

Маслянюк Р.П. д.б.н., професор;
Божик Л.Я. к.вет.н., асистент,
Романович М.С. к.вет.н., доцент

*Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій
імені С.З. Гжицького*

МІКРОБІОЗ КИШЕЧНИКА ТА ІМУНІТЕТ У ТВАРИН

*Динамічний баланс мікрофлори шлунково-кишкового тракту (ШКТ) тварин підтримується як імунним, так і не імунним механізмами. Головну роль при цьому відіграє лімфоїдна тканина кишечника. Нормальна мікрофлора залучаючись в імунні механізми: сприяє становленню імунної системи ШКТ, виконує імуномодельючі функції, проявляє активність ад'юванта. Становлення власного імунітету починаючи з імунодефіциту новонароджених і до розвитку імунологічної компетенції, відбувається на тлі мікробної колонізації кишечника. Індигентна мікрофлора є важливим регулятором імунного дозрівання. Дослідження останніх років показали, що нормальний розвиток лімфоїдної тканини кишечника, а також індукції оральної толерантності в значній мірі залежать від індигентної молочнокислої мікрофлори (*Lactobacillus* sp., *Bifidobacterium* sp.). В свою чергу дисбіотичні відхилення можуть змінити фенотип лімфоїдної тканини кишечника в бік переважання Th-2 лімфоцитів, а також сприяти розвитку алергічних реакцій, атонії, запальних процесів. Соматичні гіпермутації та переключення антитіл на імуноглобуліни секреторного типу (SIgA) індукується колонізацією кишечника бактероїдними та іншими облигатно-анаеробними бактеріями і в цілому відіграють критичну роль в регуляції кишкової мікрофлори.*

В огляді розглядаються можливі механізми розпізнання різних таксономічних груп і формування відповіді на місцевому та системному рівнях. Цілком ймовірно, що центральну роль тут відіграють Toll-рецептори, лектини та інші молекулярні структури. Останнім часом було запропоновано новий механізм протизапальної дії коменсальної мікрофлори, включаючи дію NF- κ B транскрипційного фактору. Подальше вивчення взаємодії мікрофлори з інтестинальним трактом макроорганізму дозволить краще зрозуміти патогенез багатьох захворювань як ШКТ, так і тих, що мають системний характер, а також вдосконалити шляхи їх лікування.

Ключові слова: імунорегуляція, шлунково-кишковий тракт, мікрофлора, лімфоїдна тканина кишечника

Шлунково-кишковий тракт (ШКТ) макроорганізму – це відкрита біологічна система, що знаходиться в постійному контакті з мікросвітом. Головний принцип дії проєктивних механізмів, які здійснюють контроль за колонізацією ШКТ, полягає в здатності відрізнити непатогенні елементи (бактерії, віруси, бактерії коменсали, пожива) від ентеропатогенів. В нормі існує регуляція та селективність

механізмів захисту, які в підсумку визначають імунологічну толерантність відносно індигенної мікрофлори чи імунна відповідь на патоген. Втрата «оральної» толерантності до нормальної (коменсальної) мікрофлори може спровокувати алергію, розвиток аутоімунних розладів і запальних захворювань кишечника [6, 10, 12].

Велика кількість досліджень, проведених в останні роки показали, що ШКТ – це важлива частинна імунної системи людини і тварини. В реалізації імунних механізмів на рівні кишкового тракту беруть участь три ключових і одночасно взаємозв'язаних компонентів: 1 – нормальна мікрофлора, 2 – лімфоїдна тканина, асоційована зі слизовою оболонкою кишечника, 3 – цитокіни, як фактори міжклітинної взаємодії, продукти секреції імунокомпетентних і фагоцитуючих клітин.

Нормальна мікрофлора кишечника поділяється на облигатну та факультативну. До облигатної відносяться мікроорганізми, що постійно входять до складу нормальної мікрофлори досить часто зустрічаються у здорових господарів, але вони не постійні і час від часу змінюються.

