

3
НОМЕР

БОНЦ

ISSN 2304-9081

ЭЛЕКТРОННЫЙ ЖУРНАЛ
On-line версия журнала на сайте
<http://www.elmag.uran.ru>

БЮЛЛЕТЕНЬ

ОРЕНБУРГСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА УРО РАН

Lycaena thersamon (Esper, 1784)
Червонец блестящий
Шовкун Д.Ф.



2019

УЧРЕДИТЕЛЬ
ОРЕНБУРГСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР УРО РАН

© Коллектив авторов, 2019

УДК 616.72-002-053.2-085

О.Е. Челпаченко¹, Е.И. Данилова², Е.В. Иванова^{1,2}, И.Н. Чайникова^{1,2}

РОЛЬ ЛАКТОФЕРРИНА ПРИ РЕАКТИВНОМ АРТРИТЕ У ДЕТЕЙ

¹ Оренбургский федеральный исследовательский центр УрО РАН (Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН), Оренбург, Россия

² Оренбургский государственный медицинский университет, Оренбург, Россия

Цель. Определить роль лактоферрина при реактивном артрите у детей.

Материалы и методы. Проведено микробиологическое исследование фекалий классическим бактериологическим методом 34 больных с острым (21) и хроническим (13) реактивным артритом и 25 здоровых детей от 3 до 17 лет. Содержание лактоферрина в копрофильтратах определяли методом иммуноферментного анализа с использованием коммерческих ИФА-наборов и измеряли в нг/мл, антилактоферриновую активность (АЛФА) микроорганизмов – по методике Бухарина О.В. с соавт. (2005).

Результаты. Показатели лактоферрина в копрофильтратах больных артритом значительно выше, чем у здоровых, и увеличиваются при нарастании тяжести кишечного дисбиоза, а так же при хроническом течении заболевания. Способность к инактивации лактоферрина у представителей ассоциативной микрофлоры отличалась более высоким уровнем в сравнении со здоровыми. Напротив, представители нормобиоты характеризовались достоверным снижением уровня АЛФА.

Заключение. Выявлена роль кишечного микробиоценоза в развитии реактивного артрита. Лактоферрин в копрофильтратах является одним из маркеров активности воспалительного процесса и хронизации болезни, что позволяет использовать данный показатель для диагностики и прогнозирования исхода реактивного артрита.

Ключевые слова: реактивный артрит, кишечная микробиота, лактоферрин, антилактоферриновая активность.

O.E. Chelpachenko¹, E.I. Danilova², E.V. Ivanova^{1,2}, I.N. Chaynikova^{1,2}

ROLE OF LACTOFERRIN IN REACTIVE ARTHRITIS IN CHILDREN

¹ Orenburg Federal Research Center, UB RAS (Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, UB RAS), Orenburg, Russia

² Orenburg State Medical University, Orenburg, Russia

Purpose. Determine the role of lactoferrin in reactive arthritis in children.

Materials and methods. A microbiological study of feces using the classical bacteriological method of 34 patients with acute (21) and chronic (13) reactive arthritis and 25 healthy children from 3 to 17 years old was conducted. The content of lactoferrin in coprofilters was determined by enzyme immunoassay using commercial ELISA kits and measured in ng/ ml., The anti-lactoferrin activity (ALfA) of microorganisms - by the method of O. Bukharin. et al. (2005).

Results. Indicators of lactoferrin in coprofilters of patients with arthritis are significantly higher than in healthy ones and increase with an increase in the severity of intestinal dysbiosis, as well as with the chronic course of the disease. The ability to inactivate lactoferrin in representatives of associative microflora differed in higher level than healthy ones. In contrast, representatives of normobiota characterized by a significant decrease in the level of ALfA.

Conclusion The role of intestinal microbiocenosis in the development of reactive arthritis has been revealed. Lactoferrin in coprofilters is one of the markers of inflammatory activity and chronic disease, which allows using this indicator to diagnose and predict the outcome of reactive arthritis.

Key words: reactive arthritis, intestinal microbiota, lactoferrin, antilactoferrin activity.

Введение

В настоящее время лидирующее положение по частоте встречаемости среди воспалительных заболеваний суставов у детей и подростков занимает реактивный артрит (ReA) [1]. Последнее десятилетие характеризуется проведением ряда экспериментальных исследований, посвященных роли кишечного микробиоценоза и иммунных нарушений в формировании ReA. Так, по данным N. Yeoh et al. (2013), состояние эубиоза кишечника обуславливает нормальный баланс уровня иммунорегуляторных пептидов и отсутствие воспалительного процесса в суставах. Напротив, дисбиоз дистального отдела толстого кишечника ведет к изменению иммунного ответа, а именно, нарушению соотношения ИЛ-23/Тх-17, что в совокупности с повышением проницаемости кишечной стенки и механизмом транслокации условно-патогенных микроорганизмов, способствует формированию воспалительного процесса в суставах [2].

