

Влияние колонизации желудочно-кишечного тракта бактериями семейства *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* на иммунные процессы у мышей-отъёмышей

На мышах линии СВА, відлучення яких від матері здійснювали у 3-тижневому їх віці, досліджували вплив колонізації шлунково-кишкового тракту (ШКТ) бактеріями родини *Klebsiella pneumoniae* штаму 50/59 на показники місцевого та системного імунітету. Бактерій (1×10^6 мкл/о/миша) вводили інтрагастрально. Спостереження за тваринами здійснювали на протязі 11 діб. Дослідження показали, що колонізація ШКТ викликала вірогідне підвищення концентрації IgA у кишковому вмісті, сироватці крові та відносного числа спленоцитів (%), які експресують рецептори IgA, IgM, CD4⁺ на 7-у добу. До 11-ї доби спостерігалось вірогідне зниження значень цих же показників. Таким чином, колонізація ШКТ умовно патогенними мікроорганізмами не є процесом, байдужим до організму й чинить складний вплив на його імунну систему.

Введение

Начиная с 70-х годов, отмечается повышение циркуляции грамотрицательных бактерий в окружающей среде, в частности в родильных учреждениях, и рост вызываемых одними из представителей этих бактерий — *Klebsiella pneumoniae* заболеваний новорожденных [2, 10, 12]. Бактериальные инфекции в настоящее время возникают в среднем у 8—10 % рожениц и новорожденных. Кроме того, в родильных вспомогательных учреждениях, особенно в палатах интенсивной терапии, нередко наблюдается так называемая колонизация детей бактериями *Kl. pneumoniae*, когда эти бактерии выделяются с фекалиями в количестве 10^6 — 10^9 КОЕ/г без клинических проявлений [4, 9, 15]. Оценка этого явления неоднозначна. Одни исследователи [1, 3] считают, что дети с такими нарушениями формирования нормальной микрофлоры составляют контингент риска в отношении возникновения нозокомиальной инфекции, другие [5] не отмечают развития патологических состояний на фоне кратковременного нарушения формирования нормальной микрофлоры.

Вместе с тем, ответ на этот вопрос имеет огромное практическое значение, так как если колонизация условно патогенными микроорганизмами все же отрицательно влияет на организм, то колонизированные дети нуждаются в лечебных и профилактических мероприятиях. К сожалению возможности детального исследования новорожденных детей крайне ограничены. Поэтому одним из подходов к решению этого вопроса может быть изучение влияния колонизации желудочно-кишечного тракта и генерализованной инфекции, вызванными штаммами *Kl. pneumoniae*, на показатели местного и системного иммунитета (уровень IgA, IgM в кишечном содержимом, сыворотке крови и относительное число клеток селезенки, экспрессирующих рецепторы иммуноглобулинов и CD4⁺) у экспериментальных животных.

Методика

Исследования проводили на мышах-отъёмышах линии СВА. Отъем от матери осуществляли в возрасте 3 нед. Такая экспериментальная модель иммунной системы, на наш взгляд, наиболее адекватна незрелой

иммунной системе новорожденных детей. Ко времени употребления грудного молока мышатами слизистая оболочка их кишечника остается еще незрелой, и продукция секреторного компонента в ней очень низка по сравнению со слизистой оболочкой кишечника взрослых особей [6]. Число клеток, секретирующих иммуноглобулины, в тонкой кишке в период сосания минимально и начинает увеличиваться немедленно после отъема [11].

Животные были разделены на три группы. На животных 1-й группы моделировали генерализованный инфекционный процесс интрагастральным введением *Kl. pneumoniae* штамма 50/59 (1×10^8 мкело/мышь). Микроорганизмы данного штамма циркулируют в родильных домах города Киева. Наблюдали динамику процесса: через 30 мин, 1 сут, 3 сут, 5 сут и 10 сут после заражения. Генерализация инфекции подтверждалась значительной обсемененностью тонкой кишки *Kl. pneumoniae* и их выделением из крови и паренхиматозных органов на протяжении всего периода исследования (таблица). На животных 2-й группы воспроизводили колонизацию ЖКТ *Kl. pneumoniae* того же штамма интрагастральным введением бактерий (1×10^6 мкело/мышь). Наблюдение осуществляли через те же промежутки времени. Колонизация подтверждалась меньшей обсемененностью тонкой кишки бактериями, отсутствием выделения их из крови и паренхиматозных органов, наличием макроколоний *Kl. pneumoniae* на слизистой оболочке кишечника (см. таблицу). Животных 3-й группы использовали в качестве контроля. У них *Kl. pneumoniae* в тонкой кишке, крови и паренхиматозных органах не определялась. Сразу после отъема мышата всех трех групп были переведены на кормление стандартизованным комбикормом и имели свободный доступ к стерильному 0,9 %-ному раствору NaCl.