Нормальна мікрофлора на 90% складається суворо анаеробних видів, а всі факультативні анаероби та аероби складають до 10%. Якісні (видові) та кількісні співвідношення між різними групами мікроорганізмів характеризуються певною стабільністю, що важливо для реалізації різновид них функцій нормальної мікрофлори, таких як підтримання колонізаційної резистентності, участь у процесах травлення, синтезі до імунних механізмів, сприяючи оновленню імунної системи ШКТ, виконує імуномодельючі функції, проявляє активність ад'ювантів. В цьому плані привертає увагу період ранньої мікрофлори колонізації кишечника.

Відомо, що імунний статус неонатальних тварини розглядається як функціональний імунодефіцит. Становлення власного імунітету, починаючи з імунодефіциту новонароджених і до розвитку імунокомпетенції, відбувається на тлі мікробної колонізації кишечника. Тому, нормальній мікрофлорі належить важлива роль в цьому процесі.

Для мікрофлори кишечника тварин раннього віку характерний високий популяційний рівень біфідобактерій, які можуть сягати до 95% всього біоценозу товстого відділу кишечника. Поряд з підтримкою балансу мікробної екології та запобіганням бактеріальної транслокації бактерій цього роду проявляють ад'ювантну активність. Зокрема, було показано, що при додаванні штаму *Bifidobacterium breve* в культуру клітин пейерових бляшок разом з різними антигенами (rotavirus, poliovirus, influenzavirus) продукція антиген специфічних імуноглобулінів IgA була більшою ніж при введенні тільки одного антигена: у неонатальних дітей, яким вводили цей препарат, були достовірно вищими титри антиротавірусних IgA – антитіл і знижена частота виділення вірусу, поряд з цим відмічено зростання продукції анти-influenza IgA-антитіл [23].

Що стосується лактобактерій, то частота їх виявлення у кишечнику дітей раннього віку значно поступається біфідобактеріям, крім цього, кількісний рівень цієї групи бактерій, менш стабільний ніж біфідобактерій і зазнає суттєвих

коливань. Так, за даними [9, 16] встановлено, що у здорових дітей до 8-місячного віку частота виявлення в кишечнику лактобактерій складала 100%. Крім цього показано, що кількісний і якісний склад рівня інтестинальних лактобактерій в значній мірі залежить від контролю з боку імунної системи організму порівняно з рівнями, характерними для менш імуногенних біфідобактерій [13, 14]. Є дані про те, що бактерії роду *Lactobacillus* мають властивість активувати клітинний імунітет і пригнічувати продукцію IgE. Так, штам *Lactobacillus casei shirola* (LeS) *in vitro* тф *in vivo* активує антигенпрезентуючі клітини, підвищує секрецію ІЛ-12 та ІФН- γ та пригнічує секрецію ІЛ-4, ІЛ-5, ІЛ-6 та IgE [3, 5, 7, 8]. Автори роблять висновок, що такі модулюючі властивості неонатально недорозвинених Th 2, які беруть участь в реакціях гуморального імунітету на Th 1, що контролюють клітинну ланку імунітету [17, 24].

Імунні ефекти індигенної молочної мікрофлори тісно пов'язані зі складом і біоактивністю молозива і молока. Цій проблемі присвячена значна кількість публікацій [15, 24]. До факторів молока, що активно впливають на реалізацію різновидних функцій ШКТ, відносять також біоактивні агенти: різні гормони, фактори росту для біфідобактерій, нейропептиди, речовини з протизапальними та імуномодельюючими властивостями. Серед факторів, які володіють властивістю моделювати імунну систему, виділяють нуклеотиди, гормон пролактин, який діє також на кишковий епітелій і IgA-антитіла. Дозріванню та росту епітелію потенційно можуть сприяти цитокіни, інсулін-подібний фактор росту, які також містяться в молоці.

Рядом авторів виявлено тісний зв'язок між інтестинальною колонізацією бактеріями та дозріванням місцевої імунної системи ШКТ. Було показано, що бактерії виду *B. fragilis* індукують розвиток гуморальної імунної відповіді [16]. Зокрема встановлено, що колонізація бактеріями супроводжується підвищенням рівня IgA і IgM секретуючих клітин у крові дітей раннього віку.

Крім вказаних груп бактерій, які складають значну частину кишкової мікрофлори в ранні періоди розвитку організму і його адаптації в кишечнику виявляють велику кількість бактерій, що відносяться до умовно-патогенних груп. Такими групами бактерій є коагулазопозитивні стафілококи, ешеріхії з низькою біологічною активністю та здатністю продукувати гемолізину.