В то же время неоспорим феномен непрерывного взаимодействия и взаимообусловленности между микроорганизмами кишечной микробиоты и иммунными компонентами, осуществляемыми иммунорегуляторными пептидами, об их общем вкладе в формирование нормального гомеостаза кишечного биотопа [3]. Динамический баланс соотношения Treg/Th17, составляющий центральное звено иммунных нарушений при реактивном артрите, регулируется микроорганизмами кишечного микробиоценоза [4]. Известно, что активный иммунный ответ на воздействие резидентных бактерий и патогенов обусловлен энтероцитами, макрофагами и дендритными клетками, которые секретируют хемокины, цитокины, антимикробные пептиды, секреторный иммуноглобулин А, обеспечивая локальную защиту кишечного биотопа [5, 6]. Одним из важных антимикробных агентов является лактоферрин, который рассматривается как фактор врожденного иммунитета, выполняющий роль критерия острофазовых и деструктивных заболеваний [7]. О.В. Бухариным с соавт. выявлено свойство кишечных микросимбионтов к инаktivации лактоферрина, раскрыта его биологическая роль в персистенции патогенов. Обосновано существование единой биологической системы лактоферрин – антилактоферриновый фактор микроорганизмов [8].

Учитывая выше изложенное, целью нашей работы явилось определение значения биологической системы лактоферрин хозяина - антилактоферрин кишечных микросимбионтов как для расшифровки патогенетических

особенностей реактивного артрита, так и для разработки новых диагностических маркеров.

Материалы и методы

Для определения уровня лактоферрина использовали копрофильтраты, полученные от 34 больных РеА (21 больной с острым течением и 13 детей с хроническим течением артрита) и 25 здоровых детей от 3 до 17 лет при микробиологическом исследовании фекалий классическим бактериологическим методом. Диагноз реактивного артрита выставляли в соответствии с критериями, представленными в «Федеральных клинических рекомендациях по оказанию медицинской помощи детям с реактивным артритом» МЗ РФ (Москва, 2015). Содержание лактоферрина в копрофильтратах определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием коммерческих ИФА-наборов («Вектор-Бест», Новосибирск) и измеряли в нг/мл. Копрофильтраты готовили с использованием ингибиторов протеаз: ингибитор соевых бобов, контрикал.

Антилактоферриновую активность (АлфА) бактерий определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием наборов ЗАО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск) и измеряли в ед. по методике О.В. Бухарина с соавт.; Патент РФ на изобретение № 2245923, 2005).

Результаты исследований статистически обработаны методами вариационной статистики с использованием пакета прикладных программ Microsoft Excel и «STATISTICA 10.0», включая методы как параметрического (t-критерий Стьюдента), так и непараметрического (U-критерий Манна-Уитни) анализов. Различия считались статистически достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждения

Сравнительный анализ результатов исследования показателей лактоферрина в копрофильтратах детей с РеА и здоровых детей в зависимости от состояния кишечного микросимбиоза – эубиоз или наличие дисбиоза I, II, или III степени (табл. 1).

Из представленных данных следует, что состояние эубиоза как у детей с РеА, так и у здоровых детей сопровождается низкими – нулевыми значениями лактоферрина в копрофильтратах. Напротив, при нарастании тяжести кишечного дисбиоза от I до III степени отмечается достоверное повышение уровня лактоферрина в копрофильтратах у детей обеих групп.

Таблица 1. Показатели лактоферрина в копрофильтратах (Me; Q₂₅-Q₇₅) больных РеА и здоровых детей с учетом состояния кишечного микробиоценоза

	Лактоферрин (нг/мл)			
	Эубиоз	Дисбиоз I степени	Дисбиоз II степени	Дисбиоз III степени
Больные РеА	0	343,0* ^Э [141,3-585,3]	925,0* ^Э [411,0-1427,0]	2315,0* ¹ [1335,0-4929,0]
Группа сравнения	0	239,0* ^Э [141,2-585,3]	479,0* ^Э [277,0-1427,0]	1913,0* ¹ [1335-1929]
<i>Примечание:</i> * - критерий достоверности различий показателей при p<0,05; * ^Э - отличие данного показателя от аналогичного при эубиозе внутри данной группы; * ¹ - отличие данного показателя от аналогичного при дисбиозе I степени.				