Иммунологические исследования проводили на 7-е и 11-е сутки после заражения. Кишечное содержимое получали по методу Elson и соавт. [7]. Концентрацию IgA, IgM в кишечном содержимом и сыворотке крови определяли иммуноферментным методом с использованием антител против IgA, IgM мыши и их конъюгатов с пероксидазой (фирма «Sigma», США). Учет результатов проводили на мультискане МСС/340 (фирма «Labsystems»), обработка их осуществлялась с использованием программы TiterSoft 11 (Flow). Экспрессию иммуноглобулинов на спленocyтaх определяли методом проточной цитофлуориметрии с использованием флуориметра FACScan Becton Dickinson и антител, меченных FITC против IgA, IgG, IgM мыши («Sigma»). Экспрессию CD4⁺ на мышинных спленocyтaх оценивали с использованием моноклональных антител Anti-L3T4, конъюгированных с фикоэритрином Becton Dickinson.

Результаты и их обсуждение

Кишечное содержимое. Введение *Kl. pneumoniae* в дозе 1×10^8 мкело/мышь вызывало по сравнению с контролем достоверное

Динамика обсемененности кишечника, крови и паренхиматозных органов бактериями семейства *Klebsiella pneumoniae* у мышей-отъемышей

Объект исследования	Обсемененность									
	после введения 1×10^6 мкело/мышь					после введения 1×10^8 мкело/мышь				
	через 30 мин	через 1 сут	через 3 сут	через 5 сут	через 10 сут	через 30 мин	через 1 сут	через 3 сут	через 5 сут	через 10 сут*
Тонкая кишка	4×10^4	1×10^5	1×10^5	1×10^5	12×10^4	4×10^8	8×10^8	5×10^5	2×10^6	—
Кровь	1×10^1	0	0	0	0	2×10^2	2×10^3	1×10^4	1×10^3	—
Печень	0	0	0	0	0	0	1×10^4	1×10^5	1×10^3	—
Легкие	0	0	0	0	0	1×10^1	6×10^1	7×10^5	3×10^4	—

* Исследуемые животные погибли.

увеличение концентрации IgA в кишечном содержимом на 7-е сутки после введения микроорганизмов ($1,48 \text{ мкг/мл} \pm 0,14 \text{ мкг/мл}$ и $2,06 \text{ мкг/мл} \pm 0,08 \text{ мкг/мл}$ контроль и опыт соответственно; $P < 0,01$) и снижение на 11-е сутки ($1,89 \text{ мкг/мл} \pm 0,03 \text{ мкг/мл}$ и $1,43 \text{ мкг/мл} \pm 0,18 \text{ мкг/мл}$ соответственно; $0,02 < P < 0,05$). Одновременно отмечалось достоверное снижение концентрации IgM на 7-е сутки после введения Kl. рнеумониае ($1,22 \text{ мкг/мл} \pm 0,11 \text{ мкг/мл}$ и $0,24 \text{ мкг/мл} \pm 0,08 \text{ мкг/мл}$ контроль и опыт соответственно; $P < 0,01$) и на 11-е сутки ($2,18 \text{ мкг/мл} \pm 0,02 \text{ мкг/мл}$ и $0,73 \text{ мкг/мл} \pm 0,09 \text{ мкг/мл}$ соответственно; $P < 0,01$).