Імунологічно в лімфоїдній тканині кишечника виділяють індуктивну і ефекторну зони. В індуктивній зоні кишечника знаходяться пейерові бляшки, солітарні фолікули та фолікулярні утворення черв'якоподібного відростку. В різних зонах фолікула знаходяться зрілі форми лімфоцитів, на різних стадіях диференціації, а також макрофаги, фолікулярні дендритні клітини. Найвні там Т-лімфоцити мають в основному CD4⁺ фенотип з функцією посилення синтезу IgA, та в меншій мірі – CD8⁺ фенотип опосередковуючий цитотоксичність [11, 12, 13]. В-клітинних зонах фолікулів знаходяться клітини з маркерами CD19, CD20, mIgM, mIgD та попередники продуцентів IgA. Функція печерових бляшок направлена на підготовку наївних (неактивних) Т- і В-лімфоцитів під час їх активації,

проліферації та визначення напрямку диференціації, наприклад в бік синтезу IgA чи IgM у випадку В-клітин. Необхідний контакт з антигеном в процесі такої підготовки здійснюється епітелієм, який оточує фолікули FAE (follicle-associated epithelium). Характерною ознакою такого епітелію є наявність М-клітин, які здійснюють постачання чужорідного матеріалу шляхом транс епітеліального транспорту із просвіту кишечника до лімфоїдної тканини [11, 12, 20, 21].

Ефекторна зона представлена двома відділами: lamina propria (LP) та епітелієм слизової оболонки кишечника. На LA виявляють клітини CD3⁺ Т-клітин, які несуть α і β ТКР, CD4⁺, CD8⁺, НК-кілери клітини, В₁-лімфоцити, що синтезують низько афінні антитіла, а також В-клітинні субпопуляції CD11b⁺, CD5⁺, sIgM, макрофаги та дендритні клітини. Синтез IgA є основною функцією цього відділу. На LP знаходяться в основному IgA-продукуючі клітини, хоча можуть бути IgG-синтезуючі лімфоцити [32, 40].

Епітеліальний шар слизової оболонки розглядають ще один відділ ефекторної зони. В імунні механізми залучаються два основних компоненти цієї ділянки: внутрішньо епітеліальні лімфоцити (ВЕЛ) та епітеліальні клітини кишечника (ентероцити, ВЕЛ) [6, 10, 17].

ВЕЛ розглядають як природний компонент захисту ШКТ і як антигенпрезентуючі клітини [11, 14]. При стимуляції ВЕЛ можуть продукуватися різні хемокіни та цитокіни. Вважають, що роль ВЕЛ полягає в регуляції клітинного мікрооточення як у внутрішньо епітеліальних ділянках, так і на LP, в адаптації реактивності тканини господаря до варіабельного вмістимого ШКТ.

Клітини, які залучаються до імунної відповіді господаря на мікробні антигени, декретують розчинні механізми відповіді в ШКТ. До цих механізмів природного та набутого імунітетів відносяться: інтерлейкіни (ІЛ), інтерферон (ІФН), фактори некрозу пухлин (ФНП), хемокіни, колоніє стимулюючі фактори (КСФ) та фактори росту (ФР). Порушення регуляції цитокінів, наприклад, їх надлишок, може привести до неконтрольованої активації імунної відповіді [2-5].

Важливими є дані про регулюючу роль цитокінів в імунній відповіді організму на патогенні фактори. Відомо, що контакт господаря з хвороботворним антигеном різної етіології супроводжується сигналом «імунологічна тривога», при якому біохімічні структури патогенів (патогенасоціативні молекулярні патерни (РФМР)) служать стимуляторами цитокінів; до них відносяться: ліпополісахариди (ЛПС), капсульні полісахариди (зимозан), тейхоеві кислоти, пептидоглікани, ліпіди, поверхневі білки (флагеліни), одно ланцюгові молекули ДНК і ін. [10]. Рецептори, що розпізнають ці структури об'єднуються у велику групу, яка отримала назву PRR (патерн-розпізнавальні рецептори). Представники цієї групи були виявлені на мембранах великої кількості різних клітин. Крім групи молекул PRR, на поверхні антиген-презентуючих клітин (АПК) і фагоцитів експресуються рецептори для імуноглобулінів класу IgG (Fc γ R) і комплементу [16].