Для уточнения возможности использования лактоферрина в копрофильтратах детей с РеА в качестве маркера прогнозирования исхода артрита мы провели сравнительный анализ данного показателя в зависимости от клинического варианта течения артрита (табл. 2).

Таблица 2. Показатели уровня лактоферрина в копрофильтратах (Me; Q₂₅ – Q₇₅) детей с острым и хроническим течением РеА

Течение РеА	Острое течение (n=21)	Хроническое течение (n=13)
Показатели		
ЛФ (нг/мл)	1127,0 [58,0 – 5636,0]	1480,0 [233,0 – 6613,0]
<i>Примечание:</i> * - критерий достоверность различий показателей при p<0,05.		

Представленные в таблице 2 данные демонстрируют, что у детей с хроническим течением РеА отмечается отчетливая тенденция к росту концентрации в копрофильtrate такого фактора локальной защиты кишечного биотопа, как лактоферрин.

Учитывая высокую склонность реактивного артрита к хронизации и рецидивированию, а также перспективность инфектологического подхода, наряду с определением уровня врожденного фактора локальной антимикробной

защиты кишечного биотопа – лактоферрина у больных артритом и здоровых детей, представлялось целесообразным определение способности кишечных микросимбионтов оказывать влияние на данный показатель (табл. 3).

Таблица 3. Способность кишечных микросимбионтов, выделенных у детей с острым и хроническим РеА и здоровых детей, к инактивации лактоферрина

	Группа Микроорганизмов	Антилактоферриновая активность (ед.)		
		РеА острый (n=21)	РеА хронический (n=13)	Условно здоровые дети (n=25)
Факультативно-анаэробные	<i>E. coli (lac +)</i>	0,50±0,06	0,48±0,06	0,43±0,05
	<i>E. coli (lac -)</i>	0,66±0,04 *	0,32±0,05*, **	0,45±0,06
	<i>Klebsiella spp.</i>	0,48±0,03*	0,50±0,03*	0,12±0,03
	<i>Citrobacter spp.</i>	0,44±0,02*	0,46±0,02*	0,25±0,04
	<i>Enterobacter spp.</i>	0,12±0,01	0,10±0,01*	0,06±0,05
	<i>Staphylococcus spp.</i>	0,90±0,04*	0,85±0,04*	0,45±0,05
	<i>Streptococcus spp.</i>	0,33±0,05*	0,40±0,05*	0,21±0,03
	<i>Enterococcus spp.</i>	0,48±0,06*	0,45±0,02*	0,35±0,03
	<i>Candida spp.</i>	0,49±0,05*	0,40±0,08*	0,21±0,03
Облигатно-анаэробные	<i>Bifidobacterium spp.</i>	0,18±0,02*	0,32±0,04*, **	0,50±0,05
	<i>Lactobacillus spp.</i>	0,31±0,01*	0,33±0,02*	0,42±0,05
	<i>Propionibacterium spp.</i>	0,26±0,01*	0,24±0,04*	0,32±0,02
	<i>Actinomyces spp.</i>	0,41±0,04	0,40±0,03	0,35±0,02
	<i>Clostridium spp.</i>	0,76±0,02*	0,78±0,03*	0,33±0,02
	<i>Bacteroides spp.</i>	0,84±0,04 *	0,86±0,4*	0,28±0,01
<i>Примечание:</i> достоверность различий показателей между больными РеА и здоровыми детьми: * - $p < 0,05$; ** - между больными с острым и хроническим течением реактивного артрита, $p < 0,05$.				

Анализ приведенных данных показал различия уровня АЛфА кишечных микросимбионтов, выделенных от детей с острым и хроническим РеА, в сравнении со штаммами бактерий, изолированными от здоровых детей. У детей с РеА, в отличие от здоровых детей, условно-патогенные кишечные микросимбионты: лактозонегативная *E. coli*, *Klebsiella spp.*, *Citrobacter spp.*,

Staphylococcus spp., *Streptococcus spp.*, *Enterococcus spp.* и грибы рода *Candida* отличались достоверно более высоким уровнем АЛФА. Напротив, представители нормобиоты: *Bifidobacterium spp.*, а также, относящиеся к нормобиоте: *Lactobacillus spp.*, *Propionibacterium spp.*, характеризовались достоверно более низким уровнем АЛФА. У детей с хроническим РеА выявлено снижение уровня АЛФА у *E. coli (lac -)* и повышение уровня АЛФА у *Bifidobacterium spp.* в сравнении с данными показателями у детей с острым течением РеА.