Введение мышам-отъемышам Kl. рнеумониае в значительно большей дозе — 1×10^9 мктел/мышь вызывало на 7-е сутки достоверное

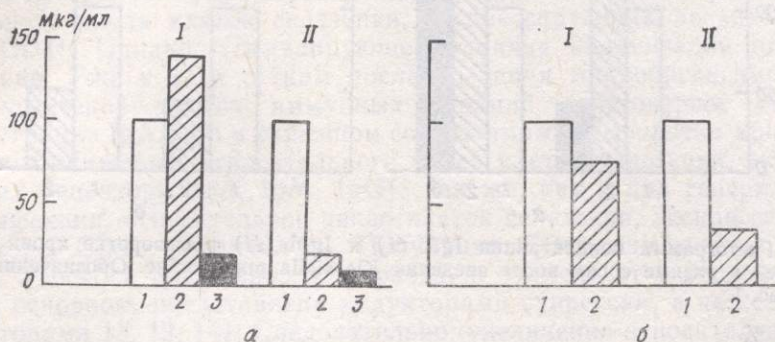


Рис. 1. Гистограмма концентрации IgA (I) и IgM (II) в кишечном содержимом мышат-отъемышей: а — 7-е сутки наблюдения (I — контроль; 2 — введение *Klebsiella рнеумониае*, 10^6 мктел/мышь; 3 — то же, 10^9 мктел/мышь), б — 11-е сутки наблюдения (I — контроль; 2 — введение Kl. рнеумониае, 10^6 мктел/мышь).

снижение в кишечном содержимом концентрации IgA ($1,48 \text{ мкг/мл} \pm 0,14 \text{ мкг/мл}$ и $0,28 \text{ мкг/мл} \pm 0,03 \text{ мкг/мл}$ соответственно; $P < 0,01$) и IgM ($1,22 \text{ мкг/мл} \pm 0,11 \text{ мкг/мл}$ и $0,12 \text{ мкг/мл} \pm 0,03 \text{ мкг/мл}$ соответственно; $P < 0,01$). На 11-е сутки исследования не проводили в связи с гибелью животных (рис. 1).

Сыворотка крови. Колонизация желудочно-кишечного тракта мышей Kl. рнеумониае (1×10^6 мктел/мышь) приводила к достоверному повышению концентрации IgA в сыворотке крови на 7-е сутки после введения возбудителя ($40,83 \text{ мкг/мл} \pm 2,95 \text{ мкг/мл}$ и $60,89 \text{ мкг/мл} \pm 5,41 \text{ мкг/мл}$ контроль и опыт соответственно; $P < 0,01$) и к достоверному ее снижению на 11-е сутки ($92,30 \text{ мкг/мл} \pm 17,23 \text{ мкг/мл}$ и $47,71 \text{ мкг/мл} \pm 5,29 \text{ мкг/мл}$ соответственно; $0,02 < P < 0,05$). Одновременно отмечалось недостоверное увеличение концентрации IgM на 7-е сутки ($559,14 \text{ мкг/мл} \pm 60,01 \text{ мкг/мл}$ и $635,13 \text{ мкг/мл} \pm 61,49 \text{ мкг/мл}$ соответственно; $P > 0,05$) и достоверное ее снижение на 11-е сутки ($1303,60 \text{ мкг/мл} \pm 156,04 \text{ мкг/мл}$ и $641,17 \text{ мкг/мл} \pm 40,88 \text{ мкг/мл}$ соответственно; $P < 0,01$).

При генерализации инфекционного процесса, вызванного введением Kl. рнеумониае в дозе 1×10^9 мктел/мышь в сыворотке по сравнению с контролем на 7-е сутки определялись достоверно более низкая концентрация IgA ($40,83 \text{ мкг/мл} \pm 2,95 \text{ мкг/мл}$ и $17,28 \text{ мкг/мл} \pm 1,38 \text{ мкг/мл}$ контроль и опыт соответственно; $P < 0,01$) и недостоверно более высокая концентрация IgM ($559,14 \text{ мкг/мл} \pm 60,01 \text{ мкг/мл}$ и $740,0 \text{ мкг/мл} \pm 59,69 \text{ мкг/мл}$ соответственно; $P > 0,05$). К 11-м суткам после введения микроорганизмов, как уже указывалось, животные погибали (рис. 2).