Визначення рівня про і протизапальних цитокінів у відповідь на відповідні імунні стимули інтенстинальної мікрофлори було використано для оцінки

імунного статусу, зокрема дітей різного віку із запальними процесами товстої кишки [1].

При вивченні постнатальної адаптації імунної системи новонароджених тварин і людини було виявлено переважання протизапальних цитокінів на тлі зниження потенціалу протизапальних факторів. Автори вважають, що розвиток системної запальної реакції в організмі на ранніх стадіях розвитку при інтенсивній стимуляції антигенами мікробного походження перешкоджає синтезу лімфоцитами протизапальних цитокінів ІЛ-4 і ТфР (трансформуючого фактору росту та запущених ними механізми зворотного зв'язку) [2,3].

Лімфоїдна тканина, асоційована з ШКТ спрямована в основному на продукцію ІgА. Активовані Т-гелперні клітини (СД4+), локалізуються в зародковому центрі фолікулів, де відбувається процес Т-В-міжклітинної кооперації. Надалі специфічні Т- і В-лімфоцити переносяться в ефекторну зону через кровоток і лімфоток. Процес підготовки лімфоцитів слизової оболонки кишечника здійснюється за допомогою експресії ними молекул інтегрину $\alpha 4\beta 7$, які в свою чергу, беруть участь у розпізнанні апресинів ендотелію кровоносних судин слизових оболонок кишечника [14].

При розгляді механізмів продукції ІgА імунної відповіді на бактерії-коменсали ШКТ [32, 33]. Так, було відмічено, що антигени клітинної стінки та білки кишкової палички володіють здатністю у мишей індукувати Т-незалежний синтез ІgА, В-клітинами (переважно В₁), що дифузно локалізовані на LP.

Згідно сучасних даних, в механізмах імунорегуляції на рівні ШКТ беруть участь Т-гелперні лімфоцити двох фенотипів – Th1 і Th2 [17, 20]. Клітини Th1 беруть участь в регуляції клітинного імунітету, а Th2 – гуморального. При цьому переважання активності однієї субпопуляції лімфоцитів веде до супресії іншої. Автори вважають слизову оболонку кишечника імунологічним і анатомічним бар'єром, клітини якого експресують на поверхні молекули родин TLR і MHC I і II класів, що дозволяє їм брати участь в процесах розпізнання та презентації агентів мікробного походження [23].

На завершення слід підкреслити, що механізми імунорегуляції відіграють важливу роль у формуванні імунної системи ШКТ та підтриманні оптимального балансу при взаємодії мікрофлори з полі функціональною життєво важливою системою організму.

Література

1. Белоусов Ю.В. Гастроудоденальная патология и биоценоз кишечника / Ю.В. Белоусов // Сучасная гастроентерология. – 2007. - № 3. – С. 57-59.
2. Бельмер С.В. Значение цитокинов в патогенезе воспалительных заболеваний / С.В. Бельмер, А.С. Симбирнев, О.В. Головенки // Рус. мед. журн. – 2003. - № 11. – С. 116-119.
3. Володин Н.Н. Роль про- и противовоспалительных цитокинов в иммунной адаптации новорожденных детей / Н.Н. Володин, М.В. Дегтярова // Int. J. Immunorehabilit. – 2000. - №2. – С. 175-184.

