм відводиться ведуча роль у захисні організму проти кишкових мікробних антигенів [18]. Їх значення при запальних процесах у кишечнику поки що до кінця не з'ясована. Незважаючи на численну інформацію на питання: як і чому розвиваються процеси запалення в організмі до сих пір однозначної відповіді немає. З одного боку – генетична схильність, порушення імунозапальної толерантності, незбалансована відповідь на власні мікробні антигени, з іншого – порушення енергозабезпечення нормальних функцій, у тому числі і бар'єрної.

Існує виражений зв'язок між запальними процесами кишечника та артропатією, яка може бути індукована не лише патогенними мікроорганізмами, але й симбіотичною нормальною мікрофлорою, здатною підтримувати хронічний запальний процес в умовах втрати толерантності та порушень кишкового бар'єру. Припускається також участь кишкової мікрофлори в патогенезі системних захворювань сполучних тканин, наприклад анкілозуючого спондилоартриту, при якому не вдається остаточно ідентифікувати специфічний мікробний агент [1, 23].

Найбільш важко може відбуватися діагностика поліорганної патології в результаті поєднаної дії різних видів мікробів. Не лише патогенні бактерії, віруси, гриби та їх токсини, але й компоненти непатогенних штамів мікробів, (наприклад, пептидоглікан *Bacillus subtilis*) здатний значно посилювати токсичну ефективність ендотоксину, виключаючи синергічне збільшення

генерації кисневих радикалів і прозапальних цитокінів зі всіма негативними явищами, аж до летального наслідку [5, 6].

Таким чином, запаленню завжди передують антигенна стимуляція клітин мікроорганізмами та/або продуктами їх життєдіяльності. При цьому у відповідальних клітинах, переважно у нейтрофілах і макрофагах, запускається каскад реакцій на атомному, молекулярному та клітинному рівнях. Вони виражаються в активації мембранних і цитоплазматичних ферментів, які продукують токсичні, кисневі та азотові метаболіти (радикали), надходження іонів кальцію до клітин, посилення метаболічних процесів, активації ядерних факторів експресії мРНК, прозапальних цитокінів [5-18]. Наслідком такого каскаду, первісно націленого на знищення патогенного стимулу, є енергетичне виснаження (глюкоза, АТФ) і катастрофічне зниження антиоксидантного потенціалу клітин. Процес може набути генералізованого характеру при наявності імунологічного дисбалансу, зниження синтезу антизапальних цитокінів, постійної антигенної стимуляції, порушення ендотеліального бар'єру – в результаті розвивається синдром системного запалення з поліорганною патологією.

У зв'язку з вище викладеним, профілактичні процедури та антибактеріальну терапію потрібно поєднувати з антиоксидантами, вітамінами, імуноглобулінами та препаратами, що знижують рівень прозапального цитокіну ФНП – α .

Аліментарне застосування кальцію зумовлено не лише необхідністю поповнення депо, але й здатністю зменшувати рівень ФНП- α . Найбільш виражений ефект в цьому аспекті, а також ослабленні інтенсивності коліту у експериментальних тварин, досягається поєднанням застосуванням кальцію та активної форми вітаміну D₃, що забезпечує зниження синтезу ФНП- α [23].

У ряді дослідів, проведених на експериментальних тваринах, отримано позитивні результати при використанні антагоністів Toll-рецепторів на моделі коліту в організмі мишей [16, 17].

На завершення слід відмітити, що не тільки патогенна, але й умовно патогенна транзиторна нормальна мікрофлора кишечника здатна викликати розвиток тяжких форм поліорганної патології при порушенні імунорегуляторних механізмів в організмі людини і тварини.

Література

1. Бондаренко В.М. Ранние этапы развития инфекционного процесса и двойственная роль нормальной микрофлоры /В.М.Бондаренко, В.Г.Петровская// Вестн. РАМН.-1997.№3.-С.7-10.
2. Бондаренко В.М. Иммунорегуляция численности грамотрицательной микрофлоры кишечника /В.М.Бондаренко, В.Г. Лиходед, А.А.Воровьев// ЖМЭИ.-2004.-№4.-С.90-91.
3. Бондаренко В.М. Синдром избыточного бактериального роста в тонкой кишке в аспекте дисбактериоза кишечника /В.М.Бондаренко, Е.А.Лыкова, Т.В.Мацулевич// ЖМЭИ.-2006.-;4.-С.50-56.