Заключение

Таким образом, наличие биологической системы "лактоферрин хозяина - антилактоферрин патогена" подтверждает патогенетическую роль микробного фактора, а именно кишечного микробиоценоза в развитии реактивного артрита у детей. Результаты проведенных нами исследований показали связь между уровнем лактоферрина копрофильтратов и тяжестью микробиоценологических нарушений кишечной микрофлоры, что свидетельствует о роли лактоферрина как показателя локальной антимикробной защиты кишечного биотопа у детей с артритом, а также в качестве фактора, определяющего активность воспалительного процесса у больных РеА. Сравнительная характеристика уровня лактоферрина в копрофильтатах у больных с острым и хроническим течением артрита, а также здоровых детей свидетельствует о возможности использования лактоферрина в качестве маркера прогнозирования течения артрита или ранней диагностики хронического артрита.

Полученные данные имеют важное прикладное значение для первичного звена здравоохранения, так как позволяют использовать альтернативный метод определения лактоферрина копрофильтратов, наряду с детекцией лактоферрина в сыворотке, для диагностики и прогнозирования исхода реактивного артрита.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алексеева Е.И., Баранов А.А., Шувалова М.П. и др. Ревматические заболевания у детей в Российской Федерации: масштаб проблемы. Педиатрия. 2003. Приложение 3: 2-10.
2. Yeoh N., Burton J.P., Suppiah P. et al. The role of the Microbiome in Rheumatic Diseases. Curr. Rheumatol. Rep. 2013. (15): 314. doi: 10.1007/s11926-012-0314-y
3. Ohland C.L., Jobin C. Microbial activities and intestinal homeostasis: A delicate balance between health and disease. Cell Mol Gastroenterol Hepatol. 2015. 1 (1): 28-40.
4. Omenetti, S. Pizarro T.T. The Treg/Th17 Axis: A Dynamic Balance Regulated by the Gut Microbiome. Front Immunol. 2015. 6: 639 (doi: 10.3389/fimmu.2015.00639).
5. Vitetta L., Coulson S., Linnane A.W. et al. The gastrointestinal microbiome and musculoskel-

- etal diseases: a beneficial role for probiotics and prebiotics. *Pathogens*. 2013. 2: 606-626.
6. O'Hara A.M., Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep*. 2006. 7: 688-693.
 7. Кокряков В.Н. Очерки о врожденном иммунитете. СПб.: Наука, 2006. 261 с.
 8. Бухарин О.В., Вальшев А.В., Вальшева И.В. Роль лактоферрина в противомикробной защите. *Успехи современной биологии*. 2011. 131 (2): 135-144.

Поступила 04 июля 2019 г.

(*Контактная информация:* **Челпаченко Ольга Ефимовна** – д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории биомониторинга и молекулярно-генетических исследований ИКВС УрО РАН; адрес: 460014 г. Оренбург, ул. Пионерская, 11; тел./факс 8 (3532) 775417; e-mail: oech57@gmail.com)

LITERATURA

1. Alekseeva E.I., Baranov A.A., Shuvalova M.P. et al. Rheumatic diseases in children in the Russian Federation: the scale of the problem. *Pediatrics*. 2003. Supl. 3: 2-10.
2. Yeoh N., Burton J.P., Suppiah P. et al. The role of the Microbiome in Rheumatic Diseases. *Curr. Rheumatol. Rep*. 2013. (15): 314. doi: 10.1007/s11926-012-0314-y
3. Ohland C.L., Jobin C. Microbial activities and intestinal homeostasis: A delicate balance between health and disease. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2015. 1 (1): 28-40.
4. Omenetti, S. Pizarro T.T. The Treg/Th17 Axis: A Dynamic Balance Regulated by the Gut Microbiome. *Front Immunol*. 2015. 6: 639 (doi: 10.3389/fimmu.2015.00639).
5. Vitetta L., Coulson S., Linnane A.W. et al. The gastrointestinal microbiome and musculoskeletal diseases: a beneficial role for probiotics and prebiotics. *Pathogens*. 2013. 2: 606-626.
6. O'Hara A.M., Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep*. 2006. 7: 688-693.
7. Kokryakov V.N. Essays on innate immunity. St. Petersburg: Nauka, 2006. 261 с.
8. Bukharin O.V., Valyshev A.V., Valysheva I.V. The role of lactoferrin in anti-infective protection. *Successes of Modern Biology*. 2011. 131 (2): 135-144.

Образец ссылки на статью:

Челпаченко О.Е., Данилова Е.И., Иванова Е.В., Чайникова И.Н. Роль лактоферрина при реактивном артрите у детей. *Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН*. 2019. 3. 7с. [Электр. ресурс] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2019-3/Articles/ChOE-2019-3.pdf>). DOI: 10.24411/2304-9081-2019-13006