Клетки селезенки. У мышей, колонизированных Kl. рнеумониае в дозе 1×10^6 мктел/мышь по сравнению с контрольной группой на 7-е сутки после введения микроорганизмов отмечено достоверно более высокое

относительное (%) число клеток селезенки, экспрессирующих рецепторы IgA ($5,66\% \pm 0,49\%$ и $7,62\% \pm 0,69\%$ контроль и опыт соответственно; $0,02 < P < 0,05$), IgM ($32,72\% \pm 1,24\%$ и $42,08\% \pm 0,98\%$ соответственно; $P < 0,01$), CD4⁺ ($20,28\% \pm 1,71\%$ и $28,62\% \pm 1,17\%$ соответственно; $P < 0,01$) и недостоверное увеличение относительного (%) числа клеток, экспрессирующих рецепторы IgG ($32,76\% \pm 1,89\%$ и $38,29\% \pm 2,40\%$ соответственно; $P > 0,05$). На 11-е сутки отмечается недостоверно более низкое, чем в контроле, относительное (%) число

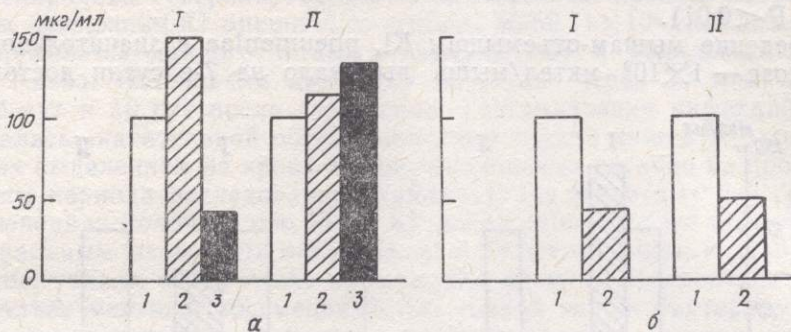


Рис. 2. Гистограмма концентрации IgA (I) и IgM (II) в сыворотке крови мышат-отъемышей в разные сроки после введения *Klebsiella pneumoniae*. Обозначения те же, что на рис. 1.

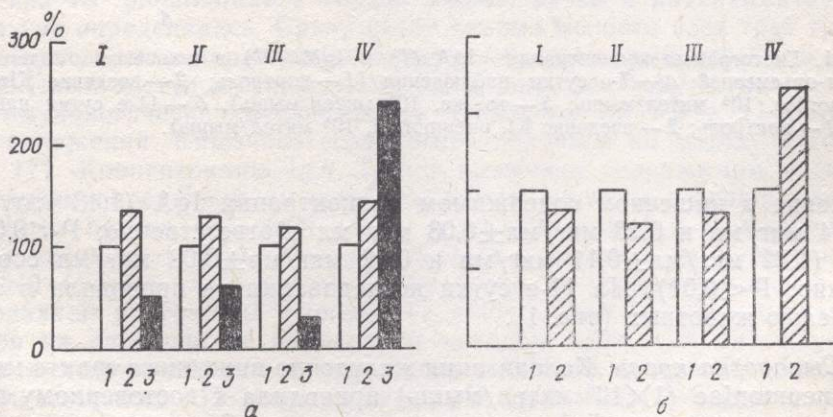


Рис. 3. Гистограмма относительного (%) содержания спленоцитов, экспрессирующих рецепторы разных иммуноглобулинов (I — IgA; II — IgM; III — IgG; IV — CD4⁺). Остальные обозначения те же, что на рис. 1.

спленоцитов, экспрессирующих рецепторы IgA ($6,39\% \pm 1,07\%$ и $5,61\% \pm 0,51\%$ соответственно; $P > 0,05$), IgM ($37,08\% \pm 2,15\%$ и $28,86\% \pm 3,41\%$ соответственно; $P > 0,05$), IgG ($29,14\% \pm 2,25\%$ и $24,66\% \pm 3,48\%$ соответственно; $P > 0,05$) и достоверно более высокое относительное (%) число спленоцитов, экспрессирующих рецепторы CD4⁺ ($16,94\% \pm 2,34\%$ и $44,85\% \pm 2,18\%$ соответственно; $P < 0,01$). У мышей, инфицированных *Kl. pneumoniae* в дозе 1×10^9 мклет/мышь, на 7-е сутки после введения бактерий при сравнении с контролем отмечено достоверно более низкое относительное (%) число спленоцитов, экспрессирующих рецепторы IgA ($5,66\% \pm 0,49\%$ и $2,92\% \pm 0,23\%$ соответственно; $P < 0,01$), IgM ($32,71\% \pm 1,24\%$ и $20,04\% \pm 1,28\%$ соответственно; $P < 0,01$), IgG ($32,76\% \pm 1,89\%$ и $10,03\% \pm 1,0\%$ соответственно; $P < 0,01$) и достоверно более высокое относительное (%) число спленоцитов, экспрессирующих рецепторы CD4⁺ ($20,28\% \pm 1,71\%$ и $48,21\% \pm 3,20\%$ соответственно; $P < 0,01$). На 11-е сутки исследования не проводили в связи с гибелью животных (рис. 3).