4. Бурмистрова А.Л. Иммунной гомеостаз и микробиоценоз. Метафоры и пути развития воспалительных заболеваний кишечника /А.Л.Бурмистрова// Челябинск.-1997.-С.42-49.
5. Рябиченко Е.В. Цитокиностимулирующая активность липополисахарида грамотрицательных бактерий и его роль в противоопухолевом иммунитете /Е.В.Рябиченко, В.М.Бондаренко, Л.Г.Веткова// ЖМЭИ.-2005.-№6.-С.76-81.
6. Рябиченко Е.В. Механизмы синергического летального действия мепополисахарида энтеробактерий и стафилококкового энтеротоксина типа А /Е.В.Рябиченко, В.В.Бондаренко// ЖМЭИ.-2006.-№4.-С.97-109.
7. Рябиченко Е.В. Роль активных форм кислорода, генериремых фагоцитами, в патогенезе заболеваний /Е.В. Рябиченко, В.М.Бондаренко, В.В.Рябиченко// ЖМЭИ.-2001.-№4.-С.65-71.
8. Сепнаневили Р.И. Физиология естественных киллеров /Р.И.Сепнагивили//М. Медицина – Здоровье.-2005.
9. Ardizzone S. Biologic therapy for inflammatory bowel disease /S. Ardizzone, B.G.Porr// Days.-2005.-v.65.-P.2253-2286.
10. Fort M. Asynthetic TLR4 antagonist has anti-inflammatory etfects in two murine models of inflammatory bowel disease /M.Fort, A.Mozaffarian, A.G.Stover// J. Immunol.-2005.-v.174 (10). P.6416-6423.
11. Fukata M. Toll-like receptor-4 is required for intestinal response of epithelial injuri and limiting bacterial translocation a murine model of acute colitis /M.Fukata, K.S.Michalsen, R.Eri// Am. J. Physiol.-2005.-v.288.-G1055-G1065.
12. Halle D. Activation of human peripheral blood mononuclear cells by nonpathogenic bacteria in vitro: evidence of NK cell as primary targets /D.Haller, S.Blun// Infect. Immun.-2000.-v.68.-P.2752-2759.
13. Haime L. CAR 15 frameshift mutation in patients with cron disease is associated with immune dysregulation /L.Heime, U.Turnnen// Scand. J. Gastroenterol.-2004.-v.39.-P.1243-1249.
14. Home K.L. Transforming growth factor-b regulation of epithelial right function proteins enhances barrier function and blocks enterehemorrhagic E. coli o 157: H7-induced increased permeability /K.L.Home, C. Reardon, A. Wang//Am. J. Pathol.-2005.-v.167.-P.1587-1597.
15. Husebye E. The pathogenesis of gastrointestinal barterial overgrowth /E.Husebye// Chemotherapy.-2005.-v.51.-P.1-22.
16. Inone S. Etiopathogenesis and aggravating factors in ulcerative colitis /S.Inone, H.Nakase, T.Chiba// Nippon Rinsho.-2005.-v.63.-P.757-762.
17. Khore C.D. HLA-B27 hery chains contribute to spontaneons inflammatory disease in B 27 /human B-2 – microglobulin double transgenic mice with disrupted mouse B-2 – m /S.D.Khare, J.Hansen, H.S.Luthra// J. Clin. Invest.-1996.-v.8.-P.2746-2755.
18. Linsrens R.K. The bacterial flora in inflammatory bovel disease: current insigbts in pathogenesis ant the influence of antibiotics and probiotics /R.K.Linskens, X.W.Huijsdens, P.H.Savelkoul// Seand. J. Gastroenterol.-2001.-v.234.-P.29-40.

19. McKey M.D. Good bug, bad bug: in the case of enteric inflammatory disease does the epithelium decide? /M.D. McKey// *Inflam. Bowel Dis.*-1999.-v.5.-P.262-270.

20. Reveille J.D. Spondyloarthritis: update on pathogenesis and management /J.D. Reveille, F.C. Arnett// *Am. J. Med.*-2005.-v.118.-P.592-603.

21. Savidge T.C. Lipopolysaccharide – induced human enterocyte tolerance to cytokine – mediated interleukin – 8 production may occur independently of TLR-4/MD-2 signaling /T.C. Savidge, P.G. Newman, W.H. Pan// *Pediatr. Res.*-2006.-v.59.-P.89-95.

22. Wrag G.M. A Cell wall component from pathogenic and nonpathogenic gram-positive bacteria (peptidoglycan) synergist with endotoxin to cause the release of tumor necrosis factor- α , nitric oxide production, shock, and multiple organ injury /dysfunction in the rat /G.M. Wray, S.J. Foster, C.J. Hinds// *Shock*.-2001.-v.15.-P.133-138.

23. Zhu Y. Calcium and 1 α , 25 – dihydroxy – vitamin D3 target the TLR – α pathway to suppress experimental inflammatory bowel disease /Y. Zhu, B.D. Mahon// *Enr. J. Immunol.*-2005.-v.35.-P.217-224.

Summary

The purpose of the review is to analyze the scientific progress to date about the role of opportunistic bacteria in development of diseases in animals and humans. Mechanisms of tolerance of local gut immune system to transitory normal microflora, translocation of bacteria and endotoxins in normal and pathology, possible routes of transmission of infectious agents and endotoxins which lead to systemic inflammation syndrome and affection of various organs were discussed.

Рецензент – к.б.н., доцент Турко І.Б.