4. Дегтярова М.В. Особенности продукции цитокинов и функционального состояния микрофлоры при неонатальной патологии и способы иммунокорекции / М.В. Дегтярова, Н.Н. Володин // Мед. иммунол. – 2000. – № 2. – С. 69-76.
5. Ковальчук Л.В. Система цитокинов / Л.В. Ковальчук, Л.В. Гонковская. – М. – 1999, 74с.
6. Маслянюк Р. Основи імунології / Р. Маслянюк. – Львів, Вертикаль. – 1999. – 472с.
7. Маслянюк Р.П. Молозиво корів і його роль в резистентності телят / Р.П. Маслянюк, Ю.Р. Кравців. – Львів. – 2008. – 123с.
8. Маслянюк Р.П. Роль умовно-патогенної мікрофлори в інфекційній патології кишечника / Р.П. Маслянюк, Л.Я. Божик // Наук. вісник ЛНУВМтаБТ ім. С.З. Гжицького. – 2011. – т. 13(48). – С. 185-191.
9. Хавкин А.И. Микробиоценоз кишечника и иммунитет / А.И. Хавкин // Рос. мед. журн. – 2003. - № 11. – С. 122-128.
10. Хаитов Р.М. Имунная система ЖКТ: Особенности строения и функционирования в норме и патологии / Р.М. Хаитов, Е.В. Пинегин // Иммунология. – 1997. - № 5. – С. 4-7.
11. Хаитов Р.М. Физиология иммунной системы / Р.М. Хаитов. – М. ВИНТИ. – 2001. – 223с.
13. Ярилин А.А. Основы иммунологии / А.А. Ярилин. – М. – 1999. – 663с.
14. Blum S. Intestinal microflora and the interaction with immunocompetent cells / S. Blum, S. Alvares, D. Haller // Antonie van Leeuwenhoek. – 1999. – V. 76. – P. 199-205.
15. Goldman A.S. Modulation of the intestinal tract of infants by human milk interfaces and interactions. An evolutionary perspective / A.S. Goldman // Lancet. - 2001. – V.130. – P. 426-431.
16. Gronlung M.M. Importance of intestinal colonization in the maturation of humoral immunity in early infancy / M.M. Gronlung // Arch. Child. Fetal Neonatal. – 2005. – P. 3-17.
17. Holt P.G. Allergic allergy and other hypersensitive the aetiology and pathogenesis of allergic disease: new insights and new challenges / P.G. Holt // Curr. Opin. Immunol. – 1998. – V.10. – P. 42-49.
18. Mackowiak P.A. The natural microbial flora / P.A. Mackowiak // N. Engl. J. Med. – 2002. – V.307. – P. 83-93.
19. Macpherson A.J. Compartmentalization of the mucosal immune responses to commensal intestinal bacteria / A.J. Macpherson, T. Uhr // Ann. N.Y. Acad. Sci. – 2004. – V.1029. – P. 36-49.
20. Neutra M.R. Regional immune response to microbial pathogens / M.R. Neutra // Immunol. Infect. Dis. – 2002. – V. 142. – P. 495-499.
21. Salisstro F. Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/ Th2 mediated responses / F. Salustro // Immunol. Today. – 2002. – V.19. – P.568-574.

22. Unanue E.R. Innate immunity in bacterial infections / E.R. Unanue // Washington: ASM Press USA. – 2002. – 495 p.
23. Xavier R.J. How to get a long – mengly microbes in a hostile world / R.J. Xavier, O.K. Podolsky // Science. – 2000. – V.289. – P. 1483-1484.
24. Yasui H. Immunomodulatory function of lactic acid bacteria / H. Yasui, S. Kan // Antonie Leeuwenhock. – 1999. – V.76. – P. 383-389.

Summary

Immunological regulation in the microflora – intestinal tract

The dynamic balance in intestinal microflora composition is maintained by various immunological and non – immunological mechanisms. Among them are host microbial and intermicrobial interactions. However gut – associated lymphoid tissue (GALT) is still considered to play the major role. An immune dependent selection of intestinal microbial species starts in the early adaptation period and continues throughout the whole life. On the other hand the indigenous gut flora is considered to be major regular for local immunity maturation. Recent studies have shown that normal development of GALT as well as induction of oral tolerance to non – pathogenic elements (i.e. food, commensal bacteria) are dependent on indigenous lactic, acid flora (Lactobacillus sp, Bifidobacterium sp.). Conversely, dysbiotic changes may lead to Th 2 phenotype prevalence in GALT, systemic allergic reactions, atopic disease or inflammatory bowel disease. Somatic hypermutations and Ig A switch were shown to be stimulated by the presence of Bacteroides genus. Further results have led to the establishment of model according to which different taxonomic groups are recognized and launch differential responses at the intestinal and or systemic level. Although the past few years a novel mechanism for anti – inflammatory action of commensal microflora involving NFkB transcription factor was proposed. Further deciphering of host – commensal molecular interface will probably light into pathogenic of various bowel disorders or even systemic disease and provide clues for therapeutic preparations design.

Рецензент – д.б.н., проф. Куртяк Б.М.