На основании приведенных результатов, можно заключить, что введение *Kl. pneumoniae* в большой дозе (1×10^9 мклет/мышь) вызывает

развитие генерализованного инфекционного процесса. Это приводит к глубокому угнетению местных и системных иммунных процессов и к гибели животных на 11-е сутки. Отмечено достоверное снижение концентрации IgA и IgM в кишечном содержимом, IgA в сыворотке крови, относительного (%) числа клеток селезенки, экспрессирующих рецепторы IgA, IgM, IgG. Исключение составили лишь клетки селезенки, экспрессирующие рецепторы CD4⁺, относительное число которых достоверно увеличилось.

Введение КЛ. пневмонияе в значительно меньшей дозе (1×10^6 мклет./мышь) приводит лишь к развитию колонизации ЖКТ. В течение первой недели этот процесс, по-видимому, оказывает стимулирующее влияние на иммунитет. Это подтверждается достоверным повышением IgA кишечного содержимого, IgA сыворотки крови и относительного числа клеток селезенки, экспрессирующих рецепторы IgA, IgM, CD4⁺. Однако, стимулирующее влияние колонизации непродолжительно. Уже к 11-м суткам после введения микроорганизмов отмечено угнетение многих иммунных реакций (достоверное снижение концентрации IgA, IgM в кишечном содержимом и сыворотке крови, тенденция к снижению относительного числа клеток селезенки, экспрессирующих рецепторы IgA, IgM, IgG). Так же, как и при генерализованной инфекции, относительное число клеток селезенки, экспрессирующих рецепторы CD4⁺, увеличилось. Популяция CD4⁺ лимфоцитов неоднородна. У особей 3-недельного возраста, в отличие от взрослых особей, она, в основном, представлена индукторами супрессии, а не хелперами-индукторами [8, 13, 14]. Следовательно, увеличение относительного числа спленоцитов, экспрессирующих рецепторы CD4⁺, в случае инфекции и в случае колонизации ЖКТ происходит за счет стимуляции индукторов супрессии.

Опираясь на вышеизложенные результаты, мы можем сделать вывод, что колонизация ЖКТ КЛ. пневмонияе небезразлична организму. Она кратковременно стимулирует иммунные реакции организма, а затем угнетает. В условиях незрелости иммунной системы новорожденного ребенка такое угнетение может неблагоприятно сказываться на резистентности организма к другим инфекционным агентам, аллергенам и т. д. Кроме того напрашивается вывод, что новорожденные во вспомогательных родильных учреждениях нуждаются в профилактических мероприятиях, направленных на предотвращение развития колонизации организма ребенка условно патогенными микроорганизмами.

L. I. Chernyshova, O. P. Kostyuk, I. I. Slukvin

THE INFLUENCE OF INTESTINAL COLONIZATION BY KLEBSIELLA PNEUMONIA BACTERIA ON THE IMMUNE PROCESSES IN MICE AFTER WEANING

The influence of intestinal colonization by the *Klebsiella pneumonia* strain 50/59 on the characteristics of local and humoral immunity has been studied on CBA mice after weaning. Bacteria have been introduced intragastrally in doses of 1×10^6 bacteria per mice. Observations have been performed in dynamics during 11 days. They have shown that intestinal colonization induces significant elevation of the concentration of IgA in serum, intestinal content and percentage of splenocytes, expressing receptors of IgA, IgM, CD4 on the 7th day. On the 11th day a significant decrease in these parameters was observed. A conclusion is made that intestinal colonization is not indifferent for the whole organism and induces complex influences on its immune system.

A. A. Bogomoletz Medical Institute, Ministry
of Public Health of Ukraine, Kiev

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Самсыгина Г. А., Бони Е. Г., Черкасская Р. С., Дарбеева О. С. Характеристика микробной колонизации новорожденных детей с перинатальной патологией // Педиатрия.— 1988.— № 8.— С. 18